



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

## TESIS DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

Implementación de indicadores de alerta temprano en programas integrales de estudio de contaminación en ambientes marinos costeros y estuariales

Daniela María Truchet

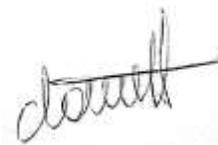
BAHIA BLANCA

ARGENTINA

(Año 2022)

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora 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 ámbito del Laboratorio de Química Marina del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional del Sur (UNS), y del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS) durante el período comprendido entre el 17/09/2017 y el 21/02/2022, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Marcovecchio y la Dra. Natalia S. Buzzi.



Lic. Daniela M. Truchet



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

*A María Ester Rivas, Silvia Nagel, Paz, Lucía y Rocío Truchet... y a todas las mujeres que alguna vez supieron cargarme en sus hombros.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca interna doctoral que me permitió desarrollar mi investigación. A la Universidad Nacional del Sur, en especial al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por su predisposición para ayudar con las consultas en todo momento. Al Instituto Argentino de Oceanografía (IADO, CONICET-UNS) por brindarme mi lugar de trabajo y a la dirección del Instituto.*

*A la Universidad Pública y gratuita y las instituciones científicas estatales de la que me siento orgullosa de formar parte y que me permitieron formarme durante mi carrera de grado en la Universidad Nacional del Litoral y mi carrera de posgrado en la Universidad Nacional del Sur.*

*A mis directores, el Dr. Jorge Marcovecchio y la Dra. Natalia Buzzi por darme la libertad y la confianza para emprender mi camino como científica. A Natalia por acompañarme, confiar y apostar en mí en momentos laborales y situaciones difíciles. A Jorge por sus consejos, ayuda y su confianza.*

*Al Laboratorio de Química Marina, en especial a las Dras. Melisa Fernández Severini, Diana Villagran, Ana Forero, Carla Spetter y a la Lic. Maialén Arduoso, mi gran amiga desde hace más de 10 años. En especial a Ana y Maia por sus consejos, su ayuda y sus energías que me ayudaron durante todo este proceso. Al Lic. Fabián García, por los mates, las charlas cinéfilas y literarias, las campañas, las embarradas, los mates horribles y las locuras.*

*Al “team cangrejo” el Dr. Jorge Bustamante, el Lic. Fabián García y el técnico Víctor Bustos por su compañerismo y generosidad y por sobre todo en hacer mucho más divertidas las campañas. Jorge, espero que donde estés hayas podido encontrar esa paz que buscabas.*

*A lxs de la biblio, los almuerzos, los asados y los afters, quiénes compartimos muchas charlas y momentos de catarsis en momentos donde hacer ciencia no es fácil. Muy especialmente en estos últimos tiempos a Meli, Carli, Tati, Lauti, Aile, Gian, Nacho, Agu, Pauli, Mili y Benja.*

*A Perkin Elmer Argentina, en especial a la Dra. Tamara Zoltán. Nada de esto hubiese sido posible sin vos, sin tu desinterés y todo el equipo. Al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS, CONICET-UNS) por habilitarme el uso del equipamiento de las instalaciones y el agua destilada. Al Laboratorio de Química Analítica*

(*INQUISUR, CONICET-UNS*), especial a la Dra. Claudia Domini por permitirme digerir parte de mis muestras en las instalaciones de la universidad.

He recibido tanta ayuda, y no quiero dejar de agradecer a mi litoral... a mis colegas del *Instituto Nacional de Limnología (INALI, CONICET-UNL)*: mis mentoras, la Dra. Luciana Montalto y la Dra. Mercedes Marchese y mi amigo el Dr. Miguel Saigo, personas invaluable desde que inicié mis primeros pasos en la investigación y aún hoy me siguen aconsejando y guiando. A la dirección del INALI, quienes me permitieron trabajar en la institución en más de una oportunidad.

Muy especialmente al Dr. Leandro Negro y a todo el *Laboratorio de Macrocrustáceos* por la buena predisposición, y a la Lic. Celeste Mora por su ayuda en las determinaciones bioquímicas. Para Leo y Cele no hay más que infinitas gracias por recibirme siempre, con tanta paciencia, dedicación y desinterés, y los momentos divertidos mientras trabajamos.

A las Dras. Soledad Diodato (*CADIC, CONICET*) y Analía Ale (*INALI, UNL-CONICET*) por su excelente predisposición para contestar todas nuestras dudas respecto a los análisis bioquímicos.

A mi querido grupo de extensión y a la Dra. M. Belén Noceti, una persona excepcional que tuve la suerte de cruzarme en Bahía Blanca. Por la confianza ciega en mí, por su amistad, por dejarme formar parte de interminables proyectos que fomentaron mi pensamiento crítico y el cuidado de la naturaleza y nuestros intercambios locos de bióloga y antropóloga. A todos los *pescadores del estuario*. GRACIAS. Por abrirme las puertas de su hogar con un mate cuando hacía frío y una gaseosa o un vaso de agua en los veranos agobiantes. A Miguel Fico seco, por las interminables charlas, risas compartidas, las muestras que me traías, tu interés genuino en los científicos y las científicas, y todas las enseñanzas que me dejaste. Me los llevo en mi corazón para siempre.

A mis *biólogxs FHUC-UNL*: en especial, a mis mejores amigxs, Emanuel Sager y Cintia Palavecino, por ayudarme con mis dudas y seguir siendo mis incondicionales a pesar de la distancia. No quiero dejar de agradecer a Fiami, Maia, Vicki, Flor, Eze, Mati, Fiami, Maru, Xenia, Belén.

