



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**RESPUESTAS DE ESPECIES LOCALES A PROCESOS DE EUTROFIZACIÓN
EN LA ZONA COSTERA PRÓXIMA A LA CIUDAD DE USHUAIA,
TIERRA DEL FUEGO**

LIC. SOLEDAD L. DIODATO

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2013

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Acuática y en el Laboratorio de Ecología Terrestre del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET), durante el período comprendido entre el 16 de septiembre de 2008 y el 30 de noviembre de 2012, bajo la dirección de la Dra. Laura I. Comoglio y el Dr. Jorge E. Marcovecchio (Área de Oceanografía Química del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO, CONICET-UNS).



Lic. Soledad L. Diodato



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)

RESUMEN

La ciudad de Ushuaia se desarrolla sobre la costa del Canal Beagle (Bahías Ushuaia, Encerrada y Golondrina). La ley de promoción industrial produjo un extraordinario crecimiento demográfico en las últimas décadas, con sustanciales cambios en el uso de la tierra, principalmente por la expansión urbana, industrial y nuevos usos turísticos. Todo el sector costero se encuentra sujeto al aporte de residuos cloacales e industriales debido a la falta de plantas de tratamiento de efluentes y al deficiente funcionamiento del sistema cloacal. Las excesivas cantidades de nutrientes y materia orgánica detectadas en la zona costera, son incorporadas al ambiente acuático a través de los cursos de agua naturales que atraviesan la ciudad, causando un fenómeno de eutrofización. En el marco de esta problemática ambiental, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es caracterizar las posibles fuentes de eutrofización costera y determinar los efectos que éstas puedan generar sobre especies de crustáceos residentes por medio de bioensayos de toxicidad y del análisis de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos, con el fin de evaluar su potencialidad como bioindicadores de la calidad ambiental. Se realizó un monitoreo bimestral de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos para evaluar la calidad del agua de 12 puntos localizados en las principales cuencas de agua dulce de la ciudad. Los sitios con menor calidad de agua correspondieron a aquellos con mayor impacto antrópico, dado principalmente por la descarga de residuos domésticos sin tratamiento. Estos sitios son el dispersor cloacal, las desembocaduras del Arroyo Rodríguez sobre Bahía Ushuaia y del Arroyo Buena Esperanza sobre Bahía Encerrada, el turbal urbano y un rebalse del colector cloacal sobre Bahía Golondrina. También se incluyeron bioensayos de tolerancia a estresores ambientales (salinidad, pH y amonio) en tres especies de crustáceos: adultos del isópodo *Exosphaeroma gigas* y del anfípodo *Paramoera* sp., y larvas del decápodo *Lithodes santolla*. Alta supervivencia se registró en isópodos y anfípodos, a la vez que se detectaron cambios a nivel bioquímico (actividad de acetilcolinesterasa, catalasa y glutatión S-transferasa, y lipoperoxidación) y fisiológico (tasas de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada). El registro de esta información de referencia o basal es imprescindible al momento de evaluar respuestas frente a contaminantes. Con relación a las larvas de *L. santolla*, si bien presentaron tolerancia a altas concentraciones de amonio, registraron cambios en la

excreción de amonio así como también alteraciones en el ciclo de muda (variaciones en las frecuencias de muda y duración de los estadios). Finalmente, para evaluar posibles efectos de los efluentes costeros sobre la biota residente del intermareal, se realizaron bioensayos de laboratorio a diferentes concentraciones de efluentes con diferente perfil de impacto (desembocaduras de los Arroyos Rodríguez y Grande, y rebalse del colector cloacal sobre Bahía Golondrina). Las respuestas bioquímicas y fisiológicas encontradas en isópodos y anfípodos, en general, fueron más contundentes en las exposiciones a los efluentes con mayor grado de impacto. Por su adaptabilidad en laboratorio y su mayor tolerancia y sensibilidad frente a las condiciones de experimentación, los anfípodos podrían ser aptos para su utilización como bioindicadores.

ABSTRACT

Ushuaia city is located on the coast of the Beagle Channel (Ushuaia, Encerrada, and Golondrina Bays). In the last decades, the industrial promotion law brought about an unusual demographic growth, together with significant changes in the use of the land due, mainly, to industrial-urban expansion, and to new tourist activities. The whole of the coastal area is subject to the disposal of sewage and industrial effluents, as a result of the lack of sewage treatment plants, and also of the inadequate working of the sewage system. The excessive amount of nutrients and organic matter found in the coastal area, is incorporated to the aquatic environment via the natural watercourses that run through the city, thus producing eutrophication. The aim of this Doctoral Thesis is, within the framework of such environmental problem, to characterize the possible coastal eutrophication sources, and to determine the effects those sources could have on resident crustacean species, with the aim of assessing their potential as bioindicators of environmental quality. This process was carried out by means of toxicity bioassays, and the analysis of biochemical and physiological biomarkers. A bimonthly monitoring of physicochemical and microbiological parameters was conducted in order to assess the quality of the water of 12 sites located in the city's main freshwater courses. The sites that showed the lesser water quality coincided with those that showed the highest anthropogenic impact, given primarily to the discharge of non-treated domestic disposals. These sites are: the sewage outfall, the estuaries of the Rodríguez stream on Ushuaia Bay, and of the Buena Esperanza stream on Encerrada Bay, the urban peatland, and an overflowing of the sewage pipe on Golondrina Bay. Bioassays of tolerance to environmental stressors (salinity, pH, and ammonia) in three crustacean species have also been included. These species are: adults of *Exosphaeroma gigas* isopod, and of *Paramoera* sp. amphipod, and larvae of *Lithodes santolla* decapod. Isopods and amphipods showed a high survival rate, and, at the same time, changes were observed on a biochemical level (acetylcholinesterase, catalase, and glutathione S-transferase activities, and lipid peroxidation). There were also changes on a physiological level (oxygen consumption and ammonia excretion rates). The recording of this reference or basal levels is essential when assessing the response to pollutants. Regarding the *L. santolla* larvae, even though they

showed tolerance to high concentrations of ammonia, they also showed changes in ammonia excretion, as well as differences in molting (that is, variations in molting frequencies, as well as in the duration of the stages). Finally, in order to assess the possible effects of coastal effluents on the resident biota of the intertidal, several bioassays were carried out on different effluent concentrations with different impact profiles (the estuaries of the Rodríguez and Grande streams, and the overflowing of the sewage pipe on Golondrina Bay). The biochemical and physiological responses found in isopods and amphipods in general were more conclusive in the exposure to effluents with a higher impact degree. Given their adaptability in the laboratory, and their higher tolerance and sensitivity to experimental conditions, amphipods might be suitable to be used as bioindicators.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo de Tesis Doctoral tiene para mí un significado muy importante, no solo por el valor académico que implica haberlo realizado, sino porque en el tiempo que me llevó transitar este camino logré además aprender valiosas cosas a nivel personal y que quedarán para siempre en mi corazón. Es por ello que creo necesario agradecer por ambas a las siguientes personas:

A mi directora de tesis Dra. Laura Comoglio, quien confió en mí para realizar este trabajo, me enseñó importantes cosas tanto para mi formación profesional como personal, me acompañó en todo momento, trabajó a la par conmigo y me alentó muchas veces a no bajar los brazos... gracias Laura!!!

A mi director de tesis Dr. Jorge Marcovecchio, por brindarme todo su apoyo profesional y personal, por estar en todos los momentos en que lo necesité y por su buena predisposición ante mis consultas y pedidos... gracias Jorge!!!

Al Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC- CONICET) por brindarme los espacios y el equipamiento necesario para desarrollar las tareas de investigación.

Al Dr. Oscar Amin, por confiar en mí para realizar este trabajo, por ayudarme en las tareas de campo y por brindarme las palabras necesarias en los momentos justos...

A la Dra. Alicia Moretto, por su excelente predisposición para que yo pudiera finalizar mi tesis, por no dejarme sola en los momentos en que más lo estaba, por confiar en mí sin pedir nada a cambio y por ofrecerme en esta última etapa todo lo que estuvo a su alcance, incluyendo su laboratorio, sus espacios, sus equipos, su tiempo y el tiempo de su gente... prometo continuar con la cadena de favores... de corazón gracias!!!

A mi esposo Aldo, por confiar en mí desde el primer día en que le propuse iniciar este nuevo camino juntos en nuestras vidas, por ser tan buen compañero, entender mi gran dedicación a este trabajo, y por ser mi sostén en los momentos más difíciles... te amo amor!!!

A mi mamá, por enseñarme que en la vida hay que luchar por lo que uno quiere y cree, y que nunca hay que abandonar los sueños aunque todo parezca ya perdido...

A mi papá, por demostrarme que la mejor herramienta que uno tiene para defenderse y seguir adelante es el trabajo y la verdad...

A mis hermanos, por hacerme sentir cerquita siempre a pesar de los cientos y cientos de kilómetros de distancia que nos separan... gracias Bu por las impresiones!

A todos los integrantes del Laboratorio de Ecología Terrestre del CADIC, Alicia, Verónica, Jazmín, Julio, Romina, Noelia, Natalia, Hernán, Luciano y Carolina. Gracias por "adoptarme" y hacerme sentir parte de este lindo grupo de gente, que nunca me dejaron sola y me aceptaron sin condiciones!!!!

A mis amigas Lore, Yami y Romi... gracias chiquis por hacerme siempre el aguante, darme fuerzas y acompañarme constantemente durante este largo camino tanto en las buenas como en las malas... gracias Romi por tantos mates compartidos, madrugadas y fines de laburo y por alentarme día a día a no bajar los brazos...

A toda la banda de Bahía, mis amigas de la Uni y del IADO y toda mi familia... que siempre estuvieron pendientes de mí, me apoyaron a la distancia y siempre mandaron buenas energías....

A Dios por no abandonarme nunca...

Cada uno se lleva un pedacito de este trabajo... sin ustedes no podría haberlo concluido.... A todos GRACIAS!!!!

Las especies que sobreviven no son las más fuertes, ni las más rápidas, ni las más inteligentes; sino aquellas que se adaptan mejor al cambio.

Charles Darwin

INDICE

PARTE A: Marco Teórico del Estudio

Introducción General.....	2
1. Contaminación costera y concepto de eutrofización.....	2
2. Efectos de la eutrofización en el ecosistema.....	3
3. Interacciones entre nutrientes y otros contaminantes.....	5
4. Ecotoxicología y estudios ambientales.....	5
5. Relevancia de las pruebas de toxicidad.....	6
6. Descripción situacional urbano–ambiental de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego.....	7
Propósito general del estudio: hipótesis y objetivo general.....	13

PARTE B: Caracterización ambiental de los sitios de estudio

Introducción.....	15
1. Evaluación y monitoreo de la calidad del ambiente acuático.....	15
2. Antecedentes de estudio.....	17
3. Objetivos específicos.....	19
Metodología.....	21
1. Descripción geográfica del área de estudio.....	21
2. Diseño de muestreo.....	25
3. Recolección y procesamiento de muestras.....	32
3.1 Recolección de muestras.....	32
3.2 Procesamiento de las muestras en laboratorio.....	33
3.3 Acondicionamiento previo del material utilizado.....	35
4. Análisis Estadístico.....	36
5. Índice de Calidad de Aguas (ICA).....	37
Resultados.....	38
1. Descripción de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Distribución temporal y espacial.....	38

2. Análisis Multivariado.....	59
3. Índice de Calidad de Aguas (ICA).....	63
Discusión.....	64
Conclusiones parciales.....	74

Parte C: Bioensayos de Laboratorio con Estresores Ambientales

Introducción.....	76
1. Pruebas de toxicidad o bioensayos.....	76
2. Medidas de ecotoxicidad: letalidad y biomarcadores.....	79
3. Biomarcadores utilizados en estudios de eutrofización.....	82
3.1 Biomarcadores bioquímicos.....	83
3.2 Biomarcadores fisiológicos.....	85
4. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	88
5. Alteraciones en el ciclo de vida en crustáceos: muda.....	88
6. Especies estudiadas.....	90
7. Objetivos específicos.....	93
Metodología.....	94
1. Resumen general de los bioensayos realizados.....	94
2. Diseño experimental de los bioensayos.....	94
2.1 Acondicionamiento del agua de mar utilizada en los bioensayos.....	94
2.2 Recolección de los organismos de ensayo y mantenimiento en laboratorio.....	95
2.3 Diseño experimental y preparación de las soluciones de ensayo.....	96
3. Medición de biomarcadores.....	100
3.1 Biomarcadores bioquímicos.....	100
3.2 Biomarcadores fisiológicos.....	101
4. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	102
5. Alteraciones en el ciclo de vida en crustáceos: muda.....	103
6. Análisis estadístico.....	103
Resultados.....	104
1. Bioensayos con isópodos y anfípodos.....	104
1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos en los bioensayos.....	104
1.2 Supervivencia a 96 h.....	105

1.3 Biomarcadores bioquímicos.....	106
1.4 Biomarcadores fisiológicos.....	113
1.5 Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	118
2. Bioensayos con larvas de centolla.....	119
2.1. Ensayo agudo a 96 h.....	119
2.2. Ensayo agudo a 48 h.....	120
2.3. Ensayos crónicos hasta muda a postlarva.....	121
Discusión.....	128
Conclusiones parciales.....	144

Parte D: Bioensayos de toxicidad con efluentes urbanos

Introducción.....	147
Objetivo específico.....	148
Metodología.....	149
1. Resumen general de los bioensayos realizados con efluentes.....	149
1.1 Bioensayos preliminares.....	149
1.2 Bioensayos definitivos.....	150
2. Diseño experimental de los bioensayos.....	151
2.1. Recolección de efluentes.....	151
2.2. Determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en los efluentes.....	151
2.3 Diseño experimental y preparación de las concentraciones de ensayo.....	152
3. Medición de biomarcadores.....	153
4. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	153
Resultados.....	154
1. Determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en los efluentes.....	154
2. Supervivencia a 96 h.....	157
3. Biomarcadores bioquímicos.....	160
3.1 Bioensayos preliminares.....	160
3.2 Bioensayos definitivos.....	162
4. Biomarcadores fisiológicos.....	169
5. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	174
Discusión.....	176

Conclusiones parciales.....	184
<u>Parte E: Consideraciones Finales.....</u>	185
<u>Parte F: Bibliografía.....</u>	188
<u>Anexos.....</u>	213

PARTE A
Marco Teórico del Estudio

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Contaminación costera y concepto de eutrofización

A lo largo de la historia, las actividades antrópicas han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro de los distintos compartimentos ambientales, incluyendo el agua, el aire, el suelo y el sedimento, así como de la biota asociada y por ende de los ecosistemas en su conjunto (Ramírez Romero & Mendoza Cantú, 2008).

Los procesos de contaminación constituyen actualmente un problema ambiental global que afecta a un buen número de regiones del planeta, principalmente lagos, ríos, áreas marítimas litorales y estuariales, sobre las cuales se desarrollan las principales actividades humanas. En consecuencia, las zonas costeras actúan como receptores de una gran variedad de compuestos, afectando de esta manera el equilibrio de los sistemas acuáticos naturales. Estos compuestos son incorporados al ambiente costero a través de diversas fuentes, tales como aportes directos de efluentes industriales y domésticos, volcado de desechos desde las embarcaciones, transporte atmosférico de contaminantes, aportes de barros suspendidos desde los ríos, contaminantes producidos por las industrias de navegación, operaciones portuarias, entre otras.

Dos grupos principales de sustancias tienen incidencia en los ecosistemas costeros: los compuestos químicos escasamente degradables y los nutrientes. Dentro del primer grupo se encuentran los **hidrocarburos** (en particular los hidrocarburos aromáticos policíclicos o PAHs) y los **metales pesados**, quienes se hallan entre los contaminantes más difundidos en los ambientes acuáticos y que tienen la peculiaridad de tener una muy alta toxicidad aun cuando sus concentraciones sean muy bajas (por ejemplo, de nivel de trazas).

Asociados a estos compuestos tóxicos se presentan los **nutrientes**, los cuales son aportados a los cuerpos de agua de manera exógena como desechos de actividades urbanas, principalmente a través de los sistemas cloacales, y que a su vez regulan en gran medida la dinámica de la materia orgánica en los mismos. Así, el incremento en las concentraciones de nutrientes y materia orgánica conlleva a que los compuestos metálicos se acumulen en el fondo de los cuerpos acuáticos, donde pueden sufrir procesos de transformación, especiación, removilización y la consecuente incorporación a las cadenas tróficas al modificarse su biodisponibilidad.

El término *eutrófico* literalmente quiere decir "mucho alimento" o "bien alimentado". Es por ello que el término **eutrofización** se refiere a los procesos por los cuales los sistemas acuáticos se hacen eutróficos (Nixon, 1995). La eutrofización es un proceso, un cambio, no un estado trófico.

Es muy común encontrar en la literatura el siguiente concepto de eutrofización: "*... proceso por el cual los cuerpos de agua se hacen más eutróficos a través del aumento en la provisión de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, ambos limitantes del crecimiento vegetal...*" (Smith et al., 1999). Sin embargo, Nixon (1995) ha definido la eutrofización como: "*... un aumento de la tasa de suministro de materia orgánica a un ecosistema*". Es esta última definición la que actualmente tiene mayor aceptación, ya que no confunde las causas y las consecuencias de este fenómeno con el fenómeno en sí (Karydis, 2009). Por otro lado, esta definición tiene en cuenta el ingreso de material orgánico tanto autóctono (producido dentro del sistema, por ejemplo la fijación de carbono por los productores primarios) como alóctono (incorporado desde afuera del sistema, por ejemplo el ingreso de materia orgánica externa al sistema) (Nixon, 1995).

2. Efectos de la eutrofización en el ecosistema

La eutrofización costera es un fenómeno recientemente reconocido y la investigación científica sobre este disturbio antrópico ha progresado solo en las últimas décadas a pesar de que en ambientes de agua dulce este fenómeno comenzó a estudiarse a principios del siglo XX (Nixon, 1995; Cloern, 2001; Howarth & Marino, 2006).

La descarga excesiva de nutrientes de origen antrópico a los ecosistemas acuáticos a través de fuentes puntuales y no puntuales se denomina **eutrofización cultural** (Smith & Schindler, 2009). Si bien este proceso está ligado a un amplio rango de efectos sobre los ambientes costeros, los cambios ecológicos que acontecen, producen en última instancia la disminución de la diversidad biológica, es decir, disminuye la variedad de organismos vivos en el ecosistema (Howarth et al., 2000).

Los nutrientes primarios (N y P) pueden regular la productividad primaria acuática provocando el aumento descontrolado de la biomasa algal y de esta manera, el enturbiamiento del agua. Más aún si las algas mueren y se descomponen, la falta de oxígeno (hipoxia y anoxia) puede ocurrir más frecuentemente. Estos cambios en los niveles de nutrientes, luz y oxígeno favorecen a determinadas especies más que a otras y producen

cambios en la estructura del fitoplancton, zooplancton y comunidades bentónicas. Así pueden ocurrir afloramientos de algas nocivas, algunas de ellas tóxicas o no palatables para los consumidores secundarios, que se hacen más frecuentes e intensos en esas condiciones limitantes (Nixon, 1995; Smith et al., 1999; Howarth et al., 2000). De este modo, leves cambios en la comunidad planctónica y en otros factores pueden reducir el crecimiento y el reclutamiento de especies de peces y disminuir así la producción pesquera.

Algunos sistemas costeros son más susceptibles al ingreso adicional de nutrientes mientras que otros parecen ser más resistentes; es por ello que algunos autores han propuesto que la eutrofización no necesariamente es perjudicial o nociva, sino que es considerada como un disturbio y no como una forma de contaminación (Nixon, 1995; Karydis, 2009). Esto se debe a la presencia de gran cantidad de factores adicionales que actúan como atenuantes del fenómeno de eutrofización. Estos atributos físicos y biológicos son la energía de marea, los gradientes de salinidad, los procesos horizontales de transporte, el tiempo de residencia del agua, el grado de disponibilidad de luz, la dilución de los nutrientes por las aguas oceánicas, entre otros (Howarth et al., 2000; Cloern, 2001). Sin embargo, la susceptibilidad al aporte excesivo de nutrientes no es estática y puede cambiar en respuesta a factores como el cambio climático. Este fenómeno de importancia global es una fuente potente de variabilidad ambiental. En este sentido, ciertas anomalías climáticas pueden cambiar las cualidades de dichos atributos, induciendo respuestas potenciales diferentes al enriquecimiento de nutrientes (Cloern, 2001).

Otra consecuencia indeseable causada por la eutrofización es la disminución del valor estético del ecosistema, de gran importancia principalmente en sitios turísticos. Ligado a esto se presentan otros impactos negativos que incluyen el detrimento del valor del ecosistema y de los usos recreacionales (Smith, 2003; Smith & Schindler, 2009).

También existe una importante relación entre la calidad del agua y la salud humana. Una gran variedad de enfermedades son transmitidas por organismos que pueden ser transportados por el agua proveniente de desechos urbanos (*virus*, *cólera*, *Escherichia coli*), pudiendo afectar a la población humana. Por otro lado, también son peligrosas para la salud humana las floraciones masivas de algas tóxicas, cuya toxina se bioacumula en moluscos

marinos y podría llegar a valores de concentración tóxica y letal para quienes lo consuman (USEPA, 2001; Smith & Schindler, 2009).

3. Interacciones entre nutrientes y otros contaminantes

Además de ser receptores de los principales nutrientes de origen antrópico, los cuerpos de agua superficiales son un medio de transporte y de reserva de metales pesados, pesticidas, compuestos farmacéuticos, hormonas y otros contaminantes que no son nutrientes. Existe evidencia de que estos contaminantes pueden estar fuertemente influenciados por la disponibilidad de nutrientes (Cloern, 2001; Smith & Schindler, 2009).

Más precisamente, debido a que el crecimiento bacteriano se encuentra limitado por las concentraciones de N y P en el ambiente, el destino de los diferentes contaminantes puede estar influenciado por el estado trófico del sistema que los recibe: el aumento en la provisión de N y P puede mejorar la biodegradación de sustancias petrogénicas, hidrocarburos aromáticos y pesticidas en muchos ecosistemas acuáticos (Graham et al., 2000). La eutrofización también acelera el ciclo biogeoquímico de los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, se comprobó que en lagos eutróficos las concentraciones en agua de PCBs transportados atmosféricamente fueron menores que en lagos oligotróficos debido a la mayor sedimentación de estos contaminantes unidos a partículas orgánicas (Jeremiason et al., 1999). También se detectó que algunos metales pesados como la plata y el cobre, hidrocarburos clorinados y algunos herbicidas selectivos inhibieron ciertas especies de algas, promoviendo de esta manera el aumento de taxas menos sensibles a este tipo de contaminantes (Cloern, 2001).

4. Ecotoxicología y estudios ambientales

Los efectos de la contaminación comenzaron a ser mayormente visibles a partir de la “Revolución Industrial” (1830-1890), cuando la producción en masa, así como el hacinamiento de personas en las ciudades, generaron condiciones insalubres y consecuentemente muertes masivas, enfermedades crónicas y degenerativas, además de la devastación de bosques y ríos (Neuzil & Kovarik, 1996). Esta situación se magnificó posteriormente por la llamada “Revolución Química”, la cual propició la utilización de miles de sustancias para fabricar productos de consumo diario, sin la realización de estudios

científicos que dieran a conocer los posibles efectos que tendrían en el hombre y en el medio ambiente (Ramírez Romero & Mendoza Cantú, 2008).

La investigación formal de los efectos adversos de los contaminantes sobre los organismos se inicia en la década de los años 30, a través del desarrollo de estudios para determinar la relación causa-efecto entre la presencia de contaminantes químicos en el agua y sus efectos biológicos en poblaciones de peces. La mayoría de estos estudios se focalizaron en confirmar si un contaminante, del que se tenía sospecha, era el agente causante de un daño que ya había ocurrido y se basaron en pruebas de mortalidad de los organismos (Ramírez Romero & Mendoza Cantú, 2008).

Durante las décadas de 1940 a 1960, los estudios que demostraron los efectos que producían los plaguicidas agrícolas sobre la vida silvestre catalizaron el desarrollo de la toxicología ambiental y con ella el desarrollo de pruebas en las que, además de la mortalidad, se medían otros indicadores de importancia ecológica, tales como el crecimiento y la reproducción en organismos acuáticos y terrestres.

En consecuencia, en el año 1969 Truhaut establece el término "**ecotoxicología**" como la rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos provocados por contaminantes naturales ó sintéticos sobre los constituyentes de los ecosistemas (Truhaut, 1977). A pesar de existir en la literatura una amplia diversidad de definiciones, todas ellas tienen en común dos factores: agentes tóxicos y ecosistema. Esta disciplina se encarga de evaluar, monitorear y predecir el destino de sustancias extrañas en el medio y el efecto de las mismas sobre los individuos, poblaciones y ecosistemas (Ferrari, 2006).

5. Relevancia de las pruebas de toxicidad

En la actualidad es ampliamente reconocido el hecho de que la medición aislada de parámetros fisicoquímicos y la determinación de compuestos tóxicos presentes en el ambiente no son suficientes para asegurar la ausencia de efectos indeseables y del consecuente riesgo ambiental en el ecosistema. La biodisponibilidad y por lo tanto el impacto ecotoxicológico de muchas sustancias pueden variar considerablemente en relación con una gran cantidad de factores ambientales como el pH, la concentración de oxígeno disuelto y los efectos antagónicos y/o sinérgicos con otras sustancias (Morales Castillo, 2004; Espina & Vanegas, 2005a; Scholes et al., 2007; Magalhães & Ferrão Filho, 2008). De esta

manera, la caracterización fisicoquímica es insuficiente ya que por sí sola no proporciona evidencia de los efectos biológicos que pueden causar los contaminantes sobre los organismos y por lo tanto no permite determinar el grado de contaminación que produce sobre el ecosistema bajo estudio (Chapman et al., 2003).

Asimismo, las respuestas biológicas sin datos fisicoquímicos del medio contienen muy poca información ya que no reflejan la variabilidad de los sistemas naturales ni la complejidad inherente a los mismos y no producen información útil para un posterior plan de manejo del sistema (Espina & Vanegas, 2005a). Diversos estudios han comprobado que a pesar de lo detallado y complejo que pueden resultar los análisis químicos, el análisis simultáneo tanto de los niveles y destino de los contaminantes como de las respuestas biológicas de los organismos sigue siendo la mejor opción para una correcta evaluación de los riesgos que presenta un ecosistema expuesto a estrés ambiental (Scholes et al., 2007). Es por ello que la utilización de ensayos biológicos o bioensayos está siendo considerada cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de los contaminantes (Morales Castillo, 2004).

6. Descripción situacional urbano –ambiental de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego

En las últimas décadas, la ciudad de Ushuaia ha experimentado un extraordinario desarrollo urbano. Su población creció de 7.000 habitantes en 1970 (Dirección de Estadística Tierra del Fuego, 1990) a aproximadamente 60.000 habitantes en la actualidad (Censo Nacional 2010). Este hecho produjo sustanciales cambios en el uso de la tierra, principalmente por la expansión urbana e industrial y nuevos usos turísticos. La principal razón de este aumento demográfico ha sido la promulgación de la ley de promoción industrial en la región (Ley Nacional 19640) en la década de los 70. Si bien el impulso industrial no ha sido continuo en los últimos años y actualmente es notoria una reactivación y crecimiento del parque industrial, la población que se había movilizó por razones laborales permaneció mayoritariamente como población residente de la Provincia. Como consecuencia directa de este notable incremento poblacional, en pocos años se produjo un crecimiento en las necesidades básicas urbanas tales como el abastecimiento de agua potable, el tratamiento de residuos sólidos y líquidos cloacales, etc. Dicha demanda no fue correspondida con una eficiente planificación de los recursos e infraestructura que pudieran satisfacer a la población futura. Como consecuencia directa de la mencionada ley de

promoción industrial, durante la década del 80 se establecieron en el lugar un gran número de industrias de ensamble de componentes electrónicos, plásticos y productos químicos, con el potencial ingreso de cantidades considerables de metales pesados y otros contaminantes al ambiente.

Otra actividad de gran impacto en la zona costera de la ciudad de Ushuaia es la actividad naviera. En la costa de Bahía Ushuaia se sitúa un muelle comercial de importantes dimensiones donde amarran grandes barcos, incluyendo cargueros de combustible, barcos pesqueros y cruceros turísticos. En la zona céntrica de la ciudad se localiza un pequeño muelle donde amarran catamaranes de variado porte destinados a las actividades turísticas dentro del Canal Beagle. Existe además un tercer muelle de menor envergadura donde se encuentra la Planta Orión, un sitio de operaciones de carga y descarga de combustibles, que cuenta con tanques de almacenamiento que abastecen vehículos, aviones y barcos. El tráfico marítimo se ha intensificado notablemente en estos últimos años por la actividad turística, la cual comprende los recorridos diarios por el Canal Beagle en las embarcaciones pequeñas y el arribo de cruceros de gran calado debido a que Ushuaia es considerada "la puerta de entrada a la Antártida".

Un factor adicional y no menos importante es el establecimiento de nuevos asentamientos urbanos en la ciudad de Ushuaia. En los últimos 10 años, han sido urbanizadas de manera irregular zonas de bosques naturales próximas a la ciudad, mientras que paradójicamente, sobre la costa de Bahía Golondrina se han establecido nuevos proyectos urbanísticos que comprenden viviendas particulares en barrios privados, hoteles y cabañas para el turismo. En el primer caso, estos asentamientos irregulares generaron la tala indiscriminada del bosque sin contar con las autorizaciones correspondientes de las autoridades municipales. Las casas precarias instaladas allí carecen de los servicios mínimos necesarios para vivir dignamente (agua potable, gas, cloacas) (Figura 1). Además, el asentamiento de población en estas zonas altas pone en riesgo la calidad de las principales fuentes de agua potable de la ciudad (Urciolo & Iturraspe, 2005). En el segundo caso, la urbanización ha sido planificada en mayor grado. El nivel económico de la gente que vive en estos sectores es más elevado y presentan la instalación de los servicios básicos mencionados (Figura 2).



Figura 1. Fotografías de asentamientos irregulares en la ciudad de Ushuaia.



Figura 2. Fotografías de nuevas urbanizaciones sobre Bahía Golondrina.

El **sistema colector cloacal** de la ciudad fue diseñado y construido en los años '80 para el tratamiento y eliminación de los efluentes cloacales generados en la ciudad. Consiste en una red troncal de carácter mixto (pluvial y cloacal) que atraviesa la ciudad principalmente por el área del antiguo casco urbano (Figura 3). Dicho colector finaliza en Punta Pingüino, extremo occidental de la Península Ushuaia, en las cercanías de la cabecera de la pista de aterrizaje del Aeropuerto Internacional "Malvinas Argentinas", donde se encuentra ubicado el **dispersor marítimo ó emisario** (Figura 4). Sin embargo, al poco tiempo de haber sido puesto en funcionamiento, quedó fuera de servicio por haber sido dañado, aparentemente, por las corrientes marinas. En el año 2000 fue reconstruido completamente y puesto en servicio nuevamente mediante la salida de 2 conductos de PRVF de 600 mm de diámetro y una longitud de 30 m cada uno.

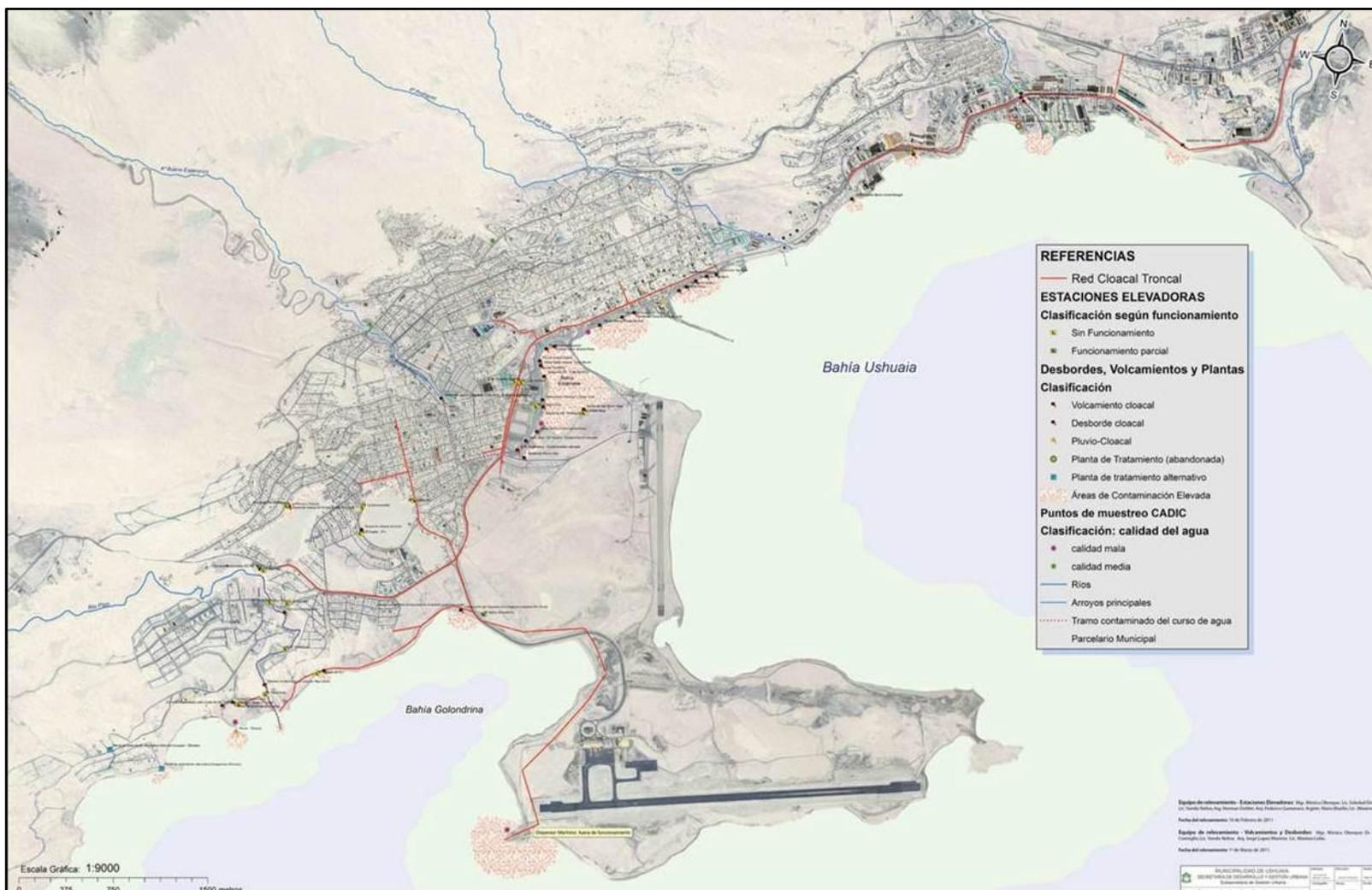


Figura 3. Mapa del tendido de la red cloacal de la ciudad de Ushuaia (COPLAM, 2011).



Figura 4. Fotografías del dispersor marítimo sobre Bahía Golondrina.

En la actualidad, el citado dispersor no se encuentra funcionando óptimamente dado que, según un informe recientemente realizado (COPLAM, 2011), falta en el sector inicial de uno de sus conductos un tramo de 7 metros aproximadamente. Si bien el otro conducto se encuentra íntegro, por diferencia de presiones el líquido cloacal se dirige hacia el extremo más corto y es vertido directamente sobre la costa de la Península.

Por otro lado, no existe hasta el momento una planta de tratamiento de líquidos cloacales, por lo cual todos los desechos domiciliarios generados en la ciudad son volcados al mar sin tratamiento previo. La ausencia del funcionamiento de las plantas elevadoras y la falla en el sistema de conducción a la Península mantiene el crónico problema de contaminación que padece la ciudad. Solamente una estación elevadora cercana a la finalización del colector funciona parcialmente (Figura 5). El único tratamiento al cual son sometidos los líquidos cloacales en dicha estación se lleva a cabo mediante un desarenador que permite disminuir la cantidad de sólidos de las aguas servidas y facilitar así la tarea del dispersor (COPLAM, 2011).



Figura 5. Fotografía de la salida de rebalse hacia el canal de una Estación Elevadora sobre Bahía Golondrina.

Además del deficiente funcionamiento en su tramo final, la red cloacal no abarca la totalidad de sectores de la ciudad. Varias zonas, principalmente aquellas urbanizadas recientemente, vuelcan sus residuos domésticos directamente a los cursos de agua naturales aledaños. Más aún, parte del propio sistema colector municipal desemboca en estos cursos ya que no se encuentra conectado al conducto troncal. Esto genera finalmente el vertido de los líquidos crudos en varios puntos a lo largo de toda la línea de costa (Figura 3).

PROPÓSITO GENERAL DEL ESTUDIO: HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

Teniendo en cuenta la problemática ambiental que presenta la zona costera de la ciudad de Ushuaia y la escasa información disponible relacionada a los posibles impactos generados por el vuelco de efluentes urbanos, se plantean las siguientes **hipótesis** de trabajo:

- *el grado de calidad ambiental que presenta la línea de costa sobre la cual se desarrolla la ciudad de Ushuaia, tiene su origen parcialmente, en las alteraciones que sufren los cursos de agua que atraviesan la ciudad, producto de las actividades humanas, causando una afectación en la calidad de las cuencas y/o reservorios finales.*
- *si existe un aporte de efluentes cloacales a los cursos de agua urbanos, entonces cuanto mayor sea la intervención antrópica mayor será el impacto final en la costa.*
- *los cambios producidos en las condiciones ambientales, es decir, la eutrofización del ecosistema costero, afectan a las especies residentes, siendo su manifestación y magnitud posible de ser detectada por alteraciones a nivel sub-organismo, tanto fisiológico como bioquímico.*

A partir de las hipótesis planteadas, el **objetivo general** de esta tesis es:

Caracterizar las fuentes de emisión de sustancias antropogénicas que contribuyen al proceso de eutrofización de la zona costera de la ciudad de Ushuaia y evaluar mediante bioensayos de toxicidad los efectos que las mismas producen en los mecanismos de respuestas en especies de crustáceos residentes de importancia ecológica y comercial, procurando aportar información inédita y complementaria al conocimiento general que se tiene sobre el ecosistema bajo estudio a fin de ser utilizada en los programas de evaluación y control costero.

PARTE B
Caracterización ambiental de los sitios de estudio

INTRODUCCIÓN

1. Evaluación y monitoreo de la calidad del ambiente acuático

La descripción de la calidad del ambiente acuático puede llevarse a cabo a través de diversos métodos, cada uno de los cuales producirá distintos tipos de datos que a su vez conducirán hacia diferentes interpretaciones de los resultados. Uno de los métodos empleados es la descripción a través de medidas cuantitativas, como la determinación de variables fisicoquímicas (en agua, material particulado y/o tejidos) y biológicas (determinación de la DBO, pruebas de toxicidad), mientras que es posible también la utilización de descripciones cualitativas y semicuantitativas como los índices bióticos, la descripción de las especies presentes en el ambiente, los aspectos visuales, la utilización de los sentidos, entre otros (Chapman, 1996).

La **evaluación** de la calidad de agua se define como el proceso total de análisis de la naturaleza física, química y biológica del agua en relación con su calidad natural, con los efectos antrópicos y los variados usos del ambiente que pueden afectar tanto la salud humana como la del sistema acuático. A diferencia de la evaluación, el **monitoreo** se define como la recolección real de la información en sitios determinados y a intervalos regulares a fin de proporcionar datos que puedan ser utilizados para definir las condiciones actuales del sistema, establecer tendencias y posibles relaciones causa-efecto. La utilización de programas de monitoreo es una herramienta indispensable ya que una evaluación incluye la interpretación e informe de los resultados del monitoreo junto con la realización de recomendaciones para futuras acciones, a cargo de los organismos de gestión (Chapman, 1996).

En el monitoreo de la calidad de agua usualmente se miden múltiples parámetros que son registrados a diferentes tiempos y en diferentes sitios de estudio. La selección de dichos parámetros depende de los objetivos de la evaluación, por lo cual si se realiza adecuadamente, se podrán llevar a cabo los objetivos planteados de manera eficiente y del modo más rentable (Chapman, 1996; Pesce & Wunderlin, 2000).

Una manera alternativa de evaluar la calidad del agua es a través de la utilización de los **índices de calidad de agua (ICA)**. Se denomina índice de calidad de agua a cualquier aproximación matemática que tiene en cuenta datos de dos o más variables de calidad de agua y los resume en un número único (Ott, 1978; Chapman, 1996; Pesce & Wunderlin, 2000). Esta expresión simplificada es una manera de evaluar los cambios en la calidad del agua debido al efecto combinado de muchos parámetros. Es por ello que puede ser utilizada para una gran variedad de propósitos, por ejemplo, como herramienta para planes de monitoreo de calidad de agua o en la evaluación de resultados de programas de control de la contaminación. En última instancia, los ICA hacen posible la transmisión de manera fácilmente comprensible, de la información sobre calidad ambiental a la población y a los organismos gubernamentales encargados de tomar decisiones al respecto.

Existen en la literatura diversos ICA utilizados desde la década de 1960, los cuales pueden clasificarse en diferentes categorías: índices generales de calidad de agua, índices específicos de uso de aguas e índices para el monitoreo (Ott, 1978; Chapman, 1996).

Los índices generales de calidad de agua representan un determinado nivel de contaminación de acuerdo a una escala numérica, sin tener en cuenta la intención de uso del agua. Sin embargo, hay que tener en cuenta los diferentes usos del agua. Es decir, en una escala de 0 a 100, un índice entre 20 y 40 puede ser aceptable si el agua va a utilizarse para la agricultura o la industria, mientras que puede ser no aceptable como agua de bebida (Ott, 1978). En este aspecto se basan los índices específicos de uso de aguas, en los cuales las variables se pesan diferencialmente de acuerdo a la importancia que presenten en cada uso particular del agua. Los índices para el monitoreo son similares a los índices generales de calidad de agua pero incluyen también variables (sociales y económicas) relacionadas con decisiones particulares que están bajo consideración.

De acuerdo a Ott (1978), se consideran *aproximaciones estadísticas* a algunos procedimientos estadísticos estándares como son las técnicas de correlación y el análisis multivariado, que se emplean para identificar asociaciones entre variables a fin de establecer la importancia de cada una de ellas en la determinación de la calidad del agua.

Dentro del Análisis Multivariado, el **Análisis de Componentes Principales (ACP)** y el **Análisis Factorial (AF)**, son técnicas estadísticas utilizadas para describir componentes importantes o factores que explican la mayoría de la varianza del sistema. Se considera que

estos análisis reducen el número de variables medidas a un número menor de variables denominadas Componentes Principales (CP) o Factores, mientras que simultáneamente se preserva las relaciones presentes en los datos originales y su variación a través del gráfico de los *scores* y los coeficientes de correlación de las variables sobre los nuevos Factores (Libralato et al., 2008).

2. Antecedentes de estudio

Los primeros datos sobre el grado de contaminación del área costera del Canal Beagle se obtuvieron durante la década de 1990 con los estudios de Amin (1995) y Amin et al. (1996a; 1996b). A partir de ellos se registraron las concentraciones de **metales pesados** (Cd, Pb, Zn, Cu, Mn, Fe y Hg) en sedimentos costeros y en tejidos blandos del mejillón *Mytilus edulis chilensis*, ambos provenientes de diferentes puntos situados en la costa de las Bahías Ushuaia y Golondrina. Trabajos similares más recientes fueron realizados por Comoglio et al. (2011), Giarratano & Amin (2010), Giarratano et al. (2010; 2011) y Duarte et al. (2011; 2012). De esta manera, se han podido obtener datos sobre la existencia de aportes terrestres de metales pesados al sistema costero del Canal Beagle en diferentes matrices (agua, sedimentos y biota). Es de esperar que las fuentes puntuales de estos contaminantes resulten producto de la actividad industrial, de los asentamientos urbanos y de la actividad portuaria que fueron significativamente en aumento en los últimos 30 años.

La presencia de una amplia variedad de **compuestos orgánicos** ha sido registrada en sedimentos y organismos acuáticos en los estudios de Sericano et al. (1995), Esteves et al. (2006), Bigatti et al. (2009), Amin et al. (2011a), Delucchi et al. (2011) y Commendatore et al. (2012). Los primeros estudios realizados en el marco del Proyecto Internacional "Mussel Watch" (1995), detectaron que las concentraciones de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs), Bifenilos Policlorados (PCBs) y plaguicidas organoclorados en los tejidos de moluscos bivalvos residentes se encontraban por debajo de los niveles permitidos para el consumo humano (Sericano et al., 1995). Un estudio llevado a cabo en 2001 sobre la presencia de hidrocarburos alifáticos en sedimentos intermareales determinó que las áreas portuarias dentro de Bahía Ushuaia son las más contaminadas en Tierra del Fuego (Esteves et al., 2006) ya que por localizarse en un área semicerrada, los hidrocarburos tienden a acumularse fácilmente. Más aún, 5 años después, Commendatore et al. (2012) encontraron que el nivel

de estos compuestos había aumentado 10 veces. De esta manera, los sitios fueron catalogados desde no contaminados (Río Pipo) hasta altamente contaminados (muelle de combustibles Planta Orión).

En una investigación realizada por Amin et al. (2011a) en Bahía Ushuaia y alrededores, diversos compuestos orgánicos fueron hallados en los tejidos de *Mytilus edulis*, entre ellos PAHs, PCBs y pesticidas clorados. Comparando las concentraciones halladas en 1999 y 2003, los niveles de PAHs aumentaron más de 5 veces. Más aún, se registraron 16 PAHs que están identificados como contaminantes prioritarios por la USEPA y la WHO; y de ellos, 6 posiblemente de carácter cancerígeno. En la zona portuaria se hallaron altas concentraciones de PCBs, mientras que se registraron bajos valores de pesticidas clorados.

Debido a la importancia que presenta hallar herramientas para subsanar las consecuencias del impacto en el ambiente de esta clase de contaminantes, diversos estudios sobre bacterias degradadoras de hidrocarburos en sedimentos han sido llevados a cabo también en esta zona. A través de los mismos han podido ser identificados diferentes genes que codifican para diversos grupos de enzimas catalizadoras de la degradación aeróbica de PAHs (Lozada et al., 2008; Marcos et al., 2009; Dionisi et al., 2011; Marcos et al., 2012).

También han sido encontradas en la zona de estudio altas concentraciones de tributilestaño (TBT), un compuesto antifouling componente de las pinturas para embarcaciones y muy utilizado en zonas portuarias. Este contaminante fue hallado en los sedimentos superficiales a lo largo de la costa de la ciudad de Ushuaia y además se ha determinado un alto grado de imposex presente en diferentes especies de gasterópodos residentes (Bigatti et al., 2009; Delucchi et al., 2011).

En cuanto a la distribución de **parámetros hidrográficos** y a la presencia de **nutrientes y materia orgánica**, se cuenta con información sobre estas variables tanto en agua como en sedimentos (Amin, 1995; Amin et al., 1996a; 1996b; Solis et al., 2004; Biancalana, 2008; Torres et al., 2009; Amin et al., 2011b; Gil et al., 2011). A partir de los datos obtenidos se han podido discriminar distintas zonas de acuerdo a los niveles de calidad de agua dentro de las Bahías Ushuaia y Golondrina. De manera general, una de las zonas, la más impactada, se localiza cerca de la costa norte y noroeste de Bahía Ushuaia donde desembocan efluentes urbanos y mixtos, y se desarrollan las principales actividades humanas. Aquí se han detectado concentraciones de nutrientes comparables a aquellas de

ambientes hipertróficos. Otro grupo comprende zonas menos impactadas, las cuales se localizan sobre la costa noreste de Bahía Ushuaia y la costa de Bahía Golondrina, y están caracterizadas por el aporte de fuentes de agua dulce (principalmente Río Olivia, Arroyo Grande y Río Pipo). Finalmente una tercera zona se encuentra externa a las bahías y presenta mayor influencia oceánica.

Escasa es la información existente acerca de las concentraciones de **bacterias coliformes totales y fecales** (indicadoras de contaminación fecal) en las aguas costeras del Canal Beagle. Sólo se han realizado determinaciones en dos fechas puntuales (enero de 2001 y marzo de 2005) y en ambos casos los niveles encontrados han superado los permitidos por la legislación (Solís et al., 2004; Gil et al., 2011).

A partir de estos trabajos se ha generado una importante base de conocimiento del área de estudio, principalmente a nivel del sistema de Bahías Ushuaia-Encerrada-Golondrina como cuerpos receptores, la cual aunque necesite ser actualizada por la constante dinámica a la que se encuentra sometida la región, constituye una base fundamental en el planteamiento de la hipótesis de trabajo de la presente Tesis Doctoral.

3. Objetivos específicos

La ciudad de Ushuaia presenta ciertas características que le confieren una dinámica especial en cuanto al ciclo de los nutrientes y al destino de los aportes contaminantes que en ella se generan y que son volcados en la zona costera. En forma parcial o total, las sustancias detectadas en bahías y zonas abiertas oceánicas son incorporadas antes de llegar a sus costas, en algún tramo del recorrido del curso de agua natural por las cuales circulan (ríos, arroyos y chorrillos) y/o se acumulan (turbales). La evidencia que se tiene sobre la alteración de este sistema proviene tanto de estudios realizados previamente como de la existencia de gran cantidad de conexiones clandestinas a los sistemas pluviales, del establecimiento de viviendas sin servicios sobre o cerca de los cursos de agua y de los asentamientos poblacionales irregulares de la ciudad que se incrementaron en los últimos años.

En base a dicha información, las áreas identificadas con mayor riesgo de alteraciones severas por incorporación de sustancias antropogénicas están ubicadas sobre las desembocaduras de los principales cursos de agua naturales. Sin embargo, es escasa la información existente sobre la calidad de estas aguas por encima de la línea de costa. Por

este motivo es de importancia el estudio de la calidad de las aguas que atraviesan la ciudad, no solo a fin de conocer el grado de impacto que presentan estos cursos de agua sino también porque la contaminación por efluentes cloacales supone un riesgo para la salud de la población y del ecosistema.

Es por ello que los **objetivos específicos** de este capítulo son:

- evaluar desde el punto de vista físico, químico y microbiológico la distribución espacial y temporal de la calidad del agua que presentan las principales cuencas hídricas que atraviesan la ciudad de Ushuaia y que desembocan en el sistema de Bahías Ushuaia-Encerrada-Golondrina.
- analizar y describir la posible existencia de sitios con similar nivel de calidad de agua a través del estudio de los parámetros medidos utilizando técnicas estadísticas multivariadas.
- integrar la información obtenida mediante la utilización de índices de calidad de agua.

METODOLOGÍA

1. Descripción geográfica del área de estudio

El **Canal Beagle** se encuentra ubicado entre la costa sur de la isla Grande de Tierra del Fuego (Argentina) y la costa norte de las islas Hoste y Navarino (Chile) (Balestrini et al., 1998) (Figura 6). Ocupa un valle glacial inundado conectando los océanos Atlántico y Pacífico, en dirección oeste-este y abarca una extensión aproximada de 240 km. El ancho medio del Canal es de 5 km, aunque alcanza valores mínimos de 1.8 km en Isla Gable. La batimetría del Canal muestra una amplia variación de profundidad a lo largo del mismo con un promedio de 50 m a la altura de la Isla Gable y alcanzando un máximo de 600 m en los brazos noroeste y sudeste (Balestrini et al., 1998; Bujalesky, 2007).

Presenta un régimen micromareal semidiurno (dos pleamares y dos bajamares por día) con desigualdades diurnas (Bujalesky, 2007). La amplitud media de marea es de 1.2 m (Servicio de Hidrografía Naval) pudiéndose encontrar ocasionalmente amplitudes máximas de hasta 2.18 m y mínimas de hasta 0.67 m (Balestrini et al., 1998). Los vientos predominantes provienen del sudoeste a una velocidad media de 31 km h⁻¹. Estos vientos generan una corriente de deriva que impulsa las aguas del Canal en sentido oeste a este alcanzando velocidades entre 7.9 y 13.7 cm seg⁻¹ (Balestrini et al., 1998). Si bien se trata de una corriente de aguas frías, la temperatura media anual del agua en superficie promedia los 6.5°C y supera sólo en un 1°C la media anual del aire (Iturraspe et al., 1989). Por este motivo, se habla de un flujo positivo de calor desde el mar hacia la atmósfera, especialmente en invierno. Por otro lado, las aguas del Canal Beagle se caracterizan por presentar bajos valores de salinidad, siendo los máximos registrados en superficie de 32 (Balestrini et al., 1998).

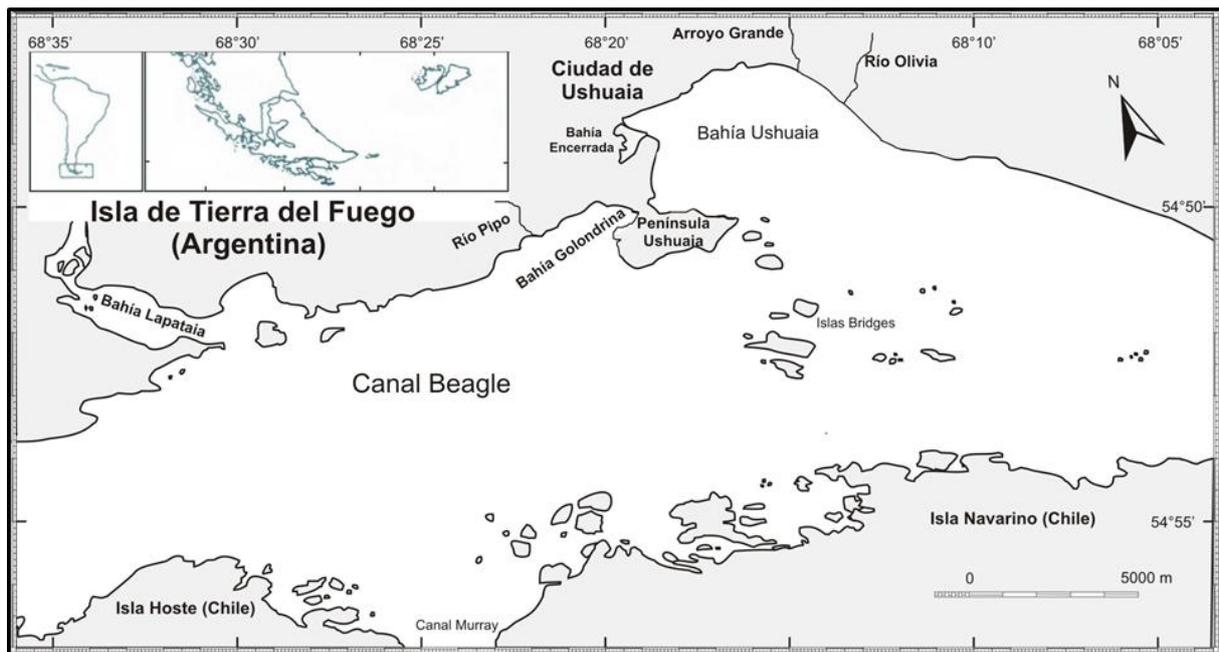


Figura 6. Localización del área de estudio. Bahías Ushuaia, Encerrada y Golondrina, Canal Beagle.

El Canal Beagle presenta costas rocosas escarpadas con pequeñas playas de grava (Bujalesky, 2007). En estas costas, precisamente sobre las Bahías Ushuaia, Encerrada y Golondrina, se desarrolló tanto la urbanización como el núcleo fabril de la ciudad de Ushuaia.

- **Bahía Ushuaia**

Se caracteriza por presentar profundidades irregulares que oscilan entre 6 y 30 m en algunos sectores hasta alcanzar los 100-170 m en dirección oeste-este cerca de la costa norte del Canal Beagle. El fondo es arenoso-fangoso y consolidado con presencia de conchillas y piedras (Amin, 1995). Dentro de esta bahía, el agua se desplaza en sentido elíptico antihorario, ingresando desde el Canal por la zona de mayores profundidades, al este y progresando con velocidades que varían entre 5,5 y 16,3 cm seg⁻¹ (Balestrini et al., 1990; Comoglio, 1994).

- **Bahía Encerrada**

Es un sistema semi-cerrado, poco profundo (media de 0.8 m) que cubre un área de 0.27 km² aprox. (Torres et al., 2009). Presenta una conexión con la Bahía Ushuaia a través de dos aberturas artificiales de 4.5 m de largo. El intercambio de agua entre ambas bahías

ocurre a través de estas aberturas a una tasa de $1 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$ durante cada ciclo de marea. De este modo, masas de agua con baja concentración de nutrientes entran a la Bahía Encerrada durante marea creciente y masas de agua con alta concentración de nutrientes fluyen luego hacia Bahía Ushuaia durante la bajamar (Torres et al., 2009). Su principal aporte de agua dulce proviene de la desembocadura del Arroyo Buena Esperanza y de la descarga de varios rebalses del sistema colector cloacal (Torres et al., 2009; Biancalana & Torres, 2011; COPLAM, 2011).

- **Bahía Golondrina**

Esta bahía se caracteriza por presentar un fondo plano cuya profundidad media es de 6.3 m (Luchini & Wicki, 2002), aunque presenta hasta 20 m en los sectores cercanos al Canal. Predomina el fango o la arena, siendo habitual encontrar piedras de variado tamaño, restos de conchillas de bivalvos, caracoles y cirripedios (Amin, 1995). En esta bahía, la velocidad de la corriente permanente es de 0.6 cm seg^{-1} y circula en el mismo sentido de los vientos predominantes: del sur-sudoeste y norte-noreste (Comoglio, 1994; Amin, 1995).

La zona costera del Canal Beagle, donde se emplaza la ciudad de Ushuaia, presenta un clima subantártico frío y húmedo con influencia oceánica. A nivel del mar, la temperatura media anual del aire es de 5.4°C , pero decrece hacia el interior por un gradiente altitudinal, incrementándose además la amplitud diaria y estacional. Las temperaturas del agua superficial, registradas durante cuatro años en el muelle de combustibles del puerto de Ushuaia (período 1985-1988), presentan valores extremos en los meses de agosto y enero (promedios de 4.38 y 9.35°C , respectivamente; Balestrini et al., 1998).

Las precipitaciones en la zona costera se distribuyen en forma relativamente uniforme durante el año con un promedio anual de 530 mm, que se incrementa por el efecto de la orografía hacia las cumbres interiores alcanzando los 800-1000 mm en la zona límite de la vegetación. La acumulación de nieve ocurre a partir de abril en toda el área de las cuencas, aunque con mayor desarrollo y estabilidad en los niveles altos. El escurrimiento es regulado por las temperaturas invernales por lo cual el período de crecidas se extiende hasta diciembre produciéndose los picos máximos en simultáneo con las lluvias (Iturraspe, 2007). En primavera y verano, el caudal de los cursos de agua naturales que vierten en el

sistema de bahías Ushuaia-Encerrada-Golondrina, se incrementa notablemente debido a la incorporación del agua de deshielo. Este hecho resulta en la disminución de los valores de salinidad del Canal para esta época (Iturraspe et al., 1989; Balestrini et al., 1998; Amin et al., 2011b).

En la zona montañosa que rodea al Canal Beagle, se desarrollan extensos bosques definidos como de tipo subantártico, compuestos por dos especies de *Nothofagus*. En la porción occidental y más lluviosa se desarrolla *Nothofagus betuloides* (guindo) de hoja perenne, con ejemplares de gran porte, que forman bosques muy cerrados. En tanto que en la porción central y oriental, de menor humedad y suelos más secos, crece además *Nothofagus pumilio* (lenga), especie de hoja caduca. Asimismo, se encuentran entremezcladas otras especies como son los maitenes (*Maytenus magellanica*) y canelos (*Drimys winteri*), ambos de menor altura que los primeros (Tuhkanen, 1992).

En los sectores bajos y asociados a los bosques se forman turberas, conformadas por musgos *Sphagnum magellanicum* como especie dominante (Premoli et al., 2006).

En el sotobosque, aparecen arbustos tales como calafates (*Berberis buxifolia*), mata negra (*Chilliostrichium diffusum*), murtillas (*Empetrum rubrum*), frutillas silvestres (*Rubus geoides*), varias juncáceas y una cantidad importante de hierbas (Pisano Valdés, 1977).

2. Diseño de muestreo

A partir de octubre de 2009 hasta febrero de 2011 se realizaron con una frecuencia bimestral, nueve campañas de muestreo (Tabla 1). En cada ocasión se tomaron muestras de agua en 12 sitios seleccionados de manera de incluir puntos en las principales cuencas de agua dulce que atraviesan la ciudad. El muestreo de los puntos de cada cuenca se realizó durante un mismo día, mientras que el muestreo completo se llevó a cabo durante 3 ó 4 días consecutivos, excepto que las condiciones climáticas no lo permitieran (precipitaciones intensas tanto níveas como lluvias, vientos o bajas temperaturas extremas).

Tabla 1. Descripción de las fechas de muestreo.

Campaña	Fecha	Abreviatura
1	Octubre 2009	Oct09
2	Diciembre 2009	Dic09
3	Febrero 2010	Feb10
4	Abril 2010	Abr10
5	Junio 2010	Jun10
6	Agosto 2010	Ago10
7	Octubre 2010	Oct10
8	Diciembre 2010	Dic10
9	Febrero 2011	Feb11

Se muestrearon tres sitios en la cuenca del Arroyo Grande (**AGa; AGm y AGd**), dos en el Arroyo Rodríguez (**ARa y ARd**), tres en el Arroyo Buena Esperanza (**ABEa; ABEm y ABEd**), dos puntos sobre un turbal urbano (**T y ST**), la salida del dispersor cloacal (**DC**) y un conducto de desborde sobre Bahía Golondrina (**BG**) (Tabla 2 y Figura 7). Este último sitio fue muestreado a partir de la campaña 4 (abril 2010).

Tabla 2. Sitios de muestreo y localización geográfica.

Sitio	Área		Localización	Sitio	Área		Localización
<i>Arroyo Grande</i>	alto	AGa	54° 47.340' S 68° 15.840' O	<i>Arroyo Buena Esperanza</i>	alto	ABEa	54° 47.906' S 68° 22.270' O
	medio	AGm	54° 47.607' S 68° 15.597' O		medio	ABEm	54° 49.010' S 68° 19.849' O
	desembocadura	AGd	54° 47.743' S 68° 15.466' O		desembocadura	ABEd	54° 49.027' S 68° 19.129' O
<i>Arroyo Rodríguez</i>	alto	ARa	54° 48.227' S 68° 19.542' O	<i>Turbal</i>	Turbera	T	54° 49.452' S 68° 20.474' O
	desembocadura	ARd	54° 48.598' S 68° 18.717' O		Salida	ST	54° 49.354' S 68° 20.123' O
<i>Dispersor Cloacal</i>	desembocadura	DC	54° 50.775' S 68° 19.367' O	<i>Pedraplén Ba. Golondrina</i>	desembocadura	BG	54° 50.335' S 68° 21.393' O

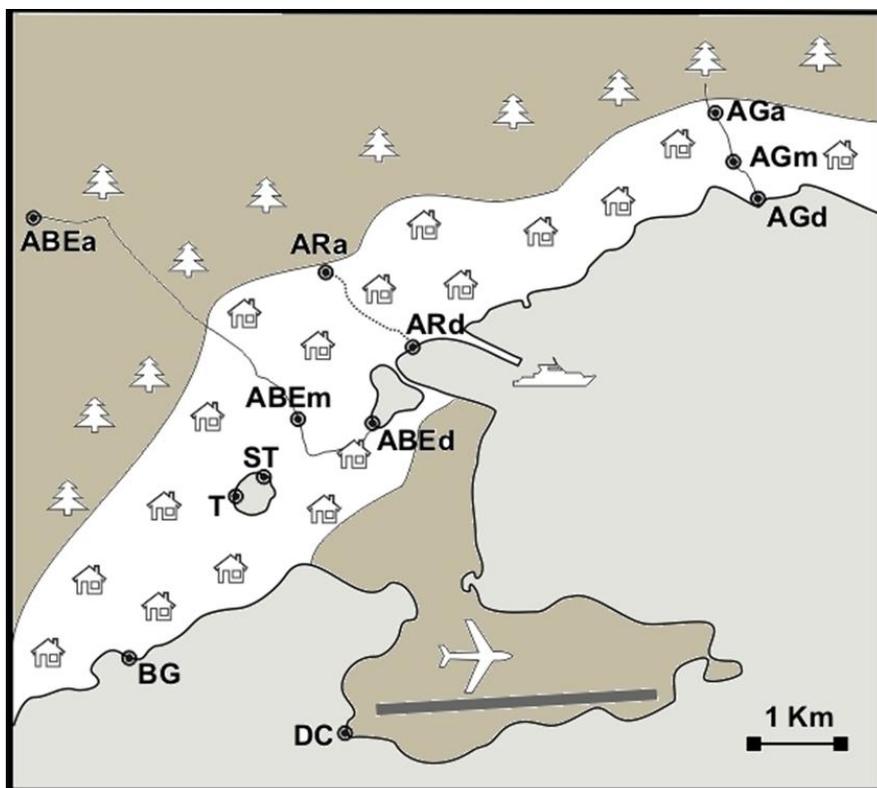


Figura 7. Mapa de la localización de los sitios de muestreo

Cada cuenca hídrica presenta características particulares de acuerdo al sitio que se considere. Por otro lado, cada una atraviesa diferentes sectores de la ciudad y recibe aportes de diversas sustancias antrópicas, por lo cual, es de importancia tener en cuenta todos los factores que en ellas influyen. A continuación se describirá más detalladamente cada uno de los sitios estudiados:

- **Cuenca del Arroyo Grande**

El **Arroyo Grande** es un curso de agua natural que nace en la montaña en el Valle de Andorra, atraviesa el ejido urbano y desemboca en la zona este de la ciudad de Ushuaia. El caudal medio en este tramo final es de $3.70 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$ (Iturraspe et al., 1989). Es la principal fuente de agua potable de la ciudad ya que suministra aproximadamente el 80% del agua tratada en las plantas potabilizadoras (Huelin Rueda, 2008). Además, es fuente de agua directa que provisiona algunos de los asentamientos irregulares de la ciudad y el riego de los cultivos en las pequeñas granjas del valle (Urciolo & Iturraspe, 2005).