A mí compañero, Matías. Gracias por hacer todo más fácil para una persona ansiosa, por entenderme siempre, por la confianza, por cuidarme, conocerme, quererme y ayudarme en todo momento. Somos muy afortunadxs de encontrarnos en esta vida.

Por último, a mi familia, a mi hermana Rocío, con quien decidimos dar los mismos pasos siempre, a mi hermano David, a mi papá Osvaldo y en especial a mi mamá, Silvia, por acompañar de manera incondicional cada una de mis decisiones y ayudarme a volverlas realidad. A Paz, Lucía y a quien viene en camino por llegar a este mundo a iluminar mis días.

## Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en las siguientes revistas indexadas:

- **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., Carcedo, M. C., & Marcovecchio, J. E. (2019). First record of the fiddler crab *Leptuca* (= *Uca*) *uruguayensis* in the Bahía Blanca Estuary (Buenos Aires, Argentina) with comments on its biology in South America. *Regional Studies in Marine Science*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100539>
- **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., Simonetti, P., & Marcovecchio, J. E. (2020). Uptake and detoxification of trace metals in estuarine crabs: insights into the role of metallothioneins. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(25), 31905–31917. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09335-6>
- Simonetti, P., **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., & Marcovecchio, J. E. (2020). First approaches to the depuration process of trace metals in the burrowing crab *Neohelice granulata* from a temperate wetland in South America: Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(29), 36900–36912. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09776-z>
- **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., Negro, C. L., Mora, M. C., & Marcovecchio, J. E. (2021). Integrative assessment of the ecological risk of heavy metals in a South American estuary under human pressures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111498>

## Otras publicaciones vinculadas a la temática donde ha participado la autora:

- **Truchet, D.M.**, Noceti, M.B., Villagran, D.M., & Truchet, R.M., (2022). Alternative conservation paradigms and ecological knowledge of small-scale artisanal fishers in a changing marine scenario in Argentina. *Human Ecology*.
- **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., Negrin, V. L., Botté, S. E., & Marcovecchio, J. E. (2022). First long-term assessment of metals and associated ecological risk in subtidal sediments of a human-impacted SW Atlantic estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113235. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113235>

- Buzzi, N. S., Menéndez, M. C., **Truchet, D. M.**, Delgado, A. L., & Fernández Severini, M. D. (2022). An overview on metal pollution on touristic sandy beaches: Is the COVID-19 pandemic an opportunity to improve coastal management? *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113275. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113275>
- **Truchet, D. M.**, Forero López, A. D., Arduzzo, M. G., Rimondino, G. N., Buzzi, N. S., Malanca, F. E., Spetter, C. v., & Fernández Severini, M. D. (2021). Microplastics in bivalves, water and sediments from a touristic sandy beach of Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113023>
- Buzzi, N. S., Fernández, E. M., Fernández Severini, M. D., **Truchet, D. M.**, Gilbert, A. S., Villagran, D. M., & Spetter, C. V. (2021). Environmental quality assessment by multiple biogeochemical indicators of an intertidal flat under anthropogenic influence from the southwest of Buenos Aires (Argentina). *Environmental Earth Sciences*, 80(7). doi:10.1007/s12665-021-09438-4
- Forero López, A. D., **Truchet, D. M.**, Rimondino, G. N., Maisano, L., Spetter, C. v., Buzzi, N. S., Nazzarro, M. S., Malanca, F. E., Furlong, O., & Fernández Severini, M. D. (2021a). Microplastics and suspended particles in a strongly impacted coastal environment: Composition, abundance, surface texture, and interaction with metal ions. *Science of the Total Environment*, 754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142413>
- Forero López, A. D., Rimondino, G. N., **Truchet, D. M.**, Colombo, C. v., Buzzi, N. S., Malanca, F. E., Spetter, C. v., & Fernández-Severini, M. D. (2021b). Occurrence, distribution, and characterization of suspended microplastics in a highly impacted estuarine wetland in Argentina. *Science of the Total Environment*, 785.
- **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., & Noceti, M. B. (2021). A “new normality” for small-scale artisanal fishers? The case of unregulated fisheries during the COVID-19 pandemic in the Bahía Blanca estuary (SW Atlantic Ocean). *Ocean and Coastal Management*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2021.105585>
- Villagran, D. M., Fernández Severini, M. D., **Truchet, D. M.**, Tartara, M. N., & Marcovecchio, J. E. (2021). A global record of particulated metals on the southwestern Atlantic shelf (Argentine Sea). *Environmental Earth Sciences*, 80(5). doi:10.1007/s12665-021-09492-y

- Fernández Severini, M. D., Buzzi, N. S., Forero López, A. D., Colombo, C. v., Chatelain Sartor, G. L., Rimondino, G. N., & **Truchet, D. M.** (2020). Chemical composition and abundance of microplastics in the muscle of commercial shrimp *Pleoticus muelleri* at an impacted coastal environment (Southwestern Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111700>
- Villagran, D. M., **Truchet, D. M.**, Buzzi, N. S., Forero López, A. D., & Fernández Severini, M. D. (2020). A baseline study of microplastics in the burrowing crab (*Neohelice granulata*) from a temperate southwestern Atlantic estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110686>
- **Truchet, D.M.**, Truchet, R.M., & Noceti, M.B., (2020). Roles y relaciones de género en contextos de pesca artesanal: una reconstrucción a partir de las narrativas orales de varones pescadores del Estuario de Bahía Blanca. *Revista de Estudios Marítimos y Sociales*
- **Truchet, D. M.**, Noceti, M. B., Villagran, D. M., Orazi, M. M., Medrano, M. C., & Buzzi, N. S. (2019). Fishers' ecological knowledge about marine pollution: What can FEK contribute to ecological and conservation studies of a Southwestern Atlantic estuary? *Journal of Ethnobiology*, 39 (4), 584–606. <https://doi.org/10.2993/0278-0771-39.4.584>
- **Truchet, D.M.**, (2018). De espaldas al mar: conflictividad socio-ecológica en el Estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina). La pesquería artesanal frente a las políticas neoextractivistas. *Revista Papeles del Centro de Investigaciones*.