Sin embargo, en su trayecto atraviesa parte del ejido urbano y potencialmente está expuesto a los aportes domiciliarios y cloacales sin tratamiento y a desechos industriales e infiltrados del primer relleno sanitario de la ciudad. Ya en su tramo final recorre la zona lindante a los establecimientos industriales y previo a su desembocadura se encuentra el Matadero Municipal, cuyos vertidos son volcados ocasionalmente en forma directa (Figura 8).



Figura 8. Fotografías de los sitios de muestreo sobre la cuenca del Arroyo Grande (alto, medio y desembocadura).

- **Cuenca del Arroyo Rodríguez**

El **Arroyo Rodríguez** es un curso de agua natural, poco caudaloso, que nace en la cordillera fueguina y cuando llega al límite superior del ejido urbano, se divide en dos ramas: una de ellas se une al Chorrillo del Este, el cual finalmente desemboca en la costa de Bahía Ushuaia, próximo al muelle de combustibles de Planta Orión. La otra rama atraviesa el cañadón “No me Olvides” ubicado en el sector urbano de la ciudad. Saliendo del mismo, es entubado y así recorre el casco viejo urbano. Finalmente desemboca sobre la línea de costa oeste-sudoeste de la Bahía Ushuaia, en la zona céntrica de la ciudad, a través de dos tuberías de 800 mm de diámetro aprox., que quedan descubiertas en bajamar (Figura 9).

Por encima del cañadón, se encuentran nuevos asentamientos irregulares, por lo cual a partir de este punto, es posible que presente aportes domiciliarios sin tratamiento.



Figura 9. Fotografías de los sitios de muestreo sobre la cuenca del Arroyo Rodríguez (alto y desembocadura).

- **Cuenca del Arroyo Buena Esperanza**

El **Arroyo Buena Esperanza** nace en los montes Martial en la cordillera fueguina a 1340 m y desemboca en la Bahía Encerrada después de un recorrido de aprox. 7 km en el cual atraviesa el ejido urbano de la ciudad (Urciolo & Iturraspe, 2005). El caudal medio de este arroyo varía entre 0.3 y 3 m³ seg⁻¹ dependiendo de las lluvias y eventos de deshielo (Torres et al., 2009). Sus aguas son hiposalinas, ligeramente bicarbonatadas, de gran transparencia y con un contenido de Fe moderadamente alto; aunque la turbidez aumenta durante las crecidas debido al arrastre de sedimentos (Iturraspe, 2007).

En la actualidad no existe ninguna actividad de carácter agrícola o ganadero dentro de la cuenca de este curso de agua. Únicamente se encuentra a los 110 msnm la planta potabilizadora N° 2 de la ciudad, a la cual aporta el 20% del agua cruda que se acondiciona allí (Huelin Rueda, 2008). Por encima de ese punto existen pequeñas tomas de agua para consumo de los asentamientos turísticos como hoteles, cabañas y refugios de montaña.

En su recorrido por el ejido urbano atraviesa sectores de viviendas con distinto grado de consolidación. Más precisamente, en sus tramos medio y final es donde recibe la mayoría de las descargas pluvio-cloacales, agua de escurrimiento de turbales y otros pequeños chorrillos, antes de desembocar en la Bahía Encerrada (Figura 10).



Figura 10. Fotografías de los sitios de muestreo sobre la cuenca del Arroyo Buena Esperanza (alto, medio y desembocadura).

- **Dispersor marítimo**

Como se mencionó en la introducción general, los líquidos cloacales que llegan hasta el **dispersor cloacal** no son tratados y se vuelcan directamente en la costa de Bahía Golondrina. Esta tubería de 600 mm de diámetro puede observarse directamente en condiciones de bajamar en el extremo occidental de la Península (Figura 11).

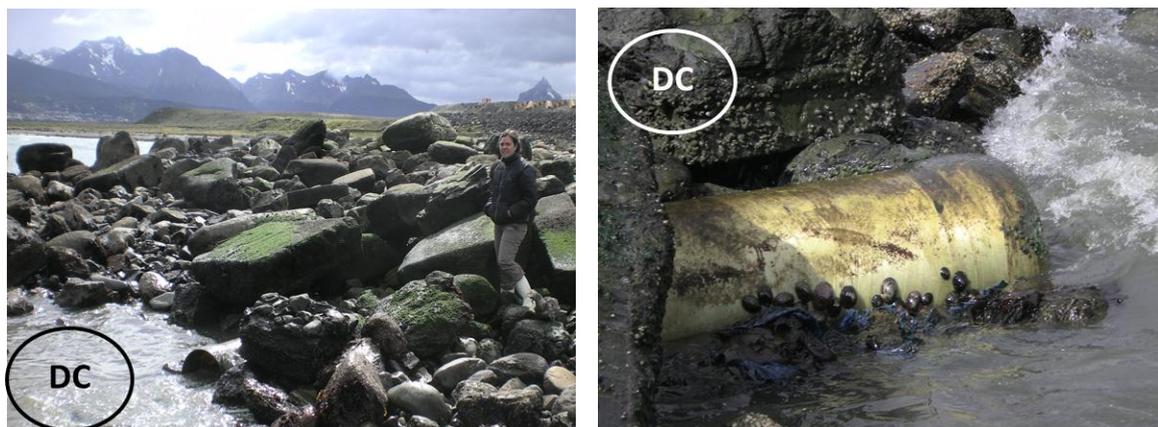


Figura 11. Fotografías del sitio de muestreo sobre la salida del Dispersor Cloacal.

- **Turbal Monte Gallinero**

Este turbal se encuentra emplazado en la zona urbana y presenta asentamientos irregulares y muy precarios que vierten sus residuos cloacales al mismo. Rodeando el turbal, existe una zanja por la cual drenan y circulan dichos líquidos (Figura 12). Finalmente este drenaje se conecta con el tramo final del Arroyo Buena Esperanza, mediante el Chorrillo Alegre, y desemboca en la Bahía Encerrada.



Figura 12. Fotografías del sector de muestreo sobre el turbal urbano (turbal y salida del turbal).

- **Bahía Golondrina**

El reciente crecimiento de la ciudad se ha proyectado sobre la costa de Bahía Golondrina aproximadamente a partir del año 2005. Este sector era considerado hace algunos años un sitio prístino. Actualmente conserva una apariencia de bajo impacto antropogénico aunque existen indicios de contaminación reciente. En este sector se ha construido una estación de bombeo de efluentes que colecta los residuos de esa zona de la ciudad cuyas instalaciones son nuevas pero aún no se encuentran habilitadas. Por lo tanto, los efluentes que llegan allí son evacuados directamente a través de un desborde del sistema cloacal protegido por un pedraplén que conduce y desemboca en la costa de Bahía Golondrina (Figura 13).

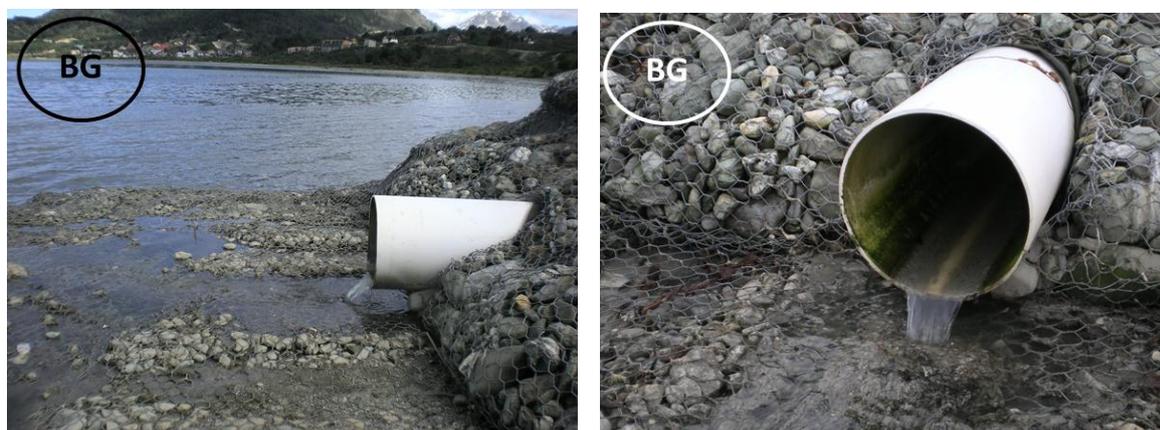


Figura 13. Fotografías del sitio de muestreo sobre la salida del colector cloacal en Bahía Golondrina.

3. Recolección y procesamiento de muestras

3.1 Recolección de muestras

El registro de variables y la recolección a campo de muestras de agua en los 12 sitios previstos y en las 9 fechas de muestreo consistió en:

1) medición de parámetros fisicoquímicos: se registraron *in situ* **temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH, conductividad y turbidez** utilizando una sonda multiparamétrica HORIBA U-10®.

2) recolección de muestras de agua: directamente del curso de agua o con la ayuda de un balde plástico. En los puntos de desembocadura, la muestra se tomó durante marea baja a fin de recolectar la muestra lo más cruda posible y evitar su mezcla con el cuerpo de agua receptor (agua de la costa). Estas muestras se recolectaron para determinar posteriormente en laboratorio los siguientes parámetros: nutrientes inorgánicos disueltos (NID), materia orgánica particulada (MOP), sólidos totales en suspensión (STS) y bacterias coliformes totales y fecales (CT y CF).

Las muestras destinadas a la determinación de NID, MOP y STS se recolectaron en botellas plásticas PET de 2.25 L acondicionadas para tal fin y en todos los casos se siguió el mismo procedimiento: enjuague de la botella con agua del lugar, posterior descarte y recolección final, completando la botella hasta el ras y cerrándola herméticamente. Las muestras destinadas a la determinación de CT y CF se recolectaron en envases plásticos estériles de 125 mL tomando las precauciones necesarias para evitar su contaminación.

Ambas muestras se mantuvieron en heladera plástica de campo hasta llegar al laboratorio. Todo el proceso de manipulación de muestras de agua siguió las normas internacionales de la USEPA descritas en los manuales de estudio de efluentes (USEPA, 2002a; 2002b).

3.2 Procesamiento de las muestras en laboratorio

Una vez en el laboratorio, las muestras se mantuvieron a 8°C y en oscuridad hasta su procesamiento, a fin de retardar la acción biológica y posible hidrólisis de compuestos y complejos químicos.

El procesamiento para determinar NID y MOP se realizó dentro de las 2 horas posteriores a la recolección de muestras y finalizó el mismo día. Para determinar STS se permitió un tiempo máximo de procesamiento de 72 horas. En el caso de la determinación de CT y CF, el cultivo comenzó inmediatamente después de la recolección y no se extendió por más de 2 horas desde el momento de muestreo.

- *Determinación de Nutrientes Inorgánicos Disueltos (nitratos, nitritos, amonio, fosfatos y silicatos)*

Las muestras para determinar NID se filtraron utilizando un equipo de filtración y una bomba de vacío, a través de un filtro de fibra de vidrio de 1.2 µm de poro y 47 mm de diámetro (Whatman GF/C) previamente calcinado (dentro de un sobre de papel aluminio a 450-500°C, de acuerdo a Strickland & Parsons (1972)).

Para la determinación de *nitratos* (NO_3^-), *nitritos* (NO_2^-), *fosfatos* (PO_4^{3-}) y *silicatos* (SiO_3^{3-}), la muestra filtrada se distribuyó en envases de plástico de 30 mL de capacidad previamente acondicionados con HCl y se preservaron a -20°C hasta el momento de su análisis (APHA-AWWA-WEF 1998). La concentración de estos nutrientes se determinó utilizando kits de reactivos colorimétricos WTW, cuya metodología está validada y es análoga a la metodología utilizada internacionalmente (DIN/ISO/EN/USEPA). Los protocolos de las técnicas para la determinación de nutrientes están desarrollados en el ANEXO I (página 214).

Para la determinación de *amonio* (NH_4^+), la muestra filtrada (ya sea cruda o diluida, según el caso) se preservó por duplicado en frascos de vidrio color ámbar previamente acondicionados. Se fijó la muestra con 1 mL de solución de fenol (fenol cristalino en alcohol etílico) y se conservó a 4°C y oscuridad hasta su determinación como máximo dentro de los 10 días. Los fundamentos de la determinación de amonio por la técnica del indofenol (Strickland & Parsons, 1972) están desarrollados en el ANEXO I (página 214).

- *Determinación de Materia Orgánica Particulada*

Las muestras destinadas a la determinación de *MOP* se filtraron de la misma manera que para la determinación de *NID*. En este caso, luego del filtrado se agregaron 4 mL de Na_2SO_4 anhidro al filtro con el material retenido para eliminar cloruros. El filtro de fibra de vidrio fue plegado en 4 y se conservó en sobre de papel aluminio a -20°C hasta su análisis. La concentración de *MOP* en el agua se obtuvo mediante el método de oxidación húmeda de Strickland & Parsons (1972) y su fundamentación está desarrollada en el ANEXO I (página 214).

- *Determinación de Sólidos Totales en Suspensión*

Para determinar la cantidad de *STS* presentes en la muestra, se filtró por duplicado un volumen conocido de agua (entre 50 y 500 mL, según el sitio) utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa Millipore de $0.45\ \mu\text{m}$ de poro y 47 mm de diámetro. La concentración de *STS* se calculó como la diferencia absoluta entre el peso seco del filtro vacío y el peso seco del filtro con muestra, corregida por el volumen filtrado. El fundamento y el protocolo de esta técnica se encuentran desarrollados en el ANEXO I (página 214).

- *Determinación de Bacterias Coliformes totales y fecales*

La detección y cuantificación de *CT* y *CF* se realizó mediante la técnica de fermentación de tubos múltiples ó número más probable (NMP). Se utilizó el **test de reactivos COLITAGTM** (CPI International) cuyo procedimiento análogo al 9221C y E (APHA-AWWA-WEF, 1998) está aprobado por la USEPA para la detección de bacterias indicadoras de contaminación fecal en agua potable, naturales y residuales.

El procedimiento consta de la incubación de la muestra de agua (cruda o diluida, según el caso) con el medio de cultivo selectivo ColitagTM durante 24 horas en estufa (las primeras 4 horas a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y posteriormente a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$). Finalizado este período, se observa la existencia de coloración amarilla en la muestra (lo que indica la presencia de *CT*) y una fluorescencia azul bajo lámpara que emite luz ultravioleta (lo que indica la presencia de bacterias *Escherichia coli*). Finalmente, se cuantifica de acuerdo a los valores obtenidos en la tabla del NMP. El protocolo detallado y la fundamentación de esta técnica están desarrollados en el ANEXO I (página 214).

3.3 Acondicionamiento previo del material utilizado

Para el acondicionamiento de todo el material utilizado se siguieron los protocolos establecidos por Strickland & Parsons (1972), APHA-AWWA-WEF (1998) y USEPA (2002a).

El material utilizado para la recolección de muestras se lavó con detergente no iónico diluido, se enjuagó repetidas veces con agua corriente, luego con agua destilada y finalmente se sumergió en HCl al 5% (v/v) por 24 horas. Al día siguiente se enjuagó varias veces con agua destilada y se secó en estufa a 35-40°C.

Los frascos plásticos y los tubos de ensayos utilizados en la conservación y determinación de NID (NO_3^- ; NO_2^- ; PO_4^{3-} y SiO_3^{3-}) se sumergieron en HCl 5% por 24 horas. Posteriormente se enjuagaron varias veces con agua destilada y se secaron en estufa a 35-40°C.

Los frascos de vidrio color ámbar utilizados en la determinación de amonio se mantuvieron con solución sulfonítrica por 24 horas, luego se enjuagaron intensamente con agua destilada y se secaron en estufa. Posteriormente se sumergieron en HCl 5% por 24 horas, luego se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 35-40°C. Una vez secos, se cerraron con papel aluminio previamente a la tapa plástica para evitar la contaminación con amonio atmosférico (Strickland & Parsons, 1972).

El material utilizado en la determinación de MOP (probetas y tubos de ensayo) se dejó por 24 horas en solución sulfonítrica, luego se enjuagó con agua destilada y se secó en estufa. Posteriormente se sumergió en HCl 5% por 24 horas, se lavó con agua destilada y se secó en estufa a 35-40°C.

El material empleado para la detección y cuantificación de CT y CF (tubos de ensayo, pipetas, tips, recipientes, varillas de vidrio, entre otros) se esterilizó mediante autoclavado a 121°C durante 15-20 minutos. Luego se preservaron en un lugar seco y protegido.

Nota: En el acondicionamiento del material para determinar amonio y MOP se utilizó la combinación solución sulfonítrica + HCl en lugar de solución sulfocrómica debido a la menor peligrosidad en la manipulación que presenta la primera.

4. Análisis Estadístico

A partir de los datos obtenidos en las 9 fechas de muestreo y en los 12 sitios estudiados, se realizó un **Análisis de la Varianza** (ANOVA) a fin de evaluar la existencia de diferencias significativas en los valores de los parámetros obtenidos entre los sitios de muestreo. Se considera que los datos de calidad de aguas siguen un proceso estocástico, es decir que son variables al azar y por lo tanto no siguen una distribución normal (Demayo & Steel, 1996; Dixon & Chiswell, 1996). Es por ello que previamente se analizó el supuesto de normalidad de los datos utilizando gráficos de valores esperados vs. observados (q-q plot) y el test de Shapiro-Wilk; y la homocedasticidad con el test de Levene (Sokal & Rohlf, 1981). En el caso de datos que no normales ni homocedásticos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Daniel, 1978).

En el presente trabajo se realizó un análisis multivariado (Análisis de Componentes Principales y Análisis Factorial) utilizando 13 variables (temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad, turbidez, nitratos, nitritos, amonio, fosfatos, silicatos, materia orgánica particulada, sólidos totales en suspensión y coliformes fecales) con el fin de: i) verificar la existencia de algún patrón particular de asociación entre los 12 sitios estudiados y ii) reducir la cantidad de variables formando nuevos CP, evitando la pérdida de información, de modo tal de poder aplicar los resultados obtenidos en este análisis en próximos monitoreos ambientales. Se realizó una matriz de correlación ya que las variables presentaban distintas unidades de medida. Según Legendre & Legendre (1998), los coeficientes de correlación son significativos cuando son mayores a $\sqrt{d/n}$, donde d es el número de CP y n el número de variables. Aquí se siguió este criterio para definir la significancia de las correlaciones tanto entre variables como entre éstas y los CP. La extracción de los factores se realizó mediante la técnica de componentes principales y aquellos que presentaron autovalores mayores a 1 fueron los que se tuvieron en cuenta para el posterior análisis. Para una mejor interpretación de la estructura factorial se utilizó la rotación Varimax.

Tanto los análisis de varianza como los multivariados se realizaron con el Software estadístico STATISTICA 6.0 trabajando con un $p < 0.05$.

5. Índice de Calidad de Aguas (ICA)

En este trabajo de tesis doctoral se utilizó un índice general de calidad de aguas basado en las mediciones de parámetros físicos, químicos y microbiológicos. Este ICA es un número adimensional que atribuye un valor de calidad a un grupo de parámetros medidos. La construcción del ICA requiere primero de un paso de normalización, en el cual cada parámetro es transformado en una escala de 0 a 100, donde 100 representa la calidad más alta. El siguiente paso es aplicar factores de peso que reflejen la importancia de cada parámetro como un indicador de la calidad del agua (Pesce & Wunderlin, 2000). De esta manera, el ICA provee un número que puede ser asociado con un porcentaje de calidad, fácil de interpretar y basado en criterios científicos.

En este caso, se calculó para cada sitio de estudio el ICA desarrollado por la Fundación Nacional de Saneamiento (*National Sanitation Foundation*, NSF) de Estados Unidos, cuyos ICAs son utilizados tradicionalmente desde 1970. Este índice se basa en la medición de un máximo de nueve parámetros: cambio de temperatura, pH, oxígeno disuelto, turbidez, coliformes fecales, DBO₅, fósforo total, nitratos y sólidos en suspensión. Los valores finales del ICA se asignan dentro de una categoría de acuerdo al nivel de calidad de agua (excelente- buena- media- mala- muy mala).

En el presente trabajo, para el cálculo del ICA se utilizó una plantilla de cálculo tomada del Water Research Center, B.F. Environmental Consultants Inc., Dallas, USA, acorde al *Field Manual for Water Quality Monitoring* de la NSF (2007) y disponible en internet (www.water-research.net/watrqualindex/index.htm).

RESULTADOS

1. Descripción de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Distribución temporal y espacial

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a la distribución temporal (variación entre fechas de muestreo) y a la distribución espacial (variación entre sitios) de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos registrados durante las 9 fechas de muestreo (octubre 2009 a febrero 2011) en los 12 puntos de estudio seleccionados.

Algunos de los parámetros estudiados cumplieron con el supuesto de homocedasticidad (temperatura $p=0.1577$; pH $p=0.6918$; nitratos $p=0.3110$; silicatos $p=0.0580$), mientras que solo uno lo hizo con el de normalidad (temperatura $p=0.0728$) (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de los estadísticos para los Tests de normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y de homocedasticidad (Test de Levene) para cada parámetro evaluado. Temp: temperatura, OD: oxígeno disuelto, pH, Sal: salinidad, Cond: conductividad, Turb: turbidez, NO_3^- : nitratos, NO_2^- : nitritos, NH_4^+ : amonio, PO_4^{3-} : fosfatos, SiO_3^{3-} : silicatos, MOP: materia orgánica particulada, STS: sólidos totales en suspensión, CT: coliformes totales, CF: coliformes fecales.

	Shapiro-Wilk		Levene	
	W	p	F	p
Temp	0,98	0,0703	1,47	0,1577
OD	0,96	0,0032	2,92	0,0026
pH	0,97	0,0261	0,75	0,6919
Sal	0,34	0,0000	20,76	0,0000
Cond	0,35	0,0000	20,93	0,0000
Turb	0,51	0,0000	5,33	0,0000
NO_3^-	0,78	0,0000	1,18	0,3110
NO_2^-	0,87	0,0000	3,38	0,0007
NH_4^+	0,80	0,0000	6,53	0,0000
PO_4^{3-}	0,82	0,0000	5,38	0,0000
SiO_3^{3-}	0,96	0,0056	1,85	0,0580
MOP	0,50	0,0000	4,52	0,0000
STS	0,41	0,0000	3,80	0,0002
CT	0,47	0,0000	5,15	0,0000
CF	0,43	0,0000	7,02	0,0000

Parámetros hidrológicos

• Temperatura

La temperatura siguió una tendencia temporal similar en todos los sitios a lo largo de las fechas de muestreo, con máximos valores registrados en Dic10 y Feb11 y mínimos en Jun10 y Ago10. Además, las temperaturas oscilaron entre un mínimo de 0.6°C (AGa; Jun10) y un máximo de 18.2°C (T; Dic10). La mayor mediana (13.1°C) se registró en T y la menor (2.9°C) en ABEa (Figura 14, Tabla 4).

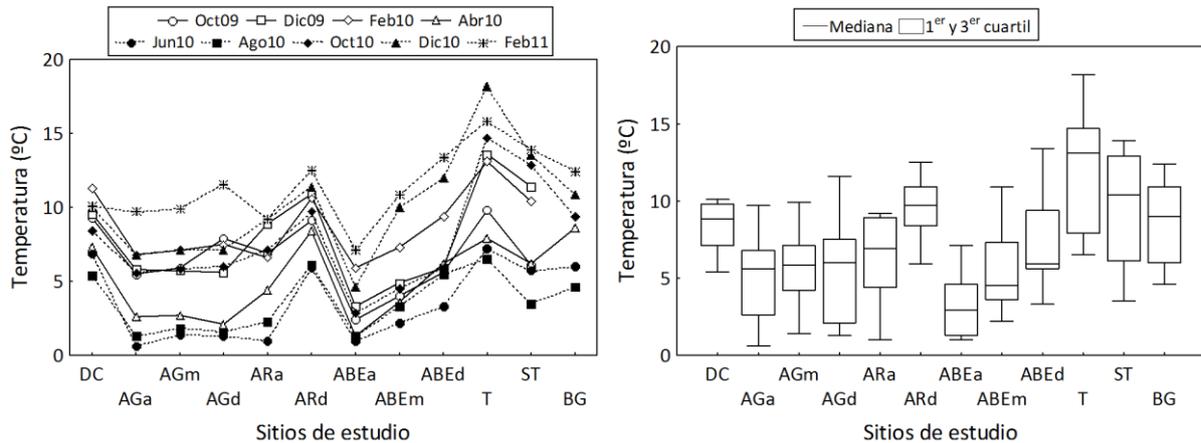


Figura 14. Distribución temporal y espacial de la temperatura en los sitios de estudio.

• Oxígeno disuelto

Los valores de oxígeno disuelto fueron mínimos en los sitios T y ST (< 2 mg/L), mientras que en ABEa, ABEEm y en los 3 sitios de la cuenca del Arroyo Grande los valores registrados correspondieron a la máxima saturación de oxígeno (superiores al 100%). En general, los valores más altos se registraron durante las épocas de menor temperatura (Figura 15, Tabla 4).

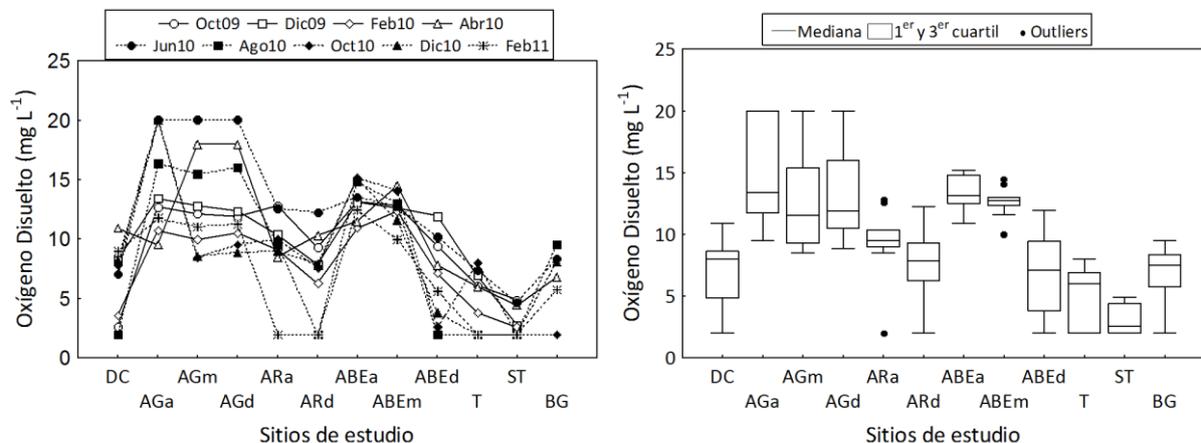


Figura 15. Distribución temporal y espacial del oxígeno disuelto en los sitios de estudio.

- **pH**

El valor mínimo de pH registrado fue de 5.5 en T (Jun10) y el máximo de 7.93 en DC (Feb11). El sitio ARa presentó valores bajos para todas las fechas (media: 6.60 ± 0.3). La distribución tendió a ser homogénea en todo el período de estudio aunque los valores de Abr10 difirieron significativamente de los estivales (Figura 16, Tabla 4).

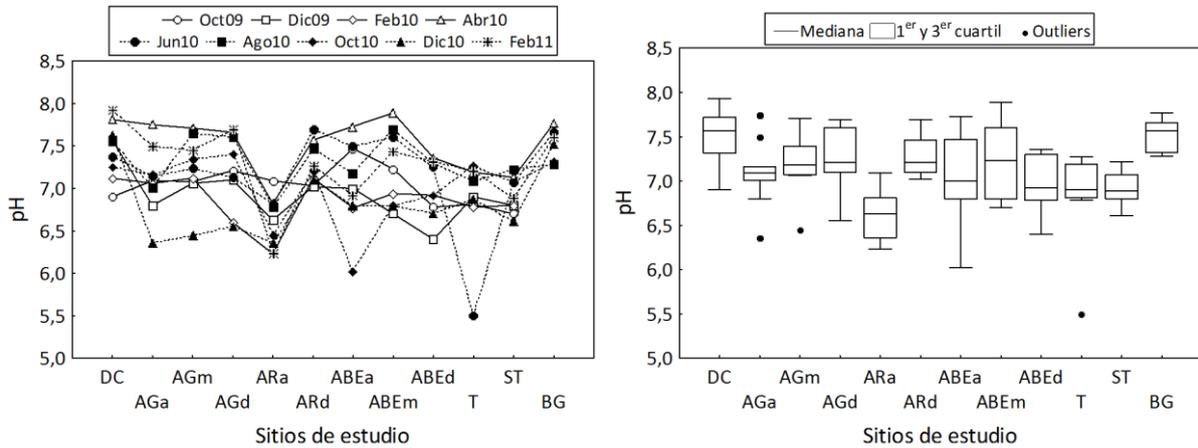


Figura 16. Distribución temporal y espacial del pH en los sitios de estudio.

- **Turbidez**

La turbidez presentó un rango de variación entre 7 NTU (ARa; Feb11) y 800 NTU, valor máximo posible de ser detectado por el sensor utilizado (Oct09 y Feb10 en DC; Feb11 en T y ST). Los mayores valores se registraron en los meses de Oct09 y Dic09 (Figura 17, Tabla 4).

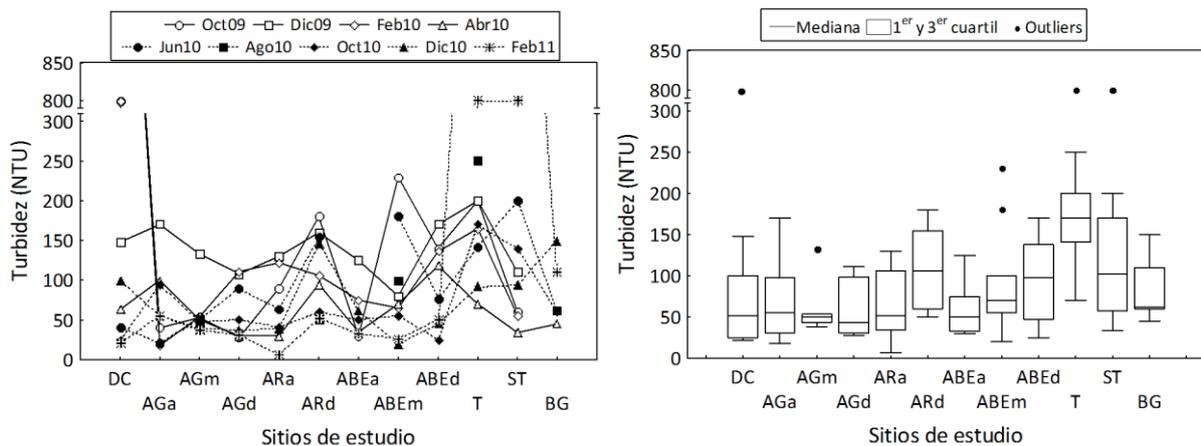


Figura 17. Distribución temporal y espacial de la turbidez en los sitios de estudio.

- **Salinidad y Conductividad**

La mayor variación tanto de salinidad como de conductividad se presentó en DC (media: 13.9 ± 7.8 para salinidad y 22.34 ± 13.53 mS cm⁻¹ para conductividad), mientras que en los restantes sitios estudiados, estos parámetros presentaron niveles mínimos en todas las fechas de muestreo. Sin embargo, tanto en AGd y ARd como en ABEd se registraron algunos valores más elevados (Figuras 18 y 19; Tabla 4).

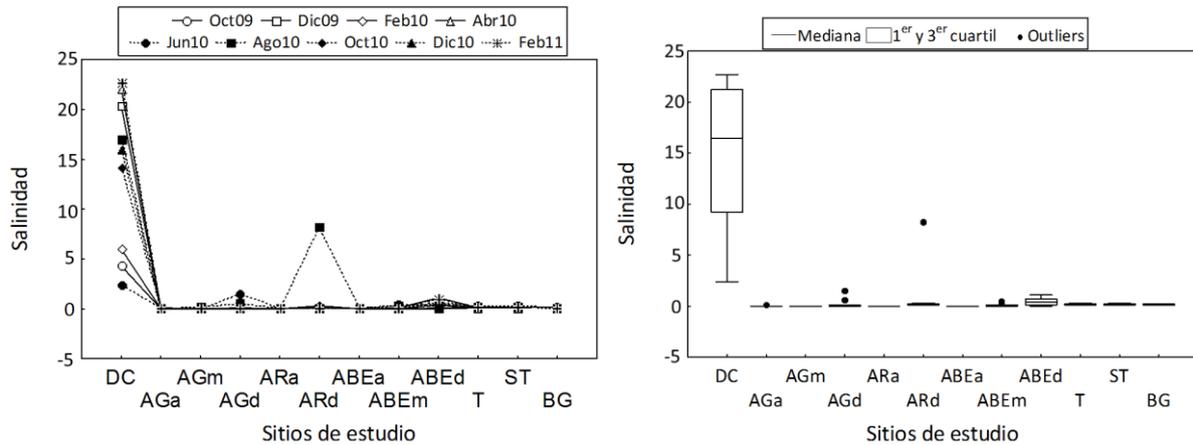


Figura 18. Distribución temporal y espacial de la salinidad en los sitios de estudio.

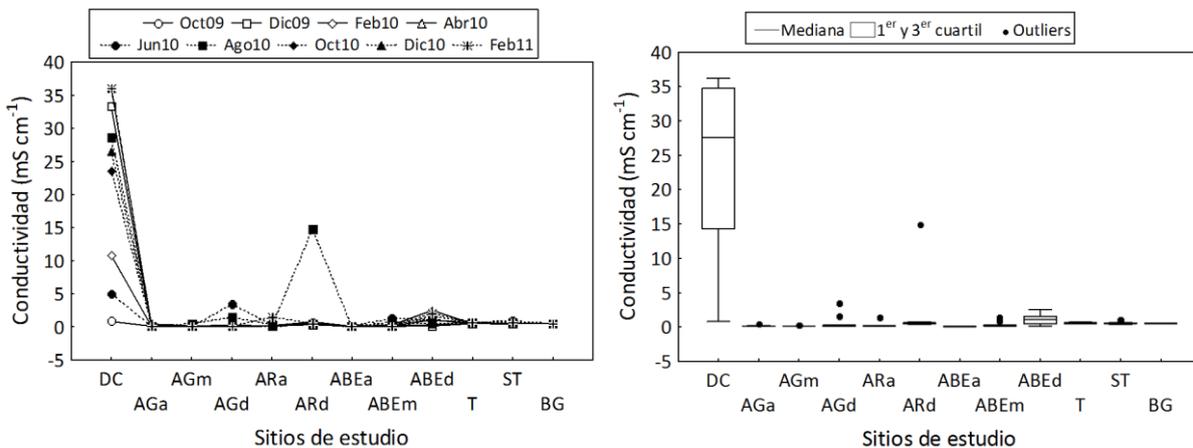


Figura 19. Distribución temporal y espacial de la conductividad en los sitios de estudio.

Tabla 4. Mediana, mínimo y máximo de los parámetros hidrológicos registrados en las fechas de muestreo para cada sitio de estudio: temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg L⁻¹), pH, turbidez (NTU), salinidad y conductividad (mS cm⁻¹).

	Temperatura		Oxígeno disuelto		pH		Turbidez		Salinidad		Conductividad	
	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx
DC	9,3	5,4- 11,3	7,8	2-10,9	7,56	6,9-7,93	63,0	22-800	15,9	2,4-22,7	26,60	0,81-36,2
AGa	5,6	0,6- 9,7	13,4	9,5-20	7,09	6,36-7,75	55,5	18-170	0	0-0,1	0,11	0,08-0,42
AGm	5,8	1,4- 9,9	12,1	8,5-20	7,24	6,44-7,71	50,0	38-133	0	0-0,2	0,13	0,08- 0,58
AGd	6,0	1,3- 11,6	11,9	8,8-20	7,21	6,55-7,69	43,5	28-111	0	0-1,5	0,14	0,08-3,44
ARa	6,9	1- 9,2	9,5	2-12,8	6,63	6,23-7,09	51,5	7-130	0	0	0,16	0,10-1,47
ARd	9,7	5,9-12,5	7,9	2-12,3	7,21	7,02-7,69	106,0	50-180	0,1	0,1-8,2	0,47	0,34-14,8
ABEa	2,9	1- 7,1	13,2	10,9-15,2	7,00	6,02-7,73	50,0	30-125	0	0	0,06	0,05-0,08
ABEm	4,5	2,2-10,9	12,8	9,9- 14,5	7,23	6,7- 7,89	70,0	20-230	0	0-0,5	0,18	0,08-1,33
ABEd	5,9	3,3-13,4	7,1	2-11,9	6,92	6,4- 7,36	97,5	25-170	0,4	0-1,1	1,06	0,14- 2,5
T	13,1	6,5-18,2	6,0	2-8	6,90	5,5-7,27	170,0	70-800	0,2	0,1-0,3	0,56	0,47-0,72
ST	10,4	3,5-13,9	2,6	2-4,89	6,89	6,61-7,22	102,5	34-800	0,2	0,1-0,3	0,54	0,41-0,93
BG	9,0	4,6-12,4	7,5	2-9,5	7,57	7,28-7,77	62,0	45-150	0,2	0,1-0,2	0,51	0,44-0,56

Los 6 parámetros hidrológicos registrados presentaron diferencias significativas entre los 12 sitios de estudio, siendo la temperatura analizada mediante ANOVA ($F=5.60$ y $p=0.0000$), y los otros 5 parámetros mediante el Test de Kruskal-Wallis (oxígeno disuelto: $H=73.43$ y $p=0.0000$; pH: $H=34.76$ y $p=0.0003$; turbidez: $H=24.24$ y $p=0.0117$; salinidad: $H=70.92$ y $p=0.0000$; conductividad: $H=71.57$ y $p=0.0000$). Temporalmente, se detectaron diferencias significativas en la temperatura ($F=11.52$ y $p=0.0000$), el pH ($H=37.33$ y $p=0.0000$) y la turbidez ($H=18.64$ y $p=0.0169$), siendo no significativas para el oxígeno disuelto ($H=9.08$ y $p=0.3359$), salinidad ($H=9.43$ y $p=0.3072$) y conductividad ($H=13.42$ y $p=0.0982$).

Las comparaciones múltiples de los parámetros hidrológicos entre los sitios y entre fechas de estudio se presentan a continuación en las Tablas 5 a 10.

Tabla 5. Comparaciones múltiples para temperatura (test de Tukey) y oxígeno disuelto (Test de Kruskal-Wallis) entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		Temperatura											
Oxígeno disuelto	Sitios	DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG
	DC		0,3066	0,4352	0,6110	0,8435	1,0000	0,0167	0,6110	0,9994	0,5625	1,0000	1,0000
	AGa	0,0208		1,0000	1,0000	0,9995	0,1075	0,9917	1,0000	0,8510	0,0005	0,1272	0,5006
	AGm	0,2833	1,0000		1,0000	1,0000	0,1748	0,9697	1,0000	0,9313	0,0010	0,2031	0,6305
	AGd	0,2209	1,0000	1,0000		1,0000	0,2938	0,9032	1,0000	0,9813	0,0024	0,3332	0,7776
	ARa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,5355	0,7050	1,0000	0,9991	0,0086	0,5841	0,9290
	ARd	1,0000	0,0552	0,6260	0,4973	1,0000		0,0034	0,2938	0,9721	0,8618	1,0000	1,0000
	ABEa	0,0257	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0672		0,9032	0,1689	0,0001	0,0043	0,0581
	ABEm	0,0815	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1971	1,0000		0,9813	0,0024	0,3332	0,7776
	ABEd	1,0000	0,0302	0,3837	0,3012	1,0000	1,0000	0,0370	0,1141		0,1138	0,9813	0,9999
	T	1,0000	0,0006	0,0140	0,0103	1,0000	1,0000	0,0007	0,0030	1,0000		0,8280	0,7003
	ST	1,0000	0,0000	0,0014	0,0010	0,3701	1,0000	0,0001	0,0003	1,0000	1,0000		1,0000
	BG	1,0000	0,0000	0,0005	0,0003	0,4867	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Tabla 6. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para pH y turbidez entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		pH											
Turbidez	Sitios	DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG
	DC		1,0000	1,0000	1,0000	0,0016	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3917	0,1677	1,0000
	AGa	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	AGm	1,0000	1,0000		1,0000	0,1151	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	AGd	1,0000	1,0000	1,0000		0,1721	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ARa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,0710	1,0000	0,2385	1,0000	1,0000	1,0000	0,0440
	ARd	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1644		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEd	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	T	0,6775	0,0412	0,0213	0,0101	0,0266	1,0000	0,0036	1,0000	0,7548		1,0000	1,0000
	ST	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	BG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6061	1,0000	1,0000	1,0000	0,0013	1,0000	

Tabla 7. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para salinidad y conductividad entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		Salinidad												
Conductividad	Sitios	DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG	
		DC		0,0000	0,0001	0,0044	0,0000	1,0000	0,0000	0,0030	1,0000	1,0000	1,0000	0,0002
		AGa	0,0000		1,0000	1,0000	1,0000	0,2974	1,0000	1,0000	0,1514	0,2356	0,3562	1,0000
		AGm	0,0002	1,0000		1,0000	1,0000	0,4457	1,0000	1,0000	0,2327	0,3562	0,5301	1,0000
		AGd	0,0058	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
		ARa	0,0028	1,0000	1,0000	1,0000		0,1296	1,0000	1,0000	0,0627	0,1009	0,1573	1,0000
		ARd	1,0000	0,2385	0,9441	1,0000	1,0000		0,1296	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
		ABEa	0,0000	1,0000	1,0000	0,5741	0,9543	0,0013		1,0000	0,0627	0,1009	0,1573	1,0000
		ABEm	0,0115	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3478			1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
		ABEd	1,0000	0,0309	0,1573	1,0000	1,0000	1,0000	0,0001	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
		T	1,0000	0,0740	0,3396	1,0000	1,0000	1,0000	0,0002	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
		ST	1,0000	0,1230	0,5301	1,0000	1,0000	1,0000	0,0005	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
		BG	0,0001	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0824	1,0000	0,4181	0,9800	1,0000	

Tabla 8. Comparaciones múltiples para la temperatura (Test de Tukey) y para el oxígeno disuelto (Test de Kruskal-Wallis) entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

		Temperatura									
Oxígeno Disuelto	Fecha	Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11	
		Oct09		0,9848	0,6821	0,9359	0,1905	0,2115	0,9860	0,0795	0,0026
		Dic09	1,0000		0,9968	0,3520	0,0123	0,0144	1,0000	0,5652	0,0623
		Feb10	1,0000	1,0000		0,0587	0,0008	0,0010	0,9950	0,9628	0,3653
		Abr10	1,0000	1,0000	1,0000		0,9032	0,9207	0,3424	0,0011	0,0001
		Jun10	1,0000	1,0000	0,8679	1,0000		1,0000	0,0106	0,0001	0,0001
		Ago10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,0125	0,0001	0,0001
		Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,5109	0,0469
		Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,9657
		Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6130	1,0000	1,0000	1,0000	

Tabla 9. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para pH y turbidez entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

		pH									
Turbidez	Fecha	Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11	
		Oct09		1,0000	1,0000	0,0160	1,0000	0,9629	1,0000	1,0000	1,0000
		Dic09	1,0000		1,0000	0,0007	0,3416	0,1029	1,0000	1,0000	0,1251
		Feb10	1,0000	1,0000		0,0003	0,2051	0,0581	1,0000	1,0000	0,0713
		Abr10	1,0000	0,2352	1,0000		1,0000	1,0000	0,2009	0,0005	1,0000
		Jun10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	0,2669	1,0000
		Ago10	0,0017	0,0000	0,0007	1,0000	0,0042		1,0000	0,0780	1,0000
		Oct10	1,0000	0,3392	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
		Dic10	1,0000	0,7449	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,0953
		Feb11	1,0000	0,1278	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Tabla 10 Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para salinidad y conductividad entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

		Salinidad								
Fecha		Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11
Conductividad	Oct09		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Dic09	1,0000		1,0000	1,0000	0,8235	0,4775	1,0000	1,0000	1,0000
	Feb10	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Abr10	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Jun10	0,9965	0,1334	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ago10	0,5491	0,0636	0,8308	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
	Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Nutrientes Inorgánicos Disueltos

• Nitratos

La concentración de nitratos fue no detectable ($nd < 0.01 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) en varios sitios (DC, AGa, AGm, ABEa, ABEd y ST), mientras que el máximo valor de $24.6 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ se presentó en ARa (Ago10), observándose allí gran variabilidad a lo largo del año. Para 6 de los sitios estudiados, la máxima concentración se registró en Feb10, mientras que la mínima se encontró en Dic09 (Figura 20, Tabla 11).

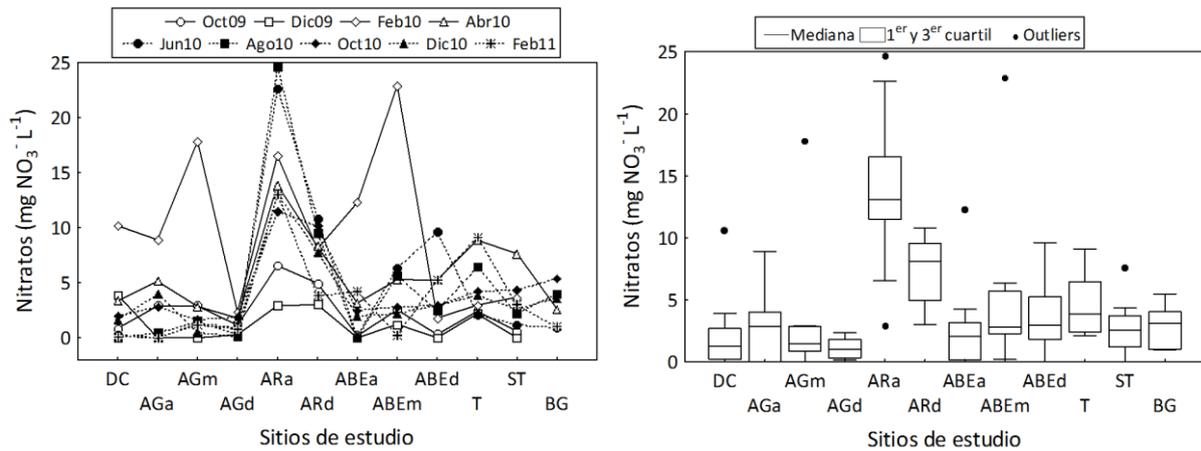


Figura 20. Distribución temporal y espacial de la concentración de nitratos en los sitios de estudio.

• Nitritos

Los valores de nitritos fueron mínimos en los sitios ubicados en la cuenca del Arroyo Grande y en ABEa ($0.11 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$), mientras que las mayores concentraciones se presentaron en T ($0.43 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$; Feb11) y en ARd ($0.30 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$; Feb11). Se observó la misma tendencia temporal en cada sitio de estudio (Figura 21, Tabla 11).

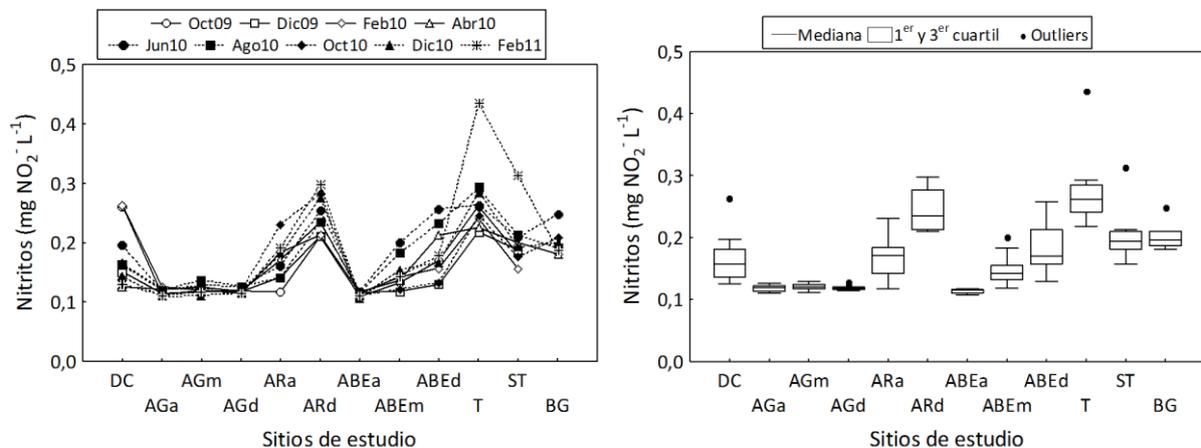


Figura 21. Distribución temporal y espacial de la concentración de nitritos en los sitios de estudio.

- **Amonio**

La concentración de amonio fue no detectable ($nd < 0.01 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) en los tres sitios de mayor altitud (AGa, ARa y ABEa), mientras que fue máxima en BG ($47.4 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$; Abr10) y en T ($39.8 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$; Jun10). En general, los máximos valores se hallaron en Abr10 y Jun10 (Figura 22, Tabla 11).

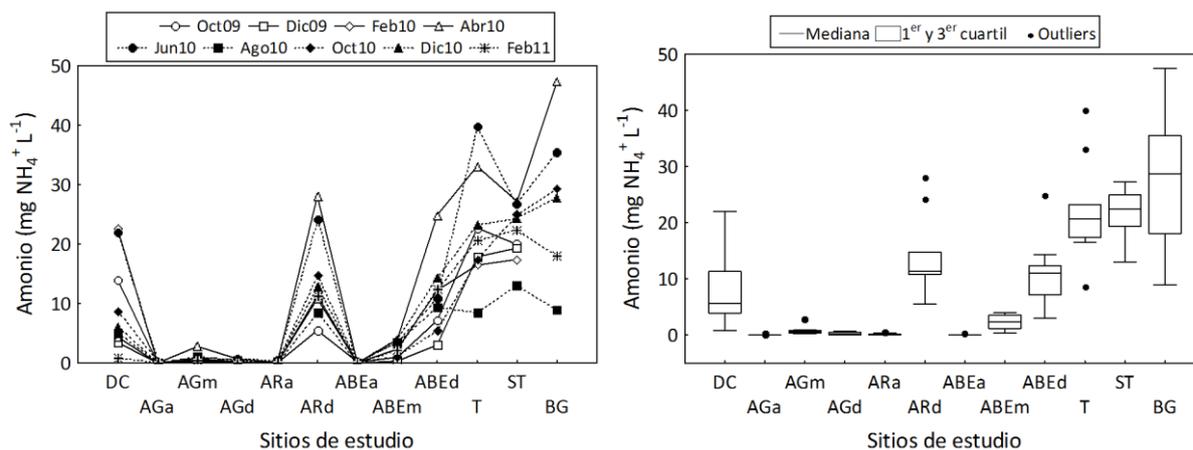


Figura 22. Distribución temporal y espacial de la concentración de amonio en los sitios de estudio.

El **DIN** (del inglés *Dissolved Inorganic Nitrogen*) es un índice que incluye la concentración de todo el Nitrógeno Inorgánico Disuelto presente en la muestra y consiste en la suma de las concentraciones de nitratos, nitritos y amonio. En la Figura 23 se observa que los valores medios más altos de DIN se presentan en los sitios ARa (14.2 mg L^{-1}), ARd (21.8 mg L^{-1}), ST (24.7 mg L^{-1}), T (27.1 mg L^{-1}) y BG (31 mg L^{-1}).

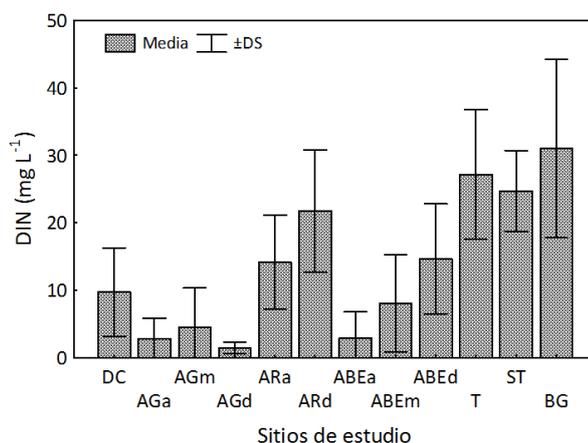


Figura 23. Nitrógeno Inorgánico Disuelto total (DIN) en los sitios de estudio.

Sin embargo, la contribución de cada especie de N al DIN es diferente en cada caso (Figura 24). Se observa que el DIN de los sitios DC, ARd, ABEd, T, ST y BG está compuesto en más del 60% por amonio, mientras que el sitio ARa presenta casi su totalidad en la forma de nitratos (97.5%).

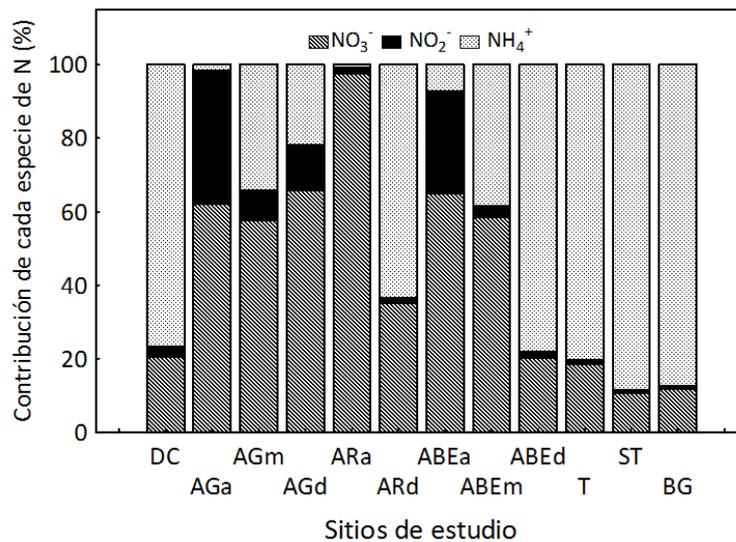


Figura 24. Contribución porcentual de cada especie de N (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+) al DIN para los sitios de estudio. Valor promedio de las 9 fechas de muestreo.

- **Fosfatos**

Los valores de fosfatos variaron desde $0.06 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ en AGa (Oct09) hasta $11.9 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ en T (Feb11). Los mayores valores registrados corresponden a los sitios DC, ARd, ABEd, T, ST y BG, siendo mayores los valores determinados en las épocas de mayor temperatura (Feb10, Dic10 y Feb11) (Figura 25, Tabla 11).

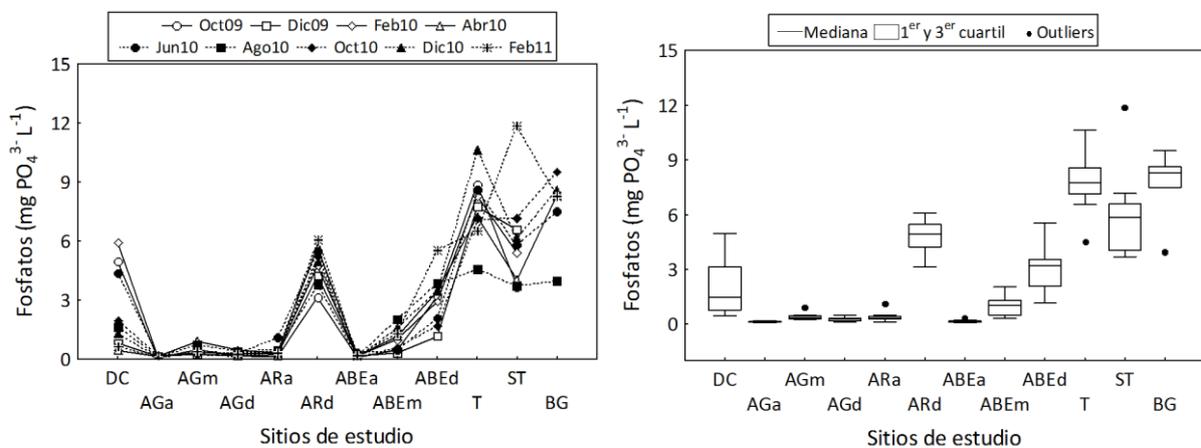


Figura 25. Distribución temporal y espacial de la concentración de fosfatos en los sitios de estudio.

- **Silicatos**

La mínima concentración de silicatos se registró en ARa (0.19 mg SiO₃³⁻ L⁻¹, Dic10) y la máxima en T (5.67 mg SiO₃³⁻ L⁻¹, Ago10). En forma general, en los meses de Dic09 y Dic10 se registraron los menores valores, mientras que los mayores se detectaron en Jun10 y Ago10 (Figura 26, Tabla 11).

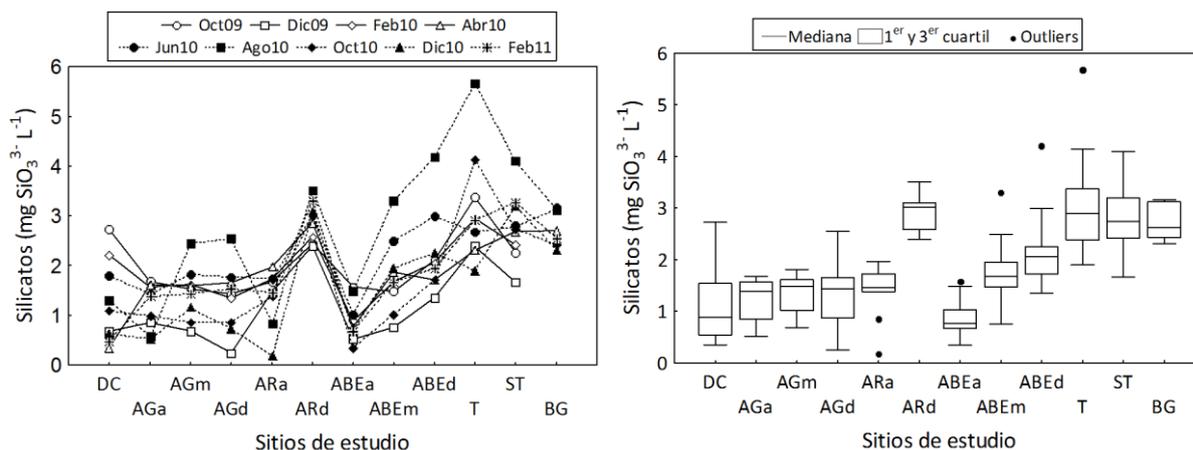


Figura 26. Distribución temporal y espacial de la concentración de silicatos en los sitios de estudio.

Tabla 11. Mediana, mínimo y máximo de la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos registrados en las fechas de muestreo para cada sitio de estudio: nitratos (mg NO₃⁻ L⁻¹), nitritos (mg NO₂⁻ L⁻¹), amonio (mg NH₄⁺ L⁻¹), fosfatos (mg PO₄³⁻ L⁻¹) y silicatos (mg SiO₃³⁻ L⁻¹).

	Nitratos		Nitritos		Amonio		Fosfatos		Silicatos	
	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx
DC	1,65	nd-10,18	0,16	0,13-0,26	6,12	0,80-22,54	1,61	0,44-5,92	1,09	0,35-2,72
AGa	2,85	nd-8,92	0,12	0,11-0,13	0,00	nd-0,25	0,11	0,06-0,19	1,39	0,51-1,68
AGm	1,47	nd-17,87	0,12	0,11-0,14	0,65	0,22-2,77	0,38	0,25-0,90	1,53	0,68-2,45
AGd	0,99	0,14-2,34	0,12	0,11-0,13	0,15	0,07-0,68	0,27	0,12-0,47	1,43	0,24-2,55
ARa	13,08	2,92-24,6	0,17	0,12-0,23	0,05	nd-0,5	0,31	0,12-1,11	1,46	0,19-1,96
ARd	8,08	3,01-10,79	0,23	0,21-0,30	11,31	5,48-28,11	4,94	3,14-6,07	3,02	2,4- 3,51
ABEa	2,03	nd-12,3	0,12	0,11-0,12	0,00	nd-0,19	0,16	0,09-0,32	0,77	0,34-1,57
ABEm	2,78	0,19-22,94	0,14	0,12- 0,2	2,32	0,32-3,94	1,01	0,32-2,04	1,68	0,76-3,30
ABEd	2,95	nd-9,61	0,17	0,13-0,26	10,98	3,03-24,9	3,19	1,15-5,53	2,06	1,35-4,19
T	3,85	2,12-9,11	0,26	0,22-0,43	20,65	8,42-39,8	7,73	4,55-10,6	2,90	1,90-5,67
ST	2,57	nd-7,64	0,19	0,16-0,31	22,38	13- 27,2	5,83	3,68-11,9	2,74	1,66-4,10
BG	3,12	0,97-5,46	0,20	0,18-0,25	28,67	8,92-47,42	8,31	3,97- 9,5	2,62	2,31-3,16

Los 5 nutrientes inorgánicos disueltos estudiados presentaron diferencias significativas en su distribución espacial al ser analizados mediante el Test de Kruskal-Wallis

(nitratos: $H=39.72$ y $p=0.0000$; nitritos: $H=83.47$ y $p=0.0000$; amonio: $H=92.69$ y $p=0.0000$; fosfatos: $H=93.17$ y $p=0.0000$; silicatos: $H=65.27$ y $p=0.0000$). Temporalmente, se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de nitratos ($H=24.22$ y $p=0.0021$) y silicatos ($H=15.86$ y $p=0.0444$), mientras que no se detectaron en nitritos ($H=4.57$ y $p=0.8028$), amonio ($H=4.34$ y $p=0.8252$) y fosfatos ($H=2.43$ y $p=0.9649$).

Las comparaciones múltiples de los nutrientes inorgánicos disueltos entre los sitios y entre las fechas de estudio se presentan a continuación en las Tablas 12 a 17.

Tabla 12. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para nitratos y nitritos entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		Nitratos											
Sitios	DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG	
Nitritos	DC		1,0000	1,0000	1,0000	0,0095	0,1810	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	AGa	0,2054		1,0000	1,0000	0,0199	0,3276	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	AGm	1,0000	1,0000		1,0000	0,0117	0,2133	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	AGd	0,4405	1,0000	1,0000		0,0002	0,0066	1,0000	1,0000	1,0000	0,4615	1,0000	
	ARa	1,0000	0,5741	1,0000	1,0000		1,0000	0,0110	1,0000	0,2385	1,0000	0,0943	
	ARd	1,0000	0,0000	0,0008	0,0002	1,0000		0,2028	1,0000	1,0000	1,0000	0,0039	
	ABEa	0,0205	1,0000	1,0000	1,0000	0,0700	0,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
	ABEm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1978	0,5549		1,0000	1,0000	1,0000	
	ABEd	1,0000	0,1167	0,7347	0,2600	1,0000	1,0000	0,0105	1,0000		1,0000	1,0000	
	T	1,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,6008	1,0000	0,0000	0,0771	1,0000		1,0000	0,6923
	ST	1,0000	0,0119	0,1050	0,0305	1,0000	1,0000	0,0007	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	BG	1,0000	0,6554	1,0000	1,0000	1,0000	0,0321	0,0488	1,0000	1,0000	0,0085	1,0000	

Tabla 13. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para amonio y fosfatos entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		Amonio										
Sitios	DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG
Fosfatos	DC		0,0103	1,0000	0,8023	0,1064	1,0000	0,0143	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	AGa	0,0152		1,0000	1,0000	1,0000	0,0005	1,0000	0,5677	0,0032	0,0000	0,0000
	AGm	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	0,8946	1,0000	1,0000	1,0000	0,0803	0,0475
	AGd	0,8946	1,0000	1,0000		1,0000	0,0943	1,0000	1,0000	0,3520	0,0051	0,0027
	ARa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,0083	1,0000	1,0000	0,0395	0,0003	0,0001
	ARd	1,0000	0,0001	0,2698	0,0205	0,0919		0,0008	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEa	0,0577	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0005		0,7186	0,0046	0,0000	0,0000
	ABEm	1,0000	0,2974	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8566		1,0000	0,6145	0,3964
	ABEd	1,0000	0,0043	1,0000	0,3605	1,0000	1,0000	0,0182	1,0000		1,0000	1,0000
	T	1,0000	0,0000	0,0039	0,0001	0,0009	1,0000	0,0000	0,1167	1,0000		1,0000
	ST	1,0000	0,0000	0,0663	0,0038	0,0199	1,0000	0,0001	1,0000	1,0000	1,0000	
	BG	1,0000	0,0003	1,0000	0,1200	0,5869	1,0000	0,0020	1,0000	1,0000	0,4556	1,0000

Tabla 14. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para silicatos entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

Sitios	DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG
DC												
AGa	1,0000											
AGm	1,0000	1,0000										
AGd	1,0000	1,0000	1,0000									
ARa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000								
ARd	0,0067	0,0023	0,0462	0,0161	0,0328							
ABEa	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0001						
ABEm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8566	1,0000					
ABEd	1,0000	0,6874	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0919	1,0000				
T	0,0134	0,0047	0,0847	0,0309	0,0610	1,0000	0,0003	1,0000	1,0000			
ST	0,0357	0,0134	0,2003	0,0781	0,1475	1,0000	0,0009	1,0000	1,0000	1,0000		
BG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3217	0,1597	1,0000	1,0000	0,6034	1,0000	

Tabla 15. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para nitratos y nitritos entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

		Nitratos								
		Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11
Nitritos	Oct09		1,0000	0,1321	0,3037	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Dic09	1,0000		0,0017	0,0064	1,0000	1,0000	0,1292	0,7951	1,0000
	Feb10	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Abr10	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Jun10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ago10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
	Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Tabla 16. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para amonio y fosfatos entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

		Amonio								
		Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11
Fosfatos	Oct09		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Dic09	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Feb10	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Abr10	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Jun10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ago10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
	Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Tabla 17. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para silicatos entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

Fecha	Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11
Oct09									
Dic09	0,8549								
Feb10	1,0000	1,0000							
Abr10	1,0000	0,9880	1,0000						
Jun10	1,0000	0,0414	1,0000	1,0000					
Ago10	1,0000	0,0137	1,0000	1,0000	1,0000				
Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000			
Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9065	1,0000		
Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

- **Materia orgánica particulada**

El contenido de materia orgánica particulada fue mínimo en los tres sitios aguas arriba de los Arroyos Grande, Rodríguez y Buena Esperanza (promedio de 574 mgC m^{-3}). El valor máximo de $57.395 \text{ mgC m}^{-3}$ se detectó en ST en Feb11. Sin embargo, a excepción de este valor, los máximos promediaron los $18.000 \text{ mgC m}^{-3}$ (DC, Oct09 y Feb10; BG Feb11) (Figura 27, Tabla 18).

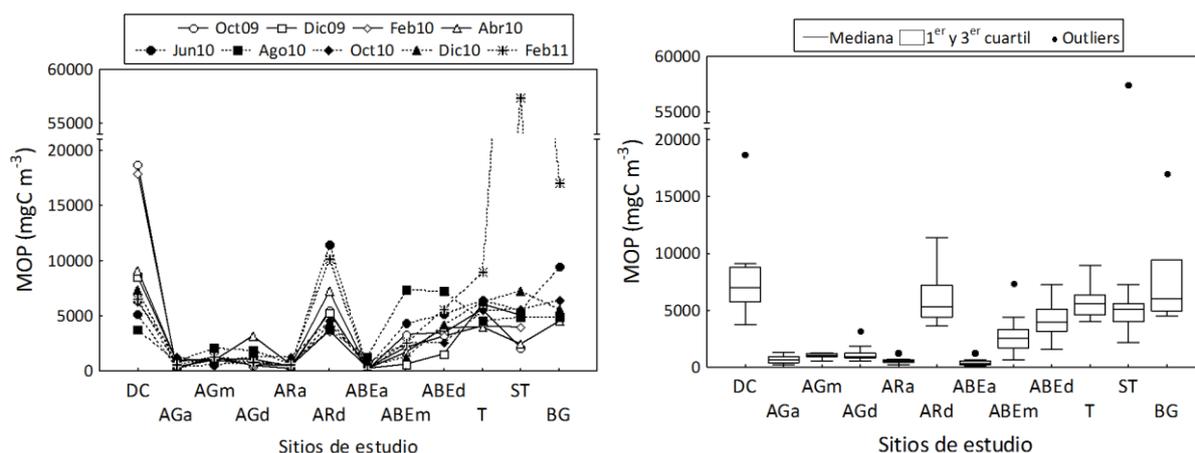


Figura 27. Distribución temporal y espacial del contenido de materia orgánica particulada en los sitios de estudio.

- **Sólidos totales en suspensión**

Los sólidos totales en suspensión fueron mínimos en los sitios ARa y ABEa en Feb11, mientras que los máximos valores se registraron en T (729 mg L^{-1}) en la misma época. La mayor variabilidad se presentó en los sitios DC y T (552 y 700 mg L^{-1} , respectivamente) (Figura 28, Tabla 18).

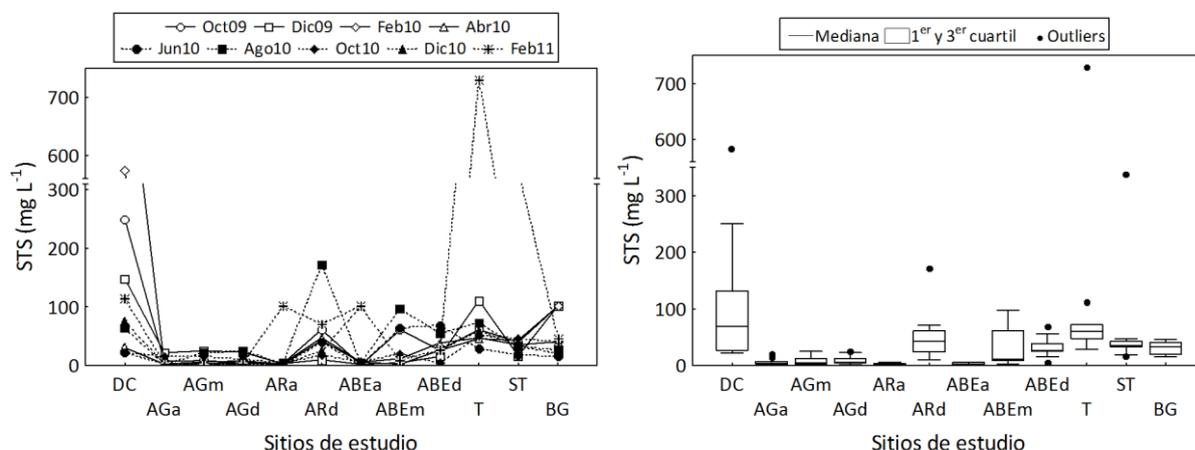


Figura 28. Distribución temporal y espacial de la concentración de sólidos totales en suspensión en los sitios de estudio.

Tabla 18. Mediana, mínimo y máximo del contenido de materia orgánica particulada (mgC m^{-3}) y de sólidos en suspensión (mg L^{-1}) registrados en las fechas de muestreo para cada sitio de estudio.

	MOP		STS	
	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx
DC	7357	3727-18678	75,6	22,4-574
AGa	659	223-1307	3,0	1,4-21,8
AGm	1012	563-2138	5,9	1,0-25
AGd	916	512-3192	5,1	1,4-24,8
ARa	518	233-1301	2,7	0,4-5,5
ARd	5303	3651-11400	42,4	9,8-171,2
ABEa	310	130-1273	5,2	0,8-5,8
ABEm	2522	625-7316	11,6	2,2-97,6
ABEd	3936	1558-7247	26,2	5,6-68,4
T	5605	4007-8940	60,0	28,7-729,2
ST	5073	2164-57395	35,2	16,4-338,6
BG	6014	4501-16985	33,5	15,2-46,2

Se encontraron diferencias significativas entre los 12 sitios de estudio en la concentración de materia orgánica particulada ($H=84.00$ y $p=0.0000$) y de sólidos totales en suspensión ($H=71,84$ y $p=0.0000$), al ser analizados mediante el Test de Kruskal-Wallis. Sin embargo, temporalmente no se hallaron diferencias significativas (MOP: $H=4.00$ y $p=0.8571$; STS: $H=4.88$ y $p=0.7698$).

Las comparaciones múltiples de los parámetros MOP y STS entre los sitios y entre las fechas de estudio se presentan a continuación en las Tablas 19 y 20.

Tabla 19. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para MOP y STS entre sitios de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		MOP											
		DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG
STS	DC		0,0002	0,0077	0,0051	0,0000	1,0000	0,0000	0,8023	1,0000	1,0000	1,0000	0,3514
	AGa	0,0022		1,0000	1,0000	1,0000	0,0057	1,0000	1,0000	0,1533	0,0034	0,0184	0,1782
	AGm	0,0238	1,0000		1,0000	1,0000	0,1475	1,0000	1,0000	1,0000	0,0969	0,3780	1,0000
	AGd	0,0221	1,0000	1,0000		1,0000	0,1050	1,0000	1,0000	1,0000	0,0681	0,2765	1,0000
	ARa	0,0001	1,0000	1,0000	1,0000		0,0017	1,0000	0,8201	0,0577	0,0010	0,0059	0,0541
	ARd	1,0000	0,0475	0,3396	0,3198	0,0026		0,0003	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEa	0,0001	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0044		0,2475	0,0128	0,0001	0,0011	0,0083
	ABEm	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4204	1,0000	0,6145		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEd	1,0000	0,4253	1,0000	1,0000	0,0362	1,0000	0,0577	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	T	1,0000	0,0014	0,0159	0,0147	0,0000	1,0000	0,0001	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
	ST	1,0000	0,0969	0,6215	0,5873	0,0060	1,0000	0,0102	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	BG	0,0224	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5474	1,0000	1,0000	1,0000	0,0136	1,0000	

Tabla 20. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para MOP y STS entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

		MOP								
		Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11
STS	Oct09		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Dic09	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Feb10	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Abr10	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Jun10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ago10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
	Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
	Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Parámetros microbiológicos

Las concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales siguieron el mismo patrón en las diferentes fechas estudiadas, aunque no se observó una tendencia temporal en la distribución de estos parámetros (Figuras 29 y 30, Tabla 21).

En los puntos más altos de las cuencas, la presencia de coliformes totales fue mínima (1 a 1.600 NMP 100mL⁻¹; AGa, ARa y ABEa) mientras que en los puntos de desembocadura sobre la costa se registraron los mayores valores (a partir de 1.300.000 NMP 100mL⁻¹ en DC, ARd, ABEd y T), hasta alcanzar máximos de 5.400.000 NMP 100mL⁻¹ en ST y BG.

Aunque en algunos casos fueron menores, los valores determinados de coliformes fecales siguieron el mismo patrón de distribución que las coliformes totales.

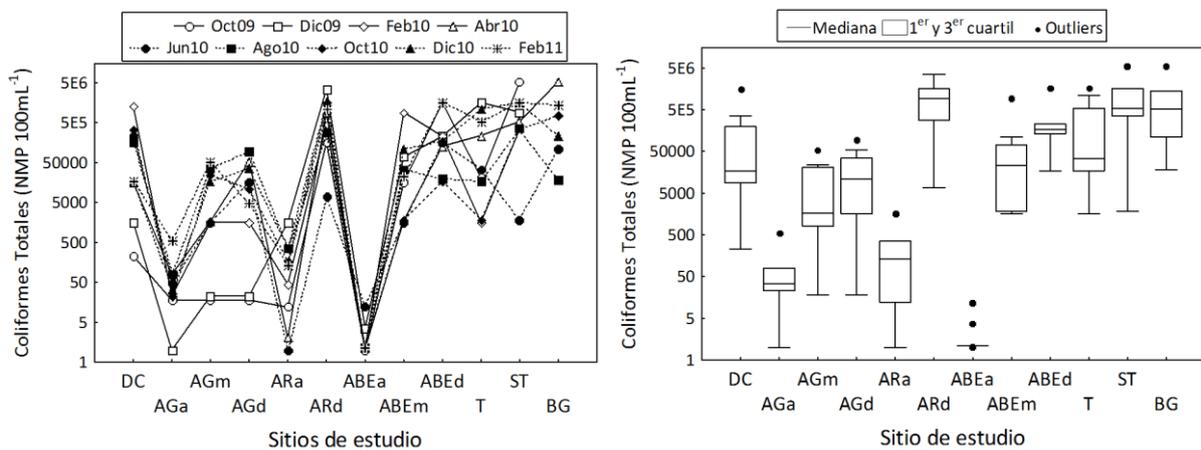


Figura 29. Distribución temporal y espacial de coliformes totales en los sitios de estudio. Los valores se presentan en escala logarítmica.

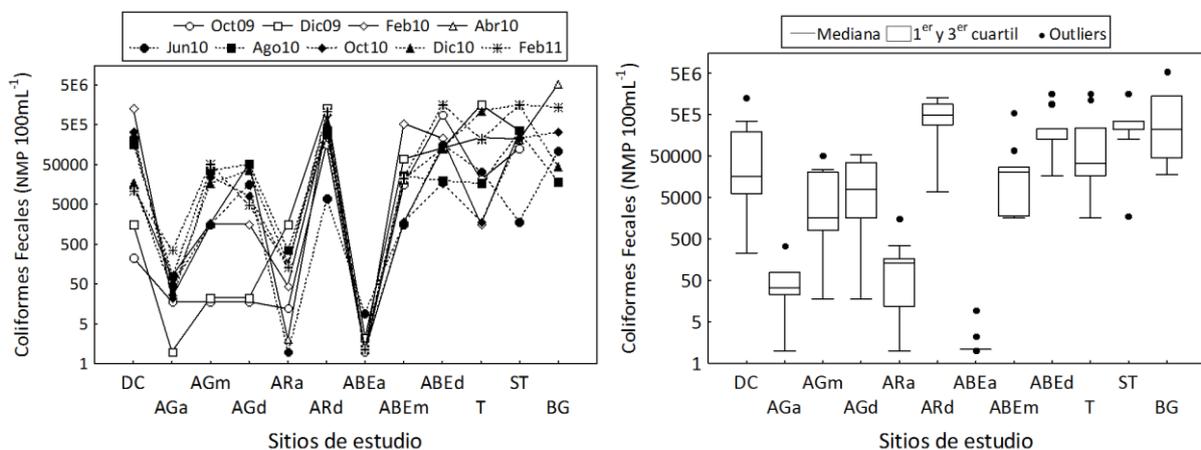


Figura 30. Distribución temporal y espacial de coliformes fecales en los sitios de estudio. Los valores se presentan en escala logarítmica.

Tabla 21. Mediana, mínimo y máximo de las concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales (NMP 100 mL⁻³) registradas en las fechas de muestreo para cada sitio de estudio.

	Coliformes Totales		Coliformes Fecales	
	Mediana	Mín- Máx	Mediana	Mín- Máx
DC	17000	230-1300000	17000	230-1300000
AGa	33	1-540	33	1-350
AGm	1700	18-54000	1700	18-54000
AGd	11000	18-92000	7900	18-54000
ARa	130	1-1600	130	1-1600
ARd	920000	6800-3500000	490000	6800-1300000
ABEa	1	1-12	1	1-9,2
ABEm	23000	1600-920000	21000	1600-540000
ABEd	170000	17000-1600000	130000	17000-1600000
T	33000	1600-1600000	33000	1600-1600000
ST	540000	1800-5400000	350000	1800-1600000
BG	510000	18000-5400000	220000	18000-5400000

Las concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales presentaron diferencias significativas entre los 12 sitios de estudio al ser analizados mediante el Test de Kruskal-Wallis (CT: H=75.13 y p=0.0000; CF: H=73.62 y p=0.0000). Sin embargo, temporalmente no se hallaron diferencias significativas (CT: H=4.83 y p=0.7750; CF: H=5.21 y p=0.7348).

Las comparaciones múltiples de los parámetros CT y CF entre los sitios y entre las fechas de estudio se presentan a continuación en las Tablas 22 y 23.

Tabla 22. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para CT y CF entre sitios de estudio. Los p<0.05 (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de sitios contrastados.

		Coliformes totales											
Sitios		DC	AGa	AGm	AGd	ARa	ARd	ABEa	ABEm	ABEd	T	ST	BG
Coliformes fecales	DC		0,3355	1,0000	1,0000	0,4834	1,0000	0,0154	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	AGa	0,2298		1,0000	1,0000	1,0000	0,0003	1,0000	0,6798	0,0082	0,0681	0,0003	0,2211
	AGm	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	0,1788	0,9543	1,0000	1,0000	1,0000	0,1834	1,0000
	AGd	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	0,2938	0,6145	1,0000	1,0000	1,0000	0,3010	1,0000
	ARa	0,3396	1,0000	1,0000	1,0000		0,0006	1,0000	0,9543	0,0132	0,1036	0,0006	0,3514
	ARd	1,0000	0,0003	0,2028	0,3276	0,0006		0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5176
	ABEa	0,0095	1,0000	0,8474	0,5486	1,0000	0,0000		0,0378	0,0002	0,0021	0,0000	0,0040
	ABEm	1,0000	0,7266	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0412		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	ABEd	1,0000	0,0067	1,0000	1,0000	0,0112	1,0000	0,0001	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
	T	1,0000	0,0562	1,0000	1,0000	0,0870	1,0000	0,0017	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
	ST	1,0000	0,0008	0,3780	0,5940	0,0014	1,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,5323
	BG	1,0000	0,2732	1,0000	1,0000	0,4365	0,4181	0,0053	1,0000	1,0000	1,0000	0,8474	

Tabla 23. Comparaciones múltiples de rangos medios (Test de Kruskal-Wallis) para CT y CF entre fechas de estudio. Los $p < 0.05$ (en negrita) indican diferencias significativas entre los pares de fechas contrastadas.

Coliformes totales

Fecha	Oct09	Dic09	Feb10	Abr10	Jun10	Ago10	Oct10	Dic10	Feb11
Oct09		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Dic09	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Feb10	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Abr10	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Jun10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Ago10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000
Oct10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000
Dic10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
Feb11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	

Coliformes fecales

2. Análisis Multivariado

En un Análisis de Componentes Principales, el número de componentes extraídos es igual al número de variables ingresadas en el análisis. En este caso, se utilizaron 13 variables (temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad, turbidez, nitratos, nitritos, amonio, fosfatos, silicatos, materia orgánica particulada, sólidos totales en suspensión y coliformes fecales) por lo cual se obtuvieron 13 CP o factores. Para realizar este análisis, no se incluyeron los parámetros salinidad y coliformes totales ya que la información era redundante al incluirse otros (conductividad y coliformes fecales, respectivamente), debido a la falta de independencia entre las respectivas variables, y a que no hacían un aporte sustancial a los resultados del trabajo.

Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson entre los pares de variables analizadas, siendo significativos aquellos valores mayores a **0.55** (Tabla 24). Este valor de correlación surge de la fórmula $\sqrt{d/n}$, donde $d=4$ es el número de CP y $n=13$ es el número de variables, por lo cual $\sqrt{4/13}=0.55$.

Tabla 24. Coeficientes de correlación entre las variables analizadas. Son significativos aquellos valores mayores a 0.55 (en negrita). Temp: temperatura, OD: oxígeno disuelto, pH, Cond: conductividad, Turb: turbidez, NO_3^- : nitratos, NO_2^- : nitritos, NH_4^+ : amonio, PO_4^{3-} : fosfatos, SiO_3^{3-} : silicatos, MOP: materia orgánica particulada, STS: sólidos totales en suspensión, CF: coliformes fecales.

	Temp	OD	pH	Cond	Turb	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	PO_4^{3-}	SiO_3^{3-}	MOP	STS	CF
Temp	1												
OD	-0,68	1											
pH	-0,09	0,09	1										
Cond	0,11	-0,09	0,33	1									
Turb	0,33	-0,35	-0,08	0	1								
NO_3^-	-0,03	-0,09	-0,1	-0,07	0,04	1							
NO_2^-	0,52	-0,64	-0,03	-0,05	0,58	0,25	1						
NH_4^+	0,45	-0,61	0,03	-0,05	0,27	-0,01	0,66	1					
PO_4^{3-}	0,64	-0,7	-0,01	-0,09	0,4	-0,01	0,77	0,89	1				
SiO_3^{3-}	0,3	-0,51	0,12	-0,24	0,31	0,17	0,74	0,59	0,68	1			
MOP	0,4	-0,42	0,09	0,16	0,68	-0,03	0,53	0,42	0,59	0,37	1		
STS	0,37	-0,4	0,08	0,19	0,86	0,11	0,61	0,28	0,36	0,27	0,55	1	
CF	0,37	-0,33	0,11	-0,04	0,15	-0,01	0,28	0,52	0,5	0,27	0,34	0,18	1

El Análisis Factorial realizado mostró que el 73.72% de la varianza total de los datos puede explicarse mediante 4 factores, ya que son los que presentaron autovalores mayores a 1 (Tabla 25), siendo estos factores los que se analizarán e interpretarán en detalle.

Tabla 25. Coeficientes de correlación entre las variables analizadas y los primeros 4 factores extraídos (con Rotación Varimax); autovalores de cada factor y porcentajes de varianza total explicada y acumulada. Son significativos aquellos valores resaltados en negrita.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Temp	0,64	0,37	-0,15	-0,29
OD	-0,72	-0,35	0,11	0,03
pH	0,06	-0,08	0,92	0,09
Cond	-0,11	0,27	0,63	-0,39
Turb	0,15	0,91	-0,09	0,09
NO ₃ ⁻	-0,08	0,10	-0,06	0,75
NO ₂ ⁻	0,65	0,53	-0,05	0,40
NH ₄ ⁺	0,88	0,11	0,02	0,09
PO ₄ ³⁻	0,92	0,27	-0,06	0,08
SiO ₃ ³⁻	0,68	0,14	0,04	0,54
MOP	0,42	0,68	0,14	-0,05
STS	0,16	0,90	0,11	0,11
CF	0,65	0,00	0,13	-0,11
<i>Autovalores</i>	5,45	1,64	1,41	1,09
<i>% Var. total</i>	41,92	12,60	10,84	8,37
<i>% Var. acumulada</i>	41,92	54,52	65,35	73,72

El Factor 1 que explica el 41.92% de la varianza total y constituye el factor dominante, se encuentra correlacionado con la temperatura, las altas concentraciones de NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, SiO₃³⁻, CF y la disminución de OD. El Factor 2, que explica el 12.60% de la varianza total, está correlacionado positivamente con la turbidez y las concentraciones de MOP y STS. El Factor 3 que explica el 10.84% de la varianza total, está correlacionado positivamente con el pH y la conductividad. Por último, el Factor 4 se relaciona positivamente con la presencia de NO₃⁻ (Tabla 25).

Al graficar los coeficientes de correlación de las variables en 2 ejes ortogonales (los Factores 1 y 2), se observa que el OD está correlacionado negativamente con el resto de los parámetros, mientras que las variables pH, nitratos y conductividad no tienen peso en estos dos factores. Contrariamente, los otros parámetros forman un grupo y se ubican próximos al cuadrante positivo de ambos Factores (Figura 31).

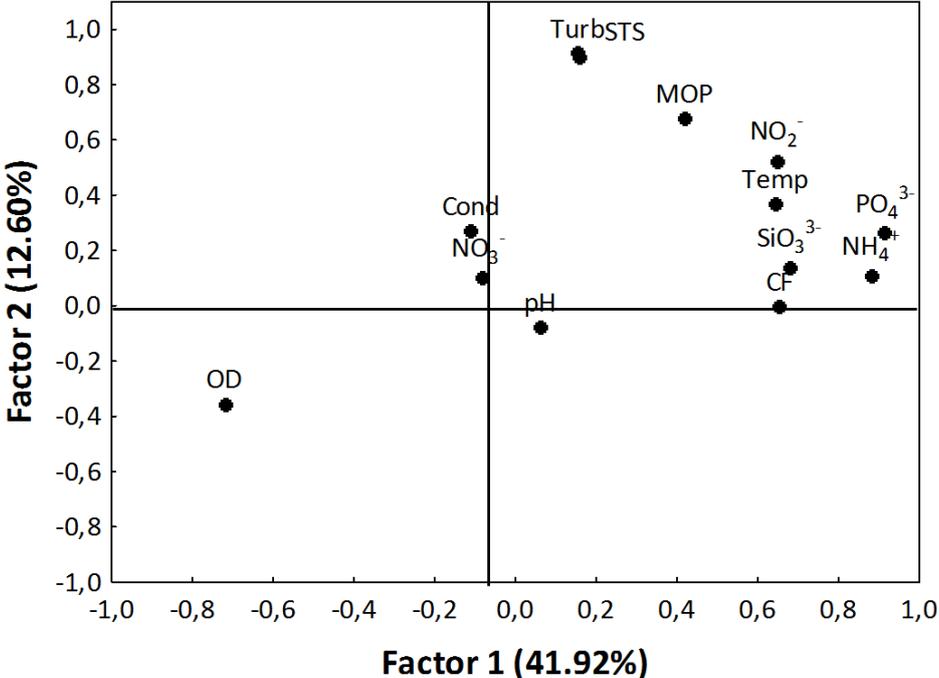


Figura 31. Gráfico de los coeficientes de correlación de las variables en los dos factores dominantes.

Con el objetivo de analizar la existencia de un patrón particular de asociación entre los sitios de estudio, se representan en la Figura 32 los valores promedio de los *scores* para los Factores 1 y 2 de los sitios estudiados. En ella se observa una clara diferenciación de los sitios en tres grupos. El primero está representado positivamente sobre el Factor 1 y comprende los sitios ABEd, ARd, T, ST y BG, mientras que el segundo grupo está relacionado negativamente con el Factor 1 e incluye los sitios AGa, AGm, AGd, ABEa, ABEm y ARa. De manera aislada se presenta el sitio DC, el cual queda definido por las variables que tienen mayor peso en el Factor 2.

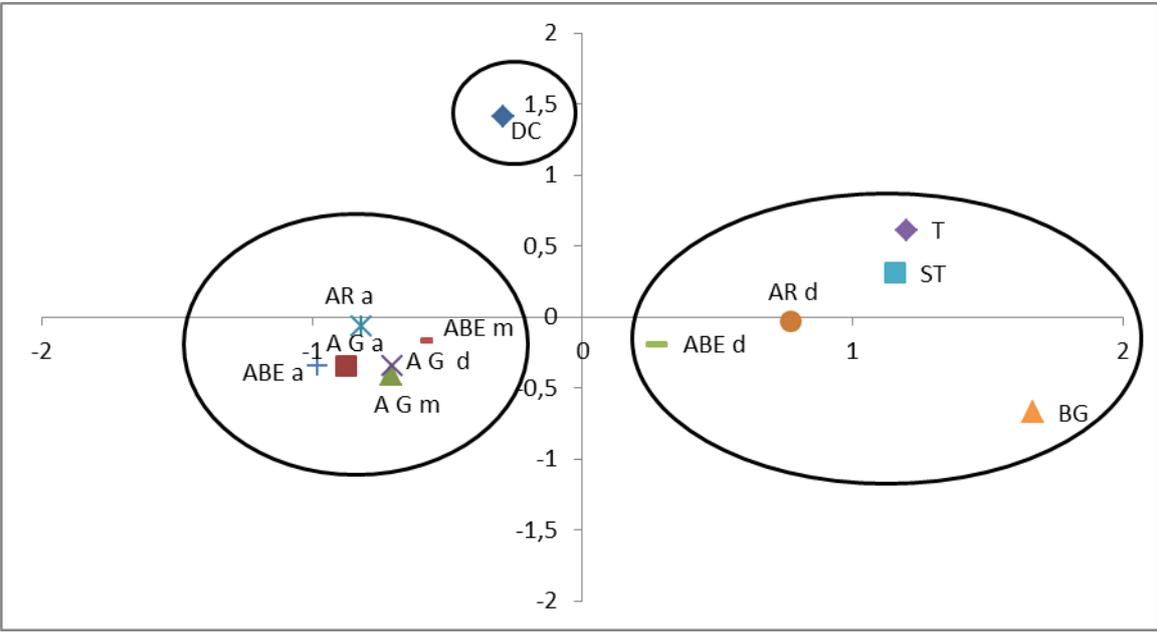


Figura 32. Gráfico de los scores medios de cada sitio de estudio sobre los Factores 1 y 2 extraídos por componentes principales.

3. Índice de Calidad de Aguas (ICA)

El ICA utilizado incluyó para su cálculo un total de 8 parámetros medidos (cambio de temperatura, pH, oxígeno disuelto, turbidez, coliformes fecales, fósforo total, nitratos y sólidos totales en suspensión) utilizando el valor promedio calculado a partir de las 9 fechas de muestreo. Los resultados obtenidos se ajustan a la siguiente escala de valores del ICA con sus correspondientes niveles de calidad de aguas:

Rango ICA	91-100	71-90	51-70	26-50	0-25
Calidad	Excelente	Buena	Media	Mala	Muy mala

De acuerdo al valor final del ICA, para cada sitio de estudio se obtuvieron los siguientes niveles de calidad de aguas:

Sitio	ICA	Calidad	Sitio	ICA	Calidad
DC	53	Media	BG	50	Mala
AGa	77	Buena	ABEa	87	Buena
AGm	67	Media	ABEm	60	Media
AGd	70	Media	ABEd	48	Mala
ARa	63	Media	T	40	Mala
ARd	48	Mala	ST	42	Mala

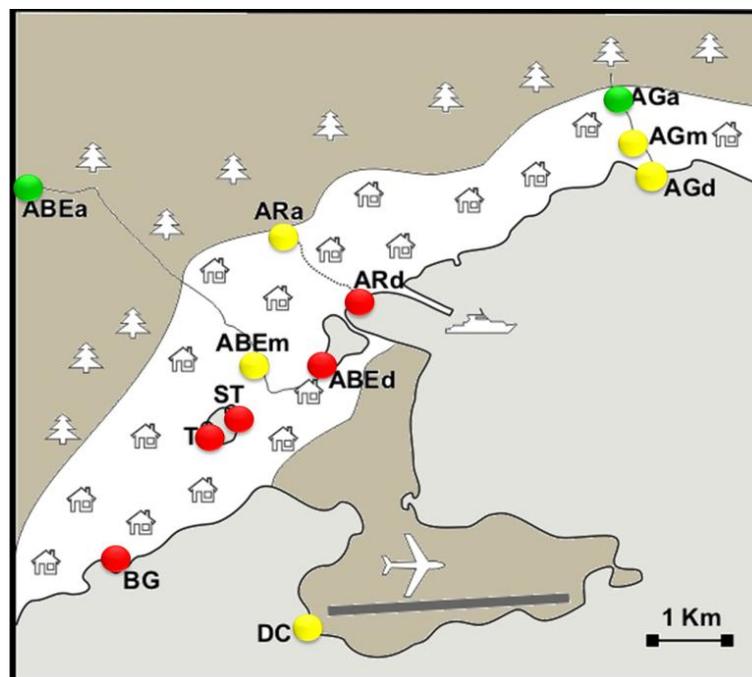


Figura 33. Representación de los valores de ICA obtenidos (según escala de color) en el mapa del área de estudio.

DISCUSIÓN

La temperatura es una variable de gran importancia ya que afecta los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en el ambiente acuático. Este parámetro varía de acuerdo a la estacionalidad climática, aunque puede estar influenciada además por parámetros como la latitud, la altitud, el flujo de agua, las corrientes, entre otros. En el presente estudio, la temperatura del agua superficial presentó una variación estacional significativa con mínimos en invierno (0.6°C) y máximos en verano (18.2°C), acorde también a los cambios estacionales de la temperatura del aire (Iturraspe et al., 1989). Por otro lado, las temperaturas mínimas correspondieron a los sitios más altos (AGa, ARa y ABEd), siendo aquellos no urbanizados. Asimismo, dentro de una misma cuenca, se registró un incremento de la temperatura a medida que el curso de agua hace su recorrido por el ejido urbano hacia la costa. Esto es un indicio del aporte de residuos domésticos ya que estos líquidos tienen habitualmente una temperatura más elevada que el agua potable proveniente de la red (Metcalf & Eddy, 2003). Los valores detectados en los sitios costeros son mayores a los encontrados por Amin et al. (2011b), lo cual puede indicar que en estos últimos años se ha incrementado el aporte de efluentes domésticos a los cursos de agua naturales, probablemente por el aumento poblacional ocurrido durante el período 2000-2010.

Por otro lado, mayores temperaturas provocan la disminución de la solubilidad del oxígeno disuelto. En este sentido, las concentraciones de este gas fueron mayores y cercanas a la saturación en los sitios aguas arriba, los mismos que presentaron también las temperaturas más bajas (AGa, ARa, ABEd). Los 3 sitios del Arroyo Grande presentaron valores de saturación, hecho dado por el gran caudal que presenta este curso de agua ($3.70 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$; Iturraspe et al., 1989). Por el contrario, en los sitios ubicados en el turbal urbano (T y ST), DC, BG y en la desembocadura de los Arroyos Rodríguez y Buena Esperanza (ARd y ABEd) se registraron valores mínimos de $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. El principal factor atribuible a la disminución de los niveles de OD en el agua fue la presencia de descargas con alto contenido de materia orgánica y nutrientes, lo cual resulta en un incremento de la actividad microbiana responsable de la degradación de dichos sustratos y consiguiente consumo de oxígeno por las mismas (Chapman, 1996).

Se debe tener en cuenta que el nivel guía nacional para la conservación de vida acuática indica que el valor del OD en aguas naturales no debe ser inferior a $5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, por lo cual en los sitios estudiados puede estar comprometido el normal funcionamiento del ecosistema.

El pH es una variable importante en la evaluación de la calidad del agua ya que influye en muchos procesos biológicos y químicos dentro del ambiente (Chapman, 1996). Los valores de pH registrados en este estudio están dentro del rango establecido para la mayoría de las aguas naturales (6.0 - 8.5). A lo largo de la cuenca del Arroyo Grande el pH se mantuvo estable, mientras que en el Arroyo Rodríguez el pH aumentó hacia su desembocadura en la costa. Por otro lado, los valores del Arroyo Buena Esperanza tendieron a disminuir desde su tramo alto y medio hacia su desembocadura. Esto se debe a que previamente a desembocar en la Bahía Encerrada, las aguas de este curso se unen a aquellas provenientes del turbal urbano cuyos valores de pH siempre fueron menores, posiblemente por el alto contenido orgánico que presenta el turbal.

Los valores de salinidad registrados en los sitios de muestreo indican que los puntos costeros situados en las desembocaduras están en permanente contacto con el agua de mar, por lo cual presentan valores de salinidad distintos de cero. Por otro lado, el DC es el sitio en el cual se observaron mayores y variadas salinidades debido a que el mismo se ubica en el sentido de los vientos predominantes (sudoeste) provocando la acumulación de agua de mar sobre la salida del mismo, no pudiéndose recolectar la muestra cruda aún realizando el muestreo durante el momento de bajamar. Este hecho debe tenerse en cuenta al momento del análisis de los valores registrados de los parámetros medidos para este sitio.

La conductividad está relacionada con el contenido de iones disueltos presentes en el agua. Generalmente en los ambientes dulceacuícolas presenta un rango entre 0.01 y 1 mS cm^{-1} , valores coincidentes con los hallados en los sitios altos y medios de las cuencas estudiadas. Por otro lado, este parámetro puede exceder dichos valores especialmente en aguas contaminadas o en aquellas que reciben gran cantidad de aportes terrestres (Chapman, 1996). Sin embargo, la gran variabilidad que este parámetro presentó en los

sitios costeros estudiados (AGd, ARd, ABEd, y DC) puede atribuirse en mayor grado a los cambios en la salinidad y no al posible aporte terrestre.

La turbidez resulta de la dispersión y absorción de la luz por parte de las partículas en suspensión, siendo una medida indirecta de la transparencia del agua y de la capacidad de penetración de la luz. Los valores estándar para ambientes no contaminados se ubican entre 1 y 1.000 NTU y pueden variar estacionalmente según la actividad biológica y la concentración de partículas aportadas por escurrimiento superficial, por lo cual puede o no estar relacionada con la presencia de sustancias tóxicas (Chapman, 1996). La turbidez registrada durante el período de estudio fue variable tanto temporalmente como espacialmente. Los mayores valores se registraron en los meses de primavera y verano (Oct09, Dic09 y Feb10), lo cual puede estar relacionado con el proceso natural de deshielo. Las montañas que rodean a la ciudad de Ushuaia permanecen completamente cubiertas por nieve y hielo durante el invierno. En primavera y verano comienza el proceso de deshielo, el cual además de incrementar el flujo de agua dulce al sistema costero, aumenta el aporte de material en suspensión, causando un aumento también en la turbidez del agua (Amin et al., 2011b).

Los nutrientes son componentes químicos esenciales del ambiente acuático. El P y el N son incorporados a los tejidos de la biota residente, mientras que el Si es necesario para la formación de los esqueletos de las diatomeas y radiolarios (Aydin-Onen et al., 2012). Debido a que pueden acumularse en los sedimentos de fondo y posteriormente ser liberados al ambiente acuático, la descarga de nutrientes presenta efectos inmediatos y acumulativos (Chambers et al., 1997; Statham, 2012).

Los compuestos inorgánicos de nitrógeno se presentan en diferentes formas reactivas dependiendo del estado de oxidación en el que se encuentren. Estas formas que pueden coexistir son nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amonio (NH_4^+).

La existencia de un patrón estacional en la concentración de NO_3^- parece poco probable, aunque valores extremos y significativamente diferentes fueron registrados en Dic09 y Feb10. Por otro lado, el valor medio máximo se registró en el sitio ARa (13.86 mg $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$), probablemente debido a que este sitio es la naciente de un chorrillo natural, poco profundo, rodeado de un bosque denso y cercano a un reciente asentamiento irregular.

Sumado a estas características, el trazado de la ruta superior (calle Alem, Ruta Nacional N°3) lo cruza en forma transversal interrumpiendo su curso natural a partir del cual continua entubado hacia su desembocadura. Sin embargo, en todos los sitios estudiados las concentraciones de nitratos han superado el valor mínimo de $0.1 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ ($0.44 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$) correspondiente a aguas superficiales dulces no contaminadas (Chapman, 1996; Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación, 2003), pero no así el límite de $5 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ ($22.15 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$) correspondiente a descargas de aguas residuales municipales e industriales, siendo los valores obtenidos difíciles de atribuir a una fuente específica, ya que también es poco probable un aporte externo por el empleo de fertilizantes con nitratos en dicho sitio.

Las concentraciones naturales de NO_2^- en cuerpos de agua dulce son por lo general muy bajas ($0.001 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ o $0.003 \text{ mg NO}_2 \text{ L}^{-1}$) y raras veces exceden $1 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ ($3.3 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$). Los valores de NO_2^- registrados en este estudio se encontraron dentro de dicho rango sugerido por la literatura (Chapman, 1996). Por otro lado, las concentraciones de NO_2^- siempre fueron mucho menores que las de NO_3^- , lo cual puede deberse a que el NO_2^- es menos estable que el NO_3^- , es muy reactivo y puede actuar como agente oxidante y reductor, transformándose rápidamente para dar NO_3^- , por lo cual este último predomina en las aguas (Albert, 1997).

El NH_4^+ está presente en el ambiente acuático debido al aporte de aguas residuales domésticas, desechos industriales y fertilizantes, siendo la concentración de este nutriente en aguas no contaminadas generalmente menor a $0.1 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ ($0.078 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$). En solución acuosa, el amonio no ionizado (NH_3) se presenta en equilibrio con el ion amonio (NH_4^+). El amonio total es la suma de estas dos formas. Las concentraciones relativas de NH_4^+ y de NH_3 son dependientes del pH y de la temperatura del agua: a medida que estos parámetros aumentan, la concentración de NH_3 también aumenta, pero la de NH_4^+ disminuye. El NH_3 es muy tóxico para los organismos acuáticos, mientras que el NH_4^+ es considerablemente menos tóxico o no tóxico (Whitfield, 1974; Camargo & Alonso, 2006). El NH_4^+ tiende a ser oxidado a NO_3^- en el proceso de nitrificación que es realizado en dos pasos ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) por bacterias quimioautótrofas aeróbicas. Este proceso puede ocurrir aun cuando los niveles de oxígeno disuelto son de $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. En consecuencia, este proceso biogeoquímico natural colabora con el incremento de los niveles de NO_3^- en los ecosistemas de agua dulce y marinos (Camargo et al., 2005).

En el presente estudio, la cuenca de Arroyo Grande registró valores muy bajos de NH_4^+ en su tramo superior (AGa) e inferior (AGd) respecto a aquellos hallados en su tramo medio (AGm). Esto se debe a que el sitio AGm se encuentra cercano a un punto de descarga pluvio-cloacal que proviene de barrios aledaños, por lo cual se encuentra afectado directamente por dichos aportes. Por otro lado, en su tramo inferior se incrementa el efecto de dilución debido al distanciamiento de la fuente de contaminación (Marques Junior et al., 2006). Contrariamente a lo ocurrido en el Arroyo Grande, las concentraciones de NH_4^+ en los Arroyos Rodríguez y Buena Esperanza fueron incrementándose a medida que los cursos alcanzaban la línea de costa, debido a la acumulación progresiva de las descargas de efluentes cloacales. Más aún, estos valores en los tramos inferiores fueron mayores a los de NO_3^- , evidenciándose así el importante aporte de excretas al sistema. Por otro lado, el nivel de NH_4^+ que llega a la Bahía Encerrada, a través de la desembocadura del ABE, se ve incrementado por el desagüe del Chorrillo Alegre, formado con los aportes de los sitios T y ST. Sin embargo, los máximos valores de NH_4^+ encontrados en este monitoreo corresponden al sitio BG (media de $27.87 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ y máximo valor de $47.42 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$). El DC presentó, llamativamente, valores intermedios de NH_4^+ , coincidiendo los máximos registrados (media de $22.3 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ en Feb10 y Jun10) con los mínimos de salinidad. Este hecho entonces puede atribuirse al efecto de la dilución mencionado anteriormente.

Al analizar los valores del índice DIN, el cual incluye las 3 formas de N inorgánico, se observa que los sitios con mayor concentración de este nutriente son ARa, ARd, ST, T y BG. En todos estos casos, excepto en ARa, la contribución de amonio es la mayoritaria, seguida por el nitrato y por último el nitrito, evidenciando así el mayor aporte de descargas cloacales en los sitios más cercanos a la costa. La descarga que recibe la Bahía Golondrina en el sitio proveniente del rebalse del colector cloacal está compuesta en su totalidad por aguas domésticas no tratadas, hecho que se evidencia por los niveles de N inorgánico (DIN promedio $31.02 \pm 13.24 \text{ mg N L}^{-1}$) que superan aquellos citados en la bibliografía para el N total en descargas domésticas no tratadas ($20\text{-}85 \text{ mg N L}^{-1}$; USEPA, 2001).

La Ley Provincial 55 de Medio Ambiente establece por medio de su Decreto 1333/1993 que el límite permitido de vuelco de N total (orgánico + inorgánico) hacia un conducto pluvial o un curso de agua es 10 mg N L^{-1} , por lo cual en dichos sitios se superó ampliamente el límite permitido, aun teniendo en cuenta sólo el contenido de N inorgánico. El límite para descargas al mar no está establecido en dicha ley.

El fósforo es un nutriente esencial para los organismos acuáticos, limitante del crecimiento algal, y se presenta en las formas particulada y disuelta, generalmente en la forma de fosfato (PO_4^{-3}). En el presente estudio se observó que las concentraciones registradas de fosfato son coincidentes con la tendencia del amonio ($r=0.89$), esto significa que los fosfatos aumentan hacia el final de las cuencas del AR y del ABE, y son máximos también los valores en el turbal urbano y en BG. Por otro lado, se observó la existencia de una correlación significativa positiva de los fosfatos con la temperatura ($r= 0.64$) y con el amonio ($r=0.89$), y negativa con el oxígeno disuelto ($r=-0.70$). Esto indica que el aporte de fosfatos proviene de la descarga de los efluentes domésticos (particularmente por el contenido de detergentes) que presentan mayores temperaturas, altas concentraciones de amonio y bajos niveles de oxígeno disuelto. Es por ello que altas concentraciones de fosfatos pueden indicar contaminación y son en gran parte responsables de condiciones de eutroficación (Chapman, 1996; Statham, 2012). En este sentido, en los sitios mencionados ha sido superado (en más de 4 veces) el valor de $3.03 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$ establecido para las descargas domésticas no tratadas y propuesto por Metcalf & Eddy (2003).

El silicio es un nutriente que se encuentra presente en las aguas superficiales y subterráneas, en forma disuelta, particulada o coloidal. El silicio reactivo, generalmente como sílice disuelta (SiO_2) o como silicato (H_4SiO_4), proviene en su mayor parte de la meteorización química de minerales silíceos, ya que es un elemento extremadamente abundante en la corteza terrestre. Por otro lado, el silicio disuelto es de importancia crítica en algunos organismos (principalmente diatomeas) que lo utilizan en la construcción de las partes rígidas de su estructura celular. En general, la presencia de altas concentraciones de silicatos está directamente relacionada al aporte de agua dulce de origen natural. En este estudio, se encontraron los máximos valores de silicatos disueltos en agua en la época invernal (Jun10 y Ago10), lo cual puede deberse a que es la época de menor producción del fitoplancton, quedando este nutriente disponible en el agua. Lo contrario ocurrió en los meses de Dic09 y Dic10, donde los mínimos valores pueden ser causados por la menor disponibilidad de silicatos en el agua debido a la mayor incorporación de este nutriente por parte del fitoplancton en la época de máxima productividad (Conley & Malone, 1992; Biancalana, 2008; Statham, 2012). Con respecto a la distribución espacial, se observó un amplio rango de valores de silicatos en todos los sitios, aunque los puntos costeros y el

turbal urbano presentaron las mayores concentraciones. Sin embargo, dichas variaciones pueden atribuirse a cambios naturales por el aporte terrestre de silicatos, más que a una fuente puntual antropogénica.

La materia orgánica total consiste en el material disuelto y particulado proveniente del material vivo (directamente originado por producción primaria o indirectamente por el aporte de materia orgánica terrestre) y de la descarga de residuos de diversos orígenes. Por consiguiente, la materia orgánica en el agua puede ser un buen indicador del grado de contaminación, en particular cuando se comparan las concentraciones río arriba y río abajo de las fuentes potenciales de contaminación, como aguas residuales urbanas o descargas industriales (Chapman, 1996). Este hecho se ha observado en forma notoria en el presente trabajo, en el cual los sitios aguas arriba (AGa, ARa y ABEa) presentaron los menores valores de MOP, mientras que los sitios costeros (DC, BG y ARd) presentaron valores máximos equivalentes a más de 30 veces los menores valores registrados. Es evidente, a través de la magnitud de este parámetro, que los sitios estudiados presentan aportes exógenos de materia orgánica, provenientes de las descargas domésticas no tratadas.

Los sólidos totales en suspensión (STS) consisten en el material erosionado de las cuencas, partículas finas de materia orgánica, además de compuestos orgánicos solubles, plancton y otros organismos microscópicos. La medición del material en suspensión es importante ya que es responsable del transporte de contaminantes en el medio acuático (Chapman, 1996). Por otro lado, los sólidos contenidos en las aguas residuales se oxidan consumiendo el oxígeno disuelto en el agua, sedimentan al fondo de los cuerpos receptores donde modifican el hábitat natural y afectan la biota acuática, pudiendo posteriormente ser resuspendidos y hacer disponibles los contaminantes asociados (Bilotta & Brazier, 2008). En este estudio, los STS estuvieron correlacionados positivamente con la turbidez ($r=0.86$) y con la concentración de MOP ($r=0.55$), lo cual indica que los valores registrados siguieron una misma tendencia, con un patrón espacial causado principalmente por el aporte de las descargas domésticas no tratadas. Los valores registrados en los sitios costeros y en el turbal urbano coinciden con los establecidos por la USEPA (2001) para las descargas urbanas (agua de tormenta) y las descargas domésticas no tratadas (67-101 mg L⁻¹ y 100-350 mg L⁻¹, respectivamente). Por otro lado, el DC presentó un amplio rango de variación de STS,

probablemente debido a la resuspensión continua del material descargado en la costa de la Península Ushuaia, la cual se encuentra favorecida por los fuertes vientos del lugar y la dirección de las corrientes de marea (Balestrini et al., 1990).

La presencia de bacterias coliformes y en especial coliformes fecales es un claro indicador de contaminación urbana, particularmente por el aporte de materia fecal humana y de animales (Chapman, 1996; Pommepuy et al., 2006). Por sí mismas, las bacterias coliformes no constituyen una amenaza para la salud; sin embargo, la determinación de *Escherichia coli* se utiliza para indicar la potencial presencia de otros patógenos posiblemente nocivos (virus, bacterias, parásitos gastrointestinales, entre otros) y transmisibles por el agua (Haile et al., 1999; USEPA, 2002c; Mara, 2003; Pommepuy et al., 2006). Estos patógenos podrían representar un riesgo de salud muy importante para bebés, niños y personas con sistemas inmunológicos gravemente comprometidos. Debido a que estas bacterias no se multiplican en las aguas naturales sino que mueren a las pocas horas, su concentración en el agua puede disminuir por dilución y por distanciamiento de la fuente donde se generan, por lo cual su presencia demuestra una contaminación "reciente" con excrementos humanos y/o animales (Haile et al., 1999). Sin embargo, la persistencia de bacterias entéricas en el agua depende de una variedad de factores ambientales y bióticos que incluyen luz solar, temperatura, pH, privación de nutrientes, salinidad, depredación por microorganismos acuáticos naturales (principalmente protozoos) e historia previa (Rozen & Belkin, 2001). La luz solar es el principal factor que controla la supervivencia de las bacterias en el agua de mar causando inactivación ya que el tiempo de desaparición de la población bacteriana disminuye a medida que aumenta la intensidad de luz y disminuye la longitud de onda; por lo cual la luz UV es más letal que la visible (Canteras et al., 1999). Por otro lado, las temperaturas bajas y los valores de pH entre 6 y 9 son condiciones propicias para la supervivencia. Es reconocida la existencia de un potencial de adaptación a la salinidad, lo cual dependerá en gran medida de otros factores ambientales. Por otro lado, la supervivencia es mayor en los sedimentos que en el agua, hecho atribuido al alto contenido de materia orgánica que presentan los sedimentos (Rozen & Belkin, 2001; Chigbu et al., 2005).

Las concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales registradas en el presente estudio variaron entre 1 y 5.400.000 NMP 100mL⁻¹ dependiendo del sitio,

observándose además escasas diferencias entre los valores de coliformes totales (CT) y fecales (CF). La relación coliformes totales/*Escherichia coli* (CT/EC) ha sido utilizada para definir el origen de las bacterias coliformes (fecal o natural), es decir, que a medida que la relación se acerca a 1, la probabilidad de un origen fecal es mayor (Haile et al., 1999; Evanson & Ambrose, 2006). En este caso, las relaciones encontradas variaron entre 1 y 5, lo cual indica una alta proporción de contaminación de origen fecal. Sólo en un caso la relación fue de 41 (ST, Oct09), por lo cual la fuente de bacterias coliformes presenta un origen distinto, como puede ser por ejemplo, una población de bacterias propia del lugar (Evanson & Ambrose, 2006).

La Ley Provincial 55 establece que el límite de vuelco de bacterias coliformes totales hacia el mar es de 20.000 NMP 100mL⁻¹, por lo cual en los cinco sitios que descargan sus contenidos a la costa (DC, AGd, ARd, ABEd y BG) se ha sobrepasado dicho límite. Además, esta ley también establece que el límite de eliminación hacia un curso de agua pluvial es de 5.000 NMP 100mL⁻¹, por lo cual dos de los sitios estudiados (T y ST) también han sobrepasado dicho límite. Por otro lado, tres de los sitios estudiados (AGa, ARa y ABEd) presentaron concentraciones muy bajas de bacterias coliformes. Este hecho reviste gran importancia dado que el agua cruda que abastece a la ciudad de Ushuaia, previamente a ingresar a las plantas potabilizadoras, proviene de dos de los sitios mencionados (ABEd y AGa). Además, parte de las nuevas urbanizaciones localizadas en lo alto de la montaña se abastecen directamente de estos cursos de agua, con el consiguiente riesgo que implica su consumo. La concentración de coliformes fecales no está establecida en la normativa provincial.

Al analizar los resultados obtenidos con el **análisis multivariado**, se observa que los 12 sitios de estudio se pueden agrupar en 3 grandes grupos. Los sitios incluidos en el primer grupo (ABEd, ARd, T, ST y BG), situados sobre el eje positivo del Factor 1, presentaron altas concentraciones de MOP, NO₂⁻, PO₄³⁻, NH₄⁺, STS, y CF, mayores valores de turbidez y temperatura y menores de OD. Estos sitios presentan importantes aportes de descargas domésticas no tratadas. La situación contraria ocurrió en el segundo grupo, situado sobre el sector negativo del Factor 1 y formado por los sitios AGa, AGm, AGd, ABEd, ABEm y ARa, el cual se caracterizó por presentar altas concentraciones de OD y bajos valores de nutrientes, MOP, STS, turbidez y temperatura. Estos sitios mantienen sus parámetros dentro de los

rangos naturales esperables y por lo tanto menos impactados por efluentes urbanos. Finalmente, el sitio DC quedó representado de manera aislada sobre el eje positivo del Factor 2 siendo el único integrante del tercer grupo, caracterizado por altos valores de MOP, STS, turbidez y conductividad (exclusivamente asociada a los niveles de salinidad).

La asociación obtenida entre los sitios de estudio, y reflejada en la formación de tres grupos principales, coincide con las descripciones realizadas previamente de los parámetros fisicoquímicos, nutrientes inorgánicos disueltos, materia orgánica y bacterias coliformes.

De acuerdo a los valores obtenidos del **índice de calidad de aguas**, los dos sitios más altos sobre la ladera de la montaña (AGa y ABEa) conservan una buena calidad de sus aguas (valores entre 71 y 90). Los puntos intermedios como ARa, AGm y ABEm, AGd y DC presentan valores de calidad media (valores entre 51 y 70), mientras que los sitios ARd, ABEd, T, ST y BG quedan catalogados como de mala calidad (valores entre 26 y 50).

CONCLUSIONES PARCIALES

A partir de la utilización de tres métodos de análisis distintos (distribución de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos; análisis multivariado e índice de calidad de aguas) se logró caracterizar en forma similar los sitios de estudio arribando de este modo a las mismas conclusiones.

Los sectores con mayor compromiso ambiental de la ciudad son aquellos que se encuentran más impactados por la actividad antrópica, principalmente por la descarga de los residuos domésticos y cloacales sin tratamiento. Ellos son el Dispensor Cloacal, las desembocaduras del Arroyo Rodríguez sobre Bahía Ushuaia y del Arroyo Buena Esperanza sobre Bahía Encerrada, el turbal urbano y el rebalse del colector cloacal sobre Bahía Golondrina. Si bien este último sitio de estudio es un sector de la ciudad recientemente afectado por la urbanización, el impacto que presenta es relevante, comparado con otros sitios poblados con anterioridad.

Por su parte, el Arroyo Grande, a pesar de estar impactado no solo por las viviendas aledañas sino también por los aportes del sector industrial descargados en la rivera, se encuentra favorecido por el efecto de dilución producto del gran caudal que posee, presentando un nivel aceptable de calidad de sus aguas.

Los dos sitios de aprovisionamiento de agua para consumo humano, los tramos superiores de los Arroyos Grande y Buena Esperanza, presentan aún una buena calidad de sus aguas, por lo cual es de vital importancia que se mantengan las condiciones naturales de ambos sectores.

PARTE C

Bioensayos de Laboratorio con Estresores Ambientales

INTRODUCCIÓN

1. Pruebas de toxicidad o bioensayos

Las **pruebas de toxicidad ó bioensayos** son experimentos en los cuales el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes. Es decir, son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Ronco et al., 2004). Un bioensayo típico involucra un estímulo o dosis absorbible que es aplicado a un sujeto cuya respuesta a dicho estímulo es estimada mediante la detección de cambios en alguna característica biológica o en el estado del sujeto, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Ronco et al., 2004; Ferrari, 2006).

De manera general, los bioensayos se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios:

- En función de la duración: ensayos agudos y crónicos. Los **ensayos agudos** consisten en tiempos de exposición cortos (generalmente de 24 a 96 h) en relación con el periodo de vida del organismo ensayado, y comprenden la exposición a una serie de concentraciones crecientes del tóxico de un nivel tal que se obtenga respuesta. Entre los efectos medidos más habituales (*endpoints*) se encuentran la mortalidad e inmovilidad. Los **ensayos crónicos** miden efectos adversos en una exposición relativamente prolongada a concentraciones subletales.
- En función del método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: ensayo estático, con renovación ó semiestático y de flujo continuo. En los **ensayos de tipo estático** (sin renovación de agua), los organismos están expuestos a la misma muestra durante todo el ensayo. Si bien son simples y de bajo costo operativo, pueden presentar pérdida de tóxicos por volatilización o adsorción reduciendo su toxicidad aparente, caída en la concentración de oxígeno disuelto, aumento de DBO y son los menos sensibles. En contraposición, los **ensayos en sistema de flujo continuo** consisten en la renovación continua del medio de exposición, generalmente a través del bombeo con equipamiento especial. Esta metodología provee una evaluación más representativa especialmente porque

el suministro constante de agua reduce la pérdida de tóxicos por adsorción, volatilización o degradación y se mantienen constantes los niveles de oxígeno disuelto. Sin embargo, este tipo de prueba presenta ciertas desventajas tales como requerimientos de mayores volúmenes de agua y equipamientos como bombas peristálticas de alto costo. Una situación intermedia se presenta en los **ensayos semiestáticos** (con renovación de agua) en los cuales el medio de exposición se renueva cada 24 h. Se mejoran las condiciones generales del ensayo respecto del estático pero se pierde sensibilidad respecto al de flujo continuo (USEPA, 2002a; 2002b).

Para la **selección del organismo prueba** se deben cumplir ciertos criterios establecidos internacionalmente que validan los resultados obtenidos en los bioensayos (USEPA 2002a; 2002b; Espina & Vanegas, 2005b; Ferrari, 2006):

- deben tener una amplia distribución geográfica, ser abundantes y de fácil disponibilidad
- deben ser sensibles a la contaminación y tolerantes a un amplio intervalo de condiciones ambientales
- deben poder mantenerse en laboratorio para ser utilizados en ensayos tanto agudos como crónicos
- deben tener un tamaño relativamente grande para una conveniente manipulación experimental
- se debe tener un adecuado conocimiento biológico de la especie (fisiológico, genético, reproductivo)
- deben ser especies preferentemente nativas o representativas del ecosistema que recibe el impacto
- deben pertenecer a una población residente de un sitio no contaminado, provenir de distribuidores comerciales o ser cultivados en laboratorio
- las especies de importancia comercial deben ser incluidas como posible organismo de ensayo

No existe una especie estándar única como organismo de prueba para los distintos ecosistemas. Un grupo de especies estándar son las recomendadas para la ejecución de bioensayos normalizados, es decir, siguiendo los protocolos de experimentación estandarizados, y son utilizadas por diversos Organismos de Protección Ambiental como

USEPA y OECD. Sin embargo, la evaluación ecotoxicológica mediante bioensayos puede utilizar otras especies que deben estar validadas, es decir, deben estar establecidas las diferencias y semejanzas en las respuestas a tóxicos de referencia de la especie utilizada en relación a la estandarizada, bajo un diseño experimental lo más cercano posible al normado (Ferrari, 2006).

Los bioensayos de laboratorio pueden llevarse a cabo utilizando una gran variedad de **estresores**. Entre ellos se pueden distinguir aquellos de origen ambiental (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, concentración de amonio, entre otros) y aquellos de origen antrópico (compuestos tóxicos como metales pesados, hidrocarburos, efluentes, entre otros).

En los estudios de contaminación, se reconocen típicamente dos aproximaciones, diferentes pero complementarias, para la caracterización de los efectos biológicos: los ya mencionados ensayos de laboratorio y los **estudios a campo ó bioevaluaciones**.

Las **bioevaluaciones** tienen el propósito de investigar la acción de los contaminantes sobre los procesos que operan en el ecosistema. Aunque las pruebas de laboratorio son más fáciles de instrumentar, es posible que se cometan errores al no tener en cuenta que los factores del medio modifican las respuestas de los organismos y que éstos tienen la capacidad de compensar a través de diferentes mecanismos de detoxificación. Por ello es necesario enfatizar la influencia de los factores del medio para poder detectar la acción tóxica de los contaminantes o sus efectos subletales. Este aspecto es crítico en experimentos a largo plazo, donde existe la posibilidad que los organismos expuestos a concentraciones subtóxicas, se adapten o se aclimaten dependiendo de la extensión de su ciclo de vida y del tiempo contemplado de prueba (Espina & Vanegas, 2005a). Por otro lado, si bien se desarrollan en escenarios más reales, se pierden los controles estrictos de la experimentación (Herricks & Schaeffer, 1984).

Todo lo anterior hace evidente la existencia de numerosos y frecuentemente discrepantes criterios sobre la forma de abordar el problema del estudio de la contaminación. La correcta elección del mismo dependerá finalmente del objetivo planteado.

2. Medidas de ecotoxicidad: letalidad y biomarcadores

De acuerdo a Bayne et al. (1976), el **estrés** es "una alteración medible del estado estable fisiológico (bioquímico, celular o conductual) inducido por un cambio ambiental que hace al individuo (población o comunidad) más vulnerable a nuevos cambios ambientales". Las respuestas primarias de estrés son nerviosas y endocrinas mientras que las segundas, consecuencia fisiológica de las primeras, incluyen respuestas tanto fisiológicas como bioquímicas. Ambos tipos de respuestas evolucionan como mecanismos adaptativos que capacitan al organismo para enfrentar las presiones externas. Las respuestas terciarias, derivadas de las secundarias, engloban alteraciones en la función osmorreguladora e inmunológica, disminución del crecimiento, modificación del comportamiento migratorio y reproductivo y reducción de la habilidad para tolerar estresores ambientales adicionales, lo cual en último grado causa la muerte del organismo (De Coen et al., 2000; Espina & Vanegas, 2005a, 2005b).

Acorde a la gran variedad de respuestas que puede generar la exposición a un ambiente contaminado, existen diversas medidas de ecotoxicidad. Ellas pueden ser de carácter molecular, bioquímico, comportamental, fisiológico, morfológico, de crecimiento, reproductivo, entre otras. El criterio ideal para considerar un punto final (*endpoint*) es el que se asocia muy fuertemente con los eventos moleculares que resultan de la exposición al tóxico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos eventos son desconocidos y por ello alternativamente se elige una medida de efecto que sea inequívoca, relevante, clara, observable, descriptible, medible, reproducible y de significado biológico (Ferrari, 2006).

Una de las medidas más utilizadas es la **letalidad** ya que cumple con las premisas previamente enumeradas y provee un medio para comparar toxicidades de sustancias con mecanismos de acción muy diferentes. La letalidad es un ejemplo de medida definida como *quantal* (respuesta "todo o nada") y es típica de estudios de corto tiempo (Ferrari, 2006). Entre los índices indicadores del nivel de letalidad, la **concentración letal media** (CL50) es uno de los más utilizados. La CL50 es la concentración de un tóxico que causa la muerte del 50% de la población expuesta. Cualquier efecto seleccionado o respuesta seleccionada para medir la relación entre el grado de respuesta de los organismos y la cantidad de tóxico

asume siempre una forma concentración-respuesta. Esta relación típicamente se representa en un diagrama x-y donde la curva obtenida presenta una forma sigmoidea.

Asociados a la letalidad, los **efectos subletales** indican estrés tóxico previo a la muerte. Típicamente, los efectos subletales medidos en bioensayos se relacionan con las variaciones en largo, peso y número de embriones normales; los defectos en la natación, las anomalías morfológicas, las alteraciones metabólicas, entre otros. Todas estas son respuestas *cuantitativas* ya que se miden en términos de incidencia y son las requeridas para medir el grado de respuesta mostrada por cada organismo (Ferrari, 2006).

Un objetivo importante de la ecotoxicología es la búsqueda de índices de estrés cuantitativos a nivel celular y subcelular en relación al impacto de los contaminantes (Espina & Vanegas, 2005b). Por lo tanto, a pesar de que las sustancias tóxicas tienen efectos sobre niveles celulares y bioquímicos, las consecuencias ecológicas se detectan a nivel de población, comunidad y ecosistema. Es por ello que es imprescindible poder trasladar los mecanismos en un nivel a los efectos en otro de manera realista, es decir, respetando las características propias de cada nivel. Los cambios o señales de alarma se detectan visiblemente en niveles de organización mayores, involucrando indefectiblemente una situación de mayor riesgo ecológico. La tendencia actual es la de detectar los efectos tóxicos en los menores niveles de organización dentro del ecosistema, como parte de una visión más reduccionista del sistema (Ferrari, 2006; Jemec et al., 2010).

A partir de esta tendencia, surge el concepto y la utilización de los **biomarcadores** en los estudios ecotoxicológicos. Hasta el momento, una de las definiciones más aceptadas y utilizadas es la propuesta por Depledge (1993) y Depledge et al. (1993), quienes definen a los biomarcadores con un concepto más global e integrador: son las respuestas biológicas adaptativas a estresores, evidenciadas como modificaciones bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas o comportamentales. En su definición clásica, McCarthy & Shugart (1990) definen a los biomarcadores como las mediciones realizadas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican tanto que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas como la magnitud de

la respuesta del organismo al contaminante. Sencillamente, los biomarcadores se definen como indicadores a corto plazo de efectos biológicos a largo plazo (Cajaraville et al., 2000).