### **Capítulo de libro:**

- **Truchet, D.M.**, & Noceti, M.B., (2021) Small-Scale Artisanal Fishers and Socio-environmental Conflicts in Estuarine and Coastal Wetlands. En: Fiori, S.M., Pratolongo, P.D. (Eds.) *The Bahía Blanca Estuary*. Springer, Cham, pp. 493-519. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_18)

## **RESUMEN**

Los estuarios son cuerpos de agua que conectan la tierra con el océano, y se extienden desde las condiciones puramente marítimas hacia sectores donde el agua marina es diluida por flujos de agua dulce. Estos sistemas proveen de varios servicios ecosistémicos, aunque en las últimas décadas, los estuarios han recibido diversas alteraciones humanas (polos industriales, asentamientos urbanos, puertos, entre otros), que ingresan elementos contaminantes al sistema, como los metales.

El cangrejo cavador, *Neohelice granulata*, es una especie clave de estos ecosistemas porque produce bioturbación, contribuyendo a la oxigenación de los sedimentos, así como a los cambios en la mineralización y biodisponibilidad de la materia orgánica. A su vez, esta especie posee diversas características (primeros eslabones de las redes tróficas, poseer escasa movilidad y fácil crianza en laboratorio, otras) que la configuran en un buen biomonitor de sistemas costeros, específicamente en las costas del Océano Atlántico Sudoccidental, donde se distribuyen sus poblaciones.

En la presente tesis se evaluaron las concentraciones espacio-temporales de metales (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni, Mn, Cr, Fe) en sedimentos finos y en el hepatopáncreas de *N. granulata*, un organismo biomonitor representativo del estuario de Bahía Blanca (EBB), en tres sitios (PC, PR, VM) con distinto impacto antrópico. Además, se analizaron las metalotioneínas (MT) como indicadores de alerta temprano (IAT) del impacto por metales y se evaluó la posibilidad de aplicar otros indicadores bioquímicos como potenciales IAT de este sistema: catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST), peroxidación lipídica (LPO) a través de TBARS, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y glutatión reductasa (GR). Se identificó la actividad de los parámetros hidrológicos que caracterizan este estuario (temperatura, salinidad, pH) como reguladores de la síntesis de estos IAT en el organismo estudiado. Finalmente se evaluó la recuperación de los distintos IAT seleccionados en la misma especie luego de ser sometidos a una fase de depuración; y se analizó la presencia de gránulos ricos en metales (GRM) como estrategia de reserva y/o de detoxificación de metales.

A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que I) Las diferencias temporales en las concentraciones de algunos metales en los sedimentos (Cu, Pb, Cr) pueden resultar dependientes de la mayor actividad biológica de organismos bioturbadores. Las

divergencias espaciales pueden deberse a una mayor actividad humana y a las características hidrodinámicas que gobiernan el transporte de partículas y metales asociados; II) *N. granulata* resultó ser un buen biomonitor del impacto por metales en los sedimentos con mayor bioacumulación de metales esenciales (Cu y Zn); III) Las MT no resultaron buenos biomarcadores bioquímicos de este proceso, y presentaron una función como primera línea de defensa antioxidante, ya que se correlacionaron con la mayoría de los biomarcadores de estrés oxidativo; IV) La actividad de los IAT se encuentra estrechamente asociada a la actividad estacional de los cangrejos y a la acumulación de metales a modo de reservas energéticas; y V) El proceso de depuración de metales en *N. granulata* resultó especie-específico, variable y dependiente de la tolerancia ambiental de las poblaciones que habitaban en los sitios estudiados.

## **ABSTRACT**

Estuaries are water bodies that connect the land with the ocean and extend from purely maritime conditions to sectors where freshwater flows dilute seawater. These systems provide various ecosystem services, although, in recent decades, estuaries have received various human alterations (industrial and urban settlements, ports, among others), which input anthropic elements into the system, such as metals.

The burrowing crab, *Neohelice granulata*, is a key species within these ecosystems because it produces bioturbation, contributing to the oxygenation of the sediments and changes in both the mineralization and bioavailability of organic matter. In turn, this species has several characteristics (bottom of the food webs, low mobility and easy breeding in the laboratory, others) that make it a good biomonitor of coastal systems, specifically on the coasts of the Southwest Atlantic Ocean where its populations are widely distributed.

In the present thesis, the spatio-temporal concentrations of metals (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni, Mn, Cr, Fe) were evaluated in fine sediments and the hepatopancreas of *N. granulata*, a representative biomonitoring species of the Bahia Blanca estuary (BBE), in three sites (PC, PR, VM) with different human impacts. In addition, metallothioneins (MT) were analyzed as early warning signals (EWS) of metal pollution and the possibility of applying other biochemical indicators as potential EWS of this ecosystem was also evaluated: catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), lipid peroxidation (LPO) through TBARS, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and glutathione reductase (GR). The activity of the hydrological parameters that characterize this estuary (temperature, salinity, pH) was identified as regulators of the synthesis of these EWS in the chosen organism. Finally, the recovery of the different selected EWS in the same species was evaluated after being subjected to a depuration experiment; and the presence of metal-rich granules (GRM) was examined as a reserve and/or metal detoxification strategy.