De acuerdo a Rodríguez (2006), para la elección de un biomarcador deben considerarse varios aspectos importantes como especificidad, sensibilidad, relevancia, factibilidad y variación natural. Un biomarcador altamente específico es aquel que responde a un contaminante en particular y por lo tanto indica inequívocamente su presencia. Sin embargo, hasta el momento existen pocos biomarcadores que cumplan con esta condición, por lo cual se acepta que sea relativamente específico, es decir, aquel que sufre cambios ante un grupo relativamente homogéneo de contaminantes con mecanismos de acción similares. Por otro lado, un biomarcador sensible responderá antes de que se manifiesten efectos deletéreos en el organismo o en la población. Esta respuesta temprana presenta dos posibles significados. En primer lugar, puede indicar la detección temprana de los efectos de la contaminación que pueden luego trasladarse con el tiempo a los niveles mayores de organización. En segundo lugar, puede indicar la detección de una respuesta a concentraciones por debajo de aquellas que causan efectos irreversibles. En este caso, el hecho de que el organismo esté estresado no indica que existan con el tiempo efectos más severos. En este sentido, resulta también muy útil que el biomarcador elegido muestre una fuerte dependencia tanto de la concentración de los contaminantes como del tiempo de exposición a ellos, lo cual permitirá una predicción del riesgo poblacional más precisa (Van Gestel & Van Brummelen, 1996; Cajaraville et al., 2000; Forbes et al., 2006; Rodríguez, 2006; Jemec et al., 2010).

De acuerdo al grado de sensibilidad, los biomarcadores se clasifican en (WHO, 1993; van der Oost et al., 2003):

-biomarcadores de exposición: aquellos que sólo indican la presencia de ciertos contaminantes, sin que sus valores alterados conlleven un perjuicio significativo al desempeño del organismo en cualquiera de sus actividades. Son los mejores para establecer alertas tempranas y consisten en la medición de un compuesto químico específico en un tejido o en fluidos de un organismo (PCB, PAHs, Pb, Cd, DDT, etc.).

-biomarcadores de efecto: aquellos que no sólo indican la presencia de contaminantes en el ambiente, sino que su alteración se encuentra también asociada a un

perjuicio significativo en una o más funciones que comprometan el rendimiento y/o desempeño del organismo. Implican una alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento que pueda ser medible y cuya modificación no esté asociada a alguna enfermedad (actividades enzimáticas de Fase I y II, EROD, colinesterasas, proteínas, ARNm, ADN, aductos en el ADN, metabolitos en bilis, micronúcleos, vitelogenina, etc.).

-biomarcadores de sensibilidad: aquellos que son indicadores de una habilidad inherente del organismo para responder a la exposición de xenobióticos específicos (fenotipo y polimorfismo genético).

Es importante también que los biomarcadores tengan un significado biológico y que sean fáciles de interpretar. Deben ser además, fáciles de medir, es decir, que sus determinaciones no sean costosas, sofisticadas ni que demanden demasiado tiempo. Es habitual la existencia de una variación ambiental (temperatura, salinidad, fotoperíodo) ó biológica (estadio de ciclo de vida, sexo, tamaño) del biomarcador. En este sentido será necesaria la obtención simultánea de valores de referencia provenientes tanto de organismos residentes de zonas prístinas, como de aquellos ensayados como grupo control, en los casos de determinaciones a campo y en laboratorio, respectivamente.

3. Biomarcadores utilizados en estudios de eutrofización

La utilización de los biomarcadores en estudios ecotoxicológicos resulta de gran interés ya que genera información sobre el impacto tóxico de muestras complejas como pueden ser los efluentes urbanos, aún si es escaso el conocimiento de su composición química y si no son totalmente conocidos los mecanismos de toxicidad involucrados (Scholes et al., 2007).

En este contexto, tanto los estudios a campo como los de laboratorio han demostrado que diferentes índices bioquímicos, celulares y fisiológicos podrían ser de utilidad en los organismos marinos como biomarcadores de exposición o daño debido a la contaminación química (Lam & Gray, 2003).

3.1 Biomarcadores bioquímicos

- **Actividad de Acetilcolinesterasa**

La enzima Acetilcolinesterasa (AChE) es reconocida como uno de los biomarcadores más antiguos que se han utilizado en estudios ambientales (Payne et al., 1996). Es responsable del rompimiento del neurotransmisor acetilcolina en ácido acético y colina dentro de la sinapsis colinérgica durante la transmisión del impulso nervioso. Su inhibición está ligada directamente al mecanismo de acción de insecticidas organofosforados y carbamatos, es decir, éstos se unen de manera irreversible ó reversible al sitio catalítico de la enzima, respectivamente (Cajaraville et al., 2000; Fulton & Key, 2001). En consecuencia, la acetilcolina se acumula, la membrana post-sináptica se hiperpolariza y la transmisión del impulso nervioso se interrumpe. De esta manera, los compuestos neurotóxicos pueden causar serias disfunciones en el organismo, desde cambios comportamentales hasta parálisis y muerte (Fulton & Key, 2001).

El porcentaje de inhibición de AChE puede ser utilizado como un indicador de exposición de un organismo a pesticidas organofosforados por un periodo considerable luego de que el contaminante por si mismo sea metabolizado o eliminado del cuerpo del organismo (Hyne & Maher, 2003). Sin embargo, evidencias recientes sugieren que su especificidad podría ser cuestionada ya que también es inhibida por metales pesados, surfactantes, piretroides y compuestos petrogénicos que están presentes en residuos urbanos (Guilhermino et al., 1996; Bocquené & Galgani, 1998; Dellali et al., 2001a; Jemec et al., 2007). Factores ambientales como la temperatura y la salinidad pueden influir también en su actividad (Escartín & Porte, 1997; Bocquené & Galgani, 1998; Pfeifer et al., 2005).

Este biomarcador ha sido determinado en un considerable número de especies de invertebrados acuáticos como moluscos y crustáceos (Bocquené & Galgani, 1998; Guilhermino et al., 1996; Dellali et al., 2001a; 2001b; Barata et al., 2004; Pfeifer et al., 2005; Diodato et al., 2012).

- **Actividad de enzimas antioxidantes: Catalasa y Glutación-S-Transferasa**

Es bien conocida la relación existente entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el organismo y el estrés ambiental. Las ERO son productos del metabolismo celular y si estos radicales libres no son inmediatamente interceptados por las defensas antioxidantes, pueden dañar los diferentes componentes celulares claves como proteínas, ADN y ácidos grasos. Este desbalance denominado estrés oxidativo ocurre cuando la tasa de producción de ERO excede la tasa de descomposición, favoreciendo así su acumulación (Livingstone, 2001; Monserrat et al., 2007). Las enzimas antioxidantes del sistema de defensa del organismo pueden ser inducidas por diferentes condiciones pro-oxidantes como son la exposición a diferentes contaminantes, así como también pueden ser afectadas por factores endógenos y exógenos tales como la edad, la dieta, el ciclo reproductivo, la temperatura y la hipoxia/hiperoxia (Correia et al., 2003). En este sentido, la exposición de los organismos acuáticos a los contaminantes puede promover un aumento en la tasa de producción de las ERO, por lo cual es de gran importancia la evaluación de parámetros indicadores de estrés oxidativo en los estudios de contaminación ambiental (van der Oost et al., 2003; Alves de Almeida et al., 2007).

Dos enzimas antioxidantes, Catalasa (CAT) y Glutación-S-Transferasa (GST) son muy importantes en la prevención del daño oxidativo y en consecuencia revisten interés como potenciales biomarcadores de contaminación.

La **Catalasa** es una enzima oxidoreductasa que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno molecular (O_2) y agua. Un incremento en la actividad de CAT ha sido observado en peces expuestos a sedimentos contaminados con PCBs o PAHs, mientras que también ha sido reportada una inhibición significativa con otros compuestos (Rendón von Osten, 2005). De esta manera, los cambios en la actividad a veces son difíciles de interpretar ya que además, también interviene en el metabolismo de los ácidos grasos al estar localizada en los peroxisomas de la mayoría de las células (van der Oost et al., 2003).

La **Glutación-S-Transferasa** es miembro de una gran familia de enzimas multifuncionales que catalizan la conjugación de varios compuestos que presentan centros electrofílicos (compuestos nitrogenados, metales, PAHs, PCBs, plaguicidas), incluyendo los productos endógenos de la lipoperoxidación, con el tripéptido glutatona. Los productos de esta reacción son menos tóxicos y se hacen más solubles en agua, lo cual facilita su excreción (Hyne & Maher, 2003; Rendón von Osten, 2005; Jemec et al., 2008). La actividad de GST es

inducida en diferentes especies y por distintos contaminantes, lo cual es indicador del proceso de detoxificación (Jemec et al., 2007). Sin embargo, en otras especies los mismos compuestos pueden ocasionar una inhibición de esta enzima (Rendón von Osten, 2005).

- **Lipoperoxidación**

El ataque de las ERO a las membranas lipídicas inicia un proceso complejo de oxidación autocatalítica conocido como peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO). Durante este proceso, los lípidos son oxidados generando hidroperóxidos lipídicos como productos primarios. La formación de estos productos interfiere en el normal metabolismo de la célula provocando respuestas adaptativas que pueden causar la muerte celular (Alves de Almeida et al., 2007). Uno de los subproductos formados es el malondialdehído (MDA), cuya detección se utiliza como biomarcador no enzimático y ha sido considerado indicador relevante de daño químico inducido por tóxicos en varios grupos de organismos como moluscos y crustáceos (Box et al., 2007). Es posible que un aumento en los niveles de MDA en los organismos esté relacionado con el grado de degradación ambiental del sitio en estudio (Charissou et al., 2004).

3.2 Biomarcadores fisiológicos

Como fue mencionado anteriormente, los biomarcadores pueden ser evaluados en diferentes niveles de organización (individual, celular, bioquímico). En este contexto, las respuestas fisiológicas se encuentran en una posición intermedia entre los niveles celular e individual, ofreciendo un nexo entre ambos y entendiendo que eventos que ocurren a nivel bioquímico y celular impactan finalmente en los ecosistemas (Depledge et al., 1993; Calow & Forbes, 1998; Espina & Vanegas, 2005b). Es por ello que los biomarcadores fisiológicos son considerados adecuados para identificar respuestas frente a la variación de factores ambientales como temperatura, salinidad y pH, y al efecto de diversos estresores como metales pesados y otros contaminantes. Son especialmente útiles en el monitoreo de eventos contaminantes fluctuantes actuando como señales tempranas ya que la respuesta tóxica a los mismos es generalmente instantánea o muy sensible a concentraciones bajas del tóxico (Handy & Depledge, 1999).

La medición de biomarcadores fisiológicos se basa en registrar la respuesta del organismo en estado de reposo y luego cuantificar los cambios de los parámetros frente a la

situación de estrés para poder correlacionar posteriormente estas variaciones con la exposición a contaminantes (Depledge et al., 1993; Handy & Depledge, 1999). Diversos índices relacionados con el metabolismo han sido utilizados para evaluar las respuestas fisiológicas bajo condiciones estresantes en varios grupos de organismos como crustáceos y moluscos (Spice & Weber, 1991; Aldridge et al., 1995; Giarratano et al., 2007; Montagna & Collins, 2008; Amin & Comoglio, 2010; Diodato et al., 2012). Algunos de los índices recomendados son las tasas de consumo de oxígeno y de excreción de compuestos nitrogenados, así como la relación atómica O:N que se desprende de ellas (Mayzaud & Conover, 1988).

- **Consumo de oxígeno**

Es generalmente aceptado que el consumo de oxígeno es un buen indicador del estado metabólico de un animal bajo estrés por contaminantes. Sin embargo, esta respuesta puede no ser completamente homogénea ya que en la literatura se reportan casos en los cuales el consumo de oxígeno ha disminuido ó aumentado frente a la exposición de diversos contaminantes como metales pesados y plaguicidas (Spice & Weber, 1991; Giarratano et al., 2007; Montagna & Collins, 2008; Amin & Comoglio, 2010). La disminución en el consumo de oxígeno, inducida por ciertos contaminantes, puede ser ocasionada por interferencias en el proceso respiratorio, ya sea por daños en el tejido respiratorio o restricciones en el transporte e intercambio gaseoso (Spice & Weber, 1991). Por otro lado, un aumento en el consumo de oxígeno puede ser reflejo de la actividad locomotora asociada con la respuesta de escape del animal a las condiciones adversas, aunque también se puede atribuir al aumento de la actividad ventilatoria ya que cualquier cambio fisiológico compensatorio que lleve a cabo el organismo estresado, requerirá de un aumento en dicho parámetro (Spice & Weber, 1991; Hebel et al., 1997; Montagna & Collins, 2008).

- **Excreción nitrogenada**

En los invertebrados acuáticos, el producto de excreción más económico en términos energéticos es el amonio, por lo cual es la forma de excreción más común entre estos organismos (según la especie, entre el 70 y 100% del N excretado es en forma de amonio) y ocurre principalmente a través del epitelio branquial (Regnault, 1987; Greenaway, 1991). La tasa de excreción de amonio puede variar dependiendo de la especie y el estresor, ya que

pueden manifestarse tanto aumentos como disminuciones con respecto a un estado basal (Giarratano et al., 2007; Montagna & Collins, 2008). Un aumento en la excreción de amonio puede producirse por un incremento en el catabolismo de los aminoácidos involucrados en la regulación osmótica o por la síntesis de polipéptidos (Regnault, 1987). Por otro lado, la excreción nitrogenada está fuertemente relacionada al proceso de osmorregulación en los crustáceos, por lo cual cualquier situación que afecte dicho proceso, se manifestará a través de un cambio en la excreción de amonio (Lignot et al., 2000; Re et al., 2004; Romano & Zeng, 2012).

- **Relación atómica O:N**

Cuando se integran los valores del oxígeno consumido y del nitrógeno excretado en relaciones atómicas (O:N), se obtiene información acerca del balance entre el catabolismo de las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. La relación O:N se basa en considerar que 1 gramo de proteína requiere 0,94 litros de oxígeno en el metabolismo oxidativo y 1 gramo de lípido requiere 2,04 litros. Claramente, cualquier variable que produce una modificación en la variación combinada de ambos procesos metabólicos, causará un cambio en la relación O:N (Mayzaud & Conover, 1988). Sin embargo, es importante tener en cuenta que si ambos parámetros varían en la misma proporción, este parámetro se mantendrá constante. Un aumento del consumo de oxígeno y disminución en la excreción nitrogenada evidencia un catabolismo lipídico, mientras que si resulta de forma inversa, se evidencia un catabolismo proteico. Esto resulta del aporte de los estudios de varios autores (Conover & Corner, 1968; Ikeda, 1974; Mayzaud & Conover, 1988), quienes sugieren que un mínimo teórico de la relación O:N de entre 3 y 16 es indicativo de un catabolismo puramente proteico; mientras que valores mayores indican la utilización de lípidos y carbohidratos como fuentes energéticas.

La proporción atómica O:N es considerada como una medida directa que refleja cambios sobre las exigencias de energía debido a variables internas y externas. Bajo condiciones naturales, un individuo "saludable" y en crecimiento debería poseer un balance de nitrógeno positivo. El ingreso de nitrógeno por la dieta debe exceder al necesario para el crecimiento y la excreción. Es por ello que la utilización de proteínas en lugar de otros combustibles orgánicos puede resultar un buen biomarcador de estrés severo (Mayzaud & Conover, 1988; Rodriguez, 2006; Montagna & Collins, 2008).

4. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores

El índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB), del inglés *Integrative Biomarker Response*, es un índice de estrés desarrollado por Beliaeff & Burgeot (2002) que resume las respuestas de los biomarcadores y facilita la interpretación de los resultados en los programas de monitoreo, constituyéndose de este modo en una herramienta adecuada para el análisis y la toma de decisiones (Leiniö & Lehtonen, 2005; Broeg & Lehtonen, 2006; Damiens et al., 2007; Trujillo-Jimenez et al., 2011). Por otro lado, el cálculo de este índice resulta un método novedoso ya que combina e integra la respuesta de biomarcadores bioquímicos, genéticos, histoquímicos, entre otros.

5. Alteraciones en el ciclo de vida en crustáceos: muda

Tanto la reproducción como el crecimiento en los crustáceos pueden verse alterados frente a la exposición a contaminantes (Petriella & Boschi, 1997; Fingerman et al., 1998; Rodríguez et al., 2007; Beltrame et al., 2010). Existen muchos casos en los cuales se ha detectado una influencia negativa para el crecimiento y supervivencia de crustáceos por acción de sustancias xenobióticas particularmente pesticidas, plaguicidas y otros compuestos químicos derivados del petróleo. La respuesta más común de los crustáceos expuestos a contaminantes no metálicos es la inhibición de la ecdisis y el aumento de la duración del desarrollo (Fingerman, 1985). El conocimiento de la alteración en dichos parámetros es relevante ya que para proteger el hábitat acuático del daño por contaminantes, se deben considerar tanto la sensibilidad de los invertebrados a dichos contaminantes como sus requerimientos ecológicos.

Para los crustáceos, la muda o ecdisis es un proceso extremadamente importante debido a que no solo les permite crecer y desarrollarse, sino que también permite la metamorfosis durante los estadios tempranos del ciclo de vida y la reproducción durante el estado adulto. Luego de eclosionar, las larvas de crustáceos decápodos generalmente son formas libres planctónicas que atraviesan varios estadios de zoea, con determinados cambios morfológicos que ocurren en cada ecdisis o muda. Este proceso culmina en los cangrejos con un cambio más radical hacia otro estadio llamado megalopa, en el cual adquieren una morfología semejante al adulto. Este último cambio, denominado

metamorfosis, origina en la siguiente muda un organismo juvenil bentónico (McKenney, 1999).

La presencia de un exoesqueleto rígido en los crustáceos restringe el crecimiento solo a períodos bien definidos. Esto implica la eliminación del antiguo exoesqueleto y la formación de un tegumento nuevo y generalmente de mayor tamaño, siendo el conjunto de estos sucesos conocido como ciclo de muda. En este fenómeno, se alternan fases de relativo reposo externo con otras de intensa actividad. El intervalo entre dos mudas sucesivas puede ser dividido en tres etapas: postmuda, intermuda y premuda. En cada muda el viejo exoesqueleto es eliminado y tiene lugar un súbito incremento de tamaño como resultado de la absorción de agua, que ocurre antes de que el nuevo tegumento se endurezca por incorporación de sales de calcio (Petriella & Boschi, 1997; Hartnoll, 2001). La duración del ciclo de muda es específico de cada especie, aunque generalmente es menor (horas, días o semanas) para los estadios larvales que para los adultos (días, semanas o meses) (McKenney, 1999).

Todo el mecanismo de muda está regido por un complejo sistema endocrino multihormonal, aunque está bajo un control inmediato de hormonas esteroideas llamadas ecdisteroides (Petriella & Boschi, 1997; Fingerman et al., 1998). Sin embargo, factores exógenos como las condiciones de salinidad y temperatura, y el estrés causado por xenobióticos, y factores endógenos como el estado nutricional y la regeneración de apéndices, pueden modificar las tasas de muda en larvas en desarrollo (McKenney, 1999).

Con este fundamento, la integración de las evaluaciones a escala fisiológica junto con el análisis de otras respuestas a niveles celular y bioquímico aparecen como la mejor herramienta en ecotoxicología para la descripción de los efectos de una sustancia o mezcla de sustancias sobre los organismos.

6. Especies estudiadas

Es ampliamente reconocido que las especies utilizadas en las evaluaciones de daño ambiental de un ecosistema deben poseer ciertas particularidades acerca de su origen, tolerancia y manipulación, las cuales han sido indicadas anteriormente (página 77). Es por ello que en este trabajo han sido seleccionados como organismos de ensayo tres especies de crustáceos residentes del área de estudio: el isópodo *Exosphaeroma gigas* (Leach, 1818), el anfípodo *Paramoera* sp. y el decápodo *Lithodes santolla* (Molina, 1782).

- ***Exosphaeroma gigas* (Crustacea, Isopoda, Sphaeromatidae)**

Sphaeromatidae es la familia de isópodos con mayor número de especies marinas (Espinosa-Perez & Hendrickx, 2001). Una de ellas es *Exosphaeroma gigas* (Figura 34), la cual posee una amplia distribución geográfica en la región circumpolar, incluida la Isla de Tierra del Fuego. Sin embargo, es muy escasa la información que se posee acerca de la biología de este organismo, estando limitada a la descripción de sus características morfológicas y taxonómicas realizadas por Brandt & Wägele (1989). Esta especie carece de dimorfismo sexual; además no hay datos disponibles acerca de su ciclo de vida, estadios larvales, así como probables patrones de segregación. Sin embargo, ha sido observado un comportamiento parental importante en cuanto los adultos llevan a sus crías en una cámara de incubación ubicada ventralmente.

Ciertas características de la especie le confieren ventajas respecto al uso potencial en estudios ecotoxicológicos. Así, su recolección en campo y su mantenimiento en laboratorio son relativamente fáciles. Es una especie muy común y abundante en el intermareal rocoso de la costa de las Bahías Ushuaia y Golondrina, que vive protegida bajo las rocas ó entre bancos de mejillones, detritívora (Adami & Gordillo, 1999) y es potencialmente uno de los primeros organismos afectados por contaminantes de origen antrópico.

Algunos antecedentes sobre la utilización de esta especie en bioensayos de laboratorio son los realizados por Giarratano et al. (2007) donde se evaluaron la toxicidad aguda y respuestas fisiológicas frente a la exposición a metales pesados (Cu, Cd y Zn) a diferentes salinidades. Por otro lado, Goldsmit (2008) evaluó de manera preliminar algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos en organismos expuestos a muestras de agua

provenientes de Bahía Encerrada, encontrando ciertas dificultades en la utilización de esta especie como organismo de ensayo.

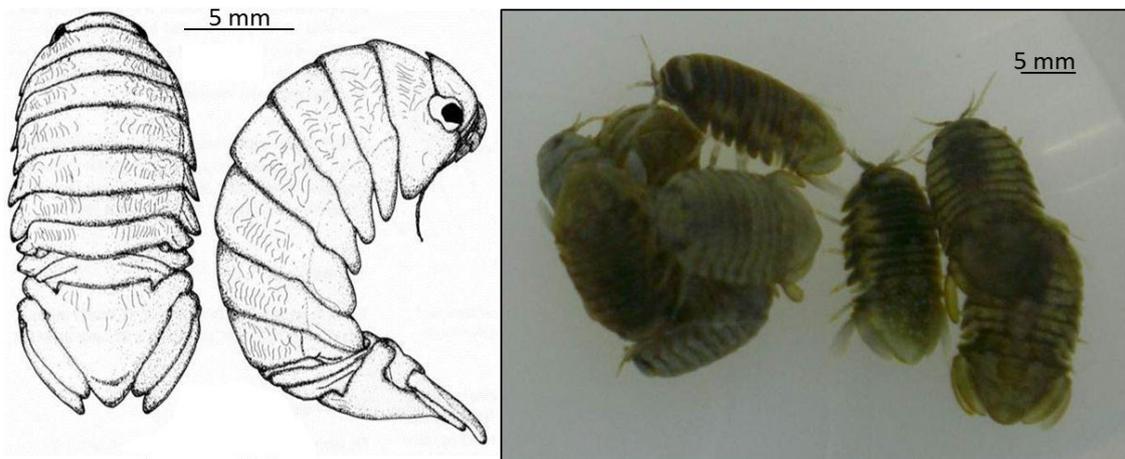


Figura 34. Dibujo (tomado de Brandt & Wagele, 1989) y fotografía del isópodo *Exosphaeroma gigas*.

- ***Paramoera* sp. (Crustacea, Amphipoda, Eusiridae)**

Los anfípodos gamáridos son un grupo de crustáceos muy abundantes en las costas del Canal Beagle (Chiesa & Alonso, 2007) y han sido ampliamente utilizados en estudios de toxicidad debido a su alta sensibilidad a los contaminantes y a los cambios en el ambiente bentónico (Duquesne et al., 2000; Clason et al., 2003; Gagné et al., 2005, entre otros). *Paramoera* sp. (Figura 35) es una de las especies presentes en estas costas, muy abundante, que se encuentra debajo de rocas y en pequeños pozos de agua, semienterrada en el sedimento superficial y generalmente asociada a *E. gigas* y a restos de macroalgas. Aunque la información disponible sobre sus características biológicas y ciclo de vida es escasa, ha sido exitosamente utilizada en bioensayos de toxicidad con sedimentos contaminados y en la evaluación de determinados parámetros bioquímicos (Schvezov & Amin, 2011).



Figura 35. Fotografías del anfípodo *Paramoera* sp.

- ***Lithodes santolla* (Crustacea, Decapoda, Lithodidae)**

La centolla *Lithodes santolla* (Figura 36) es un crustáceo decápodo que habita aguas templado-frías y es la especie de mayor importancia en la explotación comercial de las aguas del Canal Beagle. Las aguas someras como las bahías han sido mencionadas como posibles áreas de reclutamiento (Vinuesa & Lovrich, 1992; Lovrich, 1997). El ciclo de vida de la centolla consta de varias etapas. Resumidamente, el apareamiento y la fertilización externa ocurren durante los meses de noviembre y diciembre. Las hembras llevan los embriones (huevos) en la cavidad de su abdomen durante nueve meses aproximadamente hasta el momento de la eclosión que ocurre entre los meses de septiembre y octubre (Vinuesa, 1991). El desarrollo larval incluye tres estadios zoea (zoea I, II y III) con una duración de alrededor de 21 a 25 días en condiciones experimentales, y un cuarto estadio postlarval llamado glaucothoe (Campodónico, 1971; Calcagno et al., 2004).

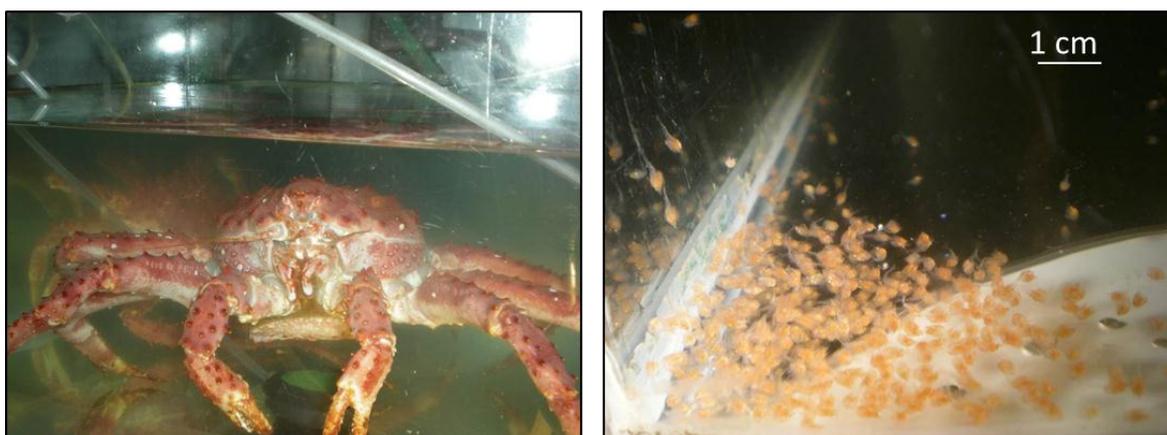


Figura 36. Fotografías de la centolla *Lithodes santolla* (hembra adulta y larvas zoea I).

Se encuentra disponible una amplia bibliografía sobre diversos aspectos biológicos de esta especie incluyendo reproducción, ciclo de vida, alimentación, composición bioquímica, fisiología y comportamiento, tanto en los adultos como en los estadios larvales (Vinuesa et al., 1985; Comoglio, 1994; Lovrich et al., 2003; Anger et al., 2004; Calcagno et al., 2004; Comoglio et al., 2008; Paschke et al., 2010; Sotelano et al., 2012; Tapella et al., 2012). Más aún, gran importancia ha tenido la utilización de embriones y larvas de centolla en bioensayos de toxicidad frente a la exposición a metales pesados (Cd, Pb, Zn y Cu) y a petróleo diesel, estudiando no solo la supervivencia sino también las anomalías,

malformaciones y cambios experimentados en las etapas de eclosión y muda (Amin et al., 1998; Amin & Comoglio, 2002; 2010; Amin et al., 2003).

7. Objetivos específicos

Los bioensayos con estresores ambientales tales como la temperatura, la salinidad, el pH, las variaciones en la concentración de oxígeno disuelto y en la concentración de amonio han sido muy utilizados en el estudio de crustáceos, principalmente debido a que estos factores son de gran importancia en el cultivo comercial de dichos organismos. Frente a la exposición a estos estresores, una amplia variedad de parámetros han sido determinados en crustáceos, incluyendo recuentos de supervivencia, determinaciones de CL50s, mediciones de parámetros fisiológicos, celulares y bioquímicos, entre otros (Ellis & Morris, 1995; Maltby, 1995; Moore et al., 1997; Jiang et al., 2000; Wang et al., 2002; Lemos et al., 2003; Kir et al., 2004; Prenter et al., 2004; Li et al., 2008).

Los crustáceos utilizados en estos bioensayos son residentes de la zona costera, por lo cual están sujetos a las variaciones del ambiente, principalmente influenciadas por el ciclo de marea. Estas variaciones pueden provocar estrés en los organismos por lo cual es importante conocer la tolerancia de estas especies a diferentes estresores ambientales como son las fluctuaciones de salinidad, pH y concentración de amonio.

Los **objetivos específicos** de este capítulo son:

- evaluar en adultos de isópodos y anfípodos la tolerancia a un rango de salinidad, pH y amonio bajo una exposición a 96 h, mediante el análisis de la supervivencia y las respuestas bioquímicas (AChE, CAT, GST y LPO) y fisiológicas (consumo de oxígeno y excreción nitrogenada).
- evaluar en larvas de centolla la tolerancia a una serie de concentraciones de amonio bajo exposiciones agudas y crónicas mediante el análisis de la supervivencia, las respuestas fisiológicas y las posibles alteraciones en las frecuencias de muda durante el desarrollo larval.

METODOLOGÍA

1. Resumen general de los bioensayos realizados

Se realizaron bioensayos de laboratorio utilizando como estresores ambientales salinidad, pH y amonio. Los mismos se desarrollaron a diferentes tiempos de exposición, en isópodos, anfípodos y larvas de centolla, determinando diferentes biomarcadores bioquímicos y fisiológicos. La Tabla 26 resume el trabajo realizado, el cual se detallará en las secciones siguientes.

Tabla 26. Tabla general de los bioensayos realizados con estresores ambientales en las tres especies de crustáceos.

Especie estudiada	Estresor ambiental	Tiempo de exposición	Supervivencia	Biomarcador determinado				
				AChE	CAT-GST	LPO	ConsO ₂ /ExcrNH ₄	MUDA
ISOPODOS Y ANFÍPODOS	Salinidad	96 h	x	x	x	x	x	-
	pH	96 h	x	x	x	x	x	-
	Amonio	96 h	x	x	x	x	x	-
LARVAS CENTOLLA	Amonio	48 h	-	-	-	-	x	-
		96 h	x	-	-	-	-	-
		crónico	x	-	-	-	-	x

2. Diseño experimental de los bioensayos

En las siguientes secciones se describirá la metodología general empleada en los diferentes bioensayos de laboratorio. Ésta incluye tanto la provisión y acondicionamiento de agua de mar y recolección de organismos, como el diseño experimental de los bioensayos y la preservación de las muestras biológicas para las posteriores determinaciones bioquímicas.

2.1 Acondicionamiento del agua de mar utilizada en los bioensayos

El agua de mar utilizada tanto en el mantenimiento y cultivo de los organismos, como en los experimentos, fue colectada de una zona prístina del Canal Beagle. En laboratorio fue filtrada a través de un filtro de polipropileno de 10 mm y posteriormente con luz ultravioleta para reducir al mínimo la actividad microbiana. Se almacenó en tanques oscuros de 250 L con aireación constante y a una temperatura de $8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

2.2 Recolección de los organismos de ensayo y mantenimiento en laboratorio

❖ *Isópodos y anfípodos*

Los isópodos y anfípodos adultos utilizados en los bioensayos se recolectaron de un lugar prístino, Playa Larga, Reserva Provincial cercana a la ciudad de Ushuaia (20 km al norte). En todos los casos se llevó a cabo la misma metodología, recolectando al azar los organismos debajo de las piedras en la zona intermareal, con marea baja y a mano con cucharas plásticas. Ya que la identificación sexual de los organismos conlleva una manipulación extra, el muestreo se realizó al azar evitando así un mayor estrés. Se asumió entonces que el grupo utilizado era representativo de la población natural, conservando la heterogeneidad propia de la población residente y en consecuencia, presentando una variabilidad causada por la exposición a las mismas condiciones ambientales en todos sus individuos. De todos modos, los isópodos carecen de dimorfismo sexual por lo cual la separación de géneros no resultaba posible.

Una vez recolectados, los organismos se mantuvieron en recipientes de plástico con agua del lugar y se trasladaron dentro de una conservadora plástica hasta el laboratorio. Una vez allí, se realizó la selección de los organismos adecuados para los ensayos, seleccionando aquellos que mostraran un buen aspecto y movilidad y un tamaño similar entre ellos. El período de aclimatación hasta el inicio del bioensayo fue de 48 h, en el cual los individuos se mantuvieron en el laboratorio climatizado ($8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), en recipientes de 5 L con agua de mar filtrada, sin alimentación, aireación constante y fotoperíodo de 12L: 12O con luz fluorescente.

❖ *Larvas de centolla*

Las larvas de *Lithodes santolla* fueron obtenidas de hembras adultas ovígeras recolectadas del ambiente natural (Canal Beagle) a fines de septiembre de 2010. En el laboratorio climatizado, se dispusieron en forma individual o de a dos, nueve hembras en acuarios de 20-30 L de capacidad con agua de mar filtrada y aireación continua, a una temperatura de $8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, salinidad de 23-24 y fotoperíodo de 12L: 12O. Durante el periodo de eclosión, las hembras se mantuvieron en ayuno sin que el mismo afecte este proceso, ya que no existe vinculación fisiológica entre los embriones y la hembra ovígera. Diariamente se filtró y renovó parcialmente el agua de mantenimiento, asegurando así que las larvas que nacieran tuvieran menos de 24 horas de eclosión para poder ser utilizadas en los bioensayos.

Esto es de importancia ya que las larvas comienzan a mudar al segundo estadio (zoea II) a partir del quinto o sexto día luego de la eclosión del embrión (Comoglio & Vinuesa, 1991).

Para todos los ensayos, zoeas de menos de 24 horas fueron seleccionadas de un grupo de larvas eclosionadas en forma simultánea a partir de dos hembras. Después de la eclosión, las larvas fueron recolectadas suavemente con la ayuda de un tamiz de tela y almacenadas en recipientes de 3 L con agua de mar filtrada hasta el inicio de cada ensayo. Fueron seleccionadas aquellas larvas que nadaban activamente y no fueron alimentadas durante los experimentos ya que estudios previos demuestran que presenta un desarrollo lecitotrófico, es decir, se alimenta de sus propias reservas (Comoglio & Vinuesa, 1991; Comoglio, 1994; Calcagno et al., 2004).

2.3 Diseño experimental y preparación de las soluciones de ensayo

❖ *Isópodos y anfípodos*

Se llevaron a cabo tres bioensayos de tolerancia a 96 h en cada especie, exponiendo los organismos a diferentes condiciones ambientales en cuanto a salinidad, pH y concentración de amonio. El mismo diseño experimental fue aplicado en ambas especies para los 3 estresores.

Los experimentos consistieron en una serie creciente de concentraciones del estresor bajo sistema estático con renovación. Una vez al día se comprobó la supervivencia de los organismos en todos los tratamientos y se registraron la temperatura, la salinidad, la conductividad, el oxígeno disuelto y el pH en cada uno de ellos con una sonda multiparamétrica Horiba U-10[®]. Al inicio de cada ensayo (T_0) se tomaron muestras de isópodos y de anfípodos como referencia de los parámetros iniciales. Al finalizar las 96 h de ensayo, se llevaron a cabo las mediciones fisiológicas de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada. Posteriormente, los organismos fueron colectados, enjuagados en agua destilada, secados en papel absorbente y dispuestos en tubos eppendorfs que se conservaron a -20°C por 24 h, paso previo necesario para la liofilización de las muestras. Este proceso extrae el contenido de agua mediante vacío y baja temperatura permitiendo el posterior análisis bioquímico de las muestras. Una vez liofilizadas se almacenaron en desecador hasta su posterior análisis bioquímico.

El rango ensayado de los estresores salinidad, pH y amonio fue seleccionado teniendo en cuenta los valores determinados en la zona costera de la ciudad de Ushuaia, bajo los cuales los organismos podrían estar sometidos.

Particularmente para la salinidad, los valores ensayados estuvieron dentro del rango obtenido por Amin et al. (2011b) (3.2 a 32.1) teniendo en cuenta diversos puntos costeros, siendo la salinidad promedio de 24.55 (± 6.63). Además, al estar los organismos presentes en zonas de descarga de cursos de agua dulce y de efluentes urbanos, podrían estar sujetos a una importante variación de este parámetro.

El pH es un parámetro que presenta menor variación a lo largo de los sitios costeros. Los valores disponibles en la literatura se encuentran dentro del rango 6.57 a 8.47 y promedian un valor de 7.62 (± 0.41) (Amin et al., 2011b).

En cuanto a la concentración de amonio en la zona costera, los valores de referencia tomados en el presente estudio fueron extraídos de aquellos obtenidos en muestreos previos incluyendo sitios costeros y descargas sobre línea de costa. Dichos valores oscilaron entre 0.03 y 38.5 mg $\text{NH}_4^+ \text{L}^{-1}$, siendo el valor del sitio control o de referencia (Playa Larga) de 0.06 mg $\text{NH}_4^+ \text{L}^{-1}$.

- **Salinidad**

Los experimentos de tolerancia a variaciones en la salinidad se llevaron a cabo utilizando cinco salinidades: 5, 10, 15, 25 y 30. Los tratamientos 5, 10 y 15 se obtuvieron por dilución de agua de mar filtrada con agua destilada, mientras que los tratamientos 25 y 30 se lograron por concentración de agua de mar mediante evaporación. Para cada tratamiento se dispusieron en total 25 isópodos o 45 anfípodos en 3 L de agua de mar.

- **pH**

Los experimentos de tolerancia a diferentes niveles de pH se realizaron utilizando tres tratamientos: 6.9, 7.8 y 8.5. Estos valores se obtuvieron ajustando el pH del agua de mar filtrada (≈ 7.65) con HCl o NaOH. En cada tratamiento se dispusieron 22 isópodos o 45 anfípodos en 3 L de agua al pH correspondiente.

- **Amonio**

Los experimentos de tolerancia a diferentes concentraciones de amonio se realizaron utilizando seis concentraciones nominales (control de agua de mar, 5.5, 9.57, 16.66, y 29 mg $\text{NH}_4^+ \text{L}^{-1}$) cuyos valores reales fueron 0.045, 3.10, 5.75, 10.41 y 17.12 mg $\text{N-NH}_3 \text{L}^{-1}$. Las concentraciones ensayadas se obtuvieron agregando en una serie de concentración logarítmica, una determinada cantidad del reactivo cloruro de amonio (NH_4Cl) al agua de mar filtrada, excepto en el tratamiento control al cual no se le adicionó reactivo. La concentración de amonio en cada tratamiento se determinó mediante el método del indofenol descrito por Strickland & Parsons (1972). Las concentraciones medias de amonio se calcularon promediando los valores de amonio inicial, medio y final de los 4 días de ensayo para cada tratamiento (variación entre 6 y 13%; $n=12$). Finalmente, en cada recipiente de ensayo se dispusieron 25 isópodos o 45 anfípodos en 3 L de agua con la concentración de amonio correspondiente.

- ❖ **Larvas de centolla**

Se realizaron tres bioensayos de tolerancia con larvas de centolla, exponiendo los organismos a diferentes concentraciones de amonio. Los diferentes tiempos de exposición y los parámetros registrados en cada bioensayo se indican en la Tabla 26.

- **Ensayo agudo a 96 h**

Se realizó un bioensayo a 96 h utilizando una serie de concentraciones nominales de amonio de 10.10; 16.32; 27.20; 45.07; 73.82; 121.99 y 202.02 mg $\text{N-NH}_3 \text{L}^{-1}$ (equivalentes a 13; 21; 35; 58; 95; 157 y 260 mg $\text{NH}_4 \text{L}^{-1}$, respectivamente). Todas las concentraciones ensayadas se prepararon a partir de una solución madre de NH_4Cl (1000 mg L^{-1}) tomando las alícuotas correspondientes a cada una.

Se seleccionaron al azar larvas recién nacidas (zoeas I). Grupos de 10 organismos se colocaron en recipientes con 150 mL de solución. Cada tratamiento se realizó por triplicado, incluyendo un control de agua de mar filtrada (menos de 0.04 mg $\text{N-NH}_3 \text{L}^{-1}$) y se mantuvieron en el laboratorio climatizado a una temperatura de $8 \pm 0.5^\circ\text{C}$, cubiertas con papel semitransparente (para evitar la luz fluorescente en forma directa) y sin aireación. Diariamente se registraron las larvas muertas y las sobrevivientes se transfirieron a recipientes con medio fresco, de acuerdo al sistema estático con renovación diaria

empleado. El criterio de muerte utilizado en este ensayo fue el cese del latido cardíaco observado bajo lupa (Rodríguez & Amin, 1991).

Se calculó el porcentaje de supervivencia de larvas en cada tratamiento y la concentración letal 50 (CL50) a 96 h y sus límites de confianza al 95% mediante el análisis Probit incluyendo la corrección de Abbott para la mortalidad del control (Finney, 1971).

- **Ensayo agudo a 48 h**

A partir de los resultados de mortalidad a 96 h, se seleccionaron 2 concentraciones subletales de amonio (20.20 y 40.40 mg N-NH₃ L⁻¹) para realizar un bioensayo de tolerancia a 48 h. Los tratamientos se prepararon con las correspondientes cantidades de NH₄Cl, adicionando un control de agua de mar filtrada. Se seleccionaron larvas recién nacidas y se expusieron grupos de 140 organismos en recipientes con 350 mL por cada tratamiento ensayado.

Luego de las 48 h se registraron el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada como respuestas fisiológicas frente a la exposición a amonio. La metodología utilizada se describirá en la sección 3.2 (página 101).

- **Ensayos crónicos hasta muda al estadio postlarva**

Para evaluar la toxicidad crónica en las larvas de centolla, se realizaron dos bioensayos siguiendo la misma metodología descrita para el ensayo agudo a 96 h, es decir, se utilizaron las mismas 8 concentraciones de amonio (control, 10.10; 16.32; 27.20; 45.07; 73.82; 121.99 y 202.02 mg N-NH₃ L⁻¹) e idéntico diseño experimental. Zoeas I permanecieron expuestas a las diferentes concentraciones de amonio durante el desarrollo larval hasta alcanzar el estado postlarval de megalopa. Las larvas ensayadas provinieron de dos eclosiones masivas diferentes (EI y EII, respectivamente) para poder evaluar al mismo tiempo la variación de respuesta entre las mismas.

Diariamente se registró la supervivencia y se determinó bajo lupa el estadio larval en el cual se encontraba cada organismo. Las larvas que mudaban de estadio, fueron transferidas a nuevos recipientes agrupando a todas aquellas mudadas simultáneamente y sometidas a idéntico tratamiento para continuar con el seguimiento diario de muda. Se calculó el tiempo medio de vida (TV50) que es el tiempo en el cual el 50% de las larvas ensayadas muere y fue estimado para cada tratamiento mediante el análisis Probit. También

se calculó el tiempo medio de muda (TM50) que es el tiempo en el cual el 50% de las larvas ensayadas mudan de un estadio al siguiente y fue estimado para cada cambio de estadio (zoea I a II, II a III y III a postlarva) y para cada tratamiento mediante el análisis Probit (Finney, 1971). Por último, se estimaron el porcentaje acumulado de muda como la proporción de larvas mudadas de un estadio al siguiente respecto al número total de larvas en cada tratamiento (zoea I a II, II a III y III a postlarva) y el porcentaje total de muda como la proporción de larvas mudadas del estadio zoea I al postlarval de megalopa.

3. Medición de biomarcadores

3.1 Biomarcadores bioquímicos

Los biomarcadores bioquímicos AChE, CAT, GST y LPO se determinaron en isópodos y anfípodos. En todos los casos se utilizó un grupo de organismos enteros (3 isópodos o 5 anfípodos para cada muestra) que fue homogenizado con el buffer correspondiente a cada técnica en particular. Los homogenatos se centrifugaron y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta el día siguiente, momento en el cual se realizaron las determinaciones.

La actividad de AChE se midió en base a la determinación de la tasa de producción de tiocolina siguiendo la técnica de Ellman et al. (1961) adaptada a microplaca (Guilhermino et al., 1996) y se expresó en nmoles de sustrato hidrolizado por minuto por miligramo de proteína ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$).

La actividad enzimática de CAT se determinó midiendo la disminución de la absorbancia debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en espectrofotómetro a 240 nm siguiendo la técnica de Beutler (1982). Los resultados se expresaron en micromoles de H_2O_2 hidrolizado por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$), lo que equivale a 1 UCAT mg prot^{-1} .

La actividad enzimática de GST se realizó siguiendo la técnica de Habig et al. (1974), procedimiento que mide la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con el glutatión reducido (GSH), indicado como el incremento en la absorbancia a 340 nm. Los resultados se expresaron en milimoles de CNDB conjugado por minuto por miligramo de proteína ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) lo que equivale a 1 UGST mg prot^{-1} .

La LPO se estimó a partir de la formación las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se cuantificó en términos de malondialdehído (MDA), siguiendo la técnica de Beuge & Aust (1978). Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 535 nm y

los resultados se expresaron en nanomoles de MDA formado por miligramo de proteína (nmol MDA mg prot⁻¹).

Para la cuantificación final de los biomarcadores mencionados, se determinó el contenido de proteínas solubles de cada muestra según la técnica propuesta por Markwell et al. (1978), leyendo en espectrofotómetro a 750 nm y utilizando una curva estándar de albúmina bovina a partir de una solución madre (concentración 3.8 g dL⁻¹).

Los protocolos detallados de todos los biomarcadores medidos se describen en el Anexo II (página 219).

3.2 Biomarcadores fisiológicos

Los biomarcadores fisiológicos se determinaron en isópodos, anfípodos y larvas de centolla y en todos los bioensayos realizados. La metodología utilizada para determinar el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada fue similar en las 3 especies; las diferencias se presentaron en la cantidad de organismos por réplica, en el tiempo de aclimatación de las mismas y en el tiempo que las cámaras permanecieron cerradas.

Al finalizar el período de exposición de cada bioensayo, grupos de 5 isópodos, 5 anfípodos o 28 larvas de centolla se colocaron en cámaras respirométricas de 72mL de capacidad bajo un sistema de flujo continuo de agua de mar filtrada (6 a 12 mL por minuto) provisto por una bomba peristáltica multicanal. Cámaras sin organismos se adicionaron como controles. Después de un período de aclimatación de entre 1:30 y 2 horas, se tomaron muestras de agua de cada cámara para determinar la concentración inicial de oxígeno y de amonio. Las cámaras sumergidas en un baño térmico controlado a $8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad (para disminuir la actividad) se cerraron herméticamente durante un periodo de tiempo determinado (2 horas en isópodos y anfípodos, y 3 horas para las larvas de centolla). Posteriormente se tomaron nuevas muestras para medir las concentraciones finales de ambos parámetros. La concentración de oxígeno se midió utilizando un electrodo polarográfico YSI® 5100 y la concentración de amonio se determinó siguiendo la técnica de Strickland & Parsons (1972). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

El oxígeno consumido y el amonio excretado fueron calculados como la diferencia neta entre los valores iniciales y finales en el período de cierre, corregido por la capacidad de la cámara y el peso seco de los organismos. Los resultados se expresaron en mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ y en µg N-NH₃ h⁻¹ g⁻¹. La proporción O:N se estimó de acuerdo a Taboada et al. (1998),

utilizando los valores de consumo de oxígeno y excreción de amonio transformados a $\mu\text{g átomo h}^{-1}\text{g}^{-1}$.

4. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores

El RIB se calcula por la combinación de diferentes biomarcadores en un único valor, el cual puede ser utilizado para describir el nivel de estrés inducido por diversos compuestos sobre las poblaciones estudiadas, teniendo en cuenta diferentes sitios, épocas o tratamientos ensayados, como es el caso del presente estudio.

Específicamente, el cálculo del RIB se basa en las diferencias relativas entre los biomarcadores en cada set de datos. Así, es calculado como la suma de las áreas de un gráfico radial (un método simple multivariado) por cada dos biomarcadores vecinos en un set de datos, según el siguiente procedimiento:

- (1) cálculo de la media y desviación estándar por cada biomarcador para todas las muestras.
- (2) estandarización de los datos para cada muestra mediante la ecuación $x_i' = (x_i - \bar{x})/s$; donde x_i' = valor estandarizado del biomarcador; x_i = valor medio del biomarcador de cada muestra; \bar{x} = media general de x_i calculada a partir de todas las muestras; s = desviación estándar de x_i calculada a partir de todas las muestras. Aquí se obtiene por cada biomarcador, media=0 y desviación estándar= 1.
- (3) adición del valor estandarizado obtenido para cada muestra (x_i') al valor absoluto del valor mínimo de todas las muestras ($y_i = x_i' + |x_{\min}'|$).
- (4) cálculo de las áreas individuales del gráfico radial por multiplicación del valor obtenido estandarizado de cada biomarcador (y_i) con el valor estandarizado del siguiente biomarcador (y_{i+1}) dividiendo por 2 ($A_i = (y_i \times y_{i+1})/2$).
- (5) cálculo del índice de RIB como la suma de todas las áreas del gráfico radial: $\text{RIB} = \sum A_i$ es decir, $\{[(B_1 \times B_2)/2] + [(B_2 \times B_3)/2] + \dots + [(B_{n-1} \times B_n)/2] + [(B_n \times B_1)/2]\}$ (Beliaeff & Burgeot, 2002).

En el presente estudio se calculó el RIB en isópodos y anfípodos para cada tratamiento ensayado de salinidad, pH y amonio, utilizando un total de 6 biomarcadores (AChE, CAT, GST, LPO, Consumo de Oxígeno y Excreción Nitrogenada). Debido a que el valor

del RIB es directamente dependiente del número de biomarcadores utilizados, se dividió el valor del RIB obtenido por 6 para calcular el RIB/n, de acuerdo a Broeg y Lehtonen (2006).

5. Alteraciones en el ciclo de vida en crustáceos: muda

Para evaluar el efecto de la exposición de amonio sobre el ciclo de muda en las larvas de centolla, las mismas se observaron bajo lupa para identificar el estadio larval en el cual se encontraban. La distinción de los diferentes estadios se realizó en base a la aparición de las exuvias y a los cambios morfológicos presentes en las larvas (Campodónico, 1971; McLaughlin et al., 2001). Según Campodónico (1971), la zoea I carece totalmente de apéndices en el pleon, mientras que en el estadio zoea II se observa el desarrollo rudimentario de los pleópodos, hecho que permite su diferenciación en forma notable del primer estadio. La zoea III completa el desarrollo de dichos apéndices los cuales son conspicuos pero aun no funcionales.

6. Análisis estadístico

Con el objetivo de evaluar la existencia de diferencias significativas entre los valores de biomarcadores determinados en los tratamientos dentro de cada bioensayo, se realizó un ANOVA cuando se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedasticidad, utilizando los test de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente (Sokal & Rohlf, 1981). En el caso de la existencia de diferencias significativas entre tratamientos, las comparaciones múltiples se llevaron a cabo empleando el test de Tukey (n desiguales). Para el caso de no cumplirse dichos supuestos, los datos se analizaron por medio del test no paramétrico de Kruskal Wallis y comparaciones múltiples de Dunn (Daniel, 1978). En todos los casos se utilizó el Software estadístico STATISTICA 6.0 trabajando con un $p < 0.05$. Para los cálculos correspondientes a la CL50 se utilizó el Análisis Probit (Finney, 1971).

RESULTADOS

1. BIOENSAYOS CON ISÓPODOS Y ANFÍPODOS

1.1. Determinación de parámetros fisicoquímicos en los bioensayos

Los valores de los parámetros fisicoquímicos registrados diariamente durante los bioensayos con estresores ambientales se presentan en las Tablas 27, 28 y 29.

Tabla 27. Parámetros fisicoquímicos determinados en los diferentes tratamientos de salinidad.

Salinidad	pH		Conductividad		Oxígeno Disuelto		Temperatura	
	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>
5	7,25	0,10	9,38	0,04	9,16	0,71	8,04	0,76
10	7,49	0,14	17,58	0,08	9,23	0,48	7,80	0,80
15	7,54	0,11	25,34	0,09	9,26	0,39	7,82	0,54
25	7,78	0,19	40,32	0,08	9,12	0,17	7,84	0,30
30	8,13	0,05	47,60	0,07	8,75	0,14	7,80	0,32

Tabla 28. Parámetros fisicoquímicos determinados en los diferentes tratamientos de pH.

pH	Salinidad		Conductividad		Oxígeno Disuelto		Temperatura	
	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>
6.9	23,65	0,24	38,18	0,39	8,40	0,93	8,53	0,28
7.8	23,85	0,06	38,60	0,14	8,60	0,53	7,90	0,28
8.5	23,95	0,06	38,73	0,10	8,65	0,44	7,80	0,14

Tabla 29. Parámetros fisicoquímicos determinados en las diferentes concentraciones de amonio (mg N-NH₃ L⁻¹).

Amonio	pH		Conductividad		Oxígeno Disuelto		Temperatura		Salinidad	
	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>	<i>media</i>	<i>DS</i>
0.04	7,83	0,07	39,88	1,28	9,80	1,15	8,38	0,21	24,88	0,88
3.10	7,81	0,01	38,58	0,38	10,34	0,99	6,68	0,29	23,63	0,31
5.75	7,80	0,01	38,68	0,43	10,13	0,89	6,60	0,14	23,70	0,37
10.41	7,78	0,04	38,88	0,43	9,70	1,13	6,70	0,18	23,85	0,29
17.12	7,75	0,07	38,68	0,30	9,73	1,52	7,23	0,15	23,78	0,22

1.2. Supervivencia a 96 h

A continuación se presentan las supervivencias totales para cada tratamiento ensayado (Tabla 30) debido a que no se detectaron diferencias notorias en la supervivencia entre las replicas utilizadas.

Tabla 30. Supervivencia de isópodos y anfípodos en los bioensayos de tolerancia a salinidad, pH y amonio.

Bioensayos y Tratamientos		Supervivencia (%)	
		Isópodos	Anfípodos
Salinidad	5	88	93,3
	10	96	100
	15	100	100
	25	100	100
	30	100	100
pH	6.9	95,5	97,8
	7.8	100	93,3
	8.5	100	100
Amonio (mg N-NH ₃ L ⁻¹)	0.04	90,9	97,8
	3.10	90,9	100
	5.75	90,9	93,3
	10.41	95,5	95,6
	17.12	90,9	97,8

En isópodos, la menor supervivencia se registró en el tratamiento 5 de salinidad (88%), mientras que en anfípodos los menores valores (93.3%) se registraron en los tratamientos 5 de salinidad, pH de 7.8 y 5.7 mg N-NH₃ L⁻¹ (Tabla 30).

Debido a que los valores de mortalidad fueron muy bajos, no fue posible calcular la CL50 en isópodos y anfípodos para los bioensayos de salinidad, pH y amonio.

1.3. Biomarcadores bioquímicos

❖ Acetilcolinesterasa

La actividad de AChE fue mayor en anfípodos que en isópodos para todos los tratamientos ensayados (Figura 37).

En los ensayos con isópodos, los valores iniciales de AChE no presentaron diferencias significativas entre ensayos ($F=0.10$; $p=0.899$), siendo el valor medio de 5.07 ± 0.73 nmol min^{-1} mg prot^{-1} . Tampoco se detectaron diferencias significativas dentro de cada bioensayo (salinidad: $H=5.46$; $p=0.3622$; pH: $H=2.17$; $p=0.5385$; amonio: $H=5.24$; $p=0.2639$). Sin embargo, las mayores inhibiciones de AChE con respecto al valor inicial correspondiente se registraron en los tratamientos de salinidad 10 (2.52 ± 1.30 nmol min^{-1} mg prot^{-1}), pH 8.5 (3.30 ± 0.82 nmol min^{-1} mg prot^{-1}) y 5.75 mg N-NH₃ L⁻¹ (2.43 ± 0.46 nmol min^{-1} mg prot^{-1}), las cuales representaron disminuciones del 52.7%, 41.6% y 42.7% respectivamente (Figura 37).

Para los bioensayos con anfípodos, los valores iniciales de AChE presentaron diferencias significativas ($F=12.78$; $p=0.018$), siendo el valor medio de 14.83 ± 5.24 nmol min^{-1} mg prot^{-1} . También se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada bioensayo (salinidad: $F=9.50$; $p=0.0015$; pH: $F=5.14$; $p=0.0286$; amonio: $F=9.56$; $p=0.0058$), registrándose una estimulación de la actividad respecto al nivel inicial. Los incrementos fueron máximos a salinidad 30 (15.19 ± 1.48 nmol min^{-1} mg prot^{-1}), pH 8.5 (24.91 ± 2.57 nmol min^{-1} mg prot^{-1}) y 10.41 mg N-NH₃ L⁻¹ (29.60 ± 3.53 nmol min^{-1} mg prot^{-1}), representando aumentos del 65.5%, 57.8% y 51.6%, respectivamente (Figura 37).

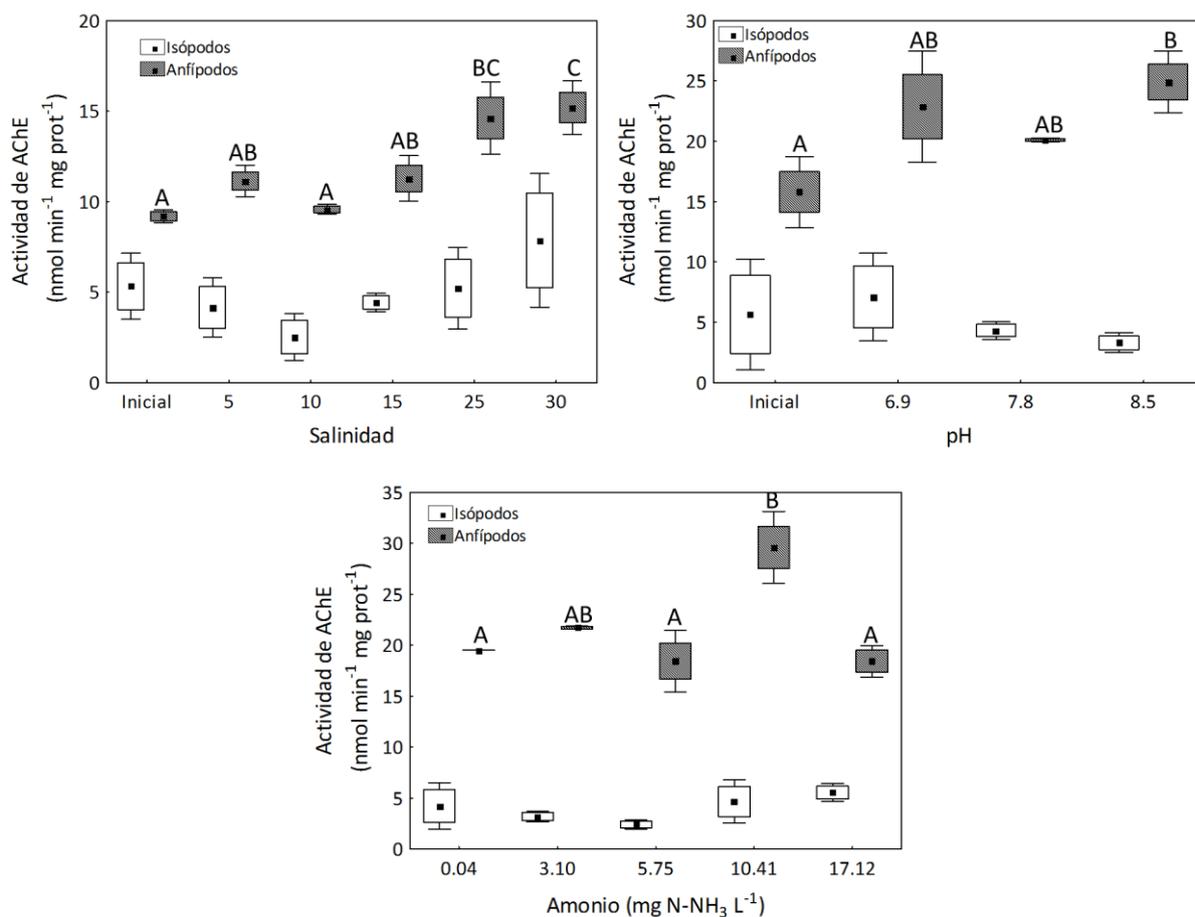


Figura 37. Actividad de AChE en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Catalasa

En forma general, los anfípodos expuestos presentaron mayores valores medios de CAT que los registrados en isópodos (Figura 38). En ambas especies no hubo diferencias significativas entre los valores iniciales de cada bioensayo ($F=2.98$; $p=0.1935$ para isópodos y $F=0.98$; $p=0.4390$ para anfípodos), siendo los valores medios de 0.66 ± 0.39 UCAT mg prot⁻¹ y de 1.03 ± 0.34 UCAT mg prot⁻¹ respectivamente (Figura 38).

En isópodos las respuestas fueron no significativas y no se detectó una tendencia general para todos los bioensayos (salinidad: $H=5.54$; $p=0.3537$; pH: $H=5.50$; $p=0.1386$; amonio: $H=5.67$; $p=0.2250$). Para los bioensayos de salinidad y amonio se registró un incremento notable respecto del nivel inicial en los tratamientos de salinidad 5 (0.76 ± 0.36 UCAT mg prot⁻¹) y de 17.12 mg N-NH₃ L⁻¹ (1.42 ± 0.09 UCAT mg prot⁻¹), correspondiendo a un

aumento del 168% y 122%, respectivamente. En cuanto al bioensayo de pH, se registró una disminución progresiva a medida que el pH se elevó (Figura 38).

En anfípodos, se detectaron diferencias significativas entre las distintas salinidades ensayadas ($H=13.16$; $p=0.0219$), siendo máximo el incremento en la salinidad 5 (2.51 ± 0.50 UCAT mg prot^{-1} ; 239%). A pesar de que en los bioensayos de pH y amonio no se registraron diferencias significativas ($F=0.69$; $p=0.5814$; y $H=8.40$; $p=0.0780$, respectivamente) sí se observó una alta actividad a pH 6.9 (1.34 ± 0.36 UCAT mg prot^{-1} ; 42% respecto del valor inicial). Por otra parte, hubo disminución en todos los tratamientos de amonio, registrándose el mayor decremento en la máxima concentración de amonio ensayada (0.38 ± 0.04 UCAT mg prot^{-1} ; 73%) (Figura 38).

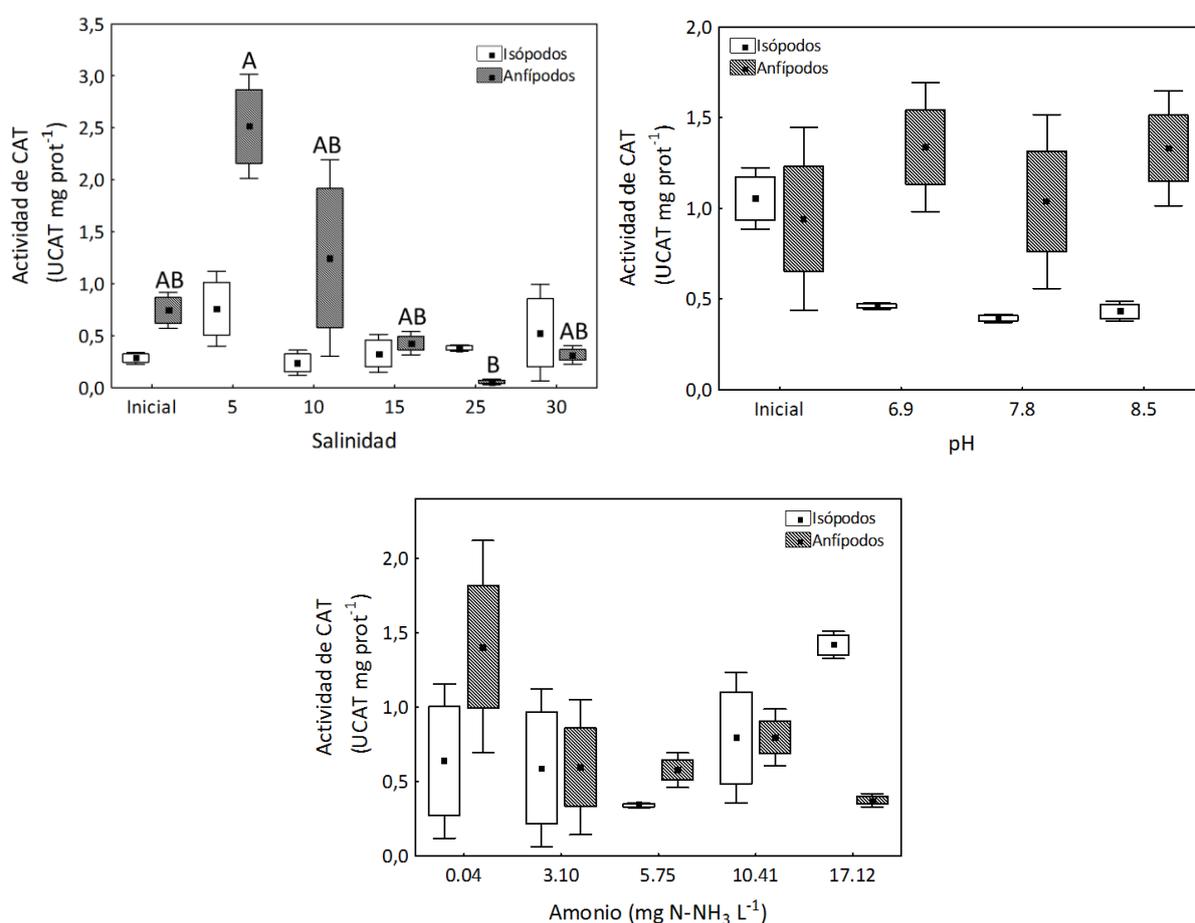


Figura 38. Actividad de CAT en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p<0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Glutación S- Transferasa

Los bioensayos con anfípodos presentaron mayor actividad GST que los de isópodos. Los valores iniciales de GST de los 3 bioensayos de anfípodos fueron significativamente diferentes ($F=11.77$; $p=0.0129$) con una media de 0.13 ± 0.05 UGST mg prot⁻¹; siendo no significativos en los ensayos de isópodos ($F=0.65$; $p=0.5830$) y con un valor medio de 0.05 ± 0.02 UGST mg prot⁻¹ (Figura 39).

En los bioensayos de isópodos, no se hallaron diferencias significativas entre diferentes tratamientos de un mismo estresor (salinidad: $H=8.61$; $p=0.1254$; pH: $H=2.00$; $p=0.5724$; amonio: $H=5.24$; $p=0.2639$), detectándose variabilidad en la respuesta. Las máximas disminuciones se registraron en los tratamientos salinidad 15 (0.02 ± 0.01 UGST mg prot⁻¹) y pH 6.9 (0.02 ± 0.03 UGST mg prot⁻¹); mientras que las máximas actividades se presentaron en salinidad 30 (0.07 ± 0.02 UGST mg prot⁻¹), pH 8.5 (0.06 ± 0.03 UGST mg prot⁻¹) y 10.41 mg N-NH₃ L⁻¹ (0.13 ± 0.03 UGST mg prot⁻¹) (Figura 39).

En anfípodos, los valores de GST difirieron significativamente entre salinidades ($F=8.44$; $p=0.0017$), pero no entre diferentes tratamientos de pH y de amonio ($H=4.74$; $p=0.1916$ y $F=0.96$; $p=0.4695$, respectivamente). La actividad disminuyó a medida que se incrementó la salinidad (máxima disminución de 66% en salinidad 30; 0.06 ± 0.01 UGST mg prot⁻¹), aumentó con el pH respecto del inicial (máximo de 57% en pH 8.5; 0.14 ± 0.05 UGST mg prot⁻¹); mientras que se mantuvo similar en las diferentes concentraciones de amonio, con valores entre 0.12 y 0.13 UGST mg prot⁻¹ (Figura 39).

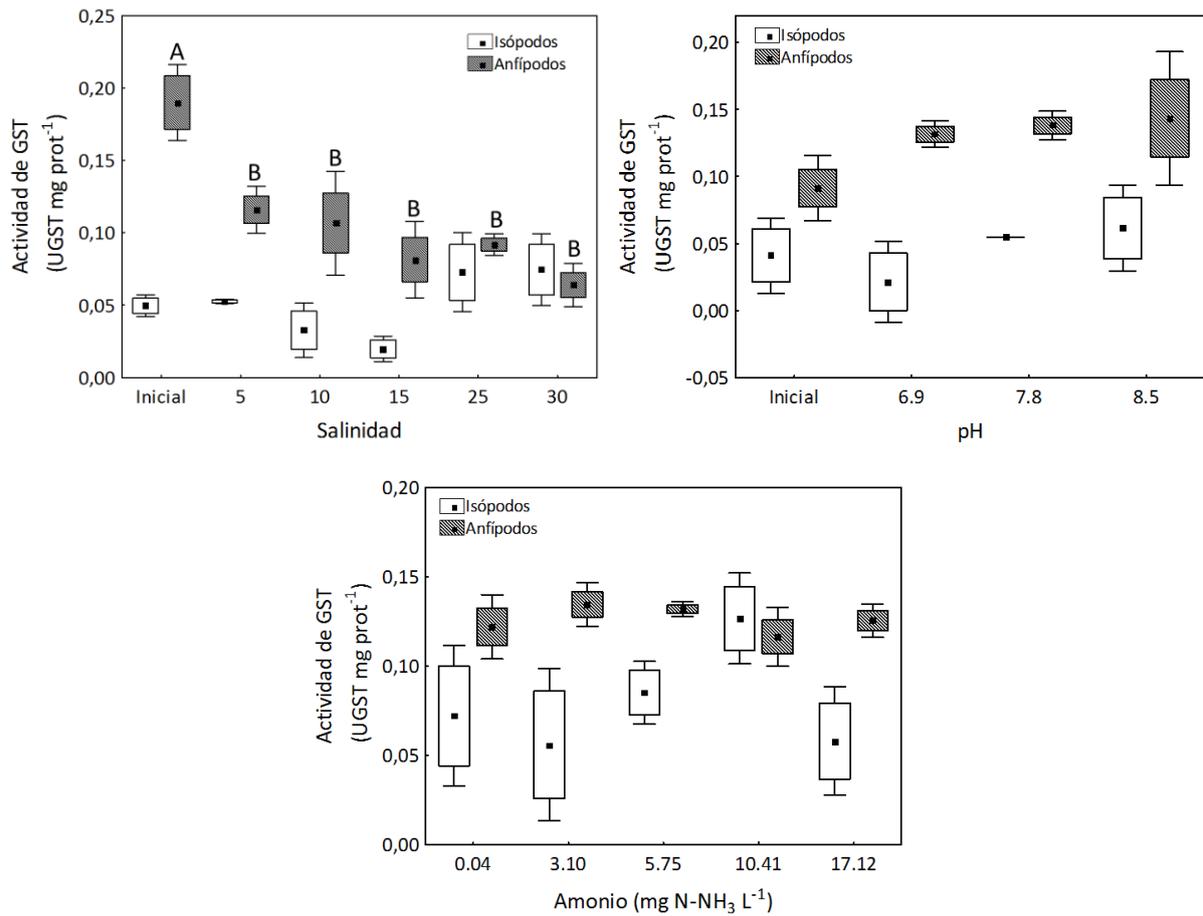


Figura 39. Actividad de GST en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Lipoperoxidación

Tanto en isópodos como en anfípodos, los valores medios de LPO se mantuvieron dentro del mismo rango (1.3 a 2.7 nmol MDA mg prot⁻¹). Se encontraron diferencias significativas entre los valores iniciales de los ensayos en isópodos (F=6.07; p=0.0459; valor medio de 2.03 ± 0.34 nmol MDA mg prot⁻¹), pero no en anfípodos (F=2.42; p=0.1845; valor medio de 1.85 ± 0.26 nmol MDA mg prot⁻¹). Por otro lado, en ambas especies no se registraron variaciones significativas entre los tratamientos de pH (H=7.00; p=0.0719 para isópodos y F=3.22; p=0.1201 para anfípodos) y amonio (F=2.29; p=0.1933 para isópodos y F=1.98; p=0.1814 para anfípodos). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre salinidades (H=12.84; p=0.0249 para isópodos y H=11.57; p=0.0412 para anfípodos) (Figura 40).

Particularmente en isópodos, la LPO disminuyó con el aumento de la salinidad, siendo mínimo el valor a salinidad 25 (1.51 ± 0.10 nmol MDA mg prot⁻¹; 26%). Los valores medios en los diferentes tratamientos de pH se mantuvieron homogéneos, mientras que se registró el máximo valor de LPO a la mayor concentración de amonio, el cual representa un aumento del 39% (2.34 ± 0.15 nmol MDA mg prot⁻¹) respecto del valor inicial (Figura 40).

En anfípodos, la LPO aumentó en todos los tratamientos respecto del nivel inicial (entre 16 y 40% de incremento), aunque el mayor registro se encontró en la salinidad 10 seguido por la salinidad 30. En forma contraria, en los ensayos de pH, la LPO fue menor a la inicial y mínima en el pH 7.8 (1.58 ± 0.09 nmol MDA mg prot⁻¹). No se observó una tendencia en la respuesta a la exposición de amonio, registrándose menores niveles (correspondientes a un 11% promedio de disminución con respecto al valor inicial) en las concentraciones 5.75 y 17.12 mg N-NH₃ L⁻¹ (Figura 40).

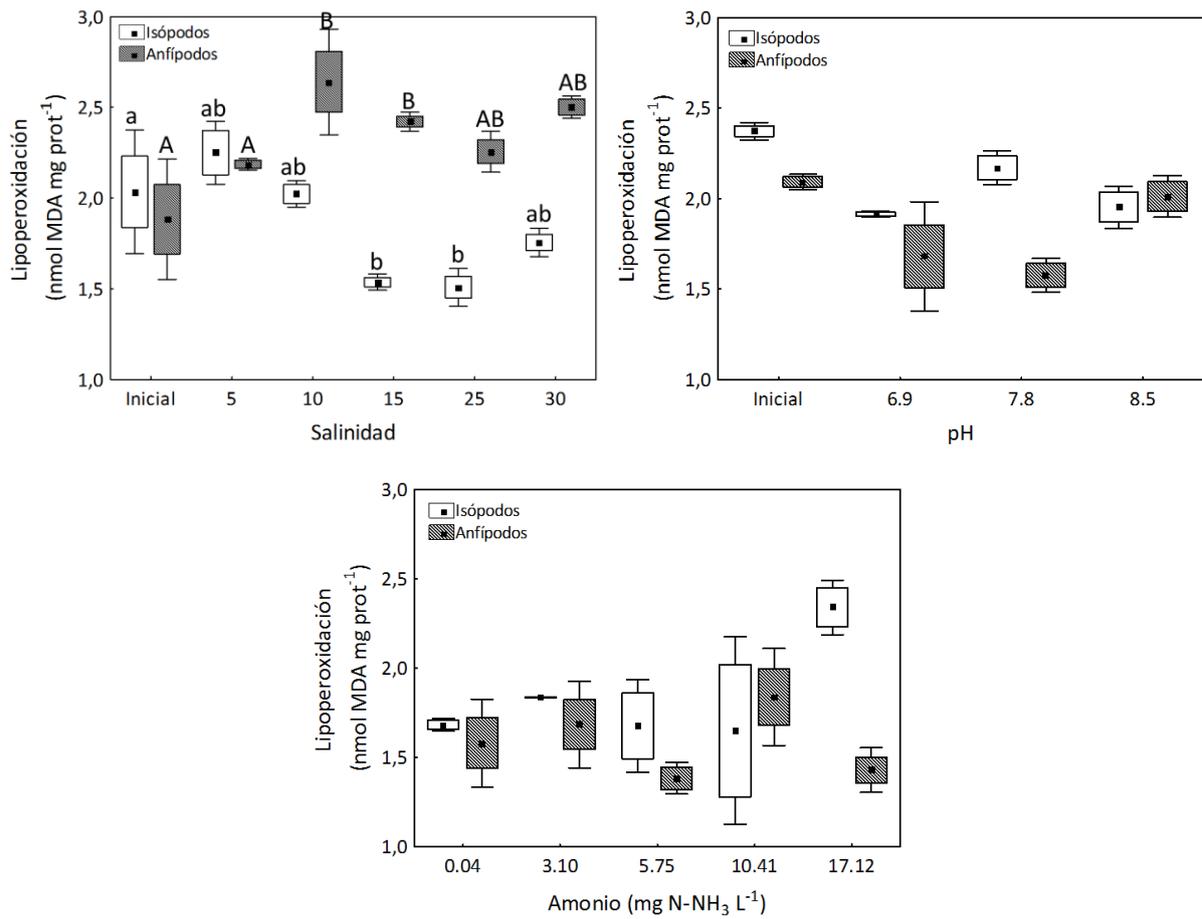


Figura 40. LPO en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

1.4. Biomarcadores fisiológicos

❖ Consumo de oxígeno

Los valores de las tasas de consumo de O₂ en los 3 bioensayos realizados fueron mayores en anfípodos que en isópodos, con una tendencia a la disminución del consumo con el aumento de salinidad. Se presentaron diferencias significativas en isópodos entre las distintas salinidades (F=8.32; p=0.0012), siendo menores los valores en las salinidades 15, 25 y 30 (media de 0.24 ± 0.04 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹). Sin embargo, en anfípodos las diferencias fueron no significativas (F=2.72; p=0.0692), registrándose un mayor consumo a la menor salinidad (0.79 ± 0.27 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹) (Figura 41).

En los bioensayos de pH no se detectaron diferencias significativas para ambas especies estudiadas (F=4.19; p=0.0636 para isópodos y F=0.57; p=0.5835 para anfípodos). A medida que se incrementó el pH, la tendencia en el consumo de O₂ fue de aumento en isópodos (máximo valor de 0.25 ± 0.04 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹) y disminución en anfípodos (mínimo valor de 0.58 ± 0.08 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹) (Figura 41).

Con respecto a los bioensayos con amonio, sólo fueron significativas las diferencias en el consumo de O₂ en los anfípodos (F=27.25; p=0.0000), siendo mayor esta tasa a la máxima concentración de amonio ensayada, registrándose un 50% de incremento entre el tratamiento control y el 17.12 mg N-NH₃ L⁻¹. Si bien no se detectaron diferencias significativas en el consumo de O₂ en los isópodos (H=7.41; p=0.1158), el máximo valor de 0.17 mg O₂ h⁻¹ g⁻¹ se registró a la mayor concentración ensayada (Figura 41).

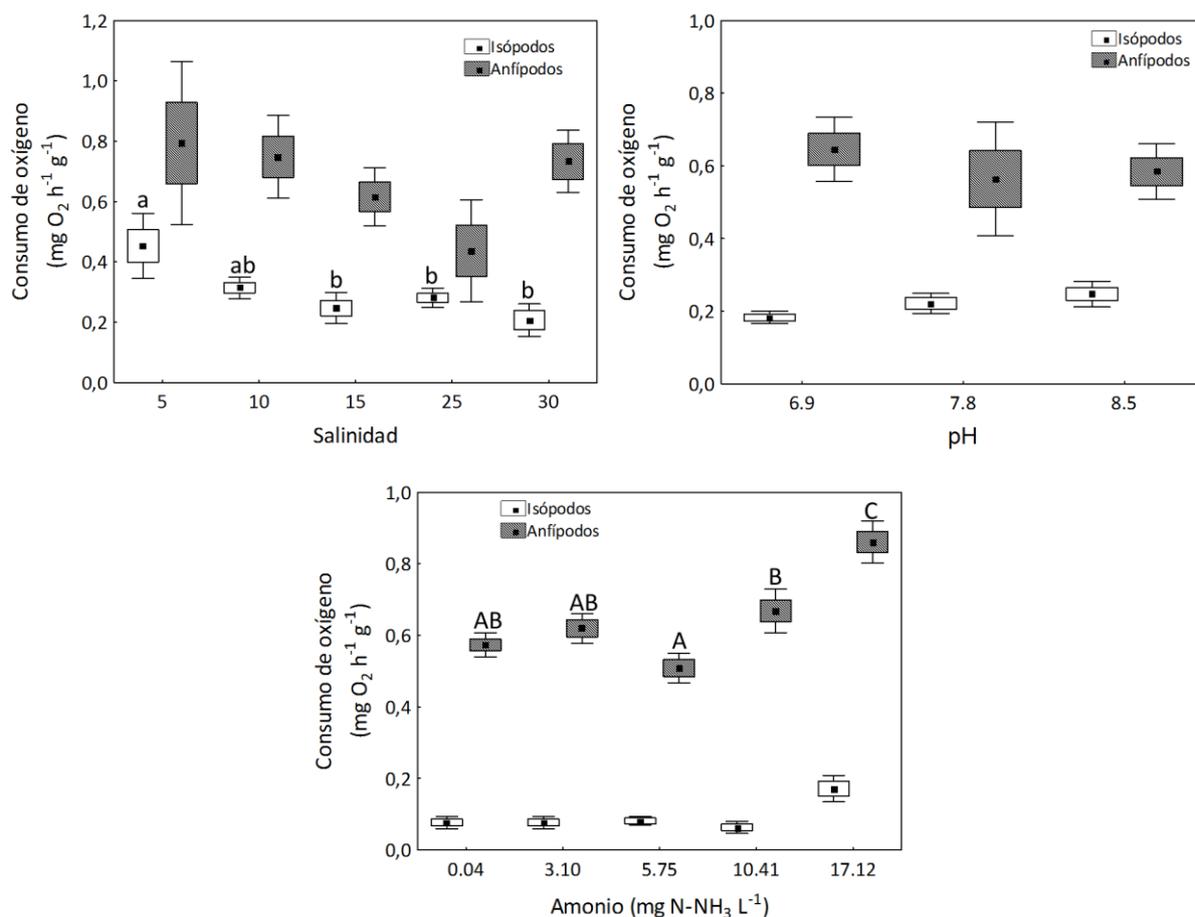


Figura 41. Consumo de oxígeno en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Excreción de amonio

En los bioensayos de salinidad y pH, en forma general la excreción de amonio presentó valores mayores en anfípodos, mientras que en el bioensayo de amonio fue mayor en isópodos (Figura 42).

Se registraron diferencias significativas en la excreción nitrogenada entre salinidades ensayadas, tanto en isópodos como en anfípodos ($F=10.66$; $p=0.0009$ y $F=9.59$; $p=0.0026$, respectivamente). Para los bioensayos con isópodos se observó un aumento de la excreción hacia las mayores salinidades (máxima excreción de $14.89 \pm 1.27 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en salinidad 30). Sin embargo, para los ensayos con anfípodos no se detectó una tendencia en la respuesta, siendo menores los valores en las salinidades 10 y 30 (promedio de $8.35 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Figura 42).

En cuanto a los bioensayos de pH, la excreción nitrogenada tendió a disminuir en isópodos ($F=6.25$; $p=0.0342$) y a aumentar en anfípodos ($F=6.30$; $p=0.0272$). Los valores más altos se registraron a pH 6.9 en isópodos ($8.34 \pm 1.63 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) y a pH 8.5 en anfípodos ($8.15 \pm 1.27 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Figura 42).

Por otro lado, para ambas especies estudiadas, la excreción de amonio aumentó significativamente hacia las mayores concentraciones de amonio ($H=12.75$; $p=0.0126$ para isópodos y $H=12.95$; $p=0.0115$ para anfípodos). En isópodos, los mayores valores se encontraron en las concentraciones 10.41 y 17.12 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (promedio de $41.68 \pm 0.18 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$), mientras que en anfípodos fue mayor la excreción a 17.12 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ ($32.89 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Figura 42).

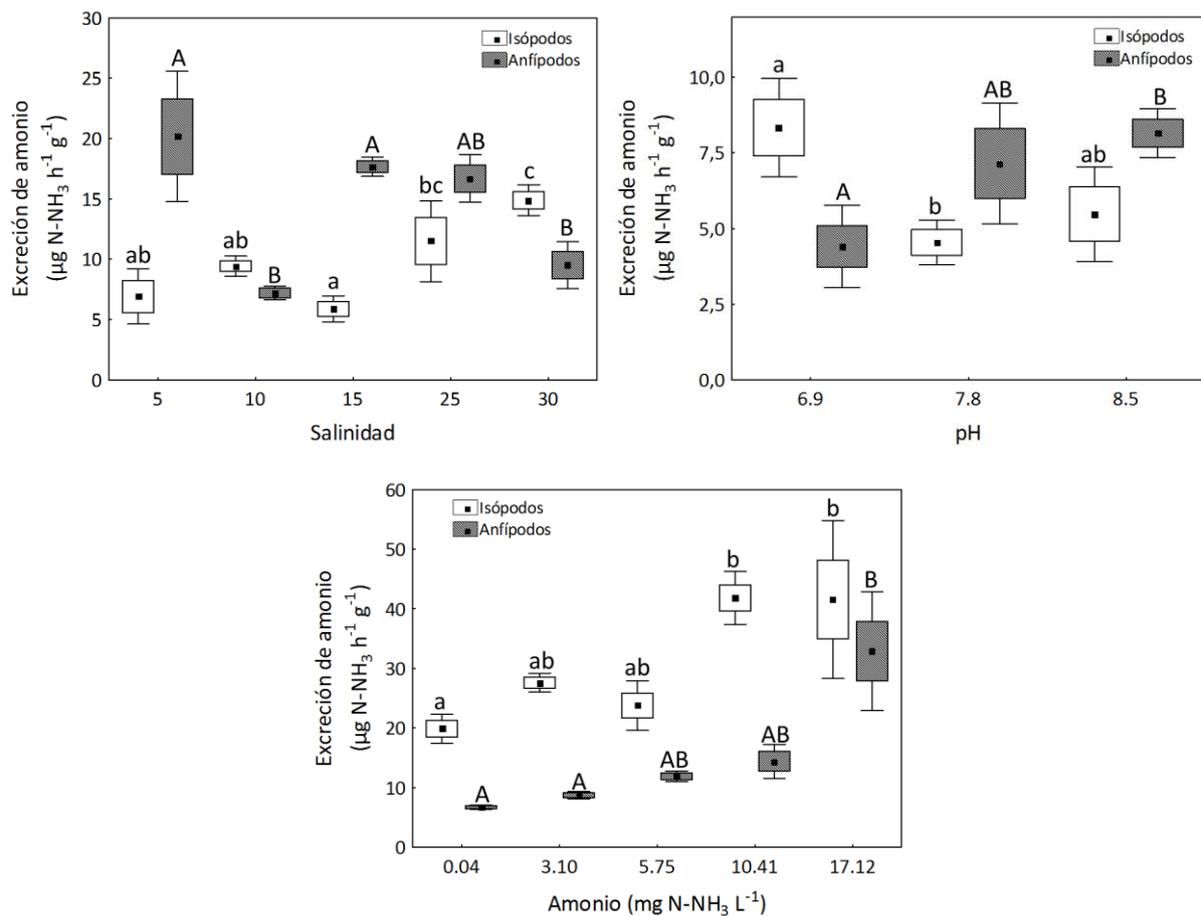


Figura 42. Excreción de amonio en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Relación atómica O:N

Este parámetro presentó diferencias significativas en todos los ensayos. En isópodos, la relación O:N presentó una tendencia a disminuir hacia mayores salinidades ($F=39.06$; $p=0.0000$), mientras que en anfípodos no se detectó un patrón de respuesta siendo mayores los valores en las salinidades 10 y 30 ($H=10.91$; $p=0.0275$) (Figura 43).

Por otro lado, analizando las relaciones O:N en los diferentes valores de pH, el valor más alto registrado en anfípodos (135.5 ± 34.10 ; $F=12.00$; $p=0.0080$) y el más bajo registrado en isópodos (19.45 ± 2.28 ; $H=6.56$; $p=0.0376$) se encontraron al pH más bajo (Figura 43).

Finalmente, se observó en ambas especies, una tendencia inversa entre la relación O:N y las concentraciones de amonio ensayadas. A medida que las concentraciones aumentaron, los valores de O:N disminuyeron significativamente ($F=3.62$; $p=0.0317$ en isópodos y $F=7.77$; $p=0.0031$ en anfípodos). Los valores máximos se encontraron en el tratamiento control (4.79 ± 1.78 para isópodos y $74,35 \pm 5.10$ para anfípodos), mientras que los menores se registraron en la concentración $10.41 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ para isópodos (1.32 ± 0.31) y $17.12 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ para anfípodos (24.49 ± 7.14) (Figura 43).

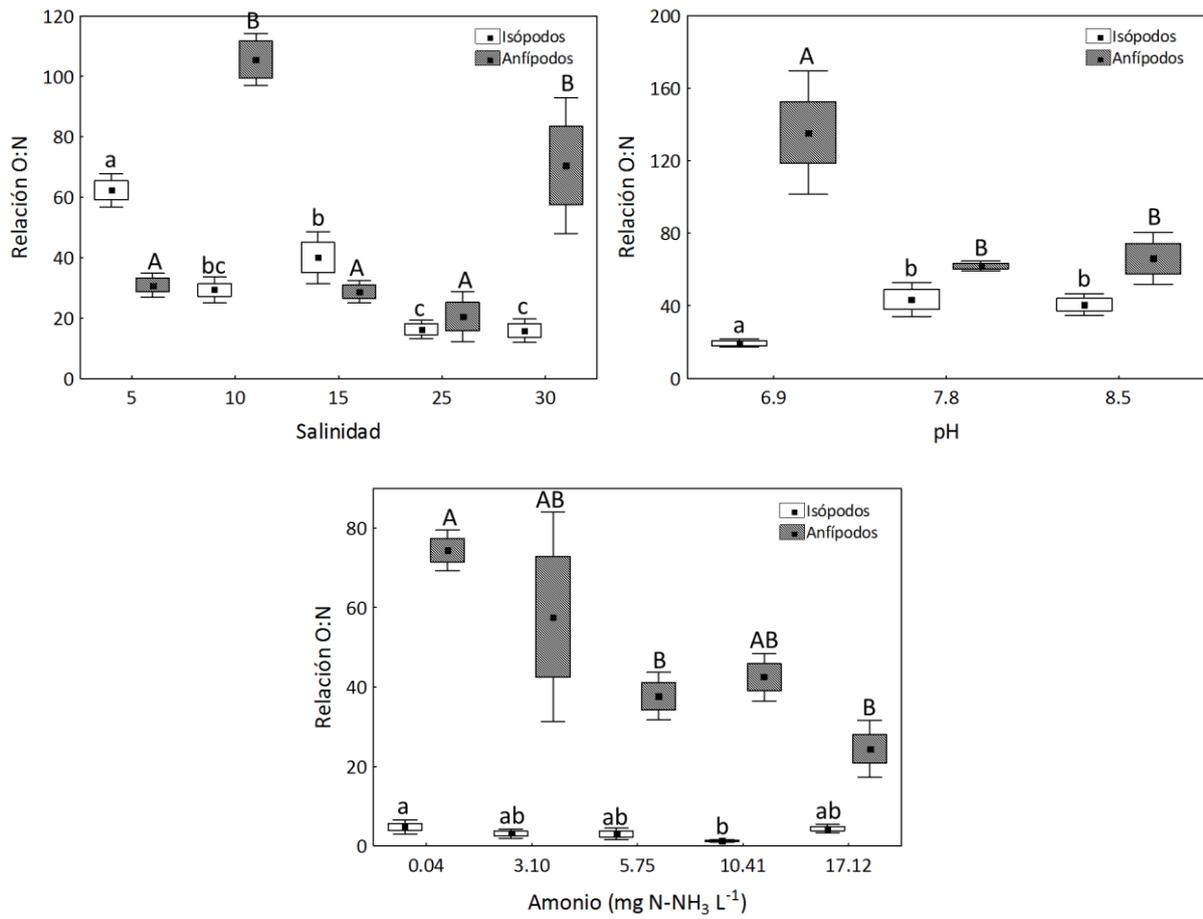


Figura 43. Relación atómica O:N en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de salinidad, pH y amonio. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

1.5. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores

A continuación se presentan los valores del RIB/n en isópodos y anfípodos obtenidos a partir de la combinación de los 6 biomarcadores determinados en los distintos tratamientos de salinidad, pH y amonio (Figura 44).

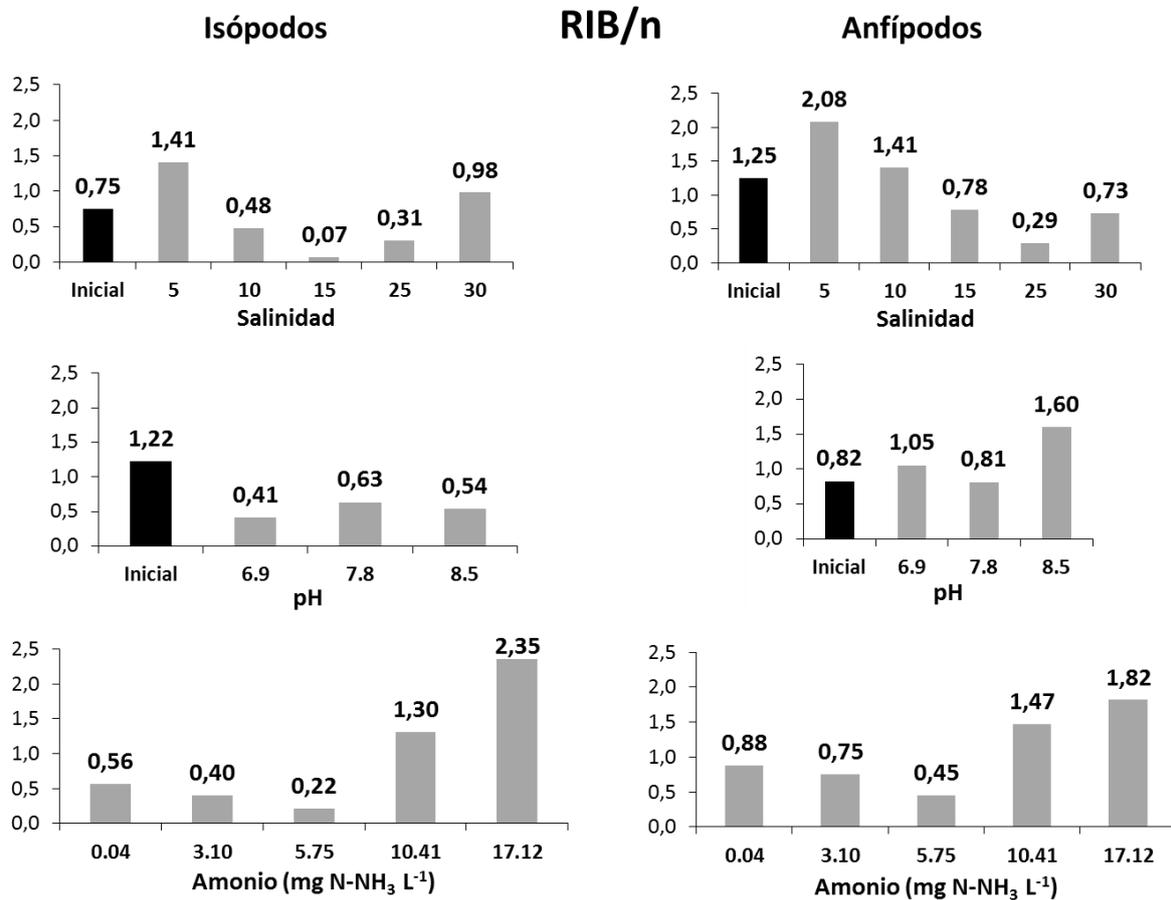


Figura 44. Valores del RIB/n para los ensayos de salinidad, pH y amonio en isópodos y anfípodos.

Los valores iniciales del RIB/n obtenidos a partir de los ensayos de salinidad y pH muestran una variación importante tanto en isópodos como en anfípodos.

En isópodos, los menores valores del RIB/n (lo cual implica menor nivel de estrés de los organismos expuestos) se presentan en los tratamientos 15 y 25 de salinidad, en todo el rango de pH estudiado y en la concentración 5.75 mg N-NH₃ L⁻¹; mientras que en anfípodos se presentan en el rango 15 a 30 de salinidad, pH 7.8 y concentración 5.75 mg N-NH₃ L⁻¹.

2. BIOENSAYOS CON LARVAS DE CENTOLLA

2.1. Ensayo agudo a 96 h

Las curvas de supervivencia representadas en la Figura 45 muestran que tanto el tratamiento control como las menores concentraciones de amonio ensayadas (10.10, 16.32 y 27.20 mg N-NH₃ L⁻¹) presentan un alto porcentaje de supervivencia (mayor al 85%) a lo largo de las 96 horas, mientras que en las mayores concentraciones de amonio la mortalidad se incrementó.

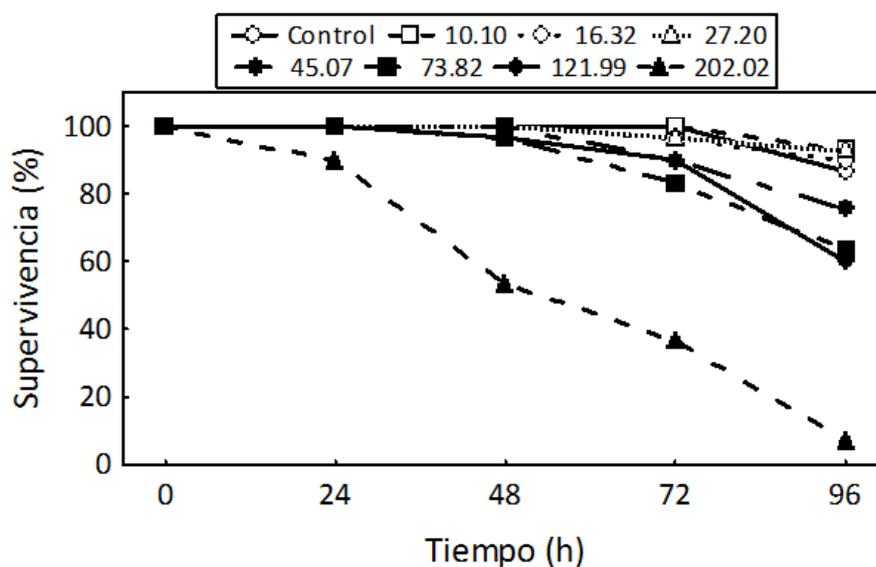


Figura 45. Supervivencia a 96 h de larvas de centolla frente a la exposición a 8 concentraciones de amonio (control; 10.10; 16.32; 27.20; 45.07; 73.82; 121.99; 202.02 mg N-NH₃ L⁻¹).

A partir de estos valores de supervivencia, la CL50 y demás parámetros estadísticos calculados por el análisis Probit para todos los tiempos fueron:

Tiempo (h)	CL50 (mg N-NH ₃ L ⁻¹)	Límites de confianza 95%	Pendiente	R ²
24	-----	-----	-----	-----
48	220,03	184,30-328,80	4,99	0,79
72	218,58	155,66-404,23	2,01	0,73
96	119,84	96,98-145,27	4,22	0,67

La CL50 a 96 h para el amonio en larvas de centolla es **119.84 mg N-NH₃ L⁻¹** (154.24 mg NH₄ L⁻¹).

2.2. Ensayo agudo a 48 h

En el bioensayo agudo con amonio, la supervivencia a 48 h de las larvas ensayadas fue mayor al 95% tanto en el control como en las concentraciones subletales utilizadas (20.20 y 40.40 mg N-NH₃ L⁻¹).

La variación de los biomarcadores fisiológicos (consumo de oxígeno y excreción de amonio) medidos en larvas de centolla puede observarse en la Figura 46.

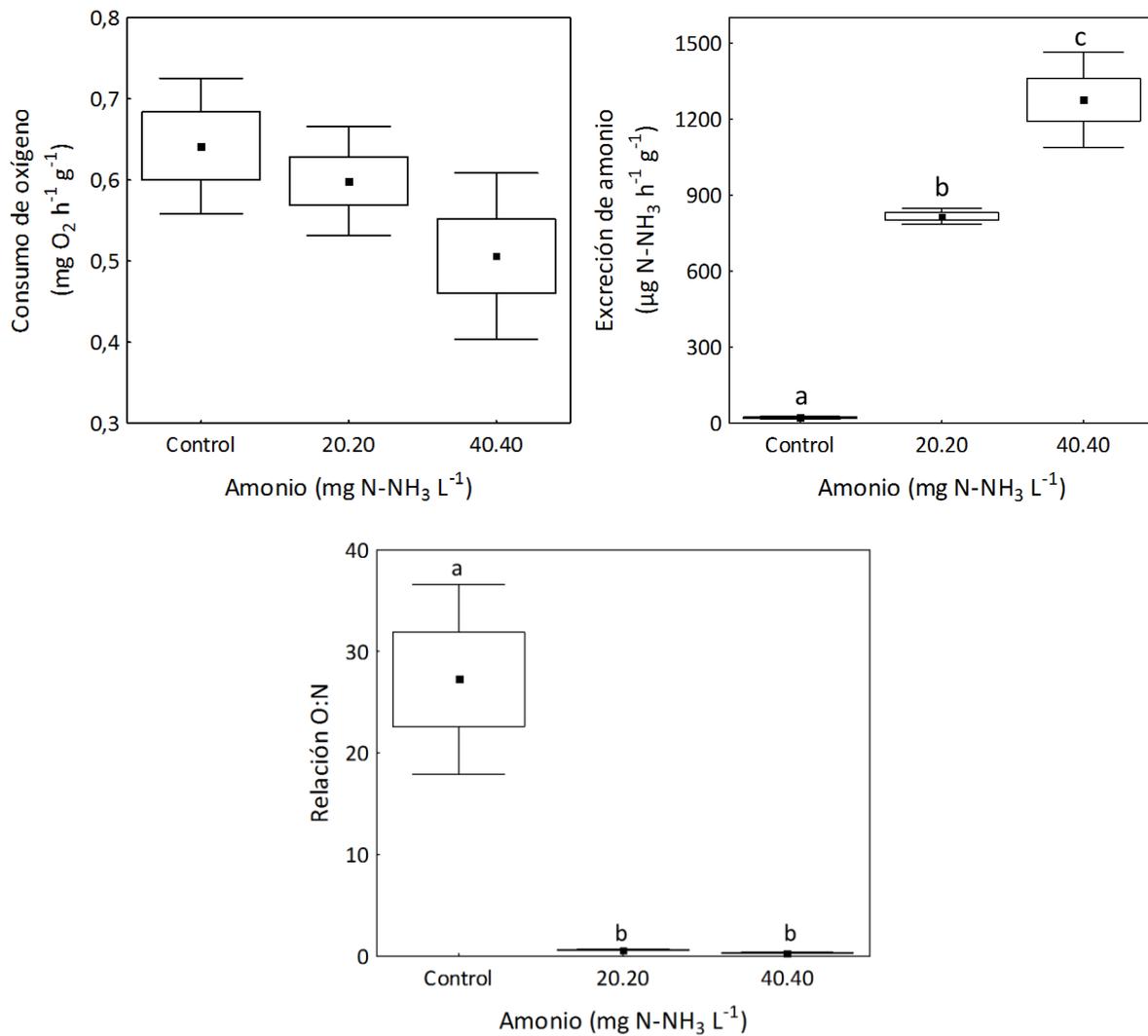


Figura 46. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y relación atómica O:N en larvas de centolla expuestas 48 h a dos concentraciones subletales de amonio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Sin letra indica grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

A pesar de no detectarse diferencias significativas en el consumo de O_2 ($F=3.02$; $p=0.0902$) se observó una tendencia de disminución a medida que aumentó la concentración de amonio formando así un grupo homogéneo (valor medio de $0.58 \pm 0.10 \text{ mg } O_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Figura 46). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en la excreción de amonio ($H=11.57$; $p=0.0031$) entre los tres tratamientos ensayados, aumentando la excreción a medida que se incrementó la concentración de amonio (21.91 ± 5.16 ; 816.41 ± 32.04 y $1275.11 \pm 188.30 \text{ } \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en control, 20.20 y 40.40 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente). De acuerdo a los valores obtenidos en ambos parámetros, la relación atómica O:N fue significativamente mayor en el control (27.26 ± 9.32), mientras que en los tratamientos de 20.20 y 40.40 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ esta relación se redujo significativamente ($H=11.57$; $p=0.0031$), formando entre ellos un grupo homogéneo (valor medio de 0.50 ± 0.17) y diferente del control.

2.3. Ensayos crónicos hasta muda a postlarva

En esta sección se presentan los resultados de dos ensayos crónicos realizados en larvas de centolla, Ensayo I (EI) y Ensayo II (EII), frente a la exposición a una serie de 8 concentraciones de amonio.

- **Supervivencia**

Ambos ensayos concluyeron cuando la última larva del grupo inicial ensayado alcanzó el estado postlarval de megalopa, es decir, a los 29 días en el Ensayo I y a los 26 días en el Ensayo II. La supervivencia disminuyó en todos los tratamientos a medida que transcurrió el tiempo de exposición y que se incrementó la concentración del estresor (Figuras 47 y 48). Sin embargo, la supervivencia fue levemente menor en el control que en la concentración de 16.32 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ en el EI (40 y 50% de supervivencia, respectivamente) y que en la de 10.10 $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ en ambos ensayos (40 y 43% de supervivencia respectivamente para el EI, y 67 y 72% respectivamente para el EII).

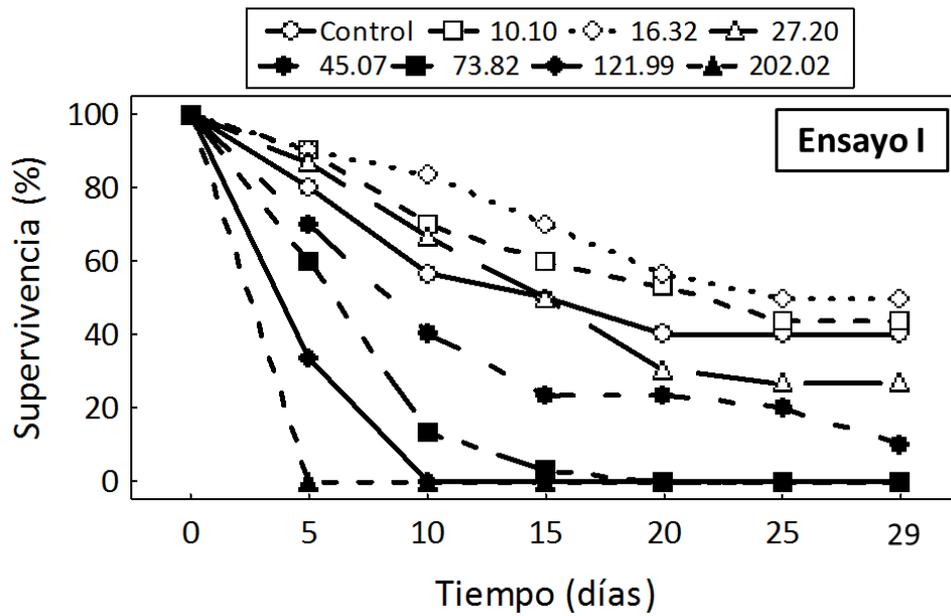


Figura 47. Supervivencia a 29 días de larvas de centolla frente a la exposición a 8 concentraciones de amonio (control; 10.10; 16.32; 27.20; 45.07; 73.82; 121.99; 202.02 mg N-NH₃ L⁻¹).

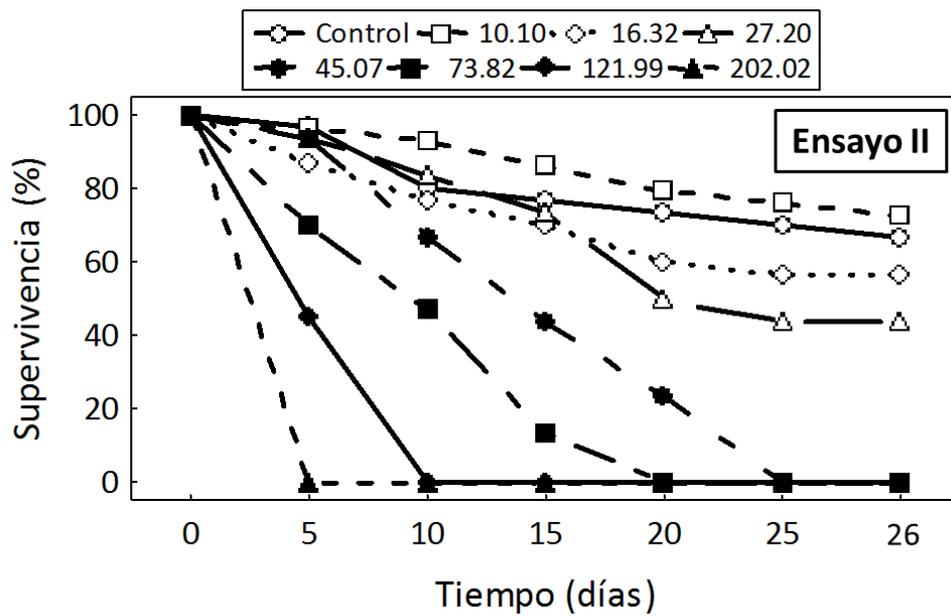


Figura 48. Supervivencia a 26 días de larvas de centolla frente a la exposición a 8 concentraciones de amonio (control; 10.10; 16.32; 27.20; 45.07; 73.82; 121.99; 202.02 mg N-NH₃ L⁻¹).

- **Porcentajes de muda**

En forma general para ambos ensayos, a medida que aumentó la concentración de amonio el porcentaje de muda dentro de cada estadio fue disminuyendo (Tablas 31 y 32). Del total de zoeas I ensayadas, solo el 40% y el 66.7% (EI y EII, respectivamente) llegó al estadio de postlarva en los controles de agua de mar. Estos porcentajes fueron disminuyendo hasta que no se registraron zoeas III que mudaran al estadio de postlarva en los tratamientos de 45.07 (solo en EII), 73.82, 121.99 y 202.02 mg N-NH₃ L⁻¹.

Tabla 31. Ensayo I. Porcentajes acumulados (zoea I a II, II a III y III a postlarva) y totales de muda (zoea I a postlarva) en larvas de centolla expuestas a 8 concentraciones de amonio.

<i>Ensayo I</i>	Concentraciones de amonio (mg N-NH ₃ L ⁻¹)							
	Control	10.10	16.32	27.20	45.07	73.82	121.99	202.02
Zoea I a Zoea II	70	83,3	86,7	75	51,7	16,7	0	-
Zoea II a Zoea III	76,2	76	96,2	76,2	73,3	40	0	-
Zoea III a Postlarva	75	68,4	60	37,5	27,3	0	-	-
Zoea I a Postlarva	40	43,3	50	21,4	10,3	0	-	-

Tabla 32. Ensayo II. Porcentajes acumulados (zoea I a II, II a III y III a postlarva) y totales de muda (zoea I a postlarva) en larvas de centolla expuestas a 8 concentraciones de amonio.

<i>Ensayo II</i>	Concentraciones de amonio (mg N-NH ₃ L ⁻¹)							
	Control	10.10	16.32	27.20	45.07	73.82	121.99	202.02
Zoea I a Zoea II	96,7	96,6	86,7	90	86,7	66,7	20,7	0
Zoea II a Zoea III	82,8	96,4	84,6	88,9	69,2	15	0	-
Zoea III a Postlarva	83,3	77,8	77,3	54,2	0	-	-	-
Zoea I a Postlarva	66,7	72,4	56,7	43,3	0	-	-	-

Estos resultados se presentan gráficamente en las Figuras 49 y 50.

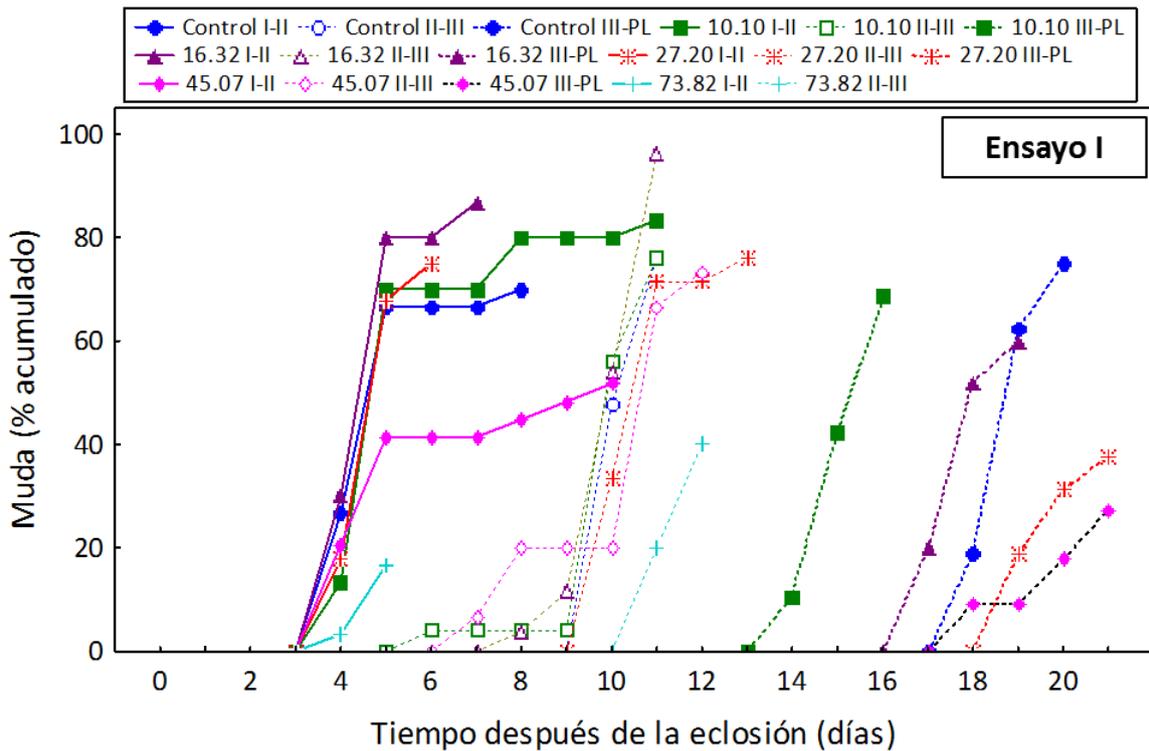


Figura 49. Ensayo I. Porcentajes de mudas acumuladas. Sólo se grafican aquellos tratamientos que presentaron zoeas que mudaron de un estadio al siguiente.

En el EI, las zoeas I comenzaron a mudar a zoea II a partir de 4^{to} día después de la eclosión y de forma similar en todos los tratamientos (Figura 49). Sin embargo, la muda de zoea II a III comenzó a partir del 6^{to} día de eclosión en los tratamientos 10.10, 16.32 y 45.07 mg N-NH₃ L⁻¹, mientras que en el de 73.82 mg N-NH₃ L⁻¹ se retrasó hasta el día 11; teniendo en cuenta que en el control las mudas comenzaron en el 10^{mo} día (al igual que en el tratamiento 27.20 mg N-NH₃ L⁻¹). Entre los días 6 y 11, hubo solapamientos entre las mudas de zoea I a II y II a III de diferentes tratamientos. Finalmente, la muda a postlarva se adelantó en los tratamientos 10.10 y 16.32 mg N-NH₃ L⁻¹, ya que en el control, 27.20 y 45.07 mg N-NH₃ L⁻¹ ocurrió a partir del día 18. Es interesante destacar que en el tratamiento 10.10 mg N-NH₃ L⁻¹, el 100% de las zoeas III habían mudado antes de que comenzaran a hacerlo aquellas del control.

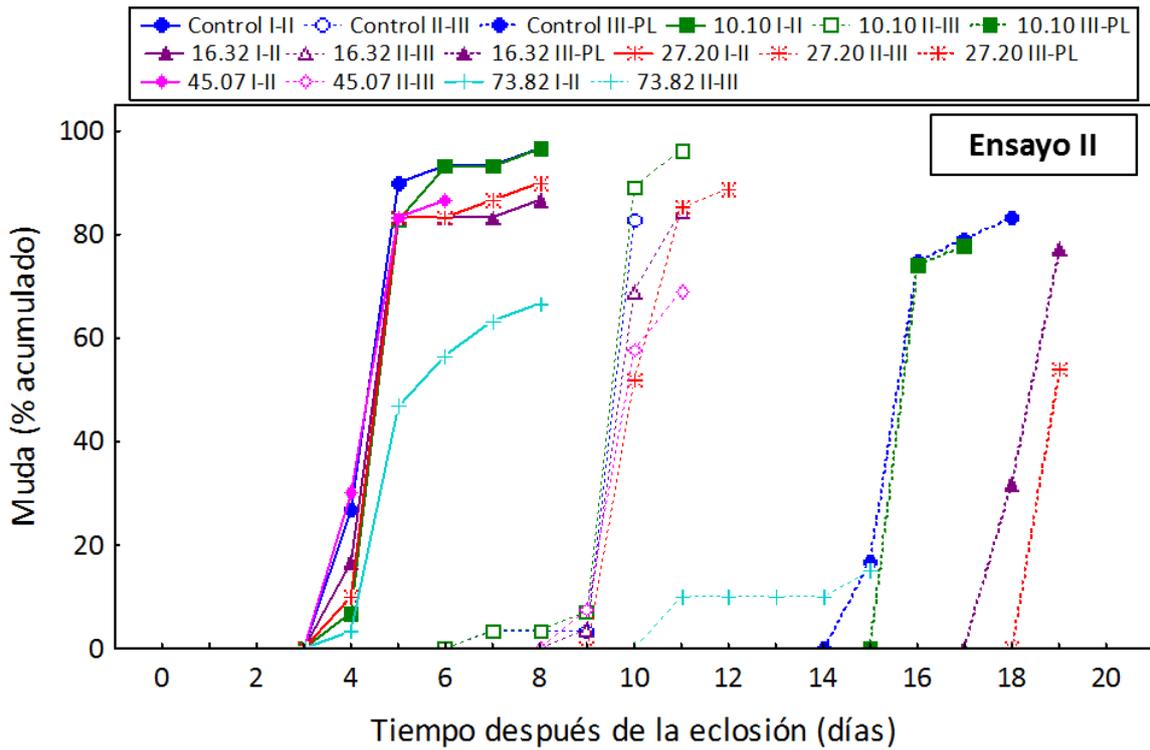


Figura 50. Ensayo II. Porcentajes de mudas acumuladas. Sólo se grafican aquellos tratamientos que presentaron zoeas que mudaron de un estadio al siguiente.

En el EII, los porcentajes acumulados de muda en los distintos tratamientos siguieron el mismo patrón que en el EI. Sin embargo, en este ensayo la muda de zoea III a postlarva en el control se presentó a partir del día 15 después de la eclosión, mientras que en los otros tratamientos ocurrió entre los días 16 y 19 (Figura 50).

- **Tiempo medio de vida del desarrollo larval**

En forma general, el tiempo medio de vida (TV50) para ambos ensayos aumentó gradualmente a medida que se incrementó la concentración de amonio, siendo este incremento más significativo en la concentración de 45.07 mg N-NH₃ L⁻¹ del EI (Tabla 33). Es decir que, en promedio, una larva zoea I del EI del tratamiento control tardó 19.51 ± 1.38 días en alcanzar el estadio de postlarva, mientras que una larva zoea I del EI expuesta a la concentración 45.07 mg N-NH₃ L⁻¹ tardó 23.25 ± 0.35 días en hacerlo (Tabla 33). Por otro lado, se registraron diferencias entre ambos ensayos ya que en el EII las larvas tardaron menos tiempo en mudar a postlarva en todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 33. Tiempo medio de vida para los distintos tratamientos de EI y EII (días ± desviación estándar).

	Zoea I-PL	
	Ensayo I	Ensayo II
Control	19,51 ± 1,38	18,93 ± 0,31
10.10	19,25 ± 0,25	18,94 ± 0,20
16.32	19,75 ± 0,29	19,71 ± 0,11
27.20	19,75 ± 1,06	19,18 ± 0,1
45.07	23,25 ± 0,35	---
73.82	---	---
121.99	---	---
202.02	---	---

- **Tiempo medio de muda**

El tiempo medio de muda (TM50) para cada muda y cada tratamiento de amonio se puede observar en las Tablas 34 y 35.

De acuerdo a los valores obtenidos en el EI, el 50% de las larvas ensayadas en el tratamiento control mudaron de zoea I a II en 4.06 días; mientras que de zoea II a III tardaron casi 6 días más y finalmente de zoea III a postlarva tardaron 8.39 días más (Tabla 34). Comparando los TM50 de los diferentes tratamientos de amonio, se observó que en la muda de zoea I a II y de II a III este parámetro fue variable, es decir, no siguió una tendencia definida en los tratamientos ensayados; mientras que de zoea III a postlarva el TM50 aumentó al incrementarse la concentración de amonio (de 8.39 días en el control a 12.04 días en 45.07 mg N-NH₃ L⁻¹).

Con respecto al EII, no fue posible calcular los TM50 en el control para la muda de zoea II a III y en la concentración de 10.10 mg N-NH₃ L⁻¹ para las mudas de zoea II a III y III a postlarva (Tabla 35). Sin embargo, se observó que, al igual que en el EI, de zoea III a postlarva el TM50 aumentó significativamente de 8.43 días en el control a 9.04 días en la concentración 16.32 mg N-NH₃ L⁻¹).

Tabla 34. Ensayo I. Tiempo medio de muda (días) en larvas de centolla expuestas a 8 tratamientos de amonio (mg N-NH₃ L⁻¹). Entre paréntesis se presentan el límite inferior y el superior. Análisis: PROBIT. PL: postlarva. ---: sin resultado.

<i>Ensayo I</i>	Zoea I-II	Zoea II-III	Zoea III-PL
Control	4,06 (3,42 - 4,44)	5,93 (5,42 - 6,48)*	8,39 (7,95 - 8,75)
10.10	4,58 (3,99 - 5,02)	5,41 (4,92 - 6,01)	8,69 (8,30 - 9,05)
16.32	4,21 (3,79 - 4,48)	5,69 (5,41 - 5,97)	9,27 (8,81 - 9,59)
27.20	4,32 (4,08 - 4,56)	6,04 (5,20 - 6,44)	---
45.07	4,09 (2,65 - 4,89)	5,44 (4,75 - 6,20)	12,04
73.82	4,14 (3,47 - 4,94)*	6,99	---
121.99	---	---	---
202.02	---	---	---

*Con análisis Lichtfield & Wilcoxon (1949)

Tabla 35. Ensayo II. Tiempo medio de muda (días) en larvas de centolla expuestas a 8 tratamientos de amonio (mg N-NH₃ L⁻¹). Entre paréntesis se presentan el límite inferior y el superior. Análisis: PROBIT. PL: postlarva. ---: sin resultado.

<i>Ensayo II</i>	Zoea I-II	Zoea II-III	Zoea III-PL
Control	4,27 (3,92 - 4,54)	---	8,43 (8,09 - 8,71)
10.10	4,63 (4,38 - 4,86)	---	---
16.32	4,37 (4,04 - 4,63)	5,63 (5,40 - 5,84)	9,04 (8,61 - 9,50)*
27.20	4,54 (4,25 - 4,79)	5,88 (5,23 - 6,15)	---
45.07	4,16 (3,94 - 4,37)	5,53 (5,27 - 5,78)	---
73.82	4,91 (4,54 - 5,21)	6,18 (1,36 - 28,19)*	---
121.99	4,15 (3,57 - 4,83)*	---	---
202.02	---	---	---

*Con análisis Lichtfield & Wilcoxon (1949)

DISCUSIÓN

Los crustáceos se distribuyen en una amplia gama de hábitats acuáticos, en los cuales experimentan diferentes grados de variabilidad ambiental. Aquellos que ocupan zonas oceánicas profundas y altas latitudes se encuentran en entornos relativamente estables donde los factores físicos muestran poca variación temporal y espacial. Sin embargo, otros ambientes como la zona intermareal y los estuarios, pueden experimentar rápidas y amplias fluctuaciones de los factores físicos en respuesta a cambios diarios en la altura de marea. Por otro lado, el aporte de agua dulce y nutrientes generan también variaciones estacionales en estos ambientes. Por consiguiente, los crustáceos que se ubican en las zonas costeras son un grupo particular dentro de los organismos marinos ya que presentan una amplia variedad de respuestas frente a los cambios ambientales como pueden ser la salinidad, la temperatura, la acidificación del medio o la toxicidad de ciertas sustancias (Spanopoulos-Hernández et al., 2005; Camargo & Alonso, 2006; Whiteley, 2011; Romano & Zeng, 2012).

El isópodo *Exosphaeroma gigas* y el anfípodo *Paramoera* sp. son crustáceos residentes de la zona intermareal de la costa de la ciudad de Ushuaia, por lo cual están sujetos a constantes fluctuaciones en las condiciones ambientales. En el presente estudio, se expusieron durante 96 h, individuos recolectados del ambiente natural a un amplio rango de tres estresores ambientales: salinidad, pH y amonio. Si bien se registraron algunos organismos muertos durante el período de exposición, el porcentaje de supervivencia fue muy alto (mayor al 88% en isópodos y al 93.3% en anfípodos) y no pudo calcularse la CL50 para estos organismos ya que ningún tratamiento provocó letalidad.

Considerando que la salinidad es uno de los factores más importantes que influyen en la distribución y los procesos metabólicos de los crustáceos acuáticos (respiración, excreción, transporte activo intracelular, tasas de alimentación y osmorregulación), existen en la literatura diversos trabajos en los cuales se evalúa la supervivencia de dichos organismos frente a esta variable ambiental (Pante, 1990; Steele & Steele, 1991; Ponce-Palafox et al., 1997; Normant & Lamprecht, 2006; Anger et al., 2008; Criales et al., 2011; Romano & Zeng, 2012, entre otros). Particularmente para la familia Sphaeromatidae, Henninger et al. (2010) trabajaron con machos y hembras de *Exosphaeroma hylocoetes* del estuario de Kasouga (Sudáfrica) y encontraron que las tasas de crecimiento no diferían

significativamente a distintas combinaciones de temperatura (15 y 25°C) y salinidad (15 y 35). En la especie *Sphaeroma serratum*, perteneciente a la misma familia que *E. gigas* (Flia. Sphaeromatidae), Charmantier & Charmantier-Daures (1994) estudiaron la tolerancia de embriones, juveniles y adultos a un amplio rango de salinidad y determinaron que esta especie es eurihalina pudiendo tolerar salinidades entre 2 y 74. Más precisamente, los adultos de *S. serratum* hiperregulan a bajas salinidades, son hiperosmoconformes en agua de mar y son hipoosmoconformes en medios altamente salinos. Otro caso similar es el de la especie *Sphaeroma quoianum* cuya distribución se encuentra limitada a ambientes con salinidades de entre 5 y 30 (mesohalinos a polihalinos), según estudios realizados por Davidson et al. (2008) en el estuario de Tamar (Australia), la Bahía Port Phillip (Tasmania) y la Bahía Coos (Estados Unidos).

En cuanto a los anfípodos, también se cuenta con registros de tolerancia a diversas salinidades. Por ejemplo, Hyne et al. (2005) registraron una alta supervivencia de adultos de *Melita plumulosa* a un rango de salinidad entre 5 y 35 durante 28 días de experimentación, así como Normant & Lamprecht (2006) encontraron en el gamárido eurihalino *Gammarus oceanicus* (Mar Báltico), supervivencias del 92% y del 100% a las salinidades 5 y 20, respectivamente. Por otro lado, Ashton et al. (2007) evaluaron la tolerancia *Caprella mutica* a la salinidad, y encontraron que esta especie presenta un rango más acotado en este parámetro, siendo la CL50 a 48 h de 18.7 ± 0.2 ; mientras que a salinidades menores a 15, la mortalidad fue del 100%.

Teniendo en cuenta los antecedentes antes mencionados para especies similares y los resultados del presente estudio se puede inferir que tanto *E. gigas* como *Paramoera* sp. son especies eurihalinas, ampliamente adaptadas al rango de salinidad evaluado. En este sentido, los organismos tienen que enfrentar estas condiciones cambiantes y por ello deben ser capaces de regular la osmolaridad hemolinfática en relación al entorno a través de mecanismos de osmorregulación (Normant & Lamprecht, 2006; Lapucki & Normant, 2008). Según ha sido descrito por Norman & Lamprecht (2006), un proceso de adaptación a largo plazo es el que ha permitido a algunas especies desarrollar estrategias fisiológicas para enfrentarse con una salinidad reducida.

Actualmente, hay un interés creciente en el estudio de los efectos potenciales de la acidificación del ambiente, causada por el incremento progresivo de las concentraciones de

CO₂ atmosférico, sobre los organismos acuáticos. Esto se debe a que a valores de pH bajos, es posible la disolución del esqueleto calcificado de los crustáceos y la reducción de las tasas de calcificación, lo cual impacta directamente en el ciclo de muda y en la supervivencia del individuo (Kurihara et al., 2008; Hofmann et al., 2010; Whiteley, 2011).

Varios autores han reportado que las fluctuaciones de pH pueden ser sumamente tóxicas para los crustáceos decápodos, causando reducciones en la supervivencia, crecimiento y reproducción, las cuales también pueden ser acompañadas por graves enfermedades o aún incluso causar mortalidad (Wang et al., 2002; Cheng et al., 2003; Kurihara et al., 2008; Zhou et al., 2009, entre otros).