From the results obtained, it was possible to conclude that I) Temporal differences in the concentrations of some metals (Cu, Pb, Cr) may depend on bioturbating organisms' greater biological activity. Spatial divergences may be due to increased human activity and hydrodynamic characteristics that govern the transport of particles and associated metals; II) *N. granulata* was a good biomonitor of metal pollution in sediments with greater

bioaccumulation of essential metals (Cu and Zn); III) MTs were not suitable biochemical biomarkers of metal pollution and presented a function as the first line of antioxidant defence since they correlated with most oxidative stress biomarkers; IV) EWS activity was closely associated with the seasonal activity of crabs and the accumulation of metals as energy reserves; and V) The metal depuration process in *N. granulata* was species-specific, variable and dependent on the environmental tolerance of the populations that inhabit the studied sites.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por el jurado y las juradas.**

Jorge E. Marcovecchio (Director)

Natalia S. Buzzi (Co-directora)

# Índice

<b>Prefacio</b> .....	<b>2</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>5</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>Capítulo 1: Introducción general</b> .....	<b>18</b>
1.1 Metales en ambientes costeros y estuariales: vías de ingreso y destino ambiental .....	18
1.2 Biomonitorio, bioindicadores e indicadores de alerta temprano: los organismos bentónicos como modelo de estudio .....	28
1.3 Antecedentes .....	35
1.4 Objetivos e hipótesis de trabajo .....	36
<b>Capítulo 2: Materiales y métodos</b> .....	<b>39</b>
<b>Parte I: Área de Estudio. El estuario de Bahía Blanca</b> .....	<b>39</b>
1.1 Características geomorfológicas, físicas y químicas .....	39
1.2 Biota: características generales y énfasis en el cangrejo cavador <i>Neohelice             granulata</i> (Dana, 1852) .....	43
1.3 Servicios ecosistémicos, impacto antrópico y la emergencia de conflictos ambientales .....	46
1.4 Sitios de muestreo y su impacto antrópico .....	47
<b>Parte II: Diseño de investigación</b> .....	<b>49</b>
2.1 Diseño de muestreo, toma de muestras y disección de los organismos.....	49
2.2 Ensayos de detoxificación .....	52

<b>Parte III: Protocolos de laboratorio</b> .....	<b>55</b>
3.1 Determinación de metales en sedimentos y tejidos: Cd, Cu, Pb, Zn, Ni, Mn, Cr, Fe .....	55
3.2 Estimación de los límites de detección del método (LDM) .....	56
3.3 Acondicionamiento del material de laboratorio.....	57
3.4 Determinación de indicadores de alerta temprano (IAT) .....	57
3.4.1 Metalotioneínas (MT) .....	57
3.4.2 Proteínas y estrés oxidativo: CAT, GST, GR, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TBARS (LPO).....	58
3.4.3 Respuesta integrada de biomarcadores: Índice IBR .....	59
3.5 Secuestro celular y detoxificación: gránulos metálicos (GRM) .....	60
<b>Parte IV: Análisis de datos</b> .....	<b>61</b>
<b>Capítulo 3: Biomonitorio integrado de metales en organismos bentónicos. <i>Neohelice granulata</i> como organismo modelo</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1 Introducción</b> .....	<b>62</b>
<b>3.2 Materiales y métodos</b> .....	<b>67</b>
3.2.1 Métodos para la evaluación geoquímica de la contaminación por metales pesados en sedimentos.....	68
3.2.2 Bioacumulación de metales en <i>N. granulata</i> : Factor de acumulación biota-sedimentos (FABS).....	70
3.2.3 Índices morfológicos en <i>N. granulata</i> .....	70
<b>3.3 Resultados</b> .....	<b>71</b>
3.3.1 Parámetros físico-químicos .....	71
3.3.2 Metales en sedimentos intermareales superficiales .....	71
3.3.3 Índices geoquímicos .....	76
3.3.4 Medidas biométricas e índices morfológicos en <i>N. granulata</i> .....	77
3.3.5 Metales en <i>Neohelice granulata</i> .....	80

3.3.6 Factor de Acumulación Biota-Sedimentos (FABS) .....	88
3.3.7 Utilización de IAT e índice IBR .....	89
3.3.7.1 Metalotioneínas (MT) .....	89
3.3.7.2 Biomarcadores de estrés oxidativo: TBARS, CAT, GST, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y GR .....	91
3.3.7.3 IBR .....	99
3.3.8 Análisis multivariados: parámetros físico-químicos, biometría, metales y biomarcadores .....	104
<b>3.4 Discusión .....</b>	<b>118</b>
3.4.1 Metales en sedimentos y riesgo ecológico asociado .....	118
3.4.2 <i>N. granulata</i> como biomonitor de metales: morfología, patrones de bioacumulación e indicadores de alerta temprana .....	126
3.4.2.1 Morfología .....	126
3.4.2.2 Patrones de acumulación de metales .....	127
3.4.2.3 Biomarcadores bioquímicos como indicadores de alerta temprana (IAT) para evaluar la contaminación por metales .....	134
3.4.2.3.1 Variación espacial y relación con metales .....	134
3.4.2.3.2 Variación estacional y relación con metales y parámetros físico-químicos .....	139
<b>Capítulo 4: Estudios ecotoxicológicos en <i>N. granulata</i>. Ensayos de detoxificación: metales, IAT y GRM .....</b>	<b>150</b>
<b>4.1 Introducción .....</b>	<b>150</b>
<b>4.2 Materiales y Métodos .....</b>	<b>153</b>
<b>4.3 Resultados .....</b>	<b>154</b>
4.3.1 Medidas biométricas e índices morfológicos .....	154
4.3.2 Distribución, concentración y/o remoción de metales luego del ensayo de depuración .....	156
4.3.3 Metalotioneínas (MT).....	158