En el presente estudio, se registró 0% de mortalidad en isópodos a pH 7.8 y 8.5, y solo un 5% al menor pH (6.9), mientras que en anfípodos la mayor mortalidad (del 7%) ocurrió al pH intermedio (7.8). Sin embargo, estos valores son relativamente bajos respecto a aquellos registrados en otras especies de crustáceos. La diversidad de tolerancia registrada es amplia; en adultos de *Litopenaeus vannamei* se registró una supervivencia del 65% a pH 5.6 y del 35% a pH 9.3 a 24 h (Wang et al., 2009), mientras que postlarvas de la misma especie presentaron una supervivencia mayor al 80% por 96 h a un rango de pH entre 7.1 y 9.1 (Pan et al., 2007). Felten et al. (2006; 2008) registraron supervivencias dispares trabajando con los anfípodos *Gammarus fossarum* y *G. pulex*, determinando que a 72 h de exposición los primeros presentaron mayor supervivencia a pH 4.5 y 5.5 (42 y 89% respectivamente) que los segundos a la mitad del tiempo a pH 4.1 y 5.1 (29 y 72%, respectivamente). Por otro lado, los ostrácodos *Physocypria kraepelini* presentaron valores medios de letalidad a 96 h de 5.59 y 8.61; hallándose el rango seguro de supervivencia de esta especie entre 6.59 y 7.61 (Yu et al., 2009), mientras que el cangrejo *Halicarcinus planatus* (Canal Beagle) presentó alta tolerancia al rango de pH ensayado (7.5 a 9.5) (Diodato et al., 2012).

Pocos estudios han sido realizados con isópodos residentes del intermareal. Uno de ellos evaluó la mortalidad de *Paradella diana* durante 22 días de exposición a pH 7.6 en dos situaciones (estable y variable) y el resultado fue una mayor mortalidad a pH 7.6 variable (entre 7.3 y 8; 63%), seguida por el pH 7.6 estable (52%) y finalmente por el pH control (8.17; 34%). En este caso, a pesar de ser valores relativamente neutros de pH, la baja supervivencia podría significar que condiciones fluctuantes ambientales pueden producir efectos estresantes que conducen a un daño fisiológico, y que a corto o mediano plazo causan la

mortalidad de los individuos que no pueden aclimatarse a las condiciones variables (Alenius & Mungia, 2012).

El amonio es considerado uno de los agentes contaminantes más importantes en los ecosistemas acuáticos no sólo debido a su naturaleza sumamente tóxica (por su fácil acumulación en el agua), sino también porque está presente en exceso en las diversas descargas antropogénicas, incluyendo escurrimiento agrícola, efluentes industriales y municipales, entre otras fuentes. Mientras que la mayoría de la información sobre la toxicidad del amonio se ha originado por las consecuencias ocasionadas en los sistemas de acuicultura, la introducción de grandes cantidades de amonio en los ambientes naturales ha recibido considerable atención a partir de los años 80 (USEPA, 2009; Romano & Zeng, 2012).

En el agua, el amonio se presenta en una forma ionizada (NH_4^+) y en otra no ionizada (NH_3). Esta última es considerada la forma más tóxica para los animales acuáticos debido a su fácil difusión a través de la membrana branquial (Evans & Cameron, 1986; Camargo & Alonso, 2006). La exposición de los crustáceos a elevados niveles de amonio en el ambiente está fuertemente ligada al proceso de osmorregulación, ya que éste es uno de los mecanismos utilizados por los crustáceos como respuesta al amonio ambiental. Por otro lado, la susceptibilidad al amonio se debe al daño causado en las branquias ya que las mismas se encuentran en contacto directo con el medio externo. Debido a que las branquias tiene funciones en la excreción de amonio, osmorregulación, intercambio de gases y balance de pH, daños a nivel branquial es una posible causa de mortalidad (Camargo & Alonso, 2006; Romano & Zeng, 2012). En consecuencia, la toxicidad del amonio ha sido evaluada sobre diversos parámetros en los organismos acuáticos, por lo cual ha sido demostrado su efecto negativo sobre la supervivencia, el crecimiento, el ciclo de muda, la alimentación, la reproducción, la acumulación y la excreción de amonio, entre otros aspectos fisiológicos; tanto en estadios larvales como en juveniles y adultos (Rebelo et al., 1999; Racotta & Hernández-Herrera, 2000; Romano & Zeng, 2007a; 2007b; Miranda-Filho et al., 2009; Yu et al., 2009; Liao et al., 2011).

En el presente estudio se evaluó la exposición de crustáceos durante 96 h a diferentes concentraciones de amonio (entre 3.10 y 17.12 mg N- NH_3 L⁻¹, equivalente a 5.5 y 29 mg amonio L⁻¹, respectivamente). Las mismas resultaron ser subletales tanto para isópodos como para anfípodos, motivo por el cual no fue posible calcular la CL50 a 96 h ni

pudo observarse un patrón definido de respuesta. La ausencia de mortalidad durante los bioensayos demuestra la capacidad de tolerancia de ambas especies a la exposición a amonio, aunque los anfípodos hayan presentado mayor supervivencia que los isópodos en los distintos tratamientos.

Son escasos los trabajos realizados sobre la toxicidad de amonio en isópodos; uno de ellos se realizó con *Asellus aquaticus*, el cual resultó dos veces más tolerante al amonio que el anfípodo *Gammarus pulex*, mientras que los adultos fueron menos tolerantes que los estadios juveniles (Maltby, 1995). Sin embargo, varios estudios han sido realizados con anfípodos. Ejemplo de ello es el trabajo de Prenter et al. (2004), en el cual determinaron que la especie invasora *Gammarus pulex* es más tolerante que la nativa *G. duebeni celticus*, cuyas CL50 a 96 h fueron 1.54 y 1.15 mg amonio L⁻¹, respectivamente. Por otro lado, Moore et al. (1997) trabajaron con juveniles y subadultos del anfípodo estuarino *Leptocheirus plumulosus* y determinaron CL50s a 96 h de 44 y 89 mg amonio L⁻¹, respectivamente. Respecto a otras especies de crustáceos, se han llevado a cabo estudios con larvas y juveniles del cangrejo *Portunus pelagicus* (Romano & Zeng, 2007a; 2010; Liao et al., 2011), adultos de *Chasmagnatus granulata* (Rebelo et al., 1999); juveniles y postlarvas de *Farfantepenaeus paulensis* (Miranda- Filho et al., 2009), adultos de *Penaeus vannamei* (Racotta & Hernández-Herrera, 2000), entre otros. Todos los estudios coinciden en que la supervivencia disminuye a medida que aumenta la concentración de amonio ensayada.

Una gran cantidad y diversidad de compuestos químicos han sido y están siendo introducidas a los ecosistemas acuáticos. Para evaluar si los organismos son afectados por estos contaminantes ambientales y de qué manera lo son, varios indicadores de efecto han sido desarrollados y establecidos durante los últimos años (Lam & Gray, 2003; Van der Oost et al., 2003; Lam, 2009). Estas señales tempranas de advertencia llamadas biomarcadores reflejan respuestas biológicas integradas frente a la exposición a contaminantes, proporcionando además información sobre la sensibilidad de organismos en cuanto a incorporación, biotransformación y desintoxicación (Livingstone, 1993; Galloway et al., 2002).

Sin embargo, en muchos casos se ha observado que las actividades en los biomarcadores bioquímicos, como AChE, CAT y GST, dependen de las condiciones abióticas del ambiente. Esto significa que los cambios en los niveles de los biomarcadores

simplemente son parte natural del ciclo de la especie y por lo tanto, no se encuentran relacionados a la exposición a contaminantes. La temperatura ha sido identificada como uno de los factores más importantes que regulan la actividad de los biomarcadores en bivalvos y crustáceos, mientras que también se ha demostrado la influencia del pH y la salinidad del agua en diversas especies (Sheehan & Power, 1999; Olsen et al., 2001; Robillard et al., 2003; Damiens et al., 2004; Khessiba et al., 2005; Pfeifer et al., 2005; Bocchetti & Regoli, 2006; Menezes et al., 2006; Cailleaud et al., 2007; Jemec et al., 2008; Paital & Chainy, 2010; Tu et al., 2012).

La actividad de la enzima acetilcolinesterasa es considerada como un biomarcador apropiado para detectar la exposición de organismos a contaminantes neurotóxicos, por lo cual su inhibición es señal de la presencia de dichos compuestos (Galgani & Bocquené, 2000; Fulton & Key, 2001; Lionetto et al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que la temperatura y la salinidad también tienen un efecto directo y/o indirecto sobre la actividad de esta enzima (Escartín & Porte, 1997; Bocquené & Galgani, 1998; Dellali et al., 2001a; Pfeifer et al., 2005). En el presente estudio, la actividad de AChE registrada en *E. gigas* no varió significativamente en los distintos niveles de salinidad, pH y amonio ensayados. Sin embargo, los niveles obtenidos de inhibición de esta enzima respecto al control (43-53%) son considerados en la literatura como de grado leve; ya que Fulton & Key (2001) han sugerido que una inhibición significativa en la actividad de AChE en invertebrados, se observa típicamente en concentraciones cercanas a las letales. Sin embargo, en *Paramoera* sp. se presentó una estimulación en la actividad de AChE en las mayores salinidades (25 y 30), mayor pH (8.5) y concentraciones de amonio de 3.1 y 10.4 mg N-NH₃ L⁻¹. En este sentido, los valores hallados en el presente estudio son mayores a los reportados por Schvezov & Amin (2011) para organismos recolectados del mismo sitio (Reserva Provincial Playa Larga). En este caso las diferencias pueden ser atribuidas a que los anfípodos utilizados en el presente estudio fueron recolectados en febrero-marzo, mientras que los utilizados en el estudio previamente mencionado fueron colectados en el mes de abril. Estas épocas presentan una diferencia de temperatura media del agua de mar de 2°C (promedio de 9.4°C en febrero y de 7.4°C en abril; Servicio de Hidrografía Naval). Estas diferencias concuerdan con resultados obtenidos por otros autores, los cuales correlacionan de manera positiva la

actividad de AChE con la temperatura (Pfeifer et al., 2005; Khessiba et al., 2005; Menezes et al., 2006; Cailleaud et al., 2007).

La catalasa es una de las enzimas antioxidantes que se induce en primera instancia para proteger al organismo del daño provocado por las EROs. Esto se lleva a cabo mediante la remoción del H_2O_2 de las células durante el metabolismo aeróbico basal o luego de la generación de radicales de O_2 promovidos por contaminantes, que pueden estar dentro del límite de tolerancia del organismo (Winston et al., 1990). En el presente estudio, el nivel de CAT en los isópodos aumentó principalmente en los tratamientos de menor salinidad y mayor concentración de amonio, mientras que en anfípodos ocurrió lo mismo a la menor salinidad y menor pH. Esto puede indicar que en condiciones por fuera del valor óptimo de funcionamiento como pueden ser bajas salinidades, ambientes acidificados y altas concentraciones de sustancias tóxicas (como el amonio), hay una inducción en la síntesis de CAT debido a la generación excesiva de EROs, causada por dichos estresores. Este hecho también concuerda con trabajos realizados en otros crustáceos y moluscos (Cossu et al., 1997; Correia et al., 2003; Douhri & Sayah, 2010; Tu et al., 2012). Por ejemplo, Robillard et al. (2003) encontraron en el bivalvo *Anodonta cygnea* que la CAT aumenta con la temperatura y disminuye con el pH, mientras que Tu et al. (2012) observaron en *Penaeus monodon* que el nivel de CAT disminuye a salinidades menores a la óptima, lo cual puede estar asociado con el costo energético que insume el proceso de osmorregulación. Finalmente, los valores de CAT en anfípodos son similares a los hallados por Schvezov & Amin (2011) para el mismo sitio.

La glutatión S-transferasa pertenece a una familia de enzimas que utilizan la glutatióna (GSH) como sustrato en reacciones que permiten la biotransformación y eliminación de un amplio rango de compuestos exógenos productores de estrés oxidativo (Contreras-Vergara et al., 2004). La glutatióna reducida contribuye para que los productos sean menos tóxicos y más hidrosolubles, por lo cual pueden ser excretados de las células con mayor facilidad (Olsen et al., 2001). Es por ello que la inducción de la actividad de GST es un indicio de un proceso de detoxificación y ha sido utilizada en diversas investigaciones (McLoughlin et al., 2000; Jemec et al., 2007; Drobne et al., 2008). En concordancia con los resultados de actividad de CAT obtenidos en el presente estudio, los niveles de GST fueron significativamente menores (respecto al valor inicial) en anfípodos frente a las diferentes salinidades. En este caso, esta respuesta de *Paramoera* sp. es inversa a la detectada en *P.*

monodon el cual presenta mayor actividad de GST a mayores salinidades (Tu et al., 2012). Contrariamente a *Paramoera* sp., *E. gigas* presentó mayores actividades de GST a las más altas salinidades, coincidiendo con el camarón estuarino *Crangon crangon* (Menezes et al., 2006). Con respecto a la variación de GST con los niveles de pH, variadas son las respuestas observadas en los organismos estudiados. Por un lado, Zhou et al. (2009) encontraron que el nivel de GST en *Litopenaeus vannamei* es estimulado por el pH ácido e inhibido a pH alcalino, mientras que Olsen et al. (2001) encontraron contrariamente, la existencia de una relación significativa y positiva de la actividad de la GST de *Chironomus riparius* con el pH, es decir, las mayores actividades se presentaron a mayores niveles de pH (8.1 y 8.4). Esta última respuesta es coincidente con lo registrado en el presente estudio para ambas especies de crustáceos. Por último, las distintas concentraciones de amonio ensayadas en este trabajo no tuvieron efectos significativos sobre la actividad de GST tanto en isópodos como en anfípodos, siendo probable que las mismas hayan resultado bajas como para generar una respuesta en la actividad de esta enzima o que otro mecanismo alternativo esté funcionando en lugar de la activación de la GST.

Sin embargo, los resultados demuestran que no fue necesario que se desencadenara el proceso de lipoperoxidación en los organismos expuestos a los estresores ambientales ensayados, teniendo en cuenta que esta es una respuesta que se desarrolla cuando ninguno de los otros mecanismos antioxidantes responde (Frenzilli et al., 2001). Jemec et al. (2008) observaron que isópodos recolectados del campo y llevados al laboratorio presentaban niveles de enzimas antioxidantes disminuidos gradualmente como consecuencia de la aclimatación de los organismos a las condiciones estables de laboratorio. El hecho de que los niveles de LPO registrados de forma generalizada en el presente estudio disminuyeron o se mantuvieron constantes respecto del nivel inicial, puede deberse a que los organismos en su lugar de origen podrían haberse encontrado bajo una situación estresante causada por otra variable ambiental y en el transcurso de las 96 horas de ensayo lograron aclimatarse a las condiciones de laboratorio, a pesar de encontrarse en uno de los bioensayos realizados, expuestos al amonio.

En el presente trabajo se han registrado en forma general respuestas significativas de los parámetros fisiológicos estudiados para ambas especies de crustáceos residentes, lo cual

indicaría que estos parámetros son herramientas adecuadas para evaluar la tolerancia de *E. gigas* y *Paramoera* sp. frente a la exposición a estresores ambientales.

La escasa variación de las tasas de consumo de oxígeno en isópodos y anfípodos al ser expuestos a un amplio rango de salinidad concuerda con los resultados registrados en la supervivencia para los mismos bioensayos y con el hecho de considerar que ambas especies son de carácter eurihalino en la zona costera de la ciudad de Ushuaia (ver en este mismo apartado). En este sentido, ha sido demostrado para algunos decápodos eurihalinos que la salinidad no tiene un efecto pronunciado sobre el consumo de oxígeno si los organismos experimentales son aclimatados a las salinidades de prueba y si éstas no son extremas (Re et al., 2004). Este hecho puede ser comparable con la exposición natural a la cual están sujetos los organismos residentes del intermareal en su lugar de origen, dado que enfrentan en forma constante variaciones de salinidad, ya sea por los cambios en los aportes de agua dulce a la costa o simplemente por estar expuestos a un ciclo diario de marea. Sin embargo, los isópodos presentaron una disminución significativa del consumo de oxígeno a las mayores salinidades lo cual concuerda con la tendencia encontrada por Giarratano et al. (2007) para la misma especie. De hecho, los valores registrados para las salinidades 20 y 30 (media de $0.30 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) son similares a los hallados en el presente estudio para el mismo rango de salinidad (media de $0.24 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Por su parte, otros autores han encontrado esta misma relación de aumento del consumo de oxígeno a bajas salinidades en crustáceos como *Onisimus glacialis* (Aarset & Aunaas, 1990), *Penaeus japonicus* (Chen & Chen, 1997) y *Litopenaeus stylirostris* (Spanopoulos-Hernández et al., 2005). De acuerdo a Li et al. (2007), esta tendencia puede ser atribuida al gasto de energía requerido para el proceso de osmorregulación, mientras que otros autores la atribuyen a una posible reacción de escape frente a condiciones desfavorables, teniendo en cuenta que en ciertos casos el costo energético de la osmorregulación puede ser relativamente bajo (McAllen & Taylor, 2001).

Con relación a la respuesta frente a variaciones de pH, las tasas de consumo de oxígeno fueron similares en los tres niveles evaluados, aunque en *E. gigas* se observó un leve aumento de este parámetro, lo cual coincide con lo observado por Alenius & Mungia (2012) para el isópodo *Paradella diana*. Contrariamente, Chen & Lin (1995) registraron disminuciones del consumo de oxígeno en *Penaeus chinensis* a medida que aumentaba el pH

en el mismo rango evaluado en el presente estudio, en concordancia con la respuesta registrada en *Paramoera* sp.

Finalmente, frente a la exposición al amonio, tanto en isópodos como en anfípodos se registraron incrementos de la tasa de consumo de oxígeno a las máximas concentraciones ensayadas, lo cual coincide con las observaciones de Chen & Lin (1995) en *P. chinensis* y de Diodato et al. (2012) en *H. planatus*. Cuando los organismos acuáticos son expuestos a altos niveles de amonio, las branquias son los órganos más sensibles al posible daño por toxicidad del amonio, debido a que están expuestas al medio exterior en forma permanente (Romano & Zeng, 2007b). Las branquias cumplen funciones muy importantes y variadas en los crustáceos, las cuales incluyen la excreción de amonio, la osmorregulación, el intercambio de gases y el equilibrio de pH (Péqueux, 1995). Un daño a este nivel provocaría desbalances fisiológicos que, de acuerdo al grado de daño ocurrido, puede llegar a causar la muerte del organismo.

Con relación a la tasa de excreción nitrogenada, en el presente estudio fue un parámetro de importancia, ya que presentó variaciones significativas en ambas especies para los tres estresores evaluados, lo cual indica la sensibilidad de este parámetro para las condiciones de estudio.

Tendencias opuestas de este parámetro frente a la exposición a diferentes salinidades se observaron para las especies bajo estudio. Es decir, en los isópodos la excreción aumentó en las máximas salinidades, probablemente como ha sido mencionado por Regnault (1987) a causa del catabolismo de aminoácidos involucrado en la regulación osmótica. Los aminoácidos libres son efectores osmóticos importantes en los crustáceos que contribuyen a mantener la concentración interna por encima de la concentración del medio cuando ésta se encuentra por debajo del punto isosmótico de la especie (Kinne, 1971; Dall, 1981). Esta tendencia ha sido detectada también para la misma especie por Giarratano et al. (2007), mientras que lo contrario ha sido observado para otras especies de crustáceos, como *Onisimus glacialis* (Aarset & Aunaas, 1990) y *Gammarus oceanicus* (Normant & Lamprecht, 2006), expuestos a un rango similar de salinidad (5 a 35). En este sentido, para los anfípodos evaluados en el presente estudio se observó una tendencia general de disminución de la excreción con el aumento de la salinidad; si bien a la salinidad 10 los organismos

presentaron una disminución significativa, la cual podría estar vinculada con algún proceso de ajuste metabólico a dicha salinidad.

La excreción de amonio en anfípodos aumentó con el pH, al igual que lo observado para *H. planatus* (Diodato et al., 2012). Sin embargo, lo contrario ocurrió en isópodos donde la excreción fue mayor a pH 6.9 y disminuyó con el incremento de pH, lo cual concuerda con lo registrado por Chen & Lin (1995) y Chen & Kou (1996) para *P. chinensis* y *Macrobrachium rosenbergii*, respectivamente. Este hecho podría deberse a que a pH altos habría un cambio en el producto de excreción (de amonio a urea, nitritos y nitratos), lo cual estaría relacionado con la detoxificación del amonio, ya que a medida que se incrementa el pH aumenta la toxicidad del amonio (Emerson et al., 1975).

Es reconocido el hecho de que el amonio ejerce efectos importantes sobre la fisiología de los crustáceos (Regnault, 1987; Chen & Kou, 1992; Mugnier & Justou, 2004; Racotta & Hernández-Herrera, 2000). En el presente estudio, la máxima concentración de amonio ensayada provocó un aumento significativo en la excreción de amonio en ambas especies. Trabajos realizados por diversos autores han demostrado que los mecanismos que utilizan los crustáceos para hacer frente a la toxicidad del amonio y a las altas salinidades están ampliamente relacionados, lo cual implicaría a la osmorregulación como un proceso utilizado en dichas situaciones (Chen & Lin, 1995; Li et al., 2007; Romano & Zeng, 2010).

Finalmente, el consumo de oxígeno y la excreción de amonio pueden integrarse en la relación atómica O:N, la cual refleja además, los cambios en los requerimientos energéticos debido a variables internas y externas, es decir, el balance entre el catabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos (Mayzaud & Conover, 1988). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que si ambos parámetros fisiológicos varían en la misma proporción, la relación O:N se mantendrá constante.

En el presente estudio, la disminución de la relación O:N en isópodos expuestos a las máximas salinidades correspondería a un catabolismo proteico, reflejo de una situación de estrés, ya que dicha tasa se desprende de una disminución del consumo de oxígeno acompañada de un aumento en la excreción de amonio. Si bien esta última tendencia también se observó para los organismos expuestos a amonio, la relación O:N correspondiente no presentó una tendencia firme. Este hecho demuestra que la observación de este parámetro por si solo puede enmascarar verdaderos cambios metabólicos que los

organismos manifiestan ante estos estresores ambientales (Giarratano et al., 2007; Amin & Comoglio 2010).

Para el caso particular de los anfípodos, los mismos presentaron valores de O:N en los mismos rangos que los isópodos, salvo en las dos salinidades donde la excreción nitrogenada disminuyó notablemente (salinidades 10 y 30), provocando de este modo un aumento importante en la relación atómica mencionada. Las disminuciones registradas en la relación O:N de anfípodos expuestos a diferentes niveles de pH y amonio indicarían una respuesta al estrés a medida que dichos parámetros se incrementaron, ya que, en forma general, resultaron del aumento de ambas tasas metabólicas.

De este modo, los resultados obtenidos en el presente trabajo sustentan el limitado poder descriptivo que por si sola tiene la relación atómica O:N, lo cual hace que sea imprescindible el análisis conjunto de las tasas metabólicas de la cual se desprende, para un correcto análisis de los efectos de los estresores estudiados sobre los organismos.

La utilización del Índice de Respuesta de Biomarcadores (RIB) ha resultado ser en el presente estudio una herramienta muy útil ya que logró resumir adecuadamente en un único valor los niveles de los biomarcadores determinados, integrando tanto respuestas bioquímicas como fisiológicas.

La variabilidad de los valores iniciales del RIB puede deberse a la variación natural que presentan los organismos al estar expuestos a un ambiente fluctuante como es la zona intermareal. Por otro lado, teniendo en cuenta que el valor del RIB es mayor cuando el grado de estrés aumenta, se puede inferir cuál es el rango óptimo de los estresores ambientales en el cual los organismos pueden vivir sin presentar indicios de estrés. En el caso de los isópodos, las salinidades entre 15 y 25, valores de pH entre 6.9 y 8.5, y $5.75 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ serían condiciones en las cuales los organismos residentes estarían libres de un estrés significativo, dado los bajos valores del RIB obtenidos. En el caso de los anfípodos, las salinidades entre 15 y 30, un pH de 7.8 y la concentración de $5.75 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ parecen ser condiciones óptimas para la supervivencia de la población. En ambas especies ocurrió que a las concentraciones ensayadas menores a $5.75 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ el valor del RIB fue mayor (en lugar se der más bajo, según lo esperado). Este hecho podría explicarse como un efecto de hormesis, que implica una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas (Calabrese & Baldwin, 2001; 2002; Calabrese, 2008).

Considerando que los valores normales de estos parámetros ambientales registrados en el sitio de recolección de los organismos ensayados (Playa Larga) coinciden con los hallados como óptimos para ambas especies, se puede reconocer a dicho ambiente como un sitio control conservando su condición de prístino.

La utilización de los estadios de vida tempranos y juveniles de los crustáceos en ensayos de toxicidad ha sido de importancia en la investigación debido a que los organismos jóvenes son en general más sensibles a los tóxicos que los adultos (USEPA, 2002a; 200b). En el presente estudio se utilizaron larvas recién eclosionadas del decápodo *Lithodes santolla*, crustáceo que conforma desde hace más de cuatro décadas la principal pesquería en el Canal Beagle.

Como se mencionó en la introducción, los estadios larvales de la centolla han sido objeto de estudio en varios aspectos biológicos incluyendo las respuestas frente a la exposición a contaminantes como metales pesados e hidrocarburos. Sin embargo, la toxicidad del amonio no había sido evaluada aún. En este sentido, el valor obtenido de CL50 a 96 h en el presente estudio fue de 119.84 mg N-NH₃ L⁻¹ (154.24 mg NH₄ L⁻¹), siendo el mismo diez veces más alto comparado con la CL50 a 96 h (11.16 mg N-NH₃ L⁻¹) obtenida para las zoeas I del cangrejo *Portunus pelagicus* (Liao et al., 2011). Más aún, los estadios de cangrejo 7 (0.7 g) de *P. pelagicus*, considerados altamente tolerantes respecto a otras especies (Romano & Zeng, 2007a; Liao et al., 2011), presentaron una CL50 a 96 h de 50.65 mg N-NH₃ L⁻¹, la cual es dos veces menor a la hallada en el presente estudio para zoeas I de *L. santolla*. Estas comparaciones indican que las larvas de centolla presentan una resistencia relativamente alta, la cual podría estar asociada a su mayor tamaño comparado con las larvas de otros decápodos. También su carácter lecitotrófico podría ser de importancia en esta resistencia ya que les permite evitar la entrada de contaminantes al organismo por la vía digestiva (Amin et al., 2003).

Al evaluar las respuestas fisiológicas (consumo de oxígeno y excreción de amonio) de zoeas I mediante un bioensayo de tolerancia a dos concentraciones subletales de amonio (20.20 y 40.40 mg N-NH₃ L⁻¹), se observó que dichas concentraciones tuvieron efecto solo sobre la excreción. En este sentido, el consumo de oxígeno se redujo a medida que se incrementó la concentración de amonio, pero dicha disminución fue leve y no significativa. Una tendencia similar fue registrada por Amin & Comoglio (2010) al exponer larvas zoea I de

L. santolla a cobre, cuya toxicidad provocó un leve aumento del consumo de oxígeno. Knops et al. (2001) describen tres posibles explicaciones para el mantenimiento constante de una tasa metabólica cuando el individuo se encuentra bajo estrés: la primera es que los costos adicionales asociados con el estrés están enmascarados por otros efectos del tóxico; la segunda es que esta demanda energética es muy pequeña comparada con los costos de todo el metabolismo; y la tercera es que por lo menos durante el tiempo de exposición, no hubo un costo adicional debido al estrés químico.

Sin embargo, fue notable el aumento en la excreción que presentaron las larvas expuestas al amonio. Es reconocido que los crustáceos expuestos al amonio ambiental, acumulan amonio en la hemolinfa (Chen & Kou, 1993; Chen & Lin, 1995; Mugnier & Justou, 2004). De este modo, la respuesta encontrada en el presente estudio estaría relacionada con dicha acumulación, ya que el amonio ingresaría al organismo por alguna otra vía distinta de la digestiva y utilizaría la osmorregulación (a través de la excreción de amonio) como un mecanismo para expulsar la acumulación excesiva de amonio presente en la hemolinfa (Romano & Zeng, 2012). Debido entonces al importante incremento de la excreción en las larvas ensayadas, la relación atómica O:N para dichas concentraciones subletales fue mínima respecto del control, lo cual estaría relacionado en mayor medida al cambio en la excreción y no a un cambio en la utilización del sustrato energético, tal como fue expresado anteriormente para los ensayos con isópodos y anfípodos.

Es importante mencionar que los valores fisiológicos registrados en larvas no expuestas al amonio en el presente estudio (control) concuerdan con los hallados por Amin & Comoglio (2010) para la misma especie y utilizando la misma metodología. En este sentido, los valores de consumo de oxígeno y de excreción de amonio registrados fueron de $0.72 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y $22.5 \text{ } \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ para Amin & Comoglio (2010), respectivamente, mientras que fueron de $0.64 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ y $21.9 \text{ } \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ para el presente estudio, respectivamente. El hecho de que estas tasas fisiológicas se mantengan dentro del mismo rango en condiciones experimentales, es un sustento válido para considerar a las larvas de centolla como adecuados organismos de prueba.

La toxicidad del amonio puede presentar efectos a largo plazo sobre los organismos expuestos, principalmente en el proceso de muda (Chen & Kou, 1992; Koo et al., 2005; Miranda-Filho et al., 2009). En el presente estudio, la supervivencia registrada en los ensayos

crónicos I (EI) y II (EII) disminuyó linealmente con el tiempo y con la concentración de amonio. Sin embargo, se presentó una leve diferencia entre ambos ensayos, posiblemente debido a la existencia de una variación natural de respuesta entre ambos grupos de larvas ensayadas. Se ha observado que las primeras eclosiones como las últimas de una hembra ovígera producen larvas con alta variabilidad de respuesta, mayor sensibilidad y mortalidad y por lo tanto son menos resistentes a las condiciones ambientales fluctuantes, siendo más homogéneas las respuestas cuando las larvas provienen de los principales pulsos de eclosión (L. Comoglio; comunicación personal).

A partir del análisis de la variación de los porcentajes de muda y de los tiempos medios de vida y de muda en las distintas concentraciones de amonio ensayadas, se pueden arribar conjuntamente a varias conclusiones. Por un lado, se observó que dicho porcentaje de muda fue disminuyendo al incrementarse la concentración de amonio, es decir, que el amonio ejerce un efecto tóxico sobre el ciclo de vida de las larvas de centolla. Sólo las zoeas expuestas a las más bajas concentraciones de amonio lograron alcanzar el estadio de postlarva, y a su vez, tardaron más días en alcanzarlo en las máximas concentraciones de amonio a las que sobrevivieron (27.20 y 45.07 mg N-NH₃ L⁻¹). Además, se observó que la muda de zoea III a postlarva fue el pasaje más crítico de los tres evaluados, ya que la reducción en el número de individuos fue notable principalmente a partir del tratamiento 27.20 mg N-NH₃ L⁻¹. Por otro lado, también se registraron diferencias en el tiempo de inicio de cada muda. En forma general y respecto al control, la muda se adelantó en las larvas expuestas a las menores concentraciones (10.10 y 16.32 mg N-NH₃ L⁻¹), mientras que se retrasó en aquellas expuestas a las mayores concentraciones. El adelanto de la muda podría explicarse como una estrategia de defensa del organismo para detoxificarse (Du Preez et al., 1993; Amin et al., 2003), y este hecho ha sido registrado también en otras especies como en los juveniles de *Litopenaeus stylirostris* (Mugnier et al., 2008) y en *Penaeus monodon* (Chen & Kou, 1993). Sin embargo, el atraso en la muda podría deberse a la relación inversa entre el amonio y el oxígeno disponible. Es decir, los altos niveles de amonio, además de ser tóxicos para los invertebrados, hacen disminuir los niveles de oxígeno lo cual perjudicaría el desarrollo de la larva o le causaría un estrés metabólico (Forward et al., 1997; 2001). La relación amonio-oxígeno y su efecto sobre los invertebrados también fue reportada por Mugnier et al. (2008) quienes encontraron que la combinación de la toxicidad del amonio y

la hipoxia condujo a una respuesta fisiológica más fuerte que aquella causada por ambos estresores por separado. También fueron observados retrasos en la muda en larvas de centolla expuestas a lindano y acetona (Lombardo et al., 1991). Más precisamente, la acetona presentó un efecto de retraso en la muda, que fue más marcado conforme se incrementaba la concentración de acetona; mientras que el lindano provocó una fuerte inhibición en la muda causando la ausencia de mudas exitosas de zoea I a zoea II bajo cualquier concentración ensayada. Por su parte, Amin et al. (2003) encontraron en esta misma especie que los metales pesados Cd, Pb y Zn causan efectos significativos tanto en el porcentaje como en el tiempo de muda, registrando también un retraso en el pasaje de un estadio al siguiente.

Tanto el estudio de los parámetros fisiológicos como de las alteraciones en el ciclo de muda en larvas de *L. santolla*, han sido herramientas útiles para evaluar la tolerancia de esta especie a un estresor ambiental relevante como es el amonio en el ambiente acuático.

CONCLUSIONES PARCIALES

La escasa mortalidad registrada en los bioensayos de tolerancia a salinidad, pH y amonio en *Exosphaeroma gigas* y en *Paramoera* sp. hace evidente la resistencia que presentan estas especies a las variaciones en las condiciones ambientales, lo cual indicaría que se encuentran adaptadas a habitar ambientes caracterizados por importantes fluctuaciones, como es la zona intermareal del Canal Beagle. Sin embargo, algunos cambios en las respuestas bioquímicas y fisiológicas han sido detectados.

Si bien se encontraron en los organismos ensayados ciertas tendencias de aumento y disminución en las actividades de los biomarcadores bioquímicos, sólo en algunos casos esas respuestas fueron específicas y significativas. De esta manera, para los niveles de salinidad, pH y amonio estudiados, los biomarcadores seleccionados y analizados de forma individual no han mostrado una variación importante e indicativa de respuesta a dichos estresores. Por el contrario, los biomarcadores fisiológicos fueron más sensibles a las variaciones en los estresores ambientales, por lo cual se debe tener en cuenta esta fluctuación al momento de utilizarlos en estudios de toxicidad. Cuando se analizaron los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos de manera integrada mediante la utilización del RIB, el resultado obtenido fue satisfactorio, ya que se pudieron reconocer cuáles serían las condiciones óptimas ambientales frente a las cuales ambas especies residentes se encontrarían en mejor condición en el ambiente estudiado.

Con relación a los estudios realizados en larvas de *Lithodes santolla* se puede concluir que, a pesar de la alta tolerancia al amonio que presenta el primer estadio larval, los efectos del amonio sobre el ciclo de vida de estos crustáceos, principalmente sobre la frecuencia y la duración de muda, y sobre la obtención de estadios postlarvales. Estos resultados revisten gran importancia ya que es posible encontrar valores de amonio en la zona de reclutamiento de esta especie similares a los perjudiciales para el normal desarrollo de los primeros estadios de la centolla.

De acuerdo a lo hallado en el presente estudio y en concordancia con lo expuesto por varios autores citados oportunamente en la sección de Discusión, es de relevancia determinar los niveles base de las actividades de los biomarcadores, para poder discernir las variaciones debidas a contaminantes de las variaciones intrínsecas respecto de parámetros

como salinidad, pH y amonio. El biomarcador ideal sería aquel que sólo responde ante la presencia de contaminantes y no a otras variables como los parámetros naturales fisicoquímicos; pero, en la realidad esto es sumamente improbable que ocurra. Para lograr una interpretación adecuada de las respuestas de los biomarcadores, estudios como el aquí presentado son una contribución importante al establecimiento de niveles de actividad de referencia contra los cuales los cambios en el biomarcador pueden ser contrastados y constituyen por lo tanto, pasos preliminares esenciales para el desarrollo de los bioensayos, complementando los mismos con la determinación de los biomarcadores seleccionados.

PARTE D
Bioensayos de toxicidad con efluentes urbanos

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los ambientes costeros han sido influenciados por aportes derivados de las actividades urbanas e industriales (Cajaraville et al., 2000). Las aguas residuales no tratadas que son descargadas en las zonas superiores de los cursos de agua, introducen en las aguas costeras gran cantidad de nutrientes (compuestos de nitrógeno, fósforo y silice), micro-contaminantes, patógenos y fármacos, incluyendo sustancias cancerígenas (Ternes, 1998; Ono et al., 2000; Mara, 2003). Por otro lado, el estudio de los efectos de la exposición a los efluentes sobre los organismos, poblaciones o comunidades, reviste gran importancia ecológica, a causa de la complejidad de las mezclas de compuestos de origen antropogénico que se encuentran presentes en los efluentes (Smolders et al., 2004).

Una medida directa de la toxicidad de los efluentes fue definida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 2002a) como “Whole Effluent Toxicity” (WET; toxicidad total o integrada del efluente), es decir, el efecto tóxico total de un efluente medido directamente por medio de una prueba de toxicidad (USEPA, 1991). El objetivo de los bioensayos WET es identificar, caracterizar y brindar información para eliminar los efectos tóxicos de las descargas sobre los recursos acuáticos (USEPA, 1996). Es decir, los bioensayos WET pretenden contribuir a la protección de la vida acuática mediante la predicción del efecto de un efluente sobre el sistema receptor (Osteen et al., 1999). Sin duda, las pruebas WET han sido herramientas sumamente útiles para identificar los impactos de toxicidad en el ambiente, aunque debe tenerse en cuenta su limitación dada por la variabilidad, la especificidad en relación a las especies estudiadas y las diferencias entre los estudios a campo y laboratorio (Chapman, 2000).

Poder relacionar los efectos observados en los bioensayos de toxicidad con contaminantes específicos o aún con clases de contaminantes, es una tarea muy difícil debido a que la composición de los efluentes generalmente es desconocida, compleja y sumamente variable (Whelan & Titamnis, 1981; De Maagd, 2000; Sarakinos et al., 2000). Más aún, estas mezclas complejas contienen sustancias cuyas determinaciones analíticas no están disponibles o son muy costosas, por lo cual, existe una necesidad de desarrollar

estrategias que permitan evaluar, en este contexto, si una zona costera determinada está bajo estrés o no.

En este sentido, la utilización de biomarcadores es un mecanismo efectivo para estimar la toxicidad de mezclas complejas (Hebel et al., 1997; de Lafontaine et al., 2000; Damiens et al., 2007; Jemec et al., 2010). Más precisamente, los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos han sido ampliamente utilizados como herramienta para detectar posibles efectos adversos en los niveles de organización más altos (Peakall, 1992; Maltby et al., 2001; de Coen & Janssen, 2003; van der Oost et al., 2003).

Los estudios ecotoxicológicos sobre los efectos de las aguas residuales o efluentes sobre el ambiente acuático son numerosos, utilizando una variedad de especies, incluyendo los crustáceos, debido a sus características biológicas y toxicológicas (Lagadic & Caquet, 1998). Actualmente, una variedad de especies de crustáceos son utilizadas como "especies estándar" para la realización de bioensayos de toxicidad de efluentes; entre ellas se encuentran *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Mysidopsis bahía*, *Hyalella curvispina* y *Leptocheirus plumulosus* (Eagleson et al., 1990; Bervoets et al., 1996; USEPA 2002a; 2002b; Diamond et al., 2008). Sin embargo, es común encontrar en la literatura bioensayos WET realizados con especies residentes de los sitios afectados (Gross et al., 2001; Arvai et al., 2002; Vallarino et al., 2002; Smolders et al., 2004; Di Marzio et al., 2005; Bartolini et al., 2009; Diodato et al., 2012).

Teniendo en cuenta la problemática ambiental a la cual se encuentra sometida la zona costera de la ciudad de Ushuaia, principalmente relacionada a la descarga de efluentes urbanos e industriales sin tratamiento, el **objetivo específico** de este capítulo es:

- evaluar en adultos de isópodos y anfípodos la supervivencia y las respuestas bioquímicas (AChE, CAT, GST y LPO) y fisiológicas (consumo de oxígeno y excreción nitrogenada) frente a la exposición aguda a una serie de concentraciones de tres efluentes costeros con diferente grado de aportes urbanos.

METODOLOGÍA

1. Resumen general de los bioensayos realizados con efluentes

Se realizaron bioensayos de laboratorio a 96 h de exposición con organismos adultos de *Exosphaeroma gigas* y *Paramoera* sp. utilizando una serie de concentraciones de efluentes costeros que son vertidos en Bahía Ushuaia y Golondrina. Los mismos constaron de ensayos preliminares y posteriormente de los definitivos.

1.1 Bioensayos preliminares

Los objetivos de los **bioensayos preliminares** fueron los siguientes:

- ✓ adecuar el diseño estándar de los bioensayos a las condiciones de trabajo presentes en el laboratorio, incluyendo la utilización de equipamiento específico para la realización de los mismos, como el uso de una bomba peristáltica de flujo continuo
- ✓ ajustar las concentraciones de efluente a ensayar en los bioensayos definitivos

Los bioensayos preliminares se llevaron a cabo sólo en *E. gigas* y se utilizó agua recolectada de la línea de costa, es decir, agua de mezcla entre efluente y agua de mar (Tabla 36). Los lugares seleccionados fueron la desembocadura del Arroyo Rodríguez (ARd; EP1) y las salidas de un colector pluvio-cloacal en la zona industrial (ZI; EP2) y de otro sobre Bahía Golondrina (BG; EP3). Se utilizaron en total 6 concentraciones del efluente (10, 16, 25, 40, 63 y 100% de efluente) y un control de agua de mar filtrada (0% de efluente), se registró diariamente la supervivencia y al finalizar las 96 h de exposición se preservaron liofilizados los organismos para la posterior determinación de los niveles de los biomarcadores AChE, CAT y GST.

Tabla 36. Bioensayos preliminares. Resumen general de los bioensayos realizados con efluentes costeros en isópodos. ARd: desembocadura del Arroyo Rodríguez; ZI: Zona Industrial; BG: Bahía Golondrina.

BIOENSAYOS PRELIMINARES									
Especie estudiada	Ensayo	Efluente	Tiempo de exposición	Tipo de bioensayo	Concentraciones ensayadas	Supervivencia	Biomarcador determinado		
							AChE	CAT	GST
ISOPODOS	EP1	ARd	96 h	Laboratorio	0-10-16-25-40-63-100%	x	x	-	-
	EP2	ZI	96 h	Laboratorio	0-10-16-25-40-63-100%	x	x	-	-
	EP3	BG	96 h	Laboratorio	0-10-16-25-40-63-100%	x	x	x	x

1.2 Bioensayos definitivos

Los **bioensayos definitivos** se realizaron tanto con organismos de *E. gigas* como de *Paramoera* sp., utilizando efluentes crudos localizados en la desembocadura del Arroyo Rodríguez (ARd); en la desembocadura del Arroyo Grande (AGd) y en la salida del rebalse pluviocloacal sobre Bahía Golondrina (BG). Los tres efluentes seleccionados para estos bioensayos también corresponden a sitios evaluados en la caracterización ambiental presentada en la Parte B de la presente Tesis Doctoral (página 25).

Se realizaron un total de cinco bioensayos definitivos para cada especie. Los bioensayos denominados E1, E2 y E3 se realizaron utilizando una serie de concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG, respectivamente. Los bioensayos E4 y E5 evaluaron la toxicidad de los tres efluentes mencionados bajo una concentración determinada e igual para los tres. El diseño de estos últimos fue planteado en base a los resultados obtenidos previamente en E1, E2 y E3. Un resumen de los bioensayos definitivos realizados se presenta en la Tabla 37.

Tabla 37. Bioensayos definitivos. Resumen general de los bioensayos realizados con efluentes costeros en las dos especies de crustáceos. ARd: desembocadura del Arroyo Rodríguez, AGd: desembocadura del Arroyo Grande; BG: Bahía Golondrina.

BIOENSAYOS DEFINITIVOS											
Especie estudiada	Ensayo	Efluente puro	Tiempo de exposición	Tipo de bioensayo	Concentraciones	Supervivencia	Biomarcador determinado				
							AChE	CAT	GST	LPO	ConsO ₂ /ExcrNH ₄
ISOPODOS Y ANFÍPODOS	E1	ARd	96 h	Laboratorio	0-20-60-100%	x	x	x	x	x	x
	E2	AGd	96 h	Laboratorio	0-20-60-100%	x	x	x	x	x	x
	E3	BG	96 h	Laboratorio	0-20-60-100%	x	x	x	x	x	x
	E4	ARd	96 h	Laboratorio	0-60%	x	x	x	x	x	x
		AGd									
		BG									
	E5	ARd	96 h	Laboratorio	0-50%	x	x	x	x	x	x
		AGd									
		BG									

2. Diseño experimental de los bioensayos

La metodología general empleada en los bioensayos de laboratorio con efluentes costeros fue similar para todos los realizados en este trabajo. Tanto la provisión y acondicionamiento de agua de mar como la recolección de organismos y su mantenimiento en laboratorio, se llevaron a cabo de la manera descrita para los bioensayos con estresores ambientales (ver secciones 2.1 y 2.2 de la Parte C, página 94).

2.1. Recolección de efluentes

Los efluentes se recolectaron el día previo al inicio del bioensayo, tomando la muestra en marea baja, para evitar la mezcla con el agua de mar. Simultáneamente se recolectaron muestras para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron a 8°C y en oscuridad hasta su utilización.

2.2. Determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en los efluentes

Para cada uno de los bioensayos realizados, tanto preliminares como definitivos, se registraron los parámetros fisicoquímicos de los efluentes recolectados (temperatura, salinidad, pH, conductividad, oxígeno disuelto y turbidez) y se determinó posteriormente la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos, MOP y coliformes totales y fecales. Los protocolos utilizados fueron los mismos utilizados para la caracterización ambiental (sección 3 de la Parte B; página 32).

2.3 Diseño experimental y preparación de las concentraciones de ensayo

Todos los bioensayos se realizaron en un laboratorio climatizado con control de temperatura y fotoperiodo ($8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 12L: 12O, respectivamente). Para cada tratamiento ensayado se expusieron 30 isópodos y 40 anfípodos. Para obtener las distintas concentraciones de efluentes utilizadas para cada bioensayo, se procedió a la dilución de los mismos con agua de mar filtrada. En los bioensayos E1, E2 y E3 se evaluaron 3 concentraciones de cada efluente (20, 60 y 100% de efluente); mientras que en los bioensayos E4 y E5 se evaluaron simultáneamente dos únicas concentraciones de cada efluente mencionado (60% de efluente en el E4 y 50% de efluente en el E5). En todos los ensayos se adicionó un tratamiento control de agua de mar filtrada (0% de efluente).

Los bioensayos se mantuvieron bajo un sistema de flujo continuo mediante el uso de una bomba peristáltica de 8 canales (Figura 51). Diariamente se prepararon las concentraciones de efluente utilizadas para renovar los depósitos correspondientes.

Al inicio de cada ensayo (T_0) se tomaron muestras de isópodos y de anfípodos como referencia de los parámetros iniciales a estudiar. Diariamente se registró la supervivencia de los organismos en todos los tratamientos. Al finalizar las 96 h de exposición, se llevaron a cabo las mediciones fisiológicas de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada. Posteriormente, los organismos fueron dispuestos en tubos eppendorfs y liofilizados (de acuerdo al protocolo detallado en la sección 2.3 de la Parte C, página 96), a fin de preservar las muestras para la posterior determinación de biomarcadores.



Figura 51. Fotografías del diseño de los bioensayos de laboratorio con efluentes.

3. Medición de biomarcadores

Las determinaciones de los biomarcadores indicadas para cada bioensayo (Tablas 36 y 37) se realizaron según los protocolos descritos en la sección 3 de la Parte C (página 100).

Todos los biomarcadores fueron medidos en las muestras a T_0 (Tiempo Inicial) y a 96 h, en las diferentes concentraciones de efluente. Dado el alto porcentaje de mortalidad registrado en el E4 solo se contó con material biológico para las determinaciones de biomarcadores en 0% y AGd 60%. Debido a estos resultados se realizó el E5 utilizando para el mismo una concentración menor de efluente (50%).

4. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores

En el presente capítulo se calculó el RIB/n teniendo en cuenta las diferentes concentraciones de efluentes ensayadas en los ensayos definitivos E1, E2 y E3. El cálculo se realizó de la misma manera que la descrita en la página 102 (Parte C). Además, se realizó para cada efluente (ARd, AGd y BG) un gráfico radial (star plot) en el cual cada valor de RIB/n de cada tratamiento fue graficado como un vector.

RESULTADOS

1. Determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en los efluentes

Los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos determinados en los efluentes colectados de línea de costa (para realizar los bioensayos preliminares) y en aquellos colectados crudos (para los bioensayos definitivos) se presentan en las Tablas 38 y 39, respectivamente.

Tabla 38. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos determinados en los efluentes costeros utilizados en los bioensayos preliminares. ARd: desembocadura del Arroyo Rodríguez; ZI: Zona Industrial; BG: Bahía Golondrina; nd: no detectable.

CARACTERIZACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LÍNEA DE COSTA					
Parámetros determinados		Unidades	EP1	EP2	EP3
Efluente			ARd	ZI	BG
Fecha			Sept08	Oct08	Dic08
PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	Temperatura	°C	8,5	8,3	9,3
	Salinidad	-	29,7	15,7	27,4
	pH	-	8,23	7,99	7,72
	Conductividad	mS cm ⁻¹	47,1	26,1	43,6
	Oxígeno Disuelto	mg L ⁻¹	6,69	10,76	12,58
	Turbidez	NTU	2,47	8,26	nd
NUTRIENTES	Nitratos	mg L ⁻¹	2,4	3,78	0,02
	Nitritos	mg L ⁻¹	0,26	0,15	0,12
	Amonio	mg L ⁻¹	-	2,80	nd
	Fosfatos	mg L ⁻¹	1,29	0,56	0,18
	Silicatos	mg L ⁻¹	1,24	1,02	0,31
MATERIA ORGÁNICA PARTICULADA		mgC m ⁻³	6865	1907	890
BACTERIOLOGÍA	Coliformes Totales	NMP 100mL ⁻¹	>230	>690	<1800
	Coliformes Fecales	NMP 100mL ⁻¹	>230	>690	<1800

Tabla 39. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos determinados en los efluentes costeros utilizados en los bioensayos definitivos. ARd: desembocadura del Arroyo Rodríguez; AGd: desembocadura del Arroyo Grande; BG: Bahía Golondrina.

CARACTERIZACIÓN DE EFLUENTES PUROS									
Ensayo	E1	E2	E3	E4			E5		
Efluente	ARd	AGd	BG	ARd	AGd	BG	ARd	AGd	BG
Fecha	Abr09	May09	Jun09	Ene10			Abr10		
Temperatura (°C)	9,4	2,9	5,5	11,1	7,4	11,7	9,3	6	11,1
Salinidad	0,1	0,6	0,1	0	0	0,2	4	0,1	0,2
pH	7,46	7,98	7,52	7,15	6,95	7,5	7,29	7,12	7,52
Conductividad (mS cm ⁻¹)	0,387	1,42	0,3	0,37	0,93	0,702	7,60	0,299	0,559
Oxígeno Disuelto (mg L ⁻¹)	13,07	19,94	12,54	8,4	12,09	3,62	-	-	-
Turbidez (NTU)	300	200	500	100	90	250	55	70	230
Nitratos (mg L ⁻¹)	10,30	3,92	4,10	5,30	1,50	1,56	5,94	2,45	3,89
Nitritos (mg L ⁻¹)	0,24	0,13	0,18	0,23	0,12	0,21	0,23	0,12	0,18
Amonio (mg L ⁻¹)	8,96	0,04	6,58	7,52	0,10	27,41	12,84	0,31	31,02
Fosfatos (mg L ⁻¹)	5,45	0,44	2,85	4,05	0,19	12,06	4,06	0,45	10,49
Silicatos (mg L ⁻¹)	2,86	2,00	2,10	2,88	1,06	3,74	2,98	1,48	3,42
Materia Orgánica Particulada (mgC m ⁻³)	3.712	1.907	2.860	2.670	559	8.975	6.830	1.896	12.101
Coliformes Totales (NMP 100mL ⁻¹)	1.300.000	2.100	45.000	1.600.000	>16.000	1.600.000	540.000	>16.000	1.600.000
Coliformes Fecales (NMP 100mL ⁻¹)	490.000	2.100	45.000	920.000	>16.000	1.600.000	540.000	>16.000	1.600.000

Se registraron diferencias en los parámetros determinados entre los efluentes recolectados sobre la línea de costa y aquellos crudos. Principalmente se presentaron variaciones de salinidad, acercándose en el primer caso, a los valores del agua de mar (15-30).

Por otro lado, comparando los parámetros registrados entre los efluentes crudos de los E1, E2 y E3, se observa que los efluentes ARd y BG presentan los valores más altos de temperatura, nutrientes, MOP y coliformes totales y fecales, y los menores de oxígeno disuelto. La tendencia inversa se registró en el efluente AGd.

En la Tabla 40 se presentan los valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidad, pH, conductividad (mS cm^{-1}) y oxígeno disuelto (mg L^{-1}) registrados en las diferentes concentraciones de los efluentes puros utilizados en los bioensayos:

Tabla 40. Parámetros fisicoquímicos registrados en las concentraciones de los efluentes costeros utilizados en los bioensayos definitivos. ARd: desembocadura del Arroyo Rodríguez; AGd: desembocadura del Arroyo Grande; BG: Bahía Golondrina. Conc: concentración.

Efluente	Conc.	Temperatura	Salinidad	pH	Conductividad	Oxígeno Disuelto
ARd	0%	8,2	29	7,86	46	12,8
	20%	7,8	23,6	7,56	38,1	12,01
	60%	7,8	12,2	7,29	20,9	10,86
	100%	7,9	0,1	7,52	0,4	9,75
AGd	0%	8,1	29,2	8,22	47,2	12,72
	20%	8,5	24	8,08	39,6	13,43
	60%	7,6	12,4	8,1	21,8	14,93
	100%	7,4	0,3	7,57	1,0	16,25
BG	0%	8,7	29,5	7,94	46,2	9,2
	20%	8	23,9	7,83	38,7	9,33
	60%	7,6	12,4	7,54	21,3	9,88
	100%	7,2	0,1	7,44	0,3	10,34

2. Supervivencia a 96 h

En todos los bioensayos realizados y para ambas especies, el tratamiento control (0% de efluente) superó el 96% de supervivencia, lo cual le proporciona amplia validez al ensayo (Tablas 41 y 42).

En los bioensayos preliminares (Tabla 41), la mortalidad fue mayor en la concentración 100% de efluente en todos los casos, siendo máxima en el EP1 (ARd, 23%). Sin embargo, la mortalidad fue mínima en el EP2 (Zl, 7%), mientras que no se registraron individuos muertos en el EP3 (BG).

Para los bioensayos definitivos (Tabla 42), la mortalidad en ambas especies fue abrupta a las 24 h en el tratamiento 100% de efluente en los ensayos E1 y E3, mientras que fue aumentando gradualmente durante las 96 h en el E2 tanto en isópodos como en anfípodos. Asimismo, los únicos sobrevivientes a las 96 h en el tratamiento 100% de efluente del E2 fueron los anfípodos.

Por otro lado, se registró una gran diferencia de mortalidad entre los efluentes del E4 y del E5 a pesar de presentar solo un 10% de diferencia en la concentración ensayada.

Al comparar la supervivencia de isópodos y anfípodos expuestos a las mismas condiciones de ensayo, se evidencia que, aunque las tendencias son similares en ambas especies, los anfípodos son más resistentes a la toxicidad que los isópodos.

Debido al modo de respuesta de los organismos frente a la exposición a efluentes, con una supervivencia alta durante las 96 h de exposición o muy baja en cortos períodos de tiempo, no fue posible realizar el cálculo de la CL50 para los efluentes utilizados.

Tabla 41. Bioensayos preliminares. Supervivencia cada 24 h de isópodos expuestos a los efluentes de línea de costa.

SUPERVIVENCIA BIOENSAYOS PRELIMINARES					
Ensayo	Concentración	24 h	48 h	72 h	96h
EP1 (ARd)	0%	96,67	96,67	96,67	96,67
	10%	100	100,0	100,0	96,7
	16%	100	100	100	100
	25%	100	100	100	100
	40%	100	96,67	96,67	96,67
	63%	96,67	96,67	96,67	96,67
	100%	90	90	86,67	76,67
EP2 (ZI)	0%	100	100	100	100
	10%	100	100	100	96,67
	16%	96,67	96,67	96,67	93,33
	25%	96,67	96,7	96,7	93,33
	40%	100	100	100	100
	63%	100	100	100	100
	100%	100	100	96,67	93,33
EP3 (BG)	0%	100	100	100	100
	10%	100	100	100	100
	16%	100	100	100	100
	25%	100	100	100	100
	40%	100	100	100	100
	63%	100	100	100	100
	100%	100	100	100	100

Tabla 42. Bioensayos definitivos. Supervivencia cada 24 h de isópodos y anfípodos expuestos a efluentes crudos.

SUPERVIVENCIA BIOENSAYOS DEFINITIVOS									
		Isópodos				Anfípodos			
Ensayo	Concentración	24 h	48 h	72 h	96h	24 h	48 h	72 h	96h
E1 (ARd)	0%	100	100	100	100	100	100	100	100
	20%	100	96,7	96,7	96,7	100	100	100	100
	60%	100	100	100	100	100	100	100	100
	100%	0	0	0	0	0	0	0	0
E2 (AGd)	0%	100	100	100	100	100	100	100	100
	20%	100	100	100	100	100	100	100	100
	60%	100	100	100	100	100	100	100	100
	100%	90	66,7	36,7	0	100	96,7	86,7	83,3
E3 (BG)	0%	100	100	100	100	100	100	100	98
	20%	100	100	100	100	100	100	100	100
	60%	100	100	100	100	100	100	100	100
	100%	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	0%	100	100	100	100	100	100	100	100
	60% ARd	100	60	6,7	0	70	35	30	27,5
	60% AGd	100	100	100	100	100	100	100	100
	60% BG	36,7	0	0	0	30	10	7,5	7,5
E5	0%	100	100	100	100	100	100	100	100
	50% ARd	100	100	100	100	100	100	100	100
	50% AGd	100	100	100	100	100	100	100	100
	50% BG	100	100	100	100	100	100	100	100

3. Biomarcadores bioquímicos

3.1. Bioensayos preliminares

❖ Acetilcolinesterasa

La actividad media de AChE registrada en los tratamientos control de ARd, ZI y BG fueron estadísticamente diferentes (KW= 6.00; $p=0.0498$), siendo $ARd > ZI > BG$ (Figura 52). En los ensayos con ARd y BG la actividad de AChE no presentó diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas ($F=1.42$; $p=0.2702$ y $F=1.94$; $p=0.1496$, respectivamente); mientras que en con ZI si fueron significativas ($F=7.85$; $p=0.0022$) ya que el tratamiento control (0% de efluente) presentó un valor medio más alto ($7.04 \pm 0.40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$) que los restantes (promedio de $2.71 \pm 0.40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$) (Figura 52).

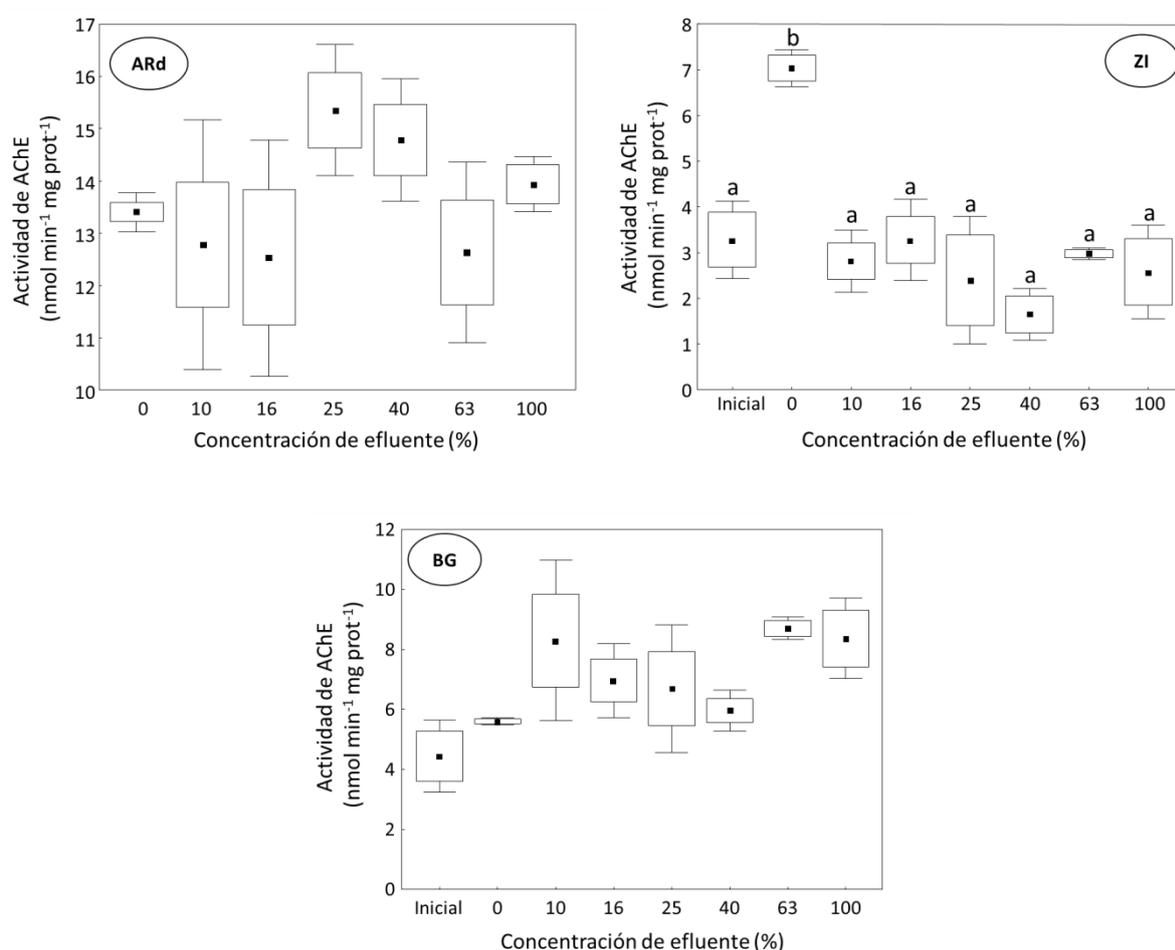


Figura 52. Actividad de AChE en isópodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, ZI y BG. Letras diferentes para cada ensayo indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Catalasa y Glutación S-Transferasa

La actividad de CAT en el ensayo con el efluente BG no mostró diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas ($F=1.19$; $p=0.3651$).

En cambio, la actividad de GST fue significativamente mayor en el tratamiento control (0.04 ± 0.003 UGST mg prot⁻¹; $F=11.08$; $p=0.0003$) que en el resto de las concentraciones ensayadas, siendo mínimo el valor registrado en el tratamiento 100% (0.008 ± 0.004 UGST mg prot⁻¹) (Figura 53).

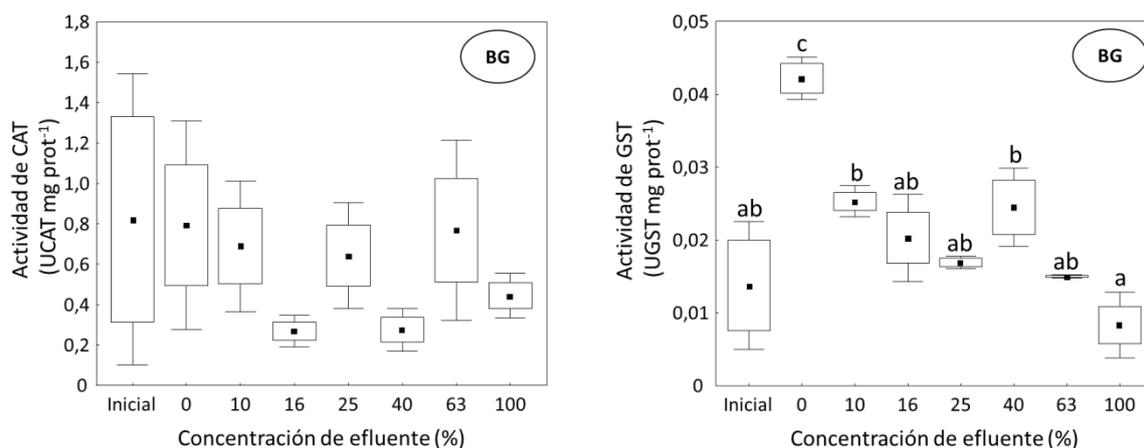


Figura 53. Actividad de CAT y GST en isópodos expuestos a diferentes concentraciones del efluente BG. Letras diferentes para cada ensayo indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

3.2. Bioensayos definitivos

❖ Acetilcolinesterasa

En los ensayos con isópodos, la actividad de AChE registrada para el control (0% de efluente) en el ensayo con ARd y para el valor inicial en el ensayo con BG fueron significativamente mayores ($15.05 \pm 3.16 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$; $F=7.82$; $p=0.0008$ y $15.02 \pm 3.98 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$; $F=7.75$; $p=0.0010$, respectivamente). Para los bioensayos con AGd y con los tres efluentes al 50% (E5) no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($H=2.26$; $p=0.5195$ y $F=1.13$; $p=0.4542$, respectivamente), aunque se observa una estimulación de la actividad de AChE en AGd y una inhibición en los tres efluentes al 50%, respecto del valor inicial (Figura 54).

Sin embargo en los anfípodos, sólo se encontraron diferencias en la actividad de AChE en los organismos expuestos al efluente AGd, las cuales presentaron una tendencia a la disminución a medida que aumentó la concentración del efluente ($F=7.82$; 0.0222), siendo máxima la inhibición en el 100% AGd (56%). Por otro lado, la actividad de AChE en los ensayos con ARd y BG fue similar entre tratamientos, registrándose valores medios de $5.26 \pm 0.42 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ en ARd ($F= 0.42$; $p=0.7475$) y de $4.94 \pm 0.65 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ en BG ($F= 2.04$; $p=0.1964$) (Figura 54).

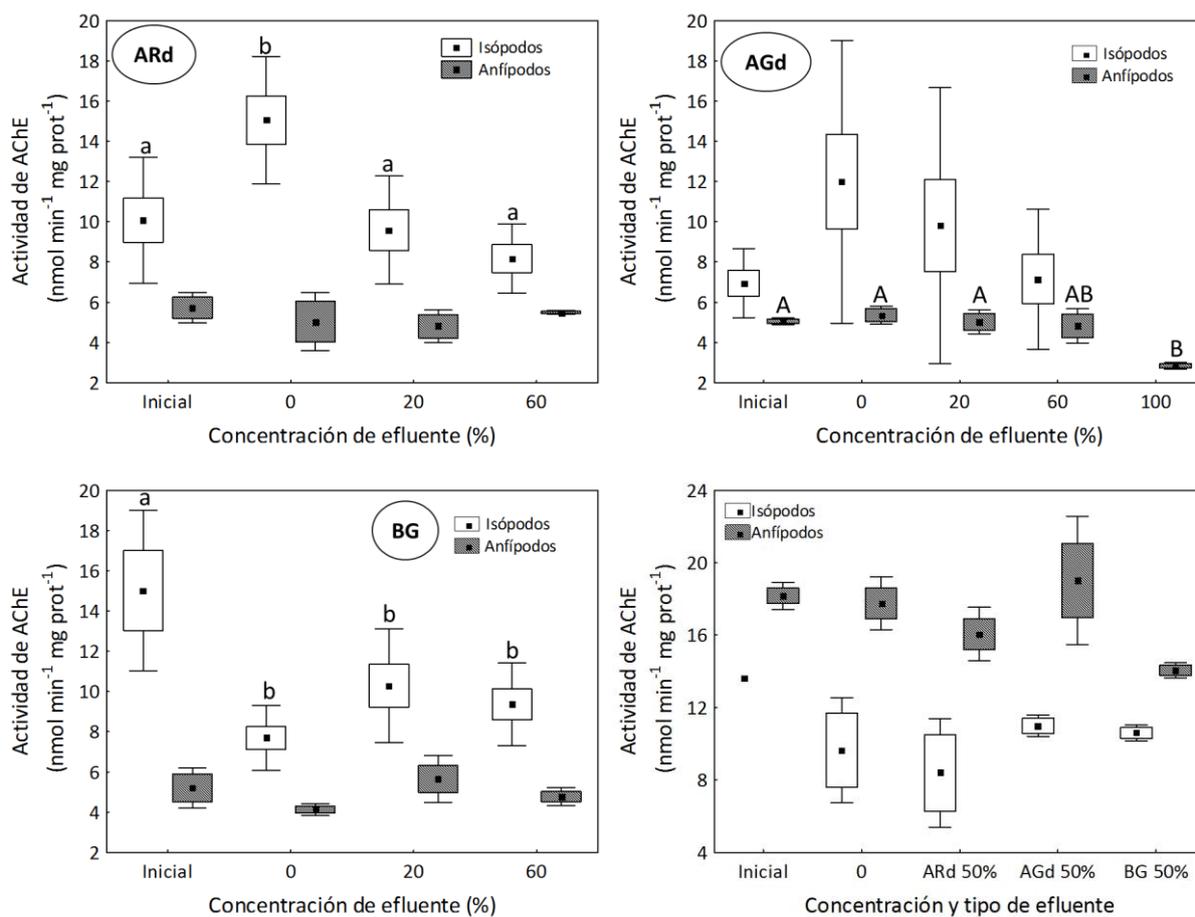


Figura 54. Actividad de AChE en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Catalasa

Los valores medios iniciales de la actividad de CAT en isópodos fueron estadísticamente similares en todos los ensayos realizados (promedio de 0.61 ± 0.10 UCAT mg prot⁻¹; $F=0.78$; $p=0.5534$). Sin embargo, la actividad de CAT en el control del ARd (0% de efluente) (1.39 ± 0.06 UCAT mg prot⁻¹) fue tres veces más alta comparada con los otros controles (promedio de 0.46 ± 0.17 UCAT mg prot⁻¹). En dichos ensayos, la actividad de CAT no presentó una tendencia definida de aumento o disminución entre tratamientos, mientras que en los tres efluentes al 50% se registró una disminución no significativa respecto del valor inicial (Figura 55).

En anfípodos, sólo se detectaron diferencias significativas entre el valor inicial de CAT (0.04 ± 0.00 UCAT mg prot⁻¹) y los correspondientes a 20 y 100% de efluente AGd (0.48 ± 0.00 UCAT mg prot⁻¹ y 0.54 ± 0.08 UCAT mg prot⁻¹, respectivamente; $F=7.29$; $p=0.0257$), siendo 10 veces mayor el valor registrado en 100% AGd que su correspondiente valor inicial. Una tendencia de aumento se registró frente a la exposición a ARd, aunque las diferencias fueron no significativas ($H=6.00$; 0.1116) (Figura 55). Finalmente, la actividad de CAT en el E5 presentó una inhibición del 13% en el tratamiento AGd 50%, mientras que en los demás tratamientos fue estimulada (máxima estimulación del 29% en ARd 50%) (Figura 55).

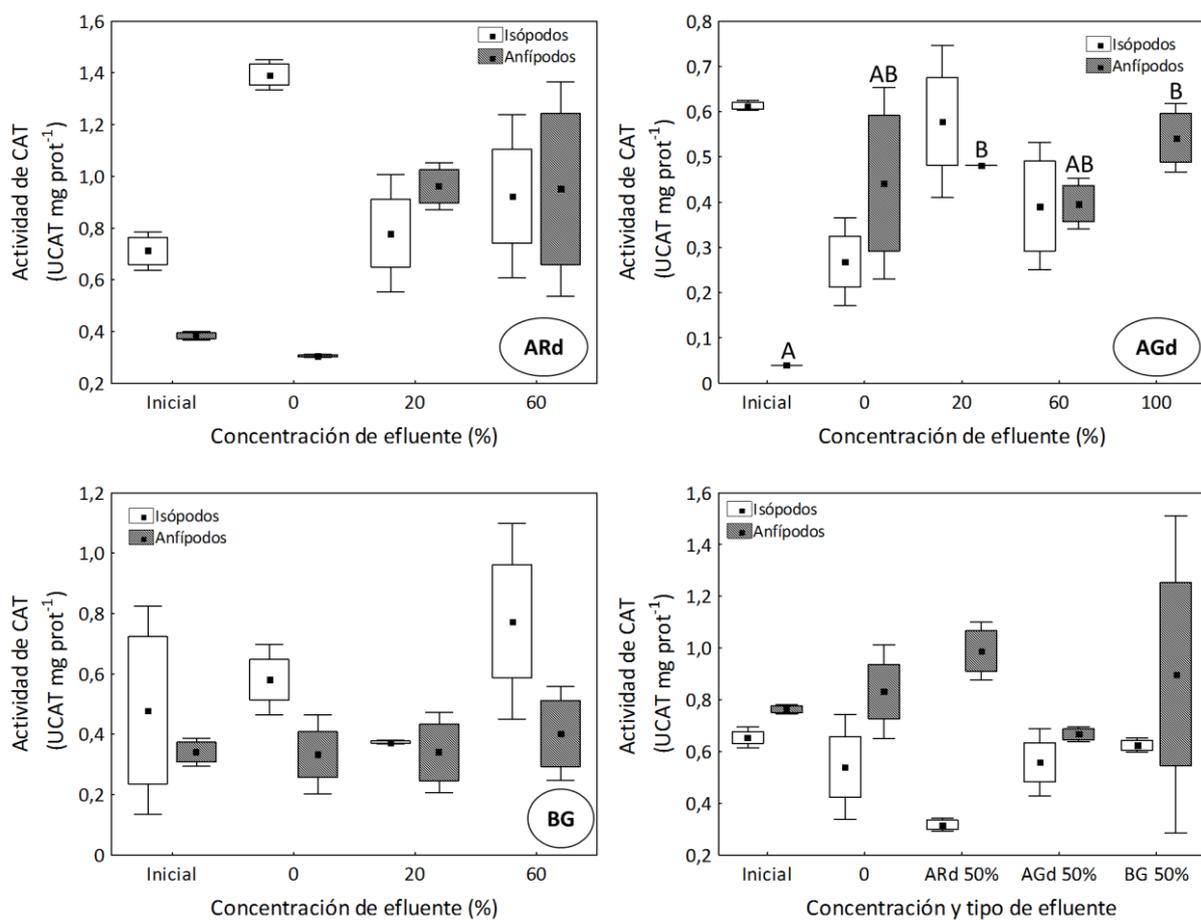


Figura 55. Actividad de CAT en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ **Glutación S-Transferasa**

Los valores iniciales de la actividad de GST registrados en los ensayos fueron significativamente diferentes tanto en isópodos como en anfípodos ($F=12.75$; $p=0.0052$ y $F=9.23$; $p=0.0286$, respectivamente).

La actividad de GST sólo fue significativamente diferente en isópodos expuestos al efluente ARd ($F=26.71$; $p=0.0042$), en el cual el valor inicial (0.005 ± 0.00 UGST mg prot⁻¹) fue menor que en los tratamientos 20 y 60% de efluente. En los bioensayos con los efluentes AGd y BG se observó una tendencia a la disminución de la actividad GST, siendo más pronunciada en BG (Figura 56).

Para los ensayos con anfípodos, la actividad de GST, si bien no fue significativamente diferente, presentó una tendencia a aumentar con el incremento en las concentraciones de los efluentes ARd y BG (máximos aumentos del 49% y 16%, respectivamente), y a disminuir hacia el tratamiento 100% AGd (disminución del 23%) (Figura 56).

Al comparar los 3 efluentes diluidos al 50% (E5), se observó en ambas especies un leve aumento de la actividad de GST en los distintos tratamientos respecto del valor inicial, a pesar de que las diferencias no fueron significativas ($F=1.16$; $p=0.3838$ en isópodos; $F=1.02$; $p=0.4519$ en anfípodos) (Figura 56).

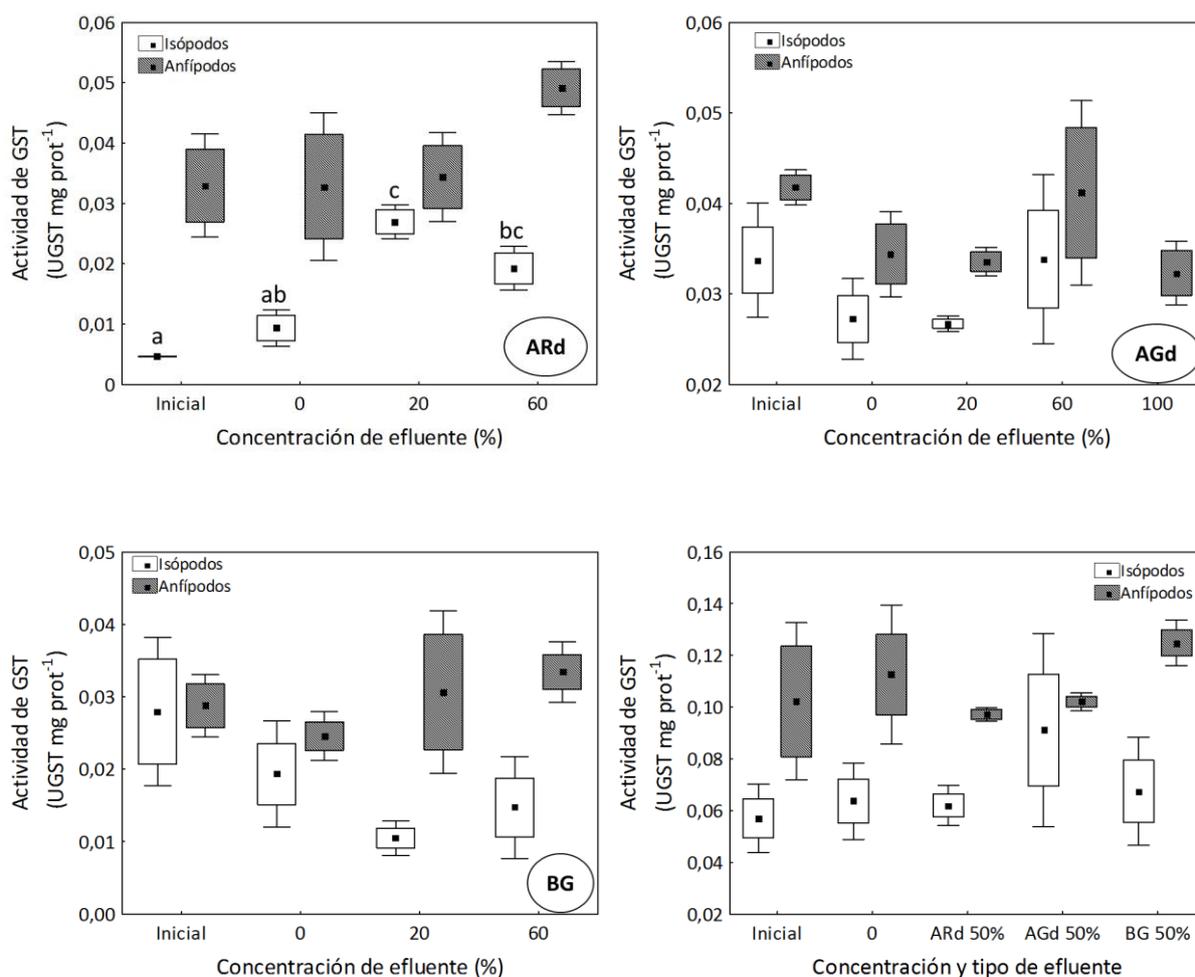


Figura 56. Actividad de GST en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ **Lipoperoxidación**

En isópodos no se registraron diferencias significativas entre los valores iniciales de LPO ($F=0.78$; $p=0.5182$; valor medio de 1.86 ± 0.13 nmol MDA mg prot⁻¹); mientras que sí se detectaron entre los valores iniciales para los ensayos con anfípodos ($F=32.10$; $p=0.0011$).

Los niveles de LPO en isópodos disminuyeron respecto del valor inicial en los ensayos con los efluentes ARd y BG (máximas disminuciones en 20% ARd y 0% BG); mientras que fueron homogéneos en el ensayo con el efluente AGd ($H=0.70$; $p=0.8741$; valor medio de 1.77 ± 0.06 nmol MDA mg prot⁻¹). Asimismo, los niveles de LPO en los tres efluentes al 50% fueron significativamente menores que el valor inicial ($F=20.75$; $p=0.0003$) (Figura 57).

De manera contraria a lo registrado en isópodos, los niveles de LPO detectados en anfípodos aumentaron conforme se incrementó la concentración de los efluentes ARd, AGd y BG. Las máximas diferencias respecto del valor inicial se registraron en 60% de ARd, 100% de AGd y 60% de BG (aumentos del 6%, 24% y 17%, respectivamente). Sin embargo al comparar la concentración de los 3 efluentes al 50%, la LPO sólo aumentó levemente en AGd (6%); mientras que en el resto de los tratamientos disminuyó (Figura 57).

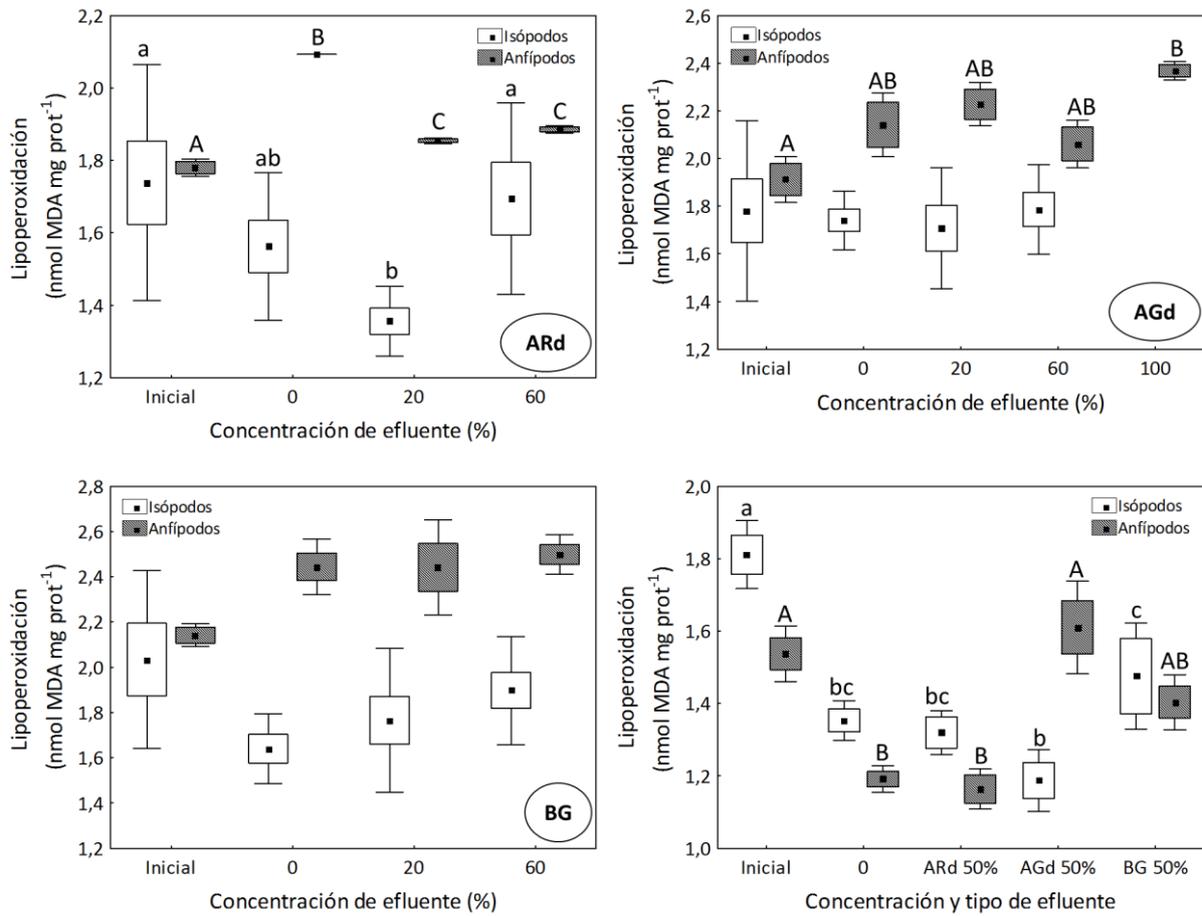


Figura 57. LPO en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

4. Biomarcadores fisiológicos

❖ Consumo de oxígeno

Los valores control de las tasas de consumo de oxígeno de isópodos fueron significativamente diferentes en los ensayos realizados ($H=8.73$; $p=0.0331$) siendo más alta en el ensayo con el efluente ARd ($0.86 \pm 0.08 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) que en el resto de los ensayos (valor promedio de $0.20 \pm 0.04 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). La tendencia del consumo de oxígeno en relación a la concentración del efluente fue variable entre los bioensayos realizados con esta especie. Más precisamente, se registró una disminución significativa promedio del 27% ($F=12.72$; $p=0.0070$) entre el control y los tratamientos 20 y 60% ARd, mientras que hubo un aumento no significativo de esta tasa en los organismos expuestos al efluente AGd ($F=3.56$; $p=0.1613$). Sin embargo, en aquellos expuestos a BG el consumo de oxígeno no registró variaciones significativas ($H=5.73$; $p=0.0572$). Comparando los valores de consumo de oxígeno entre las concentraciones al 50% de efluente, la tasa registrada en los organismos expuestos a AGd fue significativamente menor ($0.17 \pm 0.01 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$; $F=8.07$; $p=0.0064$) que las restantes (Figura 58).

Para los ensayos con anfípodos, los valores control del consumo de oxígeno fueron significativamente distintos ($F=44.59$; $p=0.0000$), registrándose el menor valor en la exposición a AGd ($0.16 \pm 0.05 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). En estos ensayos la tasa de consumo de oxígeno presentó un aumento significativo en las mayores concentraciones de los efluentes ARd ($F=27.03$; $p=0.0021$), AGd ($F=27.08$; $p=0.0016$) y BG ($F=13.95$; $p=0.0013$). Es por ello que los máximos incrementos se registraron en 20% y 60% ARd (aumento promedio del 96%), 100% AGd (aumento del 200%) y en 60% BG (aumento del 47%). Sin embargo, en el bioensayo con los tres efluentes al 50% no se registró una variación significativa en la tasa de consumo de oxígeno en estos organismos siendo los valores similares entre los tratamientos ensayados (media de $0.53 \pm 0.02 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Figura 58).

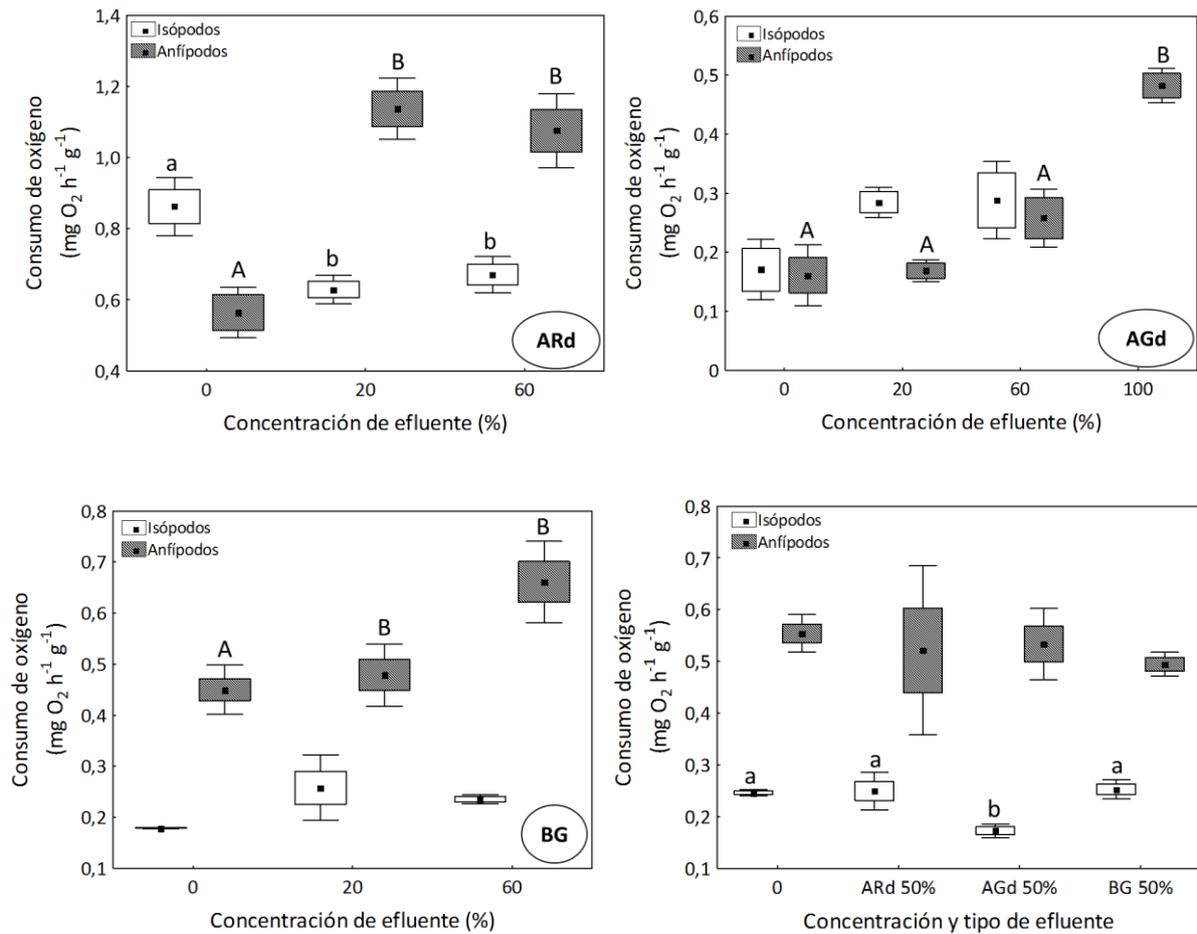


Figura 58. Consumo de oxígeno en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Excreción de amonio

La excreción nitrogenada en los controles de los ensayos realizados con isópodos presentaron diferencias significativas ($H=9.00$; $p=0.0293$) siendo el menor valor registrado en el ensayo con BG ($5.82 \pm 0.15 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Además, en los bioensayos con los efluentes ARd y BG la excreción en isópodos aumentó significativamente con la concentración del efluente ensayado (aumentos máximos del 100% en 60% ARd y del 500% en 60% BG), mientras que con el efluente AGd disminuyó de manera significativa a la mitad del valor del control ($F=35.56$; $p=0.0081$). Al comparar simultáneamente los 3 efluentes al 50%, se observó que la excreción nitrogenada de isópodos del control ($15.49 \pm 0.39 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$)

fue similar a aquella registrada en organismos expuestos a AGd, pero distinta al valor obtenido en ARd y BG ($H=10.50$; $p=0.0067$) (Figura 59).

Al igual que en isópodos, los valores control de excreción en anfípodos fueron estadísticamente distintos ($H=8.18$; $p=0.0424$), registrándose el menor valor en el E5 ($0.14 \mu\text{g N-NH}_3 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Por otra parte, la excreción varió de acuerdo al efluente ensayado. Mientras que aumentó significativamente en ARd ($F=98.67$; $p=0.0018$) y AGd ($F=154.14$; $p=0.0000$) con incrementos máximos del 875% en 20% ARd y del 166% en 100% AGd; disminuyó un 46% promedio en BG ($H=2.93$; 0.2315) (Figura 59). Respecto del inicial, se registró un aumento significativo de la excreción para los organismos expuestos al 50% de los efluentes ARd y BG.

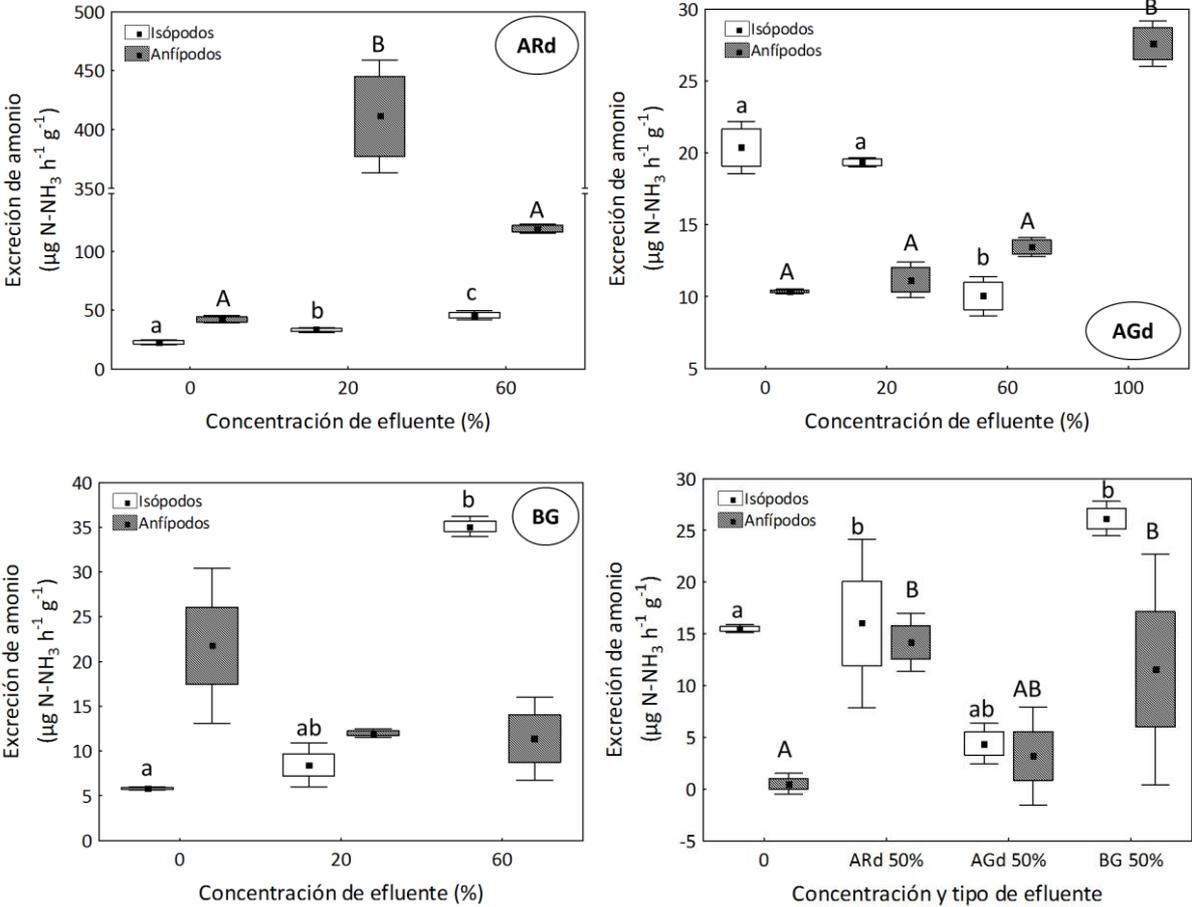


Figura 59. Excreción de amonio en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG. Letras diferentes para cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayos sin indicación representan grupos homogéneos. Media \pm desvío estándar.

❖ Relación O:N

La relación O:N registrada en isópodos disminuyó significativamente en aquellos organismos expuestos a la mayor concentración ensayada de ARd (disminución de 60%; $H=7.20$; $p=0.0274$) y de BG (disminución de 82%, $F=34.96$; $p=0.0000$), mientras que aumentó 300% en el tratamiento 60% AGd ($F=58.29$; $p=0.0011$). Teniendo en cuenta los valores obtenidos en el E5, la relación O:N aumentó significativamente sólo en el 50% AGd ($F=7.01$; $p=0.0067$) (Figura 60).

Para los ensayos con anfípodos los valores de O:N determinados mostraron una disminución significativa en los organismos expuestos a ARd con respecto al control ($F=88.63$; 0.0021), mientras que la relación fue similar en los tratamientos de AGd (valor promedio de 12.6 ± 1.5) y aumentó en 20% BG (duplicando aunque no significativamente el valor correspondiente al control; $F=3.21$; $p=0.0948$). Sin embargo, en el ensayo con tres efluentes al 50% no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($H=4.25$; $p=0.2357$) (Figura 60).

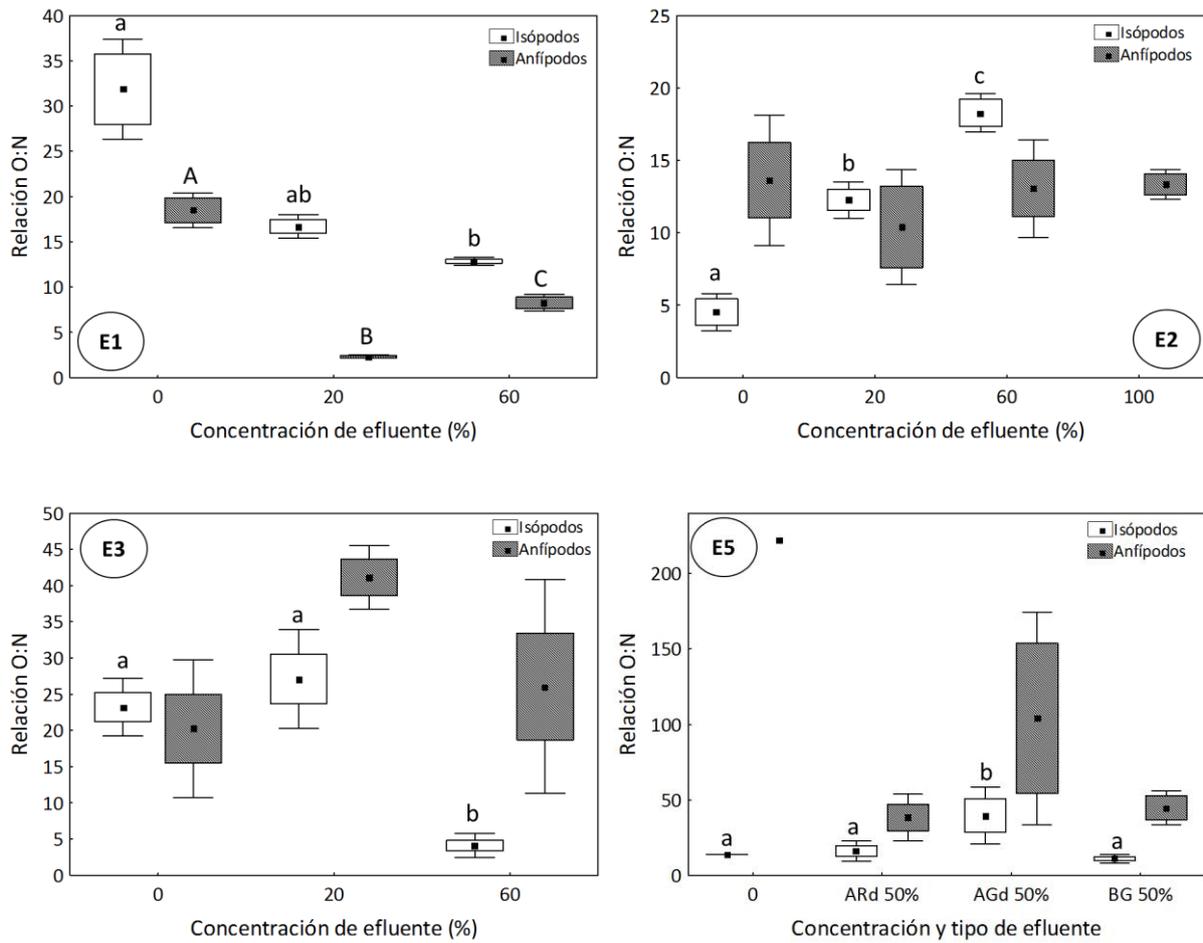


Figura 60. Relación O:N en isópodos y anfípodos expuestos a diferentes concentraciones de los efluentes ARd (E1), AGd (E2) y BG (E3). Letras distintas dentro de cada ensayo y especie indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Ensayo sin indicación representa diferencias no significativas (media \pm desvío estándar).

5. Índice de Respuesta Integrada de Biomarcadores

A continuación se presentan los valores del RIB/n en isópodos y anfípodos obtenidos a partir de la combinación de los 6 biomarcadores determinados en las distintas concentraciones de los efluentes ARd, AGd y BG (Figura 61).

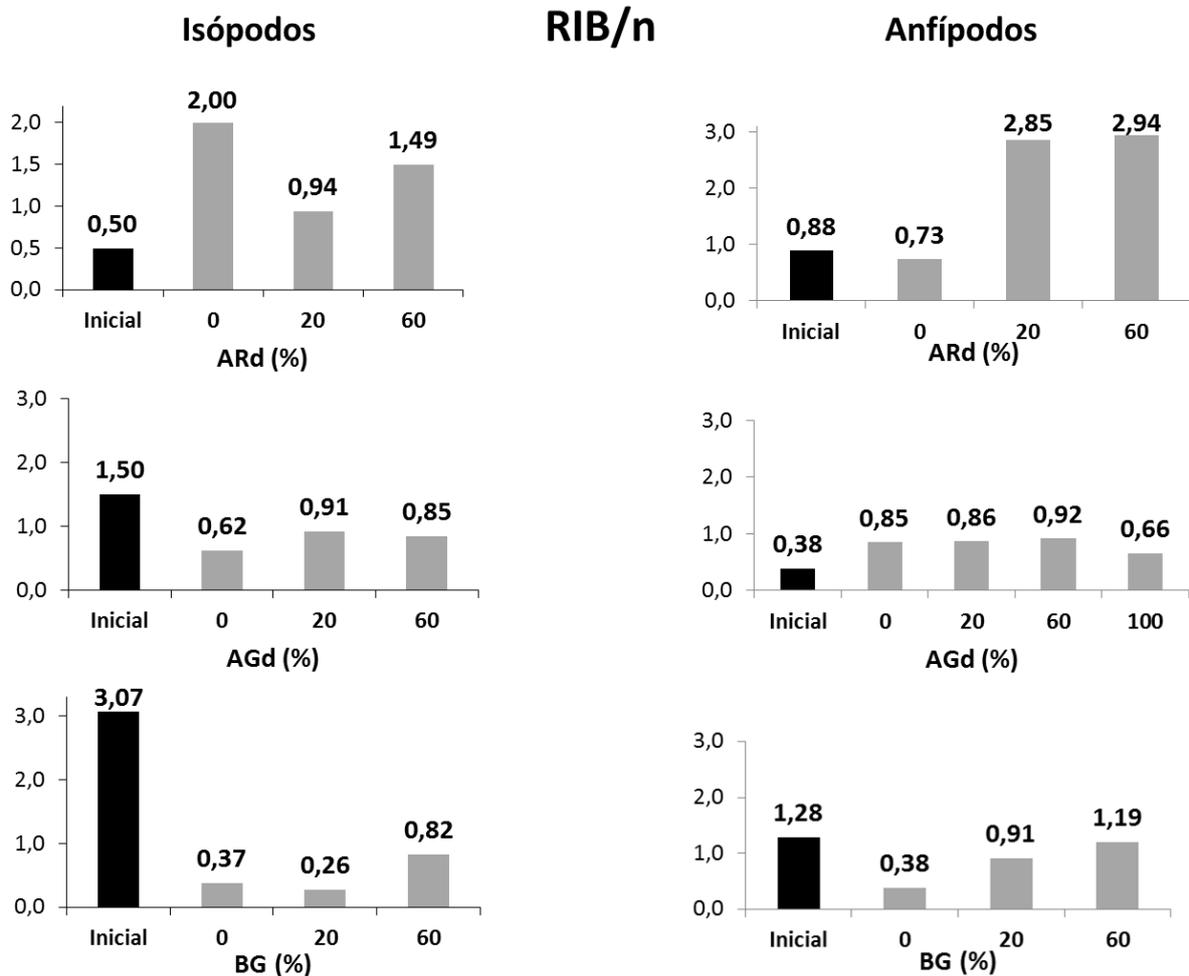


Figura 61. Valores del RIB/n para los ensayos con efluentes puros ARd, AGd y BG en isópodos y anfípodos.

Al graficar los RIB/n en un gráfico radial, se pueden ver más claramente las diferencias entre los tratamientos ensayados de 0, 20 y 60% de efluente (Figura 62).

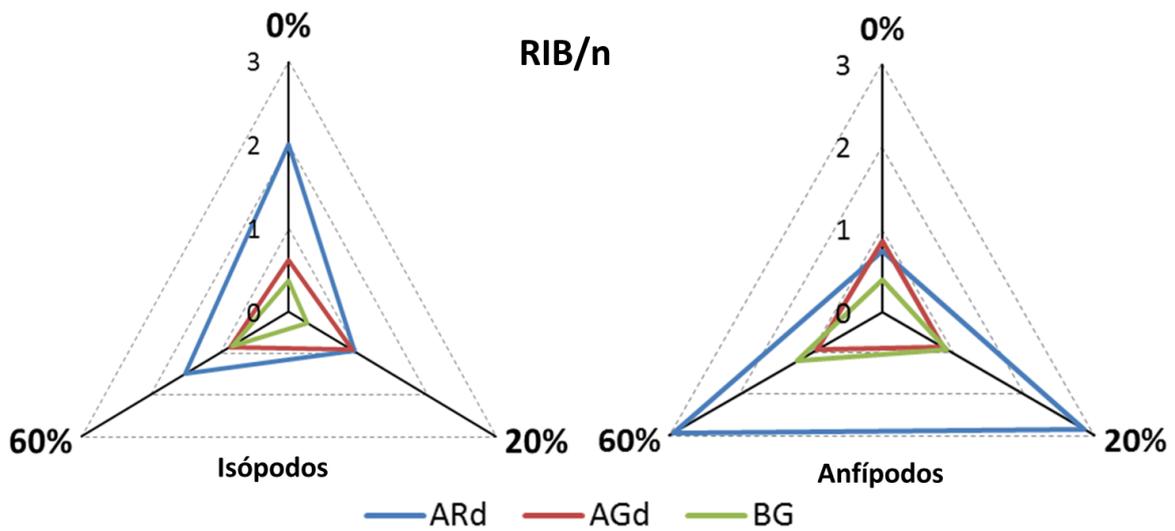


Figura 62. Gráficos radiales que representan los valores del RIB/n para los ensayos con efluentes puros ARd, AGd y BG en isópodos y anfípodos.

A través de ambos tipos de representación (Figuras 61 y 62), se puede observar que los valores iniciales del RIB/n obtenidos a partir de las diferentes concentraciones de los efluentes puros ensayados presentan una variación significativa en ambas especies.

Tanto en isópodos como en anfípodos, los valores del RIB/n permanecieron aproximadamente constantes en las distintas concentraciones ensayadas del efluente AGd, mientras que se presentaron mayores valores de RIB/n en las mayores concentraciones de efluentes ARd y BG. Por otro lado, los máximos valores obtenidos fueron frente al efluente ARd, seguidos de aquellos del efluente BG y por último los de ARd.

DISCUSIÓN

Los efluentes municipales tienen el potencial de afectar tanto la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos como los recursos naturales que emplea el ser humano cotidianamente. Es por ello que los impactos de la descarga de efluentes urbanos al ambiente costero incluyen: eutrofización; degradación de las poblaciones acuáticas residentes y de su hábitat (agua y sedimentos); restricción en el consumo de mariscos y pescados; mayor incidencia de enfermedades transmitidas por el agua y causadas por contaminación del agua potable; clausuras de balnearios y playas por contaminación microbiológica; degradación de la estética del ambiente; entre otros (Scanes & Philip, 1995; Chambers et al., 1997).

Como ha sido descrito en la introducción general de esta tesis doctoral, la ciudad de Ushuaia presenta un sistema de tratamiento de efluentes municipales insuficiente para la demanda actual de la población, que sólo recolecta una fracción de los efluentes domésticos generados. La mayoría de los efluentes no tratados son descargados en las áreas costeras y en los cursos de agua que atraviesan la ciudad y sus alrededores. A pesar de que la importancia de esta problemática se ha incrementado en los últimos años, poca es la información disponible acerca de la toxicidad de los efluentes urbanos sobre los organismos acuáticos de la zona costera de la ciudad de Ushuaia.

El presente estudio es el primero que se lleva a cabo utilizando anfípodos *Paramoera* sp. para evaluar la toxicidad de efluentes urbanos. Sin embargo, trabajos de carácter preliminar fueron realizados previamente por Goldsmit (2008) con el isópodo *E. gigas*. Particularmente, Goldsmit (2008) realizó bioensayos en laboratorio e *in situ* exponiendo isópodos adultos al agua de dos sitios impactados de la zona costera del Canal Beagle. Como resultado registró muy baja mortalidad (3%) a 96 h aunque observó cambios bioquímicos como el aumento en la actividad CAT hacia las 48 h de exposición a un efluente de Bahía Encerrada, localizado cerca del sitio ARd incluido en el presente estudio, lo cual reflejó la activación del mecanismo de defensa por estrés oxidativo. Por otro lado, también se llevaron a cabo estudios sobre la toxicidad aguda frente a la exposición de metales pesados en *E. gigas*, siendo éstos más afectados por cadmio y cobre (Giarratano et al., 2007). El trabajo más reciente realizado en el área de estudio sobre efluentes urbanos es el de Diodato et al.

(2012), en el cual se realizaron bioensayos *in situ* con el decápodo *Halicarcinus planatus*, exponiéndolo 96 h a la descarga de tres sitios costeros, dos de los cuales han sido objeto de estudio en la presente tesis (ARd y ZI). Del mismo modo que lo observado por Goldsmit (2008), no se registró mortalidad de los organismos expuestos a los distintos efluentes, pero sí se detectaron cambios a nivel fisiológico y bioquímico.

En el presente estudio, se determinó una alta supervivencia de los crustáceos residentes frente a la exposición a las diferentes concentraciones de los efluentes ensayados, excepto en las correspondientes al efluente puro (100% de efluente) de los sitios ARd y BG. Sin embargo, los anfípodos expuestos al efluente AGd sobrevivieron a la máxima concentración, lo cual demuestra que el grado de calidad ambiental que presenta este sitio se encuentra aún dentro de rangos tolerables para la biota residente. Las diferencias en la toxicidad de los tres efluentes estudiados pueden ser parcialmente explicadas mediante los valores de los parámetros fisicoquímicos hallados *in situ*, tanto los registrados en los bioensayos realizados como aquellos provenientes de la caracterización ambiental (ver Parte B) y de trabajos anteriores (Amin et al., 1996a; Amin et al., 2011b). Es poco probable que la mortalidad se deba a la baja salinidad de los efluentes puros, debido a la amplia tolerancia de ambas especies a los valores extremos de este parámetro (ver Parte C). Por otro lado, cuando se evalúa la toxicidad de efluentes urbanos es necesario tener en cuenta que la calidad de los mismos varía de forma constante y diaria. Este hecho fue evidente en el presente trabajo dado que se presentaron grandes diferencias en la mortalidad de los individuos al ser expuestos al 50% y 60% de concentración para cada uno de los tres efluentes estudiados.

El presente estudio demostró además, que a pesar del perfil que los caracteriza, los efluentes estudiados no presentan efectos letales sobre la supervivencia de organismos residentes del intermareal como son los isópodos y los anfípodos. De hecho, fueron observados en estos organismos cambios bioquímicos y fisiológicos en lugar de una respuesta aguda y letal. A partir de los valores de supervivencia registrados en los bioensayos, se puede inferir que los anfípodos serían más resistentes a la toxicidad que los isópodos. Por otro lado, la presencia de poblaciones naturales de estos crustáceos a lo largo de la costa de las Bahías Ushuaia, Encerrada y Golondrina podrían indicar un signo de adaptación de estos organismos a las distintas condiciones ambientales (Medina et al., 2007;

Comoglio et al., 2011). Esta respuesta de "no letalidad" frente a eventos de eutrofización y/o contaminación también fue observada por otros autores, incluyendo otras especies. Por ejemplo, Grapentine et al. (2004), registraron una disminución del crecimiento en anfípodos expuestos *in situ* a la descarga de efluentes mixtos en diferentes puntos del lago Ontario, sin observar toxicidad alguna asociada. Gust et al. (2010) registraron baja mortalidad en gasterópodos expuestos a efluentes de distintas plantas de tratamientos en Francia, mientras que Vallarino et al. (2002) observaron cambios en la composición de las comunidades intermareales en la zona bajo influencia del vertido de efluentes cloacales de la ciudad de Mar del Plata, con respecto a las áreas control.

En incidentes de contaminación aguda, las perturbaciones bioquímicas y fisiológicas son evidentes y a menudo letales. La letalidad es una respuesta extrema e inefectiva para determinar los efectos de la toxicidad de efluentes ya que presenta poco valor como biomarcador desde la perspectiva del ecosistema. En cambio, la utilización de biomarcadores bioquímicos y fisiológicos se convierte en una herramienta útil, debido a que permite conocer los posibles efectos crónicos sobre el ecosistema bajo estudio.

En el presente trabajo, la actividad de AChE fue inhibida sólo en algunos casos frente a la exposición a los efluentes; por ejemplo en isópodos expuestos a BG y en anfípodos a AGd. Sin embargo, fue estimulada tanto en los ensayos preliminares como en los definitivos, en el tratamiento control consistente en agua de mar filtrada. Esto podría indicar que las condiciones control son más favorables para el funcionamiento del individuo que las del efluente; e incluso mejores que las que ofrece el ambiente natural (tratamiento inicial). En este sentido, es posible que los organismos en su lugar de origen (Reserva Playa Larga) estén expuestos a alguna condición de estrés, a pesar de ser considerado desde el punto de vista ambiental y de impacto antrópico, un lugar prístino.

El aumento de la actividad CAT encontrada en individuos de ambas especies expuestos a las mayores concentraciones de efluente podría ser el resultado del comienzo de un proceso de estrés oxidativo motivado por la exposición a las sustancias presentes en los efluentes. Este hecho concuerda con lo hallado por Douhri & Sayah (2010) para el anfípodo *Orchestia gammarellus*, el cual presentó una máxima actividad de CAT en los sitios contaminados con efluentes urbanos, industriales y con gran actividad portuaria de la Bahía de Tangier (Marruecos), respecto de un sitio localizado lejos de las fuentes de

contaminación. Dellali et al. (2001b) también detectaron una estimulación de la CAT cuando se empobrecía la calidad del agua a la cual estaban expuestas dos especies de bivalvos (*Ruditapes decussatus* y *Mytilus galloprovincialis*). Sin embargo, en el presente trabajo, esta enzima mantuvo constante su actividad frente a la exposición a BG, lo cual indicaría que otro mecanismo de detoxificación podría haberse activado, por ejemplo, el proceso de LPO (Schvezov & Amin, 2011).

Son escasos los trabajos realizados sobre la respuesta de la actividad de GST frente a la exposición de efluentes urbanos, ya que los estudios disponibles están principalmente referidos a la evaluación de los efectos de pesticidas y otros compuestos químicos sobre diversas especies de crustáceos, como ser el isópodo terrestre *Porcellio scaber* (Drobne et al., 2008; Jemec et al., 2008; Kolar et al., 2010). En los animales estresados por el contacto con sustancias químicas, es posible tanto el aumento como la disminución de la actividad de GST, porque la misma depende del tipo de químico, del tiempo y de la dosis de exposición (Sheehan & Power, 1999; Drobne et al., 2008). Teniendo en cuenta que en el presente estudio la actividad de GST fue variable y que se registraron ambas tendencias según la especie y efluente ensayado, la misma podría potencialmente deberse a la presencia en los efluentes de alguna sustancia específica (como metales pesados o compuestos orgánicos). Por ello sería necesario contar con la información detallada de la composición de los mismos para poder ajustar la respuesta a los compuestos presentes en los efluentes.

Finalmente, los niveles iniciales de LPO registrados para ambas especies, aumentaron a medida que disminuyó la temperatura del ambiente (ya que las exposiciones a ARd, AGd y BG fueron realizadas en los meses de abril, mayo y junio, respectivamente), lo cual puede indicar que los organismos estén más expuestos al daño oxidativo con las bajas temperaturas. Estos resultados también fueron observados por otros autores (Power & Sheehan, 1996; Company et al., 2006) los cuales reportan aumentos de LPO en invierno como resultado de la reducción de las enzimas antioxidantes, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el cual los niveles de CAT y GST disminuyen con las bajas temperaturas. Por otro lado, el hecho de que durante la época invernal la población natural de estos organismos se observe diezmada (Diodato S., observación personal) sería también una explicación a este fenómeno natural del ciclo de vida de ambas especies.

El daño oxidativo de los tejidos puede ocurrir cuando los sistemas antioxidantes y desintoxicantes son deficientes e incapaces de neutralizar los intermediarios activos producidos por los tóxicos y sus metabolitos (Frenzilli et al., 2001). La alta inducción de CAT registrada en isópodos y anfípodos expuestos a las altas concentraciones de los efluentes ARd y BG puede haber prevenido la reacción de las ERO con las membranas y otros lípidos, reduciendo así al mínimo la LPO. Sin embargo, esta relación no fue tan clara entre la LPO y la actividad de GST debido al comportamiento variable de esta última, hecho que coincide con resultados previos obtenidos por Schvezov & Amin (2011).

Los ensayos fisiológicos intentan medir respuestas dentro del funcionamiento fisiológico normal del organismo y poder correlacionar éstas con la exposición o el efecto contaminante (Handy & Depledge, 1999). En este sentido, el consumo de oxígeno y la excreción de amonio han sido herramientas útiles en este estudio debido a las respuestas inmediatas de los organismos para modificar sus procesos metabólicos según las condiciones del ambiente.

Es comúnmente aceptado que la variación en el consumo de oxígeno es un buen indicador del estado metabólico del organismo (Vosloo et al., 2002), aunque esta respuesta puede ser completamente heterogénea de acuerdo a la especie estudiada y al estresor ensayado (Spicer & Weber, 1991; Giarratano et al., 2007; Montagna & Collins, 2008; Amin & Comoglio, 2010). En el presente trabajo, tanto los organismos de *E. gigas* como los de *Paramoera* sp. expuestos a los efluentes presentaron tasas de consumo de oxígeno más altas que aquellos no expuestos (tratamiento control). Solo para el caso de la exposición de isópodos a ARd el consumo siguió una tendencia inversa. Este hecho podría deberse a diversos motivos, entre los cuales se puede mencionar en primer lugar que los organismos ensayados se encontraban probablemente en una situación metabólica diferencial previa al inicio del ensayo, lo cual está sustentado también por el hecho de que algunos de los biomarcadores determinados en los mismos individuos registraron valores altamente disimiles para el tratamiento control. En segundo lugar, la posible ocurrencia de un efecto de hormesis, mencionado previamente, en el cual frente a la exposición a determinados efluentes (AGd y BG) los organismos mostraron un aumento metabólico en el consumo de oxígeno pero que en el caso particular de ARd mostraron una inhibición. De corresponderse lo ocurrido en el presente estudio con un efecto de hormesis, entonces esto indicaría que las

condiciones del efluente ARd son más tóxicas que las del resto y que los organismos no podrían hacer frente a la misma mediante un gasto energético extra aumentando el consumo de oxígeno, sino que lo resolverían mediante una inhibición del mismo.

Aumentos en este parámetro también fueron registrados en individuos de *Halilcarinus planatus* expuestos a efluentes descargados en la costa de Bahía Ushuaia con características similares a los utilizados en estos bioensayos (Diodato et al., 2012). Como se mencionó en la introducción, el incremento de esta tasa metabólica podría estar relacionado a una respuesta de escape del organismo frente a las condiciones adversas relacionadas a la baja disponibilidad de oxígeno en el medio y a las altas concentraciones de nutrientes (principalmente amonio) y materia orgánica.

Por su parte, la excreción de amonio en ambas especies también presentó valores más altos en las distintas concentraciones de efluentes respecto del control, siendo éstas mayores frente a la exposición a ARd y BG. En coincidencia con los bioensayos individuales con ARd, AGd y BG, el ensayo utilizando los mismos efluentes al 50% demostró que la excreción aumentó en los organismos expuestos a los efluentes que presentan mayor impacto (ARd y BG). Este hecho demuestra que los sitios impactados generan un aumento en la excreción de amonio, mientras que un sitio menos contaminado como es AGd provoca poca variación en este parámetro. En este sentido, el aumento en la excreción podría estar ligado a un incremento en el catabolismo de los aminoácidos involucrados en la regulación osmótica (Regnault, 1987) o a un aumento en el requerimiento total metabólico lo cual indicaría que los organismos se encuentran frente a una condición estresante (Tedengren et al., 1999); en concordancia con lo expuesto por Calow (1989), quien sostiene que el efecto de los tóxicos puede ser tolerado por los organismos de un gran número de formas y que una de ellas es la excreción.

Como ya fue mencionado en la introducción de la Parte B, la relación atómica O:N es el resultado de la combinación de dos parámetros, el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada, los cuales varían independientemente frente a condiciones estresantes. Sin embargo, la relación O:N obtenida no solo depende de la magnitud de los cambios sino también de si ambos parámetros cambian en igual proporción, ya que en ese caso el valor O:N se mantendría sin variación (Mayzaud & Conover, 1988). Es por ello que por si sola la relación O:N no indica en forma completa lo que sucede a nivel fisiológico, por lo cual en

este tipo de análisis deben incluirse las tasas individuales para poder hacer una lectura adecuada de la relación O:N.

Teniendo en cuenta los valores de la relación atómica O:N sugeridos por Mayzaud & Conover (1988), este parámetro disminuyó en los isópodos expuestos a las mayores concentraciones de ARd y de BG, por lo cual, el metabolismo podría tender a cambiar desde una relación proporcional entre lipídico y proteico hacia un metabolismo exclusivamente proteico, lo cual es considerado un síntoma de estrés (Tedengren et al., 1999). Sin embargo, estas disminuciones en el valor O:N provienen de diferente tipo de respuesta de los organismos, ya que los expuestos a ARd presentaron una disminución significativa en la tasa de consumo de oxígeno y los expuestos a BG una tendencia de mantenimiento, mientras que en ambos casos la excreción nitrogenada aumentó con la concentración del efluente. Por otra parte, si bien los organismos expuestos a AGd presentaron valores bajos de la relación O:N, el mismo mostró un incremento conforme aumentó la concentración de efluente, hecho que se corresponde con la disminución de la excreción nitrogenada.

En los anfípodos, las tendencias variaron de acuerdo al efluente ensayado, representando el valor O:N un metabolismo proteico solamente frente a la exposición a ARd, lo cual estaría indicando que los organismos se encontraban estresados. Por otro lado, esta relación no varió significativamente en los anfípodos expuestos a AGd y BG, lo cual no significa que los organismos respondan de la misma manera a ambos efluentes. Si bien en ambos casos el consumo de oxígeno aumentó, solo se registró un aumento en la excreción a la máxima concentración de efluente en los anfípodos expuestos a AGd, sugiriendo que en este parámetro se hicieron los ajustes metabólicos necesarios para la supervivencia.

Al analizar los resultados del RIB/n, el cual integra biomarcadores bioquímicos y fisiológicos, se registraron importantes variaciones en los valores iniciales de este índice. Estas diferencias podrían deberse a que los organismos utilizados en los tres ensayos fueron recolectados en distinta época del año por lo cual podrían presentar distintos niveles base en los biomarcadores determinados. Además de la posible variación estacional, otro factor que podría incorporar variabilidad inicial (pero que luego se logra equilibrar con el período de aclimatación) es el estrés provocado en los organismos por el traslado desde el ambiente natural al ambiente controlado de laboratorio. Es por ello que ha sido previamente

mencionada la importancia de conocer cuáles son los niveles base de los biomarcadores utilizados en el estudio.

El hecho de que la concentración de 60% de los efluentes ARd y BG provoque mayor estrés que la de 20% en los organismos ensayados refleja y concuerda con los valores de los parámetros fisicoquímicos obtenidos mediante el monitoreo ambiental (Parte B), es decir, dichos efluentes presentan aportes típicamente urbanos, mientras que AGd mantiene una mejor calidad de agua debido al gran caudal que posee este arroyo a lo largo su trayecto.

En el presente trabajo se realizaron en primera instancia, bioensayos con agua de línea de costa (denominados preliminares), los cuales resultaron ventajosos para el diseño final de los bioensayos definitivos. En aquellos bioensayos preliminares se observó que la dilución de los efluentes tomados de línea de costa era muy alta (por el importante grado de mezcla con el agua de mar). A partir de los valores de los parámetros fisicoquímicos (los cuales resultaron similares a los correspondientes al agua de mar), de la escasa mortalidad observada en los isópodos expuestos y de la escasa variación de los biomarcadores determinados, se puede deducir que el efecto tóxico de los efluentes puede verse "diluido" en gran medida por la mezcla con el agua de mar. Por otro lado, los organismos residentes utilizados en este estudio presentaron pocas variaciones en relación a los biomarcadores determinados, lo cual podría deberse a que estos organismos se encuentran bien adaptados a las condiciones ambientales presentes o que los biomarcadores bioquímicos estudiados no fueron los más adecuados para detectar respuestas a las condiciones ambientales específicas. Sin embargo, sí fueron observadas respuestas más precisas en los parámetros fisiológicos determinados, lo cual demuestra que la variación en el consumo de oxígeno y la excreción de amonio son la primera herramienta con la que cuentan para responder el estrés ambiental.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a la mortalidad a 96 horas y a los valores del RIB de isópodos y anfípodos, se corresponden con el nivel de impacto de los sitios estudiados, siendo ambos parámetros mayores en los sitios de mayor compromiso ambiental (ARd y BG). Además, fue demostrado que, a pesar del alto impacto que pueden causar los efluentes urbanos sin tratamiento en la zona costera de la ciudad, no lograron generar letalidad sobre los organismos evaluados ya que las supervivencias registradas fueron altas, incluso frente a la exposición a efluentes poco diluidos. Sin embargo, sí fueron observados ciertos cambios bioquímicos y fisiológicos en los organismos. Más aún, la determinación de parámetros fisiológicos ha demostrado ser una herramienta útil en este estudio debido a las respuestas inmediatas de los organismos para ajustar su metabolismo según las condiciones del ambiente.

Tanto la alta supervivencia como las respuestas precisas frente a la exposición a efluentes diluidos indican que estas especies se encuentran adaptadas a las fluctuaciones en la calidad ambiental, siendo estas respuestas más contundentes particularmente en los anfípodos. De hecho, en algunos casos se observaron respuestas de recuperación en los organismos al ser expuestos a condiciones controladas de agua de mar filtrada, lo cual sugiere que posiblemente en su ambiente natural estarían sujetos a algún grado de estrés.

Finalmente, es importante remarcar que la dilución que presentan los efluentes urbanos con el agua de mar al ser volcados en la línea de costa, atenúa de alguna manera el efecto tóxico de las sustancias que aportan los mismos, teniendo en cuenta que para dos de los sitios estudiados el efluente puro provocó un 100% de mortalidad de los organismos. Sin embargo, será necesario evaluar la toxicidad a largo plazo debido a la acumulación de dichas sustancias en el ambiente natural.

PARTE E
Consideraciones Finales

CONSIDERACIONES FINALES

El presente estudio reviste gran importancia tanto desde el punto de vista científico como desde la óptica social.

Los resultados obtenidos sobre el nivel de calidad de las aguas de los principales cursos que atraviesan la ciudad de Ushuaia demuestran que la zona costera del sistema Bahía Ushuaia- Encerrada- Golondrina es el receptor final de las sustancias causantes de eutrofización. El aporte al sistema de la descarga de los efluentes domésticos sin tratamiento resulta ser perjudicial tanto para la calidad del ambiente y la salud de la población, como para las actividades económicas de la ciudad ya que la mayor atracción que presenta Ushuaia para los turistas es el paisaje saludable y prístino que posee.

Por otro lado, la generación y la disponibilidad de nueva información sobre la calidad del ecosistema acuático son esenciales para que las autoridades competentes puedan utilizarla como insumo al momento de reparar y ampliar el sistema cloacal de la ciudad, incluyendo la construcción de plantas de tratamiento de efluentes cloacales e industriales. En este sentido, parte de estos resultados fueron comunicados a la sociedad a través de Informes al Concejo Deliberante y a la Intendencia de la ciudad, obteniendo resultados positivos como la formación de una Comisión para la realización del Plan de Manejo Integrado Costero de la ciudad de Ushuaia, de la cual se formó parte.

Frente a la continua problemática ambiental que padece la ciudad, es importante planificar la continuidad del programa de monitoreo, incluyendo otros puntos dentro de las cuencas ya estudiadas (para poder situar más precisamente los focos de mayor aporte urbano), además de incorporar otras cuencas importantes, como por ejemplo el Río Pipo, sobre cuyo margen se están desarrollando nuevas urbanizaciones, y sobre el cual a corto plazo se instalará una nueva planta potabilizadora de agua para la ciudad. En este sentido, el presente estudio también aporta datos sobre la calidad del agua que ingresa a las actuales plantas potabilizadoras. Este hecho debe ser tenido en cuenta debido a que el cuidado y preservación de las fuentes naturales de agua dulce de la ciudad de Ushuaia revisten gran importancia, más aún con el continuo avance de asentamientos irregulares en las zonas boscosas más altas de la ciudad. También debe considerarse profundizar el análisis sobre la

dinámica de los contaminantes en los turbales urbanos, los cuales actuarían como depuradores naturales, hecho que aquí se evidencia al registrarse niveles más altos en los indicadores de aportes urbanos dentro del turbal respecto del punto de salida del mismo.