4.3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo .....	158
4.3.5 IBR .....	162
4.3.6 Gránulos ricos en metales (GRM) .....	164
4.3.7 Análisis multivariados entre metales, biomarcadores y morfología de los cangrejos luego de la depuración.....	164
<b>4.4 Discusión.....</b>	<b>167</b>
4.4.1 Medias biométricas e índices morfológicos .....	168
4.4.2 Ensayo de depuración: distribución de metales, IAT, IBR y GRM .....	169
4.4.2.1 Metalotioneínas (MT).....	169
4.4.2.2 Zinc (Zn).....	170
4.4.2.3 Cadmio (Cd) .....	172
4.4.2.4 Otros metales esenciales (Mn, Cu, Ni, Fe) y estrés oxidativo.....	175
4.4.2.5 Gránulos ricos en metales (GRM) .....	180
<b>Capítulo 5: Consideraciones finales y perspectivas futuras .....</b>	<b>183</b>
5.1 Conclusiones.....	183
5.2 Futuras líneas de investigación .....	186
<b>Abreviaciones .....</b>	<b>188</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>190</b>

# Capítulo 1: Introducción general

## 1.1 Metales en ambientes costeros y estuariales: vías de ingreso y destino ambiental

Los **ambientes estuariales** son definidos como cuerpos de agua que conectan la tierra con el océano, y se extienden desde las condiciones puramente marítimas hacia sectores donde el agua marina es diluida por flujos de agua dulce (Hobbie, 2000). Estas relaciones tierra-agua dulce-océano los convierte en sistemas altamente sensibles a las alteraciones humanas, y las interacciones entre humanos y estuarios resultan estrechas ya que la mayoría de las actividades humanas contemporáneas ocurren en las zonas costeras. A su vez, los sistemas marinos proveen de varios servicios ecosistémicos, algunos vitales e intangibles como la regulación climática, y otros tangibles como la provisión de alimento y trabajo a través de las pesquerías artesanales que se asientan en sus costas o a través de emprendimientos de acuicultura (Martinetto *et al.*, 2019; Speake *et al.*, 2020).

Sin embargo, en las últimas décadas, los establecimientos de grandes polos industriales, puertos, pesquería y acuicultura de gran escala, y asentamientos urbanos con descargas domésticas residuales han producido que los estuarios reciban de manera directa o indirecta los productos y efluentes generados de estas actividades. Estas actividades, conllevan a procesos de contaminación y eutrofización que impactan las zonas costeras y estuariales, deteriorando la sustentabilidad de estos ecosistemas (Marcovecchio *et al.*, 2013). Sumado a ello, el cambio climático global implica una interacción sinérgica entre impactos humanos y los cambios en las variables climáticas, que ya manifiestan sus efectos en los sistemas estuariales. No sólo se proyectan altas temperaturas, sino que también incremento poblacional, aumentos en el nivel del mar, acidificación oceánica, cambios en los patrones de vientos y corrientes, olas de calor, oscilaciones hidrológicas extremas y tormentas costeras que alterarán la dinámica de nutrientes y contaminantes y su relación con la biota (Kopprio *et al.*, 2015). En este contexto de vulnerabilidad ambiental, la capacidad adaptativa de los sistemas socioeconómicos en América Latina es muy baja, mientras que su sensibilidad al cambio climático y a la contaminación de los sistemas costeros es muy alta (Kopprio *et al.*, 2015).

En suma, entre las alteraciones que afectan a los ambientes costeros, es fundamental destacar cambios en los flujos de nutrientes, materia orgánica y otros materiales desde los continentes hacia el océano; modificación de la estructura de sistemas naturales costeros con el consecuente impacto sobre la dinámica sedimentaria y construcción de geoformas. También se destacan la alteración de los servicios ecosistémicos; aumento de procesos de erosión, eutrofización y contaminación; variaciones en los ciclos biogeoquímicos de elementos críticos para los mencionados ecosistemas, incremento de especies invasoras, entre otras (Marcovecchio *et al.*, 2013; Kopprio *et al.*, 2015; Barletta *et al.*, 2019)

A partir de los '90, la historia de América Latina ha sido caracterizada por la generalización de un modelo extractivo-exportador, que apuntó a consolidar y ampliar aún más las brechas sociales entre los países del Norte (los llamados desarrollados) y del Sur, basado en la extracción de recursos naturales no renovables, la extensión del monocultivo, la contaminación y la pérdida de biodiversidad (Foguelman & Brailovsky, 2009; Svampa, 2012). El modelo de agronegocios y el legado extractivista de Argentina, han estructurado al país como una zona “*ecológicamente sacrificable*” (Svampa, 2012). En otras palabras, en términos de la ecología política, se le asigna un “valor” improductivo a ciertas tierras, mientras que otras se presentan como dignas de ser explotadas y contaminadas. De esta manera, nuestro país emerge como una de las áreas con problemas severos de contaminación, entre ellos, por el impacto de compuestos orgánicos e inorgánicos, como los metales, surgidos principalmente, de un modelo agroindustrial y agroexportador (Lajmanovich *et al.*, 2019, 2022).

En base a las actividades extractivistas de nuestro continente, el ingreso de los metales en sistemas estuariales se ve acrecentado ya que estos sistemas funcionan como “sumideros” de distintas descargas (naturales y/o antropogénicas). Una síntesis reciente de Souza Machado *et al.* (2015) afirma que, en la actualidad, el legado de la contaminación metálica, se encuentra agravado por las descargas de agua dulce, la creciente urbanización y descargas de efluentes domésticos, la industria, la quema de combustibles fósiles, la minería extractiva a cielo abierto, el uso de los acuíferos, la escorrentía superficial y la erosión del suelo y la movilización de sedimentos históricamente contaminados por actividades como los dragados portuarios (Urban *et al.*, 2010).

Los **metales** puros son característicamente sólidos a temperatura ambiente, a excepción del mercurio. Son descriptos como buenos conductores eléctricos y térmicos, brillantes y maleables, que al calentarse emiten electrones fácilmente. Un rasgo que contribuye a este comportamiento de los metales de relevancia ambiental es que generan uniones químicas por los electrones de los orbitales externos. Por lo general, los metales tienden a perder electrones cuando reaccionan con no-metales, y, por lo tanto, son dadores de electrones en la mayoría de las reacciones biológicas y pueden actuar como cofactores enzimáticos. Como la mayoría de estos elementos no existen de manera prominente en su estado elemental, los efectos de los compuestos metálicos, complejos e iones son procesos relevantes para el ambiente. Los procesos biológicos normales pueden estar afectados de manera negativa por la incorporación de estos elementos desde el ambiente y es necesario reconocer las características que influyen los cambios de estado (por ejemplo, la oxidación, ionización e incorporación en la forma orgánica) en el ambiente y el movimiento subsecuente e interacción de dicho metal (Newman, 2014).

De acuerdo a las **propiedades bioquímicas** de los metales, estos también son requeridos por los organismos vivos en pequeñas pero críticas concentraciones para el desarrollo metabólico (**metales esenciales**), aunque a concentraciones excesivas pueden resultar tóxicos. Entre estos elementos, se incluye al cobre, hierro, zinc y manganeso, y la mayoría de esos elementos son requeridos por ser parte de enzimas y otras proteínas usadas en caminos metabólicos fundamentales. Los elementos que no tienen una función bioquímica conocida se denominan elementos **no esenciales**, e incluyen entre otros, al cadmio, mercurio y plomo, que pueden causar toxicidad en concentraciones bajas. Dada la toxicidad de estos metales, los estudios toxicológicos en ambientes costeros han referido principalmente al cromo, cadmio, mercurio y al arsénico, ya que son generados por las actividades portuarias, industriales y agroindustriales e ingresan a los sistemas estuariales por diferentes vías (Rodrigues *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; De Melo Gurgel *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2022).

El **ingreso natural** de los metales a los sistemas acuáticos ocurre a través de procesos **geogénicos** como la erosión y desgaste de rocas, lixiviado o lavado lento de suelos/rocas, sedimentación de unidades geológicas dentro de la cuenca, actividades volcánicas, emisiones hidrotermales del mar profundo, incendios forestales o de pastizales producidos de manera natural (Botté *et al.*, 2013). En tanto, las vías de ingreso de los metales por **procesos**

**antropicos** ocurren a través del desarrollo y crecimiento de centros urbanos y asentamiento informales, de las actividades agroindustriales y ganaderas, de la acumulación de residuos sin tratar, desechos de la navegación (como combustibles) y accidentes (petróleo), minería, refinerías, actividades petroleras asociadas, fundición de minerales, galvanoplastia y otras operaciones industriales. A su vez, de manera más reciente, los residuos nanometálicos de las nanoindustrias han probado ser altamente tóxicos para los organismos marinos (Ale *et al.*, 2019). Todos estos desechos con cargas importantes de metales asociados llegan a los ambientes acuáticos por medio del transporte atmosférico, descargas de ríos, escorrentías difusas, o vertidos directos y/o puntuales (como en el caso de las industrias y ciudades) (Botté *et al.*, 2013; Souza Machado *et al.*, 2015).

Asimismo, el ingreso de los metales antropogénicos ha sido clasificado según su fuente en **puntuales** o **difusas**. La primera de ellas se refiere a los metales particulados y disueltos de origen fluvial, actividades portuarias y dragados, centros urbanos y aguas de escorrentías (Förstner *et al.*, 1986; Marcovecchio, 2000; Urban *et al.*, 2010; Souza Machado *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2022). Por otro lado, las fuentes difusas refieren a los aportes de agroquímicos, principalmente a las escorrentías, junto a las deposiciones atmosféricas y el enriquecimiento de aguas subterráneas (Förstner *et al.*, 1986; Marcovecchio, 2000; Zoffoli *et al.*, 2013; Souza Machado *et al.*, 2015; Buzzi & Marcovecchio, 2018). Un esquema del ingreso de los metales en sistemas estuariales se encuentra en la Figura 1. A modo de síntesis, a continuación, se expondrán las fuentes (naturales y antropogénicas) de los metales presentes en estuarios que se tratarán en la presente tesis en relación a los diferentes usos de la tierra que se presentan en el área en la que se llevó a cabo este trabajo:

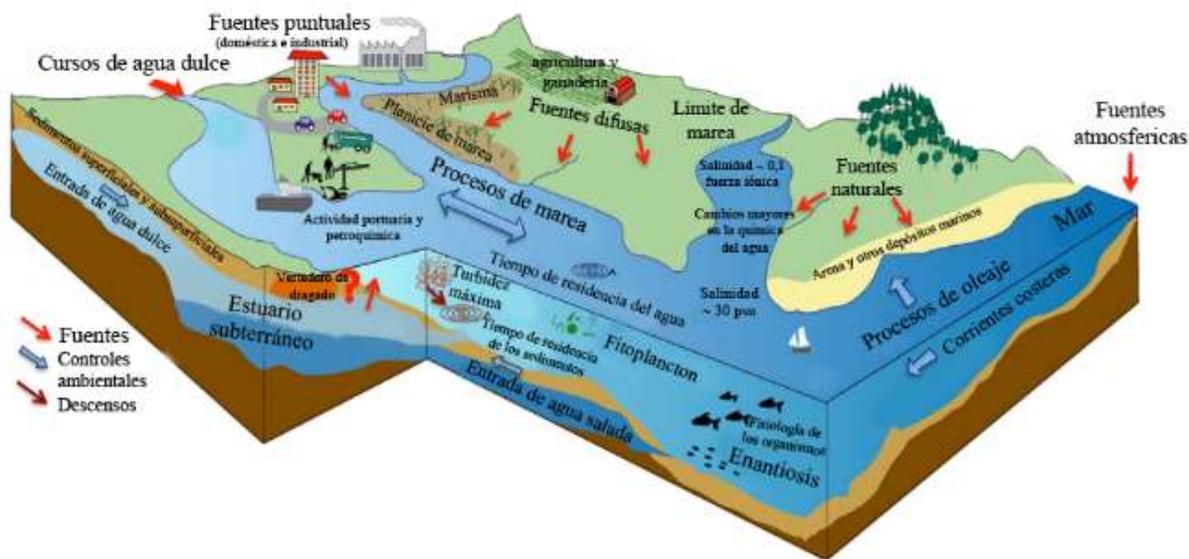
- **Cadmio (Cd)**: una de las fuentes principales del Cd en los ambientes naturales son los agroquímicos (fertilizantes, pesticidas y biocidas). En especial, en los compuestos organofosforados y ciertos fertilizantes, ya que el Cd está presente como una impureza en las rocas fosfatadas utilizadas para la producción de agroquímicos (López Carnelo *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2007) que pueden llegar por escorrentía y deriva a los estuarios y sistemas costeros. Es utilizado en la producción de aleaciones, galvanoplastia y galvanizante. A su vez, es utilizado en pigmentos, baterías, plásticos y numerosos productos, y se genera durante el procesamiento de mineral de zinc y resulta tóxico y carcinogénico (Newman, 2014).

- **Cobre (Cu):** es un metal esencial para las rutas metabólicas biológicas, y además reviste importancia ambiental por ser aplicado en diversas industrias, como la automotriz, la electrónica y la plomería. A nivel mundial, se estima que el cobre es uno de los metales más utilizados en el mundo luego del hierro en la industria galvánica. Estudios en suelos con impacto agrícola, también han localizado al Cu como un metal presente en las fracciones superficiales de los sedimentos (Huang *et al.*, 2007), encontrándose en algunos plaguicidas, funguicidas, bactericidas, hasta alcanzar los cursos de agua por escorrentía, y finalmente, a los estuarios por deriva. Es un elemento esencial, pero se ha probado que es tóxico en altas concentraciones (Newman, 2014).
- **Plomo (Pb):** El Pb se encuentra dentro de los no esenciales caracterizados por su alta toxicidad a bajas concentraciones. Solía utilizarse a gran escala en cubiertas de cables, pinturas, tuberías, naftas y algunos insecticidas hasta que su uso fue prohibido en los años '90, principalmente su aplicación en las naftas debido a estudios toxicológicos en seres humanos que demostraron su persistencia en la sangre, y que bajo una exposición crónica produce anemia y disfunciones neurológicas (Newman, 2014). Sin embargo, algunos estudios recientes en Argentina han detectado grandes concentraciones de Pb en suelos industriales y en agroecosistemas (Albornoz *et al.*, 2016), agua y sedimentos de humedales y ríos. En este último caso, se debe a su continua utilización en perdigones y municiones para la caza de patos y otros animales, que son acumulados en otros compartimentos de la biota acuática (Ferreira *et al.*, 2014, 2015; Romano *et al.*, 2016). De esta manera, el Pb es aún un metal ampliamente utilizado que persiste en los suelos, cursos de agua y que tienen, como último destino, los estuarios y otros sistemas costeros.
- **Zinc (Zn):** el Zn es uno de los denominados metales esenciales para las funciones biológicas metabólicas: conforma varias metaloenzimas y es un cofactor enzimático. Sin embargo, tiene muchas aplicaciones industriales tales como aleaciones, como revestimiento de superficies, componentes de protección contra la corrosión, agentes de fabricación de bronceado y caucho, aditivos de aceite y pigmentos de pintura. En los ecosistemas costeros y estuariales, su ingreso antropogénico se debe a su uso en algunos pesticidas y fertilizantes, y las descargas industriales y domésticas (Albornoz

*et al.*, 2016; Marcovecchio *et al.*, 2016). Por otro lado, el material particulado en suspensión proveniente de las descargas fluviales y de las escorrentías es otra vía fundamental para el ingreso del Zn a los estuarios (Fernández Severini *et al.*, 2013; Marcovecchio *et al.*, 2016; La Colla *et al.*, 2018a). Es el menos tóxico de los elementos que se enlistan en esta tesis (Newman, 2014).