A través de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, queda confirmado que para lograr una buena caracterización del ambiente estudiado, resulta favorable integrar los análisis de parámetros ambientales con la respuesta de organismos expuestos a diferentes xenobióticos mediante bioensayos de toxicidad. La utilización de crustáceos residentes del intermareal como organismos bioindicadores de la calidad del ambiente ha sido exitosa en cuanto a las respuestas bioquímicas y fisiológicas generadas por estos individuos frente a los cambios de condiciones ambientales. Los resultados obtenidos en el presente estudio a partir de bioensayos de tolerancia a estresores ambientales y a efluentes urbanos indican que las especies estudiadas son tolerantes a las variadas condiciones que puede ofrecer el ambiente, demostrando su gran versatilidad para desenvolverse en el ambiente natural, pero a la vez manifiestan ciertos ajustes metabólicos que sirven como señales de alerta temprana frente a episodios de eutrofización del ambiente. Dada la forma de respuesta de las especies residentes del intermareal, los anfípodos serían organismos potencialmente más adecuados que los isópodos para la evaluación de la calidad de las aguas de la zona costera.

Además, la utilización de herramientas de integración como los índices de calidad de agua, el análisis multivariado y los índices de respuesta de biomarcadores ha reflejado adecuadamente el estado general ambiental del área de estudio.

La inclusión en el presente trabajo de bioensayos con un crustáceo de alto valor comercial como es la centolla, ha permitido evidenciar que los cambios en la calidad de las aguas costeras, como es el incremento de compuestos nitrogenados de origen antrópico, podrían impactar negativamente sobre las poblaciones naturales de dicho crustáceo. En particular, podrían verse seriamente afectados los estadios tempranos de desarrollo, lo cual impactaría en el reclutamiento de la especie.

Finalmente, se desprende la necesidad de continuar con la realización de bioensayos de toxicidad para evaluar cuáles son las sustancias presentes en los efluentes urbanos que ejercen mayor efecto perjudicial sobre la biota residente y en última instancia, sobre el ecosistema.

PARTE F
Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aarset Q. & Aunaas T. 1990. Influence of environmental salinity on oxygen consumption and excretion of the arctic under-ice amphipod *Onisimus glacialis*. *Marine Biology* 107: 9-15.
- Adami M. & Gordillo S. 1999. Structure and dynamics of the biota associated with *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) from the Beagle Channel, Tierra del Fuego. *Scientia Marina* 63 (1): 183-191.
- Albert L. 1997. Capítulo 17: Nitratos y nitritos. Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental, Organización Panamericana de la Salud. 279- 296.
- Aldridge D., Payne B. & Miller A. 1995. Oxygen consumption, nitrogenous excretion, and filtration rates of *Dreissena polymorpha* at acclimation temperatures between 20 and 32°C. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1761-1767.
- Alenius B, & Munguia P. 2012. Effects of pH variability on the intertidal isopod, *Paradella diana*, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 45 (4): 245-259.
- Alves de Almeida E., Dias Bainy A., de Melo Loureiro A., Martinez G., Miyamoto S., Onuki J., Barbosa L., Carrião Machado Garcia C., Manso Prado F., Ronsein G., Sigolo C., Barbosa Brochini C., Gracioso Martins A., Gennari de Medeiros M. & Di Mascio P. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146: 588-600.
- Amin O. 1995. Toxicidad para invertebrados marinos de algunos metales pesados detectados en la zona costera próxima a Ushuaia, Tierra del Fuego. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.
- Amin O., Ferrer L. & Marcovecchio J. 1996a. Heavy metal concentrations in littorals sediments from the Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Env. Monit. Assess* 41 (3): 219-231.
- Amin O., Andrade S., Marcovecchio J. & Comoglio L. 1996b. Heavy metal concentration in the mussels *Mytilus edulis chilensis* from the coast near Ushuaia city (Tierra del Fuego, Argentina). *Pollution Processes in Coastal Environments* 335-339.
- Amin O., Rodríguez E., Hernando M., Comoglio L., López L. & Medesani D. 1998. Effects of lead and cadmium on hatching of the southern king crab *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Invertebrate Reproduction and Development* 33 (1): 81-85.
- Amin O. & Comoglio L. 2002. Toxicidad del petróleo diesel en el primer estadio larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37: 139-144.

- Amin O., Comoglio L. & Rodríguez E. 2003. Toxicity of Cadmium, Lead, and Zinc to Larval Stages of *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 527–534.
- Amin O. & Comoglio L. 2010. Effects of copper on the physiological responses of the commercial crab *Lithodes santolla* (Decapoda: Anomura) larvae. *Scientia Marina* 74 (2): 215-221.
- Amin O., Comoglio L. & Sericano J. 2011a. Polynuclear aromatic and chlorinated hydrocarbons in mussels from the coastal zone of Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Environ Toxicol Chem* 30: 521-529.
- Amin O., Comoglio L., Spetter C., Duarte C., Asteasuain R., Freije R. & Marcovecchio J. 2011b. Assessment of land influence on a high latitude marine coastal system: Tierra del Fuego, southernmost Argentina. *Environ Monit Assess* 175: 63-73.
- Anger K., Lovrich G., Thatje S. & Calcagno J. 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306: 217– 230.
- Anger K., Spivak E., Luppi T., Bas C. & Ismael D. 2008. Larval salinity tolerance of the South American salt-marsh crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*: physiological constraints to estuarine retention, export and reimmigration. *Helgoland Marine Research* 62: 93–102.
- APHA-AWWA-WEF. 1998. *Standard Methods for Examination of Water & Wastewater*. En: Clesceri L., Greenberg A. & Eaton A. (Editors). Washington, D. C.
- Ashton G., Willis K., Burrows M. & Cook E. 2007. Environmental tolerance of *Caprella mutica*: Implications for its distribution as a marine non-native species. *Marine Environmental Research* 64: 305–312.
- Arvai, J.L., Levings, C.D., Harrison, P.J., Neill, W.E., 2002. Improvement of the sediment ecosystem following diversion of an intertidal sewage outfall at the Fraser river estuary, Canada, with emphasis on *Corophium salmonis* (Amphipoda). *Mar. Pollut. Bull.* 44, 511–519.
- Aydin-Onen S., Kocak F. & Kucuksezgin F. 2012. Evaluation of spatial and temporal variations of inorganic nutrient species in the eastern Aegean Sea waters. *Marine Pollution Bulletin* 64(12): 2849-2856.
- Balestrini C., Vinuesa J., Speroni J., Lovrich G., Mattenet C., Cantú C. & Medina P. 1990. Estudio de las Corrientes Marinas en los alrededores de la Península Ushuaia. CADIC - Centro Austral de Investigaciones Científicas, Comunicación Científica N°10.
- Balestrini C., Manzella G. & Lovrich G. 1998. Simulación de Corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un Modelo Bidimensional. Servicio de Hidrografía Naval -Departamento Oceanografía. Informe técnico N° 98.

- Barata C., Solayan A. & Porte C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 66: 125–139.
- Bartolini F., Penha-Lopes G., Limbu S., Paula J., & Cannicci S. 2009. Behavioural responses of the mangrove fiddler crabs (*Uca annulipes* and *U. inversa*) to urban sewage loadings: Results of a mesocosm approach. *Marine Pollution Bulletin* 58: 1860–1867.
- Bartram J. & Ballance R. 1996. *Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*. United Nations Environment Programme and the World Health Organization (UNEP/WHO).
- Bayne B., Thompson R. & Widdows J. 1976. *Physiology: I*. En: Bayne B. (ed): *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. IBP 10: 121-206.
- Beliaeff B. & Burgeot T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (6): 1316–1322.
- Beltrame, M.O., De Marco, S.G., Marcovecchio, J.E. 2010. Effects of zinc on molting and body weight of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Brachyura: Varunidae). *Science of the Total Environment* 408, 531–536.
- Bervoets L., Baillieul M., Blust R. & Verheyen R. 1996. Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. *Environmental Pollution* 91 (3): 333-341.
- Beuge J. & Aust S. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302–310.
- Beutler E. 1982. Catalase. En: Beutler E. (Ed.), *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Gruneand Stratton, Inc., 105–106.
- Biancalana F. 2008. *Dinámica del mesozooplankton y su regulación ambiental en las bahías Ushuaia y Golondrina (Canal Beagle)*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
- Biancalana F. & Torres A. 2011. Variations of mesozooplankton composition in a eutrophicated semienclosed system (Encerrada Bay, Tierra del Fuego, Argentina). *Braz. J. Oceanogr.* 59 (2): 195-199.
- Bigatti G., Primost M., Cledón M., Averbuj A., Theobald N., Gerwinski W., Arntz W., Morriconi E. & Penchaszadeh P. 2009. Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). *Marine Pollution Bulletin* 58: 695–701.
- Bilotta G. & Brazier R. 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research* 42: 2849-2861.
- Bocchetti R. & Regoli F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65: 913–921.

- Bocquené G. & Galgani F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterases inhibition by organophosphate and carbamate compounds, ICES Tech. Mar. Environ. Sci. 22: 1-13.
- Box A., Sureda A., Galgani F., Pons A. & Deudero S. 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol 146: 531-539.
- Brandt A. & Wagele J. 1989. Redescriptions of *Cymodocella tubicauda* Pfeffer, 1887 and *Exosphaeroma gigas* (Leach, 1818) (Crustacea, Isopoda, Sphaeromatidae). Antarctic Science 1: 205-214.
- Broeg K. & Lehtonen K. 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. Marine Pollution Bulletin 53: 508–522.
- Bujalesky G. 2004. La costa de Tierra del Fuego, Argentina. Informe Técnico. 30p.
- Bujalesky G. 2007. Coastal geomorphology and evolution of Tierra del Fuego (Southern Argentina). Geologica Acta 5 (4): 337-362.
- Cailleaud K., Maillet G., Budzinski H., Souissi S. & Forget-Leray J. 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). Comparative Biochemistry and Physiology A 147: 841–849.
- Cajaraville M., Bebianno M., Blasco J., Porte C., Sarasquete C. & Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Total Environ. 247: 295-311.
- Calabrese E. & Baldwin L. 2001. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology Trends in Pharmacological Sciences 22 (6): 285-291.
- Calabrese E. & Baldwin L. 2002. Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. Trends in Pharmacological Sciences 23 (7):331-337.
- Calabrese E. 2008. Hormesis and medicine. Br J Clin Pharmacol 66 (5): 594–617.
- Calcagno J., Anger K., Lovrich G., Thatje S. & Kaffenberger A. 2004. Larval development of the subantarctic king crabs *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa* reared in the laboratory. Helgol Mar Res 58: 11–14.
- Calow, P. 1989. Physiological ecotoxicology: theory, practice and application. In Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology, eds., H. Lokke, H. Tyle, and F. Bro-Rasmussen, pp. 23-25. Conference Organizing Committee, Lyngby, Denmark.
- Calow P. & Forbes V. 1998. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes?. Comparative Biochemistry and Physiology A 120: 11–16.
- Camargo J., Alonso A & Salamanca A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. Chemosphere 58: 1255–1267.

- Camargo J. & Alonso A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32: 831–849.
- Campodónico I. 1971. Desarrollo larval de la centolla *Lithodes antarctica* Jaquinot en condiciones de laboratorio (Crustacea Decapoda Anomura: Lithodidae). *Anales del Instituto de la Patagonia* 2 (1-2): 181-190.
- Canteras J.C., Pérez L., León P. & Lorda T. 1999. Efecto de la radiación luminosa en la desaparición de *Escherichia coli* (T90) en medio acuático. Estudio experimental. *Ingeniería del Agua* 6 (3): 269-274.
- Chambers P.A., Allard M., Walker S.L., Marsalek J., Lawrence J., Servos M, Busnarda J., Munger K.S., Adare K., Jefferson C., Kent R.A. & Wong M.P. 1997. The Impacts of Municipal Wastewater Effluents on Canadian Waters: A Review. *Water Quality Research Journal of Canada* 32 (4): 659-713.
- Chapman D. 1996. *Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring - Second Edition*. UNESCO/WHO/UNEP.
- Chapman P. 2000. Whole Effluent Toxicity testing—usefulness, level of protection, and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (1): 3–13.
- Chapman P., Wang F., Janssen C., Goulet R. & Kamunde C. 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: Current status. *Human and Ecological Risk Assessment* 9: 641-697.
- Charissou A., Cossu-Leguille C. & Vasseur P. 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Sci. Total Environ.* 322: 109-122.
- Charmantier G. & Charmantier-Daures M. 1994. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the isopod crustacean *Sphaeroma serratum*. *Marine Ecology Progress Series* 114: 93-102.
- Chen J & Chen K. 1997. Oxygen uptake and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* during depuration following one-day exposure to different concentrations of saponin at different salinity levels. *Aquaculture* 156: 77-83.
- Chen J. & Kou, Y. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 104, 249–260.
- Chen J. & Kou, Y. 1993. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 109, 177–185.
- Chen J. & Kou C. 1996. Nitrogenous excretion in *Macrobrachium rosenbergii* at different pH levels. *Aquaculture* 144: 155-164.

- Chen J. & Lin, C. 1992. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102C: 287-291.
- Chen J. & Lin C. 1995. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture* 136, 243–255.
- Cheng W., Chen S., Wang F., Hsu P., Liu C. & Chen J. 2003. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture* 219: 111– 121.
- Chiesa & Alonso G. 2007. Biodiversity of the Gammaridea and Corophiidea (Crustacea: Amphipoda) from the Beagle Channel and the Straits of Magellan: a preliminary comparison between their faunas. *Rev. Biol. Trop.* 55 (1): 103-112.
- Chigbu P., Gordon S. & Strange T. 2005. Fecal coliform bacteria disappearance rates in a north-central Gulf of Mexico estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 309-318.
- Clason B., Duquesne S., Liess M., Schulz R. & Zauke G. 2003. Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906): comparison of two compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquatic Toxicology* 65: 117-140.
- Cloern J. 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar Ecol Prog Ser* 210: 223- 253.
- Commendatore M., Nievas M., Amin O. & Esteves J. 2012. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Mar Environ Res* 74: 20-31.
- Comoglio L. 1994. La nutrición de los Crustáceos Decápodos en el Canal Beagle, con especial énfasis en la Centolla (*Lithodes santolla*) y en el Centollón (*Paralomis granulosa*), y la función trófica de los mismos en el Ecosistema. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Comoglio L. & Vinuesa J. 1991. Larval culture under laboratory conditions of southern king crab *Lithodes santolla* and false king crab *Paralomis granulosa*. *European Aquaculture Society. Special Publicación especial Nº 15: 349-351.*
- Comoglio L., Goldsmit J. & Amin O. 2008. Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(2): 345-353.
- Comoglio L., Amin O., Botté S. & Marcovecchio J. 2011. Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 382-393.

- Company R, Serafim A, Cosson R., Fiala-Médioni A., Dixon D. & Bebianno M. 2006. Temporal variation in the antioxidant defence system and lipid peroxidation in the gills and mantle of hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Deep-Sea Research I* 53: 1101–1116.
- Conley D. & Malone T. 1992. Annual cycle of dissolved silicate in Chesapeake Bay: implications for the production and fate of phytoplankton biomass. *Marine Ecology Progress Series* 81: 121- 128.
- Conover R., Corner E. 1968. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *J mar. biol Ass U. K.* 48: 49-75.
- Conti M., Stripeikis J., Finoia M. & Tudino B. 2011. Baseline trace metals in bivalve molluscs from the Beagle Channel, Patagonia (Argentina) *Ecotoxicology* 20: 1341–1353.
- Contreras-Vergara C., Harris-Valle C., Sotelo-Mundo R. & Yepiz-Plascencia G. 2004. A mu-class glutathione S-transferase from the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and active-site structural modelling. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 18 (5): 245–252.
- COPLAM. 2011. Situación del sistema cloacal de la ciudad de Ushuaia. Constataciones y recomendaciones. Informe Técnico de la Comisión del Plan de Manejo Integrado Costero. 60p.
- Correia A., Costa M., Luis O. & Livingstone D. 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289: 83– 101.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M., Babut M., Exinger A. & Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 122–131.
- Criales M., Zink I., Browder J. & Jackson T. 2011. The effect of acclimation salinity and age on the salinity tolerance of pink shrimp postlarvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 409: 283–289.
- Dall W., 1981. Osmoregulatory ability and juvenile habitat preference in some penaeid prawns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 54, 55–64.
- Damiens G., His E., Gnassia-Barelli M., Quiniou F. & Roméo M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 121–128.
- Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loquès F., Roméo M. & Salbert V. 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66: 574–583.
- Daniel W. 1978. *Applied Nonparametric Statistics*. Houghton Mifflin Co., Boston.

- Davidson T., Hewitt C. & Campbell M. 2008. Distribution, density, and habitat use among native and introduced populations of the Australasian burrowing isopod *Sphaeroma quoianum*. *Biological Invasions* 10: 399–410.
- De Coen W., Janssen C. & Giesy J. 2000. Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. En: Persoone y otros (Eds.). *New microbiotests for routine screening and biomonitoring*. Kluwer Academics.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 2003. A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2195–2201.
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.
- Dellali M., Gnassia Barelli M., Romeo M. & Aissa P. 2001a. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comp. Biochem. Phys.* 130: 227-235.
- Dellali, M., Romeo M. & Aissa P. 2001b. Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte . *Oceanologica Acta* 24(3): 263-271.
- Delucchi F., Narvarte M., Amín O., Tombesi N., Freije H. & Marcovecchio J. 2011. Organotin compounds in sediments of three coastal environments from the Patagonian shore, Argentina. *International Journal of Environment and Waste Management* 8 (1/2): 3 – 17.
- De Maagd, P.G.J., 2000. Bioaccumulation tests applied in whole effluent assessment: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 25–35.
- Demayo A. & Steel A. 1996. Data handling and presentation En: *Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring – Chapman D. (Editor)*. Second Edition. UNESCO/WHO/UNEP. Capítulo 10: 500-601.
- Depledge M. 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. En: Fossi M. & Leonzio C. *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers Boca Raton, Florida, 271-285.
- Depledge M., Amaral-Mendes J., Daniel B., Halbrook R., Kloeppersams P., Moore M. & Peakall D. 1993. The conceptual basis of the biomarker approach. En: Peakall D. & Shugart L. *Biomarker: Research and application in the assessment of environmental health* NATO ASI Series, Berlin, 15-29.
- Diamond J., Stribling J., Bowersox M. & Latimer H. 2008. Evaluation of Effluent Toxicity as an Indicator of Aquatic Life Condition in Effluent-Dominated Streams: A Pilot Study. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4 (4): 456–470.

- Di Marzio W., Sáenz M., Alberdi J., Tortorelli M. & Galassi S. 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61: 380–391.
- Diodato S., Comoglio L., Camilión C. & Amin O. 2012. Responses of the resident rocky crab (*Halicarcinus planatus*, Decapoda) to natural stressors and effluent discharges in Ushuaia Bay, Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 436-437: 11–18.
- Dionisi H., Lozada M., Marcos M., Di Marzio W. & Loviso C. 2011. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. En: de Bruijn F. (ed.), *Handbook of molecular microbial ecology, volume II: metagenomics in different habitats*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. 461-473.
- Dirección General de Estadística y Censos. Síntesis Estadística 2010-2011. Tierra del Fuego.
- Dixon W. & Chiswell B. 1996. Review of aquatic monitoring program design. *Water Research* 30 (9): 1935-1948.
- Douhri H. & Sayah F. 2010. Validation of *Orchestia gammarellus* enzymatic activities in several sites of Tangier's bay (Morocco). *African Journal of Environmental Science and Technology* 4 (5): 256-262.
- Drobne D., Blazic M., Van Gestel C., Leser V., Zidar P., Jemec A. & Trebse P. 2008. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere* 71: 1326–1334.
- Duarte C., Giarratano E., Amin O. & Comoglio L. 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1895-1904.
- Duarte C., Giarratano E. & Gil M. 2012. Trace metal content in sediments and autochthonous intertidal organisms from two adjacent bays near Ushuaia, Beagle Channel (Argentina). *Marine Environmental Research* 79: 55-62.
- duPreez H., Steenkamp V. & Schoonbee H. 1993. Bioaccumulation of zinc and lead in selected tissues and organs of the freshwater crab, *Potamonautes warren*. *Science of The Total Environment* 134 (1): 469–478.
- Duquesne S., Riddle M., Schulz R. & Liess M. 2000. Effects of contaminants in the Antarctic environment — potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. *Aquatic Toxicology* 49: 131–143.

- Eagleson K., Lenat D., Ausley L. & Winborne F. 1990. Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9 (8): 1019–1028.
- Ellis B. & Morris S. 1995. Effects of extreme pH on the physiology of the Australian 'yabby' *Cherax destructor*: acute and chronic changes in haemolymph oxygen levels, oxygen consumption and metabolite levels. *The Journal of Experimental Biology* 198: 409–418.
- Ellman G., Courtney D., Andres V. & Featherstone R. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol* 7: 88-95.
- Emerson K, Russo R., Lund R & Thurston R. 1975. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1975, 32(12): 2379-2383.
- Escartin E. & Porte C. 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2090-2095.
- Espina S. & Vanegas C. 2005a. Ecofisiología y Contaminación. En: Botello A., Rendón von Osten J., Gold-Bouchot G. & Agraz-Hernández C. (Eds), *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias 2da Edición*. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología, 53-78.
- Espina S. & Vanegas C. 2005b. Ecotoxicología y Contaminación. En: Botello A., Rendón von Osten J., Gold-Bouchot G. & Agraz-Hernández C. (Eds), *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias 2da Edición*. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología, 79-120.
- Espinosa-Perez M. & Hendrickx M. 2001. A new species of *Exosphaeroma* Stebbing (Crustacea: Isopoda: Sphaeromatidae) from the Pacific coast of Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 114(3): 640-648.
- Esteves J., Commendatore M., Nievas M., Massara Paletto V. & Amín O. 2006. Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia, Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 52:582–590.
- Evans D. & Cameron J. 1986. Gill ammonia transport. *The Journal of Experimental Zoology* 239: 17–23.
- Evanson M. & Ambrose R. 2006. Sources and growth dynamics of fecal indicator bacteria in a coastal wetland system and potential impacts to adjacent waters. *Water Research* 40: 475 – 486.
- Felten V., Baudoin J & Guérol F. 2006. Physiological recovery from episodic acid stress does not mean population recovery of *Gammarus fossarum*. *Chemosphere* 65: 988–998.

- Felten V., Charmantier G., Charmantier-Daures M., Aujoulat F., Garric J. & Geffard O. 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147: 189–197.
- Ferrari L. 2006. Generalidades sobre ecotoxicología. En: Carballo M. & Mudry M. (Eds), *Genética Toxicológica*, Editorial Los Cuatro Vientos, Buenos Aires, Argentina. 393-421.
- Fingerman, S.W. 1985. Non-metal environmental pollutants and growth. In: A.M. Wenner (ed.). *Factors in Adult growth*. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 219-234.
- Fingerman M., Jackson N. & Nagabhushanam R. 1998. Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 120: 343–350.
- Finney D. 1971. *Probit analysis*. Tercera edición. Cambridge University Press, Cambridge. 333.
- Forbes V., Palmqvist A. & Bach L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (1): 272–280.
- Forward R., Tankersley R., Blondel D. & D. Rittschof. 1997. Metamorphosis of the blue crab *Callinectes sapidus*: Effects of humic acids and ammonium. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157:277– 286.
- Forward R., Tankersley R. & Rittschof D. 2001. Cues for Metamorphosis of Brachyuran Crabs: An Overview. *Amer. Zool* 41: 1108–1122.
- Frenzilli G., Nigro M., Scarcelli V., Gorbi S. & Regoli F. 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquat.Toxicol.*53: 19–32.
- Fulton M. & Key P. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticides exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 37-45.
- Gagné F., Blaise C. & Pellerin J. 2005. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research* 98: 89–99.
- Galgani F. & Bocquene G. 2000. Molecular biomarkers of exposure of marine organisms to organophosphorus pesticide and carbamates. En: Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. & Ramade F. (eds.): *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*. USA: Science Publishers, Inc., 113-137.
- Galloway T., Sanger R., Smith K., Fillmann G., Readman J., Ford T., & Depledge M. 2002. Rapid Assessment of Marine Pollution Using Multiple Biomarkers and Chemical Immunoassays. *Environ. Sci. Technol.* 36 (10): 2219–2226.
- Giarratano E., Duarte C. & Amin O. 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 73: 270-279.

- Giarratano E. & Amin O. 2010. Heavy metals monitoring in the southern most mussel farm of the world (Beagle Channel, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1378–1384.
- Giarratano E., Comoglio L. & Amin O. 2007. Heavy metal toxicity in *Exosphaeroma gigas* (Crustacea, Isopoda) from the coastal zone of Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 451-462.
- Giarratano E., Gil M. & Malanga G. 2011. Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Marine Pollution Bulletin* 62(6): 1337-1344.
- Gil M., Torres A., Amin O. & Esteves J. 2011. Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62 (1): 201–207.
- Goldsmid J. 2008. Respuestas fisiológicas y bioquímicas del mejillón *Mytilus edulis* y del isópodo *Exosphaeroma gigas* expuestos a cambios en las condiciones ambientales. Ensayos en laboratorio y en campo en la ciudad de Ushuaia. Tesina de Licenciatura, Universidad de Córdoba.
- Graham D., Miley M., Denoyelles F., Smith V., Thurman M. & Carter R. 2000. Alachlor transformation patterns in aquatic field mesocosms under variable oxygen and nutrient conditions. *Wat. Res.* 34 (16): 4054-4062.
- Grapentine L., Rochfort Q. & Marsalek J. 2004. Benthic Responses to Wet-Weather Discharges in Urban Streams in Southern Ontario. *Water Qual. Res. J. Canada* 39 (4): 374–391.
- Greenaway P. 1991. Nitrogenous excretion in aquatic and terrestrial crustaceans. *Memoirs of the Wueensland Museum* 31: 215-227.
- Gross M, Maycock D, Thorndyke M, Morrith D. & Crane M. 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 8, pp. 1792–1797.
- Guilhermino L., Lopez M., Carvalho A. & Soares A. 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 32: 727-738.
- Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Queau H., Mouthon J. & Garric J. 2010. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. *Water Research* 44: 4517- 4528.
- Habig W., Pabst M. & Jakobi W. 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130–7139.
- Haile R., White J., Gold M., Cressey R., McGee C., Millikan R., Glasser A., Harawa N., Ervin C., Harmon P., Harper J., Dermand J., Alamillo J., Barrett K., Nides M. & Wang G. 1999. The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. *Epidemiology* 10: 355–363.

- Handy R. & Depledge M. 1999. Physiological responses: their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology* 8: 329-349.
- Hartnoll R. 2001. Growth in Crustacea twenty years on. *Hydrobiologia* 449: 111–122.
- Hebel D., Jones M. & Depledge M. 1997. Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 44: 177-184.
- Henninger T., Froneman P., Booth A. & Hodgson A. 2010. Growth and longevity of *Exosphaeroma hylocoetes* (Isopoda) under varying conditions of salinity and temperature. *African Zoology* 45(1): 41–51.
- Herricks E. & Schaeffer D. 1984. Compliance monitoring. Standard development and regulation enforcement using biomonitoring data. En: *Freshwater Biological Monitoring*, Pascol D. & Edwards R (eds.). Pergammon Press, NY. 153-166.
- Hofmann G., Barry J., Edmunds P., Gates R., Hutchins D., Klinger T. & Sewell M. 2010. The effect of ocean acidification on calcifying organisms in marine ecosystems: an organism to ecosystem perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 127–147.
- Howarth R. & Marino R. 2006. Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. *Limnol. Oceanogr.* 51(1, 2): 364–376.
- Howarth R., Anderson D., Cloern J., Elfring C., Hopkinson C., Lapointe B., Malone T., Marcus N., McGlathery K., Sharpley A. & Walker D. 2000. Nutrient Pollution of Coastal Rivers, Bays, and Seas. *Issues in Ecology* 7: 1-15.
- Huelin Rueda P. 2008. Ordenación hidrológico- forestal de la cuenca del arroyo de Buena Esperanza, Tierra del Fuego (Argentina). Tesis de grado. Universidad Politécnica de Madrid.
- Hyne R. & Maher W. 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 366–374.
- Hyne R., Gale S. & King C. 2005. Laboratory culture and life-cycle experiments with the benthic amphipod *Melita plumulosa* (Zeidler). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8): 2065–2073.
- Ikeda T. 1974. Nutritional ecology of marine zooplankton. *Mem Fac Fish Hokkaido Univ.* 22. 1-91.
- Iturraspe R., Sottini R., Schroeder C. & Escobar J. 1989. Generación de información hidroclimática en Tierra del Fuego. En: *Hidrología y variables climáticas del Territorio de Tierra del Fuego. Información básica. Publicación Científica N° 7.* CADIC-CONICET.
- Iturraspe R. 2007. Report on basin response for Argentina. Deliverable D18 EPIC FORCE. Argentina.
- Jemec A., Drobne D., Tišler T., Trebše P., Milenko Roš M. & Sepčič K. 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 144: 303–309.

- Jemec A., Drobne D., Remškar M., Sepčič K. & Tišler T. 2008. Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (9): 1904–1914.
- Jemec A., Drobne D., Tišler T. & Sepčič K. 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17: 571-581.
- Jeremiason J., Eisenreich S., Paterson M., Beaty K., Hecky R. & Elser J. 1999. Biogeochemical cycling of PCBs in lakes of variable trophic status: A paired-lake experiment. *Limnol. Oceanogr.* 44 (3, 2): 889–902.
- Jiang D., Lawrence A., Neill W. & Gong H. 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 253: 193–209.
- Karydis M. 2009. Eutrophication assessment of coastal waters based on indicators: a literature review. *Global NEST Journal* 11 (4): 373-390.
- Khessiba A., Romeo M & Aissa P. 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution* 133: 275–281.
- Kinne, O., 1971. Invertebrates. In: Kinne, O. (Ed.), *Marine Ecology. Part 2, Chapter 4, vol. I.* Wiley-Interscience, New York pp. 821–995.
- Kir M., Kumlu M. & Eroldogan O.T. 2004. Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. *Aquaculture* 241: 479–489.
- Knops, M., R. Altenburger and H. Segner. 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Toxicol.*, 53: 79-90.
- Kolar L., Jemec A., van Gestel A., Valant J., Hrzenjak R., Erzen N. & Zidar P. 2010. Toxicity of abamectin to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Ecotoxicology* () 19:917–927.
- Koo J., Kim S., Jee J., Kim J., Bai S. & Kang J. 2005. Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). *Aquaculture Research* 36: 79-85.
- Kurihara H., Matsui M., Furukawa H., Hayashi M. & Ishimatsu A. 2008. Long-term effects of predicted future seawater CO₂ conditions on the survival and growth of the marine shrimp *Palaemon pacificus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 367: 41–46.
- Lagadic L. & Caquet T. 1998. Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives? *Environmental Health and Perspectives* 106 (2): 593-611.
- Lam P. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal Management* 52: 348–354.

- Lam P. & Gray J. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46: 182-186.
- Lapucki T. & Normant M. 2008. Physiological responses to salinity changes of the isopod *Idotea chelipes* from the Baltic brackish waters. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 149: 299–305.
- Leach W. 1818. Cymothoadees. En Cuvier F. ed., *Dictionnaire des Sciences Naturelles* 12: 338- 354.
- Legendre P. & Legendre L. 1998. *Developments in Environmental Modelling, 20. Numerical Ecology. Second English Edition. Elsevier. 853.*
- Leiniö S. & Lehtonen K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140: 408 – 421.
- Lemos D., Jorge R. & Phan V. 2003. Simultaneous measurements of oxygen consumption and ammonia-N excretion in embryos and larvae of marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 136: 321–328.
- Li E., Chen L., Zeng C., Chen X., Yu N., Lai Q. & Qin J. 2007. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture* 265: 385–390.
- Li E., Chen L., Zeng C., Yu N., Xiong Z., Chen X. & Qin J. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture* 274: 80–86.
- Liao Y., Wang H. & Lin Z. 2011. Effect of ammonia and nitrite on vigour, survival rate, moulting rate of the blue swimming crab *Portunus pelagicus* zoea. *Aquaculture International* 19 (2): 339-350.
- Libralato G., Losso C., Arizzi Novelli A., Citron M., Della Sala S., Zanotto E., Cepak F. & Volpi Ghirardini A. 2008. Ecotoxicological evaluation of industrial port of Venice (Italy) sediment samples after a decontamination treatment. *Environmental Pollution* 156: 644–650.
- Lichtfield & Wilcoxon (1949). A simplified method for evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-101.
- Lignot J.-H., Spanings-Pierrot C. & Charmantier G. 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191: 209–245.
- Livingstone D. 1993. *Biotechnology and Pollution Monitoring : Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 195-211.
- Livingstone D. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42 (8): 656-666.

- Lombardo R., Ferrari L. & Vinuesa J. 1991. Effects of lindane and acetone on the development of larvae of the southern king crab (*Lithodes antarticus* Jaquinot). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46:185-192.
- Lovrich G. 1997. La pesquería mixta de las centollas *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Anomura: Lithodidae) en Tierra del Fuego, Argentina. *Invest Mar* 25: 41–57.
- Lovrich G., Thatje S., Calcagno J., Anger K. & Kaffenberger A. 2003. Changes in biomass and chemical composition during lecithotrophic larval development of the Southern king crab, *Lithodes santolla* (Molina). *J Exp Mar Biol Ecol* 288: 65–79.
- Lozada M., Riva Mercadal J., Guerrero L., Di Marzio W., Ferrero M. & Dionisi H. 2008. Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia. *BMC Microbiol.* 8: 50.
- Luchini L. & Wicki G. 2002. Evaluación del potencial para acuicultura en la Provincia de Tierra del Fuego. Información Básica. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA).
- Magalhães D. & Ferrão Filho A. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas acuáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3): 355-381.
- Maltby L. 1995. Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: observations and possible mechanisms. *Wat. Res.* 29 (3): 781-787.
- Maltby L., Kedwards T.J., Forbes V., Grasman K., Kammenga J.E., Munns Jr. W., Ringwood A., Weis J. & Wood S. 2001. Linking individual-level response and population-level consequences. In: Baird D. & Burton Jr. G. (Eds.). *Ecological Variability: Separating Natural and Anthropogenic Causes of Ecosystem Impairment*. SETAC, Pensacola, FL, USA, pp. 27–82.
- Mara D. 2003. *Domestic wastewater treatment in developing countries*. Earthscan, London.
- Marcos M., Lozada M. & Dionisi HM. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 602– 608.
- Marcos M., Lozada M., Di Marzio W. & Dionisi H. 2012. Abundance, Dynamics, and Biogeographic Distribution of Seven Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenase Gene Variants in Coastal Sediments of Patagonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(5):1589. DOI: 10.1128/AEM.06929-11.
- Mariuzzi A., Conzonno V., Ulibarrena J., Paggi J. & Donadelli J. 1987. Limnological investigation in Tierra del Fuego, Argentina. *Biol. Acuát.* 10- Inst. Limn. R. Ringuelet. La Plata.
- Markwell M., Haas S., Bieber L. & Tolbert N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem* 87: 206–210.
- Marques Júnior A., Araujo M., Crapez C. & Nunes Barboza C. 2006. Impact of the Icaraí Sewage Outfall in Guanabara Bay, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(4): 643-650.

- Mayzaud P. & Conover R. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 289-302.
- McAllen R & Taylor A. 2001. The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the high-shore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263: 227–240.
- McCarthy, J. & Shugart, L. 1990. Biomarkers of environmental contamination, Lewis Publ., Boca Raton. USA.
- McKenney C. Jr. 1999. Hormonal processes in decapod crustacean larvae as biomarkers of endocrine disrupting chemicals in the marine environment En: *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for endocrine disruption and environmental assessment*, Henshel D., Black M. & Harrass M. (Eds.) 8th volume ASTM STP 1364. American Society for Testing Materials.
- McLaughlin P., Anger K., Kaffenberger A. & Lovrich G. 2001. Megalopal and early juvenile development in *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura; Paguroidea: Lithodidae), with notes on zoeal variations. *Invertebr. Reprod. Dev.* 40, 53–67.
- McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R. & Yu H. 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean Biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, No. 8, pp. 2085–2092.
- Medina M., Correa J. & Barata C. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67: 2105–2114.
- Menezes S., Soares A., Guilhermino L. & Peck M. 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 335: 114–122.
- Metcalf & Eddy. 2003. *Wastewater Engineering. Treatment Disposal Reuse*. G. Tchobanoglous; F.L. Burton & H D Stensel (Eds.). 4ta edición. New York: McGraw-Hill. 1878p.
- Miranda-Filho K., Lopes Leães Pinho G., Wasielesky Jr. W & Bianchini A. 2009. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 150: 377–382.
- Monserrat J., Martínez P., Geracitano L., Lund Amado L., Martinez Gaspar Martins C., Lopes Leães Pinho G., Soares Chaves I, Ferreira-Cravo M., Ventura-Lima J. & Bianchini A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146: 221–234.
- Montagna M. & Collins P. 2008. Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 92: 150–155.

- Moore D., Bridges T., Gray B. & Duke M. 1997. Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (5): 1020–1027.
- Morales Castillo G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México. 189p.
- Mugnier, C., Justou, C., 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 309, 35–46.
- Mugnier C., Zipper E., Goarant C. & Lemonnier H. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture* 274: 398–407.
- National Sanitation Foundation (NSF). 2007. Field Manual for Water Quality Monitoring. Disponible en www.nsf.org.
- Neuzil M. & Kovarik W. 1996. Mass Media and Environmental Conflict: America's Green Cruzades. Sage Publications, Nueva York. 245p.
- Nixon S. 1995. Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41: 199-219.
- Normant M. & Lamprecht I. 2006. Does scope for growth change as a result of salinity stress in the amphipod *Gammarus oceanicus*? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334: 158–163.
- Olsen Y., Ellerbeck L., Fisher T., Callaghan A. & Crane M. 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius meigen* deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (8): 1725–1732.
- Ono Y., Somiya M. & Yoshimitsu Oda M. 2000. Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water. *Water Res.* 34, 890–894.
- Osteen D., Specht W., Gordon D., Ektndge L. 1999. An Evaluation of the Whole Effluent Toxicity Test Method. Westinghouse Savannah River Company LLC. 14p.
- Ott W. 1978. Water quality indices: a survey of indices used in the United States. EPA.
- Paital B. & Chainy G. 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151 () 142–151.
- Pan L, Zhang L & Liu H. 2007. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture* 273: 711–720.

- Pante M. 1990. Influence of Environmental Stress on the Heritability of Molting Frequency and Growth Rate of the Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei*. University of Houston-Clear lake, Houston, TX, USA, M.Sc. Thesis.
- Paschke K., Cumilla P., Loyola S., Gebauer P., Urbina M., Chimal M., Pascual C. & Rosas C. 2010. Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae). *Mar Biol* 157:7–18.
- Payne J., Mathieu A., Melvin W. & Fancey L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32: 225-231.
- Peakall, D.B., 1992. Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman & Hall, London.
- Péqueux A. 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15 (1): 1-60.
- Pesce S. & Wunderlin D. 2000. Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba city (Argentina) on Suquía River. *Wat. Res.* 34 (11): 2915-2926.
- Petriella A. & Boschi E. 1997. Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina *Invest. Mar. Valparaíso*, 25: 135-157.
- Pfeifer S., Schiedek D. & Dippner J. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol Ecol.* 320: 93-103.
- Pisano Valdés E. 1977. Fisiografías de Fuego-Patagonia Chilena I: comunidades vegetales entre las latitudes 52 y 56° S. *Anales del Instituto de la Patagonia, Serie Ciencias Sociales.* Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile. 8: 121-250.
- Pompey M., Hervio-Heath D., Caprais M., Gourmelon M., Le Saux J. & Le Guyader F. 2006. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. En: Belkin & Colwell (eds.), *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment* Springer, New York, 331-359.
- Ponce-Palafox J., Martínez-Palacios C. & Ross L. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile White shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157: 107-115.
- Power A. & Sheehan D. 1996. Seasonal Variation in the Antioxidant Defence Systems of Gill and Digestive Gland of the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114C (2): 99-103.
- Premoli A., Aizen M., Kitzberger T. & Raffaele E. 2006. Situación ambiental en los Bosques Andino Patagónicos. En: Brown A., Martínez Ortiz U., Acerbi M. & Corcuera J. (Eds.). *La Situación Ambiental Argentina 2005.* Buenos Aires, Argentina. 279-281.
- Prenter J., MacNeil C., Dick J., Riddell G. & Dunn A. 2004. Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. *Water Research* 38: 2847–2850.

- Racotta I. & Hernández-Herrera R. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 125: 437–443.
- Ramírez Romero P. & Mendoza Cantú A. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- Re A., Díaz F., Sierra E. Gómez-Jiménez S. 2004. Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas* 30(3): 443–453.
- Rebello M., Santos E. & Monserrat J. 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851: accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 122: 429–435.
- Regnault M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. *Biological Reviews* 62: 1-24.
- Rendón von Osten J. 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos. . En: Botello A., Rendón von Osten J., Gold-Bouchot G. & Agraz-Hernández C. (Eds.), Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias 2^{da} Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología, 121-140.
- Robillard S., Beauchamp G & Laulier M. 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 135: 49–59.
- Rodríguez E. 2006. Biomarcadores en fauna acuática: estudios de campo y de laboratorio, en un contexto ecotoxicológico. En: Carballo M. & Mudry M. (Eds), Genética Toxicológica, Editorial Los Cuatro Vientos, Buenos Aires, Argentina. 459-479.
- Rodríguez E. & Amin O. 1991. Acute Toxicity of Parathion and 2, 4-D to Larval and Juvenile Stages of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 634—640.
- Rodríguez, E.M., Medesani, D.A, Fingerman, M. 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comparative Biochemical Physiology* 146A, 661-671.
- Romano N. & Zeng C. 2007a. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated histological gill alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture* 266: 246–254.
- Romano N. & Zeng C. 2007b. Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymph osmolality, ammonia-N, pH and ionic composition of early juvenile mud crabs, *Scylla serrata* (Forskål). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 148: 278–285.

- Romano N. & Zeng C. 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture* 334-337: 12–23.
- Ronco A., Díaz Báez M. & Pica Granados Y. 2004. Conceptos generales. En: Castillo Morales G. (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Canadá & IMTA, México, 17-22.
- Rozen Y. & Belkin S. 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 513-529.
- Sarakinos, H.C., Bermingham, N., White, P.A., Rasmussen, J.B., 2000. Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 63–71.
- Scanes P. & Philip N. 1995. Environmental Impact of Deepwater Discharge of Sewage off Sydney, NSW, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 31 (4-12): 343-346.
- Scholes L., Baun A., Seidl M., Eriksson E., Revitt M. & Mouchel J. 2007. Assessment of storm water ecotoxicity using a battery of biotests. En: G.M. Morrison and S. Rauch (eds.), *Highway and Urban Environment: Proceedings of the 8th Highway and Urban Environment Symposium*, 399–410.
- Schvezov N. & Amin O. 2011 Biochemical response of amphipods (Gammarid: *Paramorea*) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74(3): 394-402.
- Sericano J., Wade T., Jackson T., Brooks J., Tripp B., Farrington J., Mee L., Readman J., Villeneuve J. & Goldberg E. 1995. Trace organic contamination in the Americas: An overview of the U.S. National Status and Trends and the International “Mussel Watch” Programs. *Mar Pollut Bull* 31: 214–225.
- Sheehan D. & Power A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123: 193–199.
- Smith V. 2003. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems: A global problem. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 10: 126–139.
- Smith V., Tilman G. & Nekola J. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100: 179-196.
- Smith V. & Schindler D. 2009. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution* 24 (4): 201-207.

- Smolders R., Bervoets L. & Blust R. 2004. In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environ. Pollut.* 132, 231–243.
- Sokal R. & Rohlf R. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman and Company, New York, USA. 859p.
- Solís M., Willers V., Rodríguez M., Amin O. & Esteves J. 2004. Efluentes, ríos o arroyos que drenan a las Bahías Golondrina, Encerrada y Ushuaia. Anexo 1. En: Esteves J. & Amin O. (Eds.), *Evaluación de la Contaminación Urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina*, 16–22.
- Sotelano M., Lovrich G., Romero M. & Tapella F. 2012. Cannibalism during intermolt period in early stages of the Southern King Crab *Lithodes santolla* (Molina 1872): Effect of stage and predator–prey proportions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 411: 52–58.
- Spanopoulos-Hernández M., Martínez-Palacios C., Vanegas-Pérez R., Rosas C. & Ross L. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture* 244: 341–348.
- Spice, J.I., Weber, R.E., 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 339–342.
- Statham P. 2012. Nutrients in estuaries - An overview and the potential impacts of climate change. *Science of The Total Environment* 434: 213–227.
- Steele D. & Steele V. 1991. Effects of salinity on the survival, growth rate, and reproductive output of *Gammarus lawrencianus* (Crustacea, Amphipoda). *Marine Ecology Progress Series* 78: 49-56.
- Strickland J. & Parsons T. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada 167.
- Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación. 2003. *Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a nitratos y nitritos*. 13p.
- Taboada G., Gaxiola G., García T., Pedroza R., Sanchez A., Soto L. & Rosas C. 1998. Oxygen consumption and ammonia N-excretion related to protein requirements for growth of white shrimp, *Penaeus vannamei* (L.), juveniles. *Aquaculture Research* 29: 822-833.
- Tapella F., Sotelano M., Romero M. & Lovrich G. 2012. Experimental natural substrate preference of southern king crab *Lithodes santolla* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 411: 70–77.
- Tedengren M., Olsson B., Bradley B. & Zhou L. 1999. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. *Hydrobiologia* 393: 261–269.
- Ternes T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260.

- Torres A., Gil M., Amin O. & Esteves J. 2009. Environmental characterization of an eutrophicated semi-enclosed system: nutrient budget (Encerrada Bay, Tierra del Fuego Island, Patagonia, Argentina). *Water, Air, Soil Pollut.* 204: 259-270.
- Truhaut R. 1977. *Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1 (2): 151-173.
- Trujillo-Jiménez P., Sedeño-Díaz J., Camargo J. & López-López E. 2011. Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *Ecological Indicators* 11: 1636–1646.
- Tuhkanen S. 1992. The climate of Tierra del Fuego from a vegetation geographical point of view and its ecoclimatic counterparts elsewhere. *Acta Botánica Fennica*. 145: 1-64.
- Tu H., Silvestre F., De Meulder B., Thome J., Phuong N. & Kestemont P. 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere* 86: 83–91.
- Urciolo A. & Iturraspe R. 2005. Ordenamiento hídrico de las cuencas de fuentes aptas para provisión de agua potable a la ciudad de Ushuaia. *Anales XX Congreso Nacional del Agua*, Mendoza.
- USEPA. 1991. Technical support document for water quality-based toxics control. EPA/505/2-90-001.
- USEPA. 1996. Regions 9 and 10 guidance for implementing whole effluent toxicity testing programs. Technical Report. Seattle, WA.
- USEPA. 2001. Report to Congress: Implementation and Enforcement of the CSO Control Policy. EPA 833-R-01-003, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA. 2002a. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition.
- USEPA. 2002b. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Fourth Edition.
- USEPA. 2002c. Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria. Draft.
- USEPA 2009. Draft 2009 Update Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria For Ammonia – Freshwater. EPA-822-D-09-001. 184p.
- Vallarino E., Rivero M., Gravina M. & Elías R. 2002. The community-level response to sewage impact in intertidal mytilid beds of the Southwestern Atlantic, and the use of the Shannon index to assess pollution. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37 (1): 25 – 33.
- van der Oost R., Beyer J. & Vermeulen N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.

- Van Gestel C. & Van Brummelen T. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225.
- Vinuesa J. 1991. Biología y pesquería de la centolla (*Lithodes santolla*). *Atlántica* 13: 233–244.
- Vinuesa J., Ferrari L. & Lombardo R. 1985. Effects of temperature and salinity on larval development of southern king crab (*Lithodes antarcticus*). *Marine Biology*, 85(1):83-88.
- Vinuesa J. & Lovrich G. 1992. Biología y Pesca de la centolla en el Canal Beagle, Tierra del Fuego, Argentina. Recomendaciones para su manejo. *Contr. Cient.CADIC, Ushuaia, Nº15: 27p.*
- Vosloo A., van Aardt W. & Miente L. 2002. Sublethal effects of copper on the freshwater crab *Potamonautes warreni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 695–702.
- Wang W., Wang A., Chen L., Liu Y. & Sun R. 2002. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na⁺–K⁺ ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. *Aquatic Toxicology* 60: 75–83.
- Wang W, Zhou J, Wang P, Tian T, Zheng Y, Liu Y, Mai W & Wang A. 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150: 428–435.
- Whelan B. & Titannis Z. 1982. Daily chemical variability of domestic septic tank effluent. *Water, Air, and Soil Pollution* 17: 131-139.
- Whiteley N. 2011. Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. *Marine Ecology Progress Series* 430: 257–271.
- Whitfield M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water. A theoretical study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 565–580.
- WHO. 1993. Biomarkers in risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* No. 155. IPCS/WHO. Geneva.
- Winston G., Livingstone D. & Lips F. 1990. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Zoology* 255 (3): 296–308.
- Yu N., Chen S., Li E., Chen J. & Chen L. 2009. Tolerance of *Physocypria kraepelini* (Crustacean, Ostracoda) to water-borne ammonia, phosphate and pH value. *J. Environ. Sci.* 21, 1575–1580.
- Zhou J., Wang W., Wang A., He W., Zhou Q., Liu Y. & Xu J. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 150: 224–230.

ANEXOS

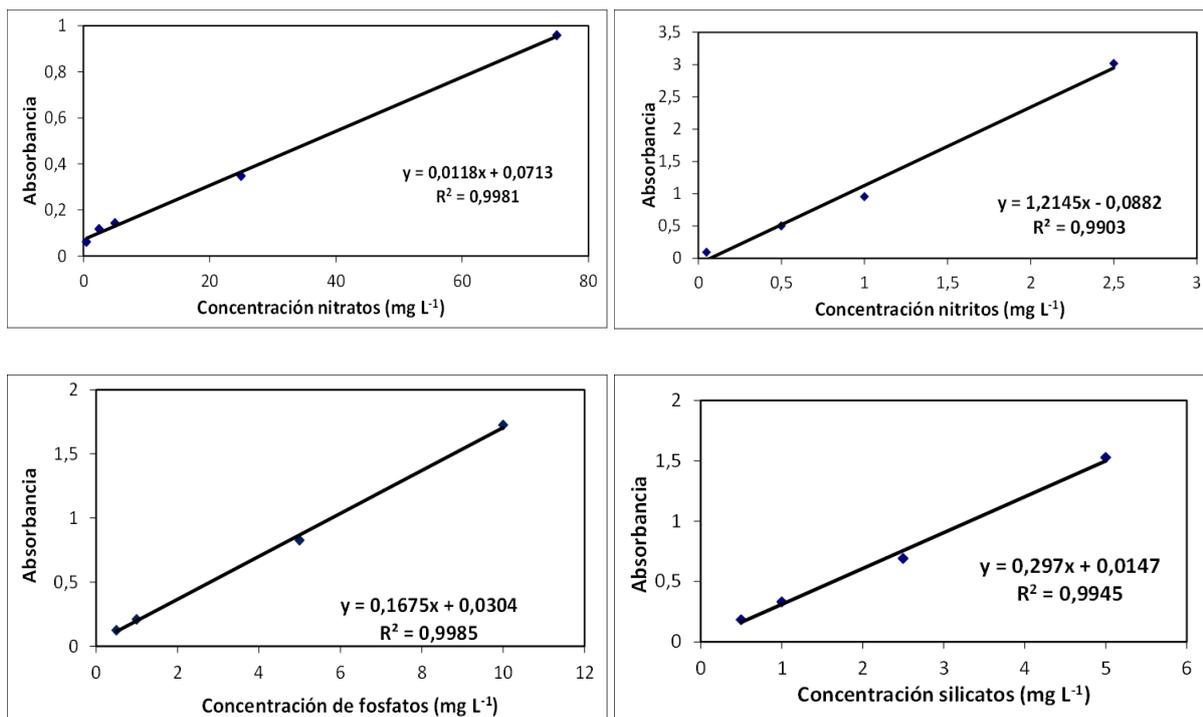
ANEXO I

FUNDAMENTOS Y CÁLCULOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA MEDICIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Nutrientes Inorgánicos Disueltos

- ❖ Nitratos (NO_3^-): en solución sulfúrica y fosfórica, los iones nitrato forman con el 2,6-dimetilfenol el compuesto 4-nitro-2,6-dimetilfenol dando una coloración rosada que se determina fotométricamente a 340 nm. El procedimiento es análogo a ISO 7890/1.
- ❖ Nitritos (NO_2^{2-}): en solución ácida, los iones nitrito forman con el ácido sulfanílico una sal de diazonio que reacciona con el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina dando un producto de coloración violeta rosada que se determina fotométricamente a 525 nm. El procedimiento es análogo a EPA 354.1 y US Standard Methods 4500-NO₂B.
- ❖ Fosfatos (PO_4^{3-}): en solución sulfúrica los iones ortofosfato forman con los iones molibdato el ácido molibdofosfórico. Este último, con ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno que se determina fotométricamente a 690 nm. El procedimiento es análogo a EPA 365.2, US Standard Methods 4500-P E e ISO 6978/1.
- ❖ Silicatos (SiO_3^{3-}): en solución sulfúrica los iones silicato forman con iones molibdato un heteropoliácido amarillo. Este último se reduce a azul de silicomolibdeno que se determina en espectrofotómetro a 665 nm. El procedimiento es análogo a US Standard Methods 4500-SiO₂ E.

Para cada nutriente, se realizó la correspondiente **curva de calibración** para poder cuantificar la concentración final del mismo. Para esto se utilizaron soluciones estándar de concentración conocida: 1000 mg L⁻¹ NO₃⁻; 1000 mg L⁻¹ NO₂²⁻; 1000 mg L⁻¹ PO₄³⁻ y 1000 mg L⁻¹ SiO₃³⁻.



La concentración final de los distintos nutrientes se calculó de acuerdo a las siguientes fórmulas surgidas de las correspondientes curvas de calibración:

$$\begin{aligned} \text{mg NO}_3^- \text{ L}^{-1} &= (absM - 0.0713) / 0.0118 \\ \text{mg NO}_2^{2-} \text{ L}^{-1} &= (absM + 0.0882) / 1.2145 \\ \text{mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1} &= (absM - 0.0304) / 0.1675 \\ \text{mg SiO}_3^{3-} \text{ L}^{-1} &= (absM - 0.0147) / 0.297 \end{aligned}$$

donde **absM** es la absorbancia de la muestra medida en espectrofotómetro

❖ Amonio (NH₄⁺): la concentración de **amonio** de las muestras se determinó de acuerdo a la técnica del indofenol de Strickland & Parsons (1972). Para muestras que presentaban baja concentración de amonio, se utilizaron 25 mL de muestra, mientras que para aquellas muy concentradas se diluyó la muestra 5, 10, 25, 50 o 100 veces, según el caso. Para cada medición se incluyeron blancos de agua destilada.

Analíticamente, la técnica del indofenol consiste en que la muestra de agua es tratada a temperatura ambiente en un medio alcalino de citrato con hipoclorito de sodio y fenol, en presencia de nitroprusiato de sodio el cual actúa como un catalizador. Así se forma con el amonio un complejo, el azul de indofenol, cuya concentración se mide en espectrofotómetro a 640 nm.

También se realizó una curva de calibración con 3 concentraciones de sulfato de amonio (1.5, 3 y 4.5 $\mu\text{g at N L}^{-1}$) en forma conjunta con las mediciones realizadas. A partir de dicha curva se obtiene el valor F para la concentración de 1.5 $\mu\text{g at N L}^{-1}$ el cual se utiliza en el correspondiente cálculo de concentración.

La concentración final de amonio se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1} = (\text{abs M} - \text{abs B}) \times F \times \text{dilución} \times 0.014$$

donde **abs M** es la absorbancia de la muestra y **abs B** la del blanco; **F** es el factor de conversión que se toma de la curva de calibración (**F= 3/(Es-Eb)**); donde **Es** es la absorbancia dada por la recta para la concentración de 3 mg N-NH₃ L⁻¹ y **Eb** es la absorbancia del blanco) y **0.014** es el factor de conversión de unidades (de $\mu\text{g at N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ a $\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$).

Materia Orgánica Particulada

Esta técnica consiste en la determinación del contenido de materia orgánica particulada por oxidación húmeda con dicromato de potasio en un medio de ácido sulfúrico concentrado. Se mide la disminución en la absorbancia del color amarillo del dicromato (Cr^{7+}), después de su reducción (a Cr^{3+}) por la materia orgánica presente. Se utilizó un espectrofotómetro leyendo la extinción del blanco contra la muestra a 440 nm de longitud de onda. Todas las determinaciones de muestras, estándares y blanco se realizaron por duplicado.

Para la calibración se utilizó una solución estándar de glucosa de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir del cual se obtiene un factor F calculado como $F= 120/E$; donde E es la extinción promedio de los tres estándares.

La concentración de MOP se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg C m}^{-3} = (1,1E \times F \times v) / V$$

donde **E** es la extinción medida del blanco contra la muestra; **F** el factor de calibración; **v** el volumen de solución oxidante empleado (mL) y **V** el volumen de muestra filtrado (L).

Sólidos Totales en Suspensión

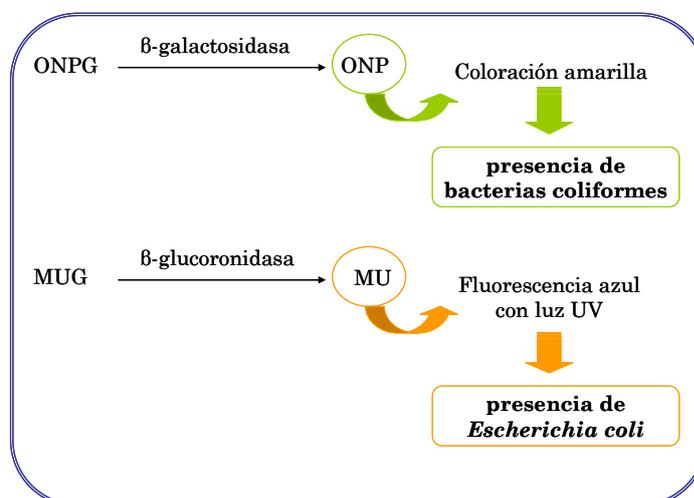
Previamente, los filtros de membrana de acetato de celulosa Millipore de 0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro fueron sumergidos en ácido nítrico diluido (0,7%) durante 48 h, enjuagados varias veces con agua destilada y colocados en una caja de Petri plástica también acondicionada con ácido nítrico diluido. Luego fueron secados en estufa a 50 ± 5°C hasta peso constante (48 h aprox.). Una vez secos, fueron pesados en balanza analítica (*peso inicial*) y guardados hasta su utilización. Un volumen conocido de muestra fue filtrado a través de los mismos y posteriormente fueron secados en estufa a 50 ± 5°C hasta peso constante (48 h aprox.) y nuevamente pesados (*peso final*).

La concentración de sólidos totales en suspensión se calculó de la siguiente manera:

$$\text{mg STS L}^{-1} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{volumen filtrado}$$

Bacterias Coliformes Totales y Fecales

El test ColitagTM es un medio selectivo y diferencial capaz de detectar simultáneamente coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua. Se basa en la presencia de dos enzimas, la β-galactosidasa y la β-glucoronidasa, indicadoras de la presencia de bacterias coliformes y de *E. coli*, respectivamente. El medio Colitag tiene sustratos cromogénicos que, en presencia de dichas enzimas, son hidrolizados y generan productos que liberan un color amarillo a simple vista ó una fluorescencia azul frente a la luz UV (365 nm). Más precisamente:



Previamente se realizaron análisis preliminares a fin de ajustar las diluciones correspondientes a cada muestra. Teniendo en cuenta *a priori* la probable presencia de bacterias coliformes en las mismas y de acuerdo a los análisis preliminares, se procedió a incubar la muestra cruda o diluida (en los casos en donde se esperaba que la cantidad de bacterias fuera relativamente baja o relativamente alta, respectivamente).

En el caso de utilizar muestras crudas, se incubaron 10 tubos de ensayo que contenían 10 ml de muestra con reactivo Colitag. Una vez transcurridas las 24 h, se verificó el número de tubos con coloración amarilla y con fluorescencia azul. Para contabilizar la cantidad de coliformes se utilizó como referencia una tabla estándar para el test NMP, ingresando el número de tubos positivos y obteniendo el NMP/100mL y los límites de confianza al 95% superior e inferior de bacterias coliformes totales y fecales (*E. coli*) (APHA-AWWA-WEF, 1998; Bennett et al 2000).

En el caso de utilizar muestras diluidas, se realizaron tres series de diluciones consecutivas con cinco tubos cada una y 10 ml de muestra diluida en cada tubo. Se utilizaron volúmenes de muestra desde 1 ml (dilución 1:10) hasta 0.00001 ml (dilución 1:1000000). La incubación se llevó a cabo de la misma manera mencionada previamente y luego de las 24 h se verificó la cantidad de tubos positivos en cada serie. En este caso, se utilizó como referencia otra tabla estándar en la cual se ingresa la combinación de tubos positivos de las tres diluciones ensayadas y se obtiene (para las diluciones 10^1 , 10^{-1} y 10^{-2}) el NMP/100mL y los límites de confianza.

En el caso de haber utilizado series de diluciones diferentes a las presentadas en la tabla, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{NMP/100 mL} = (\text{NMP/100 mL de tabla}) \times 10 / V$$

donde **V** es el volumen de muestra utilizado (mL) en la menor dilución realizada.

ANEXO II

FUNDAMENTOS Y CÁLCULOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES

Acetilcolinesterasa (Ellman et al., 1961)

La actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) se mide utilizando el sustrato análogo acetiltiocolina, el cual es convertido en tiocolina por la acción de esta enzima. La reacción de la tiocolina con el sustrato cromogénico ácido ditionitrobenzoico (DTNB) conduce a la formación del ácido nitrobenzoico, un anión amarillo, el cual absorbe fuertemente a 412 nm.

La actividad enzimática se expresa en nM de sustrato hidrolizado* minuto⁻¹* mg proteínas⁻¹ y se mide como el cambio en absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs min}^{-1}$).

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta\text{Abs min}^{-1} * 6}{0.0136 * 0.826 * \text{mg proteína}}$$

Donde:

$\Delta\text{Abs min}^{-1}$: ($\Delta\text{Abs muestra min}^{-1}$ - $\Delta\text{Abs blanco}$) * dilución de la muestra

6: $\text{VolT} / \text{VolM} = 0.3/0.05$; donde VolT: volumen total ensayado en ml (muestra + solución de reacción= 0.3 ml) y VolM: volumen de la muestra en ml= 0.05 ml

0.0136: ϵ (coeficiente de extinción molar -absorbancia de 1M de compuesto puro-) para el ácido tionitrobenzoico a 405 nm, en $\text{ml} * \text{cm}^{-1} * \text{nmol}^{-1}$.

Catalasa (Beutler, 1982)

La actividad enzimática de CAT se determinó midiendo la disminución de la absorbancia debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en espectrofotómetro a 240 nm.

La actividad específica de la catalasa se expresa como micromoles de H₂O₂ hidrolizado por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$), lo que equivale a 1 UCAT mg prot^{-1} y se calcula como:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta\text{Abs min}^{-1} * \text{Dilución}}{0,071 * V * \text{mg proteínas}}$$

Donde:

$\Delta\text{Abs min}^{-1}$: (Abs min^{-1} muestra) – (Abs min^{-1} blanco)

V: volumen de muestra

Glutati3n S- Transferasa (Habig et al., 1974)

La actividad enzimática de GST se mide a través de la conjugaci3n del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con el glutati3n reducido (GSH), indicado como el incremento en la absorbancia a 340 nm.

La actividad enzimática se expresa en milimoles de CNDNB conjugado por minuto por miligramo de proteína ($\text{mmol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) lo que equivale a 1 UGST mg prot^{-1} y se calcula como:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta\text{Abs min}^{-1} * \text{diluci3n}}{V * \epsilon * \text{mg proteínas}}$$

Donde:

$\Delta\text{Abs min}^{-1}$: (Abs min^{-1} muestra) – (Abs min^{-1} blanco)

ϵ (Coeficiente de extinci3n): $9.6 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$

V: volumen de muestra

Lipoperoxidación (Beuge & Aust, 1978)

La reacción de peroxidación a malondialdehído (MDA) que se forma por la ruptura de los ácidos grasos polinsaturados. MDA es el producto de la lipoperoxidación que reacciona con tiobarbitúrico (TBA) para dar un producto rojo con pico de absorción a los 535 nm.

La lipoperoxidación se expresa en nanomoles de MDA formado por miligramo de proteína (nmol MDA mg prot⁻¹).

$$\text{Concentración MDA} = \frac{\text{Abs}}{E * V * \text{mg proteínas}}$$

Donde:

Abs: (Abs muestra) – (Abs blanco)

E (Coeficiente de extinción): 1,56 x 10⁵ M cm⁻¹

V: volumen de muestra

Contenido de Proteínas Solubles (Markwell et al., 1978)

La técnica se basa en el procedimiento propuesto por Lowry (1951), pero con la utilización de dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual permite solubilizar las proteínas evitando utilizar soluciones alcalinas que requieren más tiempo de exposición y evita así la formación de precipitados causados por detergentes no iónicos o catiónicos. Se lee en espectrofotómetro a 750 nm y se cuantifica utilizando una curva estándar de albúmina bovina a partir de una solución madre (concentración 3.8 g dL⁻¹).