- **Manganeso (Mn):** el Mn es un metal esencial que actúa como cofactor de una serie de enzimas en los organismos filogenéticamente superiores (en especial en mamíferos), donde son esenciales para desintoxicación de los radicales libres de superóxido involucrados en el ciclo oxidativo (Baden, & Eriksson, 2006). A nivel mundial, el Mn es el cuarto metal más utilizado (en toneladas) después del hierro, el aluminio y el cobre. La industria del acero depende directamente de la demanda universal de Mn, y más del 95 % del Mn producido a nivel mundial se utiliza en la desulfuración y el refuerzo de aceros y el otro 5 % se utiliza en la industria química y de baterías (Das *et al.*, 2015). Este elemento llega a los sistemas acuáticos, ya que se encuentra en aguas residuales y drenajes de diferentes sectores industriales, y su remoción es notoriamente difícil debido a la alta estabilidad del ión Mn (II) en soluciones acuosas, que puede resultar tóxico (Barboza *et al.*, 2016). Sus aplicaciones industriales son a través de su forma fosfatada como anticorrosivo del acero y para aumentar el octanaje de las gasolinas sin Pb.
- **Níquel (Ni):** el Ni es otro de los considerados metales esenciales debido a su papel enzimático como compuesto de la mayoría de las hidrogenasas de los organismos. En la industria metalúrgica es utilizado aleado con el hierro para generar resistencia a la corrosión, y se utiliza ampliamente en la producción de baterías (baterías de Ni-Cd). López Carnelo *et al.* (1997) y Zoffoli *et al.* (2013) ubicaron al Ni entre los metales hallados en suelos impactados por el uso de agroquímicos en agroecosistemas latinoamericanos. En tanto, los análisis geoquímicos de Gu *et al.* (2014) llevan a concluir que las concentraciones antropogénicas de Ni halladas en el ambiente, son particularmente, por los desechos industriales de la galvanoplastia.. En concentraciones lo suficientemente elevadas, el Ni es tanto tóxico como carcinogénico (Newman, 2014).

- **Cromo (Cr):** el Cr es un metal altamente tóxico utilizado en la industria metalúrgica en aleaciones, procesos de cromado y en las pinturas. Su uso más frecuente es en las curtiembres donde el cuero se curte al cromo, utilizando hidroxisulfato de Cr (III). De esta manera, diversos trabajos en sistemas lóticos (Gagneten *et al.*, 2007; Regaldo *et al.*, 2017) han identificado al Cr como un elemento abundante en estos cursos donde las curtiembres arrojan sus efluentes. Por otro lado, varios estudios (López Carnelo *et al.*, 1997; Zoffoli *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2014, entre otros), han detectado al Cr en suelos contaminados con pesticidas organofosforados y fertilizantes de agroecosistemas. De esta manera, la vía de ingreso de este elemento a estuarios puede ser por fuentes puntuales industriales y difusas a través de la deriva de agroquímicos en el agua. A su vez, el Cr es utilizado en aleaciones, industria catalítica, pigmentos, preservadores de la madera, anticorrosivos, y en los sistemas marinos, puede estar presente como Cr (VI) o Cr (III) (Forero López *et al.*, 2021a), el primero de ellos es carcinogénico para los seres humanos y es el más tóxico de las dos formas (Newman, 2014).
- **Hierro (Fe):** el Fe es otro metal esencial y el más abundante en la tierra. En los organismos posee diversas funciones metabólicas, en especial a nivel mitocondrial, enzimáticas y estructurales (composición tisular, de eritrocitos, proteínas, ARN, entre otras). En el caso de las industrias, es el metal más empleado en aceros (aleaciones férreas) en vehículos, tuberías, tintes, herramientas y otros elementos estructurales debido a su gran resistencia. Además, su combinación en conjunto con el Cr genera acero inoxidable, que es uno de los compuestos más utilizados en las industrias.



*Figura 1: Modelo conceptual de las variables físico-químicas y biológicas, procesos del comportamiento y toxicidad de los metales, y entrada natural y antropogénica de metales a un estuario. Fuente: Modificado de Souza Machado et al. (2015).*

Con respecto de la toxicidad de los metales, Monserrat *et al.* (2007) ha realizado una revisión sobre los efectos a nivel fisiológico que surgen de la interacción biota-metales en ambientes estuariales. La complejidad del estudio de los efectos nocivos en estuarios se debe a que éstos se encuentran modulados por parámetros oceanográficos (en especial la salinidad y el pH) y los factores fisiológicos y metabólicos intrínsecos de cada *taxa*. Los estuarios, por lo general, poseen gradientes de salinidad entre la parte interna (con menor salinidad debido a los aportes fluviales) y externa (con mayor salinidad debido al ingreso marítimo) y el estudio de la toxicidad por metales es más complejo porque la fisiología de los organismos cambia con los aumentos de salinidad (Alsop & Wood, 2011; Brooks *et al.*, 2011).

Una vez absorbidos por el organismo, los metales pueden ser localizados o no en un órgano o molécula blanco, conocida como “**sitio de acción**” (p.ej., hígado en vertebrados, hepatopáncreas en crustáceos, glándula intestinal en bivalvos, entre otros). La idea más aceptada es que la toxicidad es proporcional a la acumulación de un determinado metal en el blanco de toxicidad. El concepto de “**bioacumulación**” considera los procesos básicos de **consumo** o **ingreso**, **biotransformación** y **eliminación** o **detoxificación** (Newman, 2014). La **bioacumulación** es la acumulación neta de contaminantes en los organismos desde todas las fuentes, incluida el agua, el aire y las fases sólidas del ambiente (sedimentos, alimento,

suelo, partículas suspendidas en aire y agua). Refiere a una sustancia química absorbida por un organismo a través de todas las rutas de exposición, como ocurre en el ambiente natural (a través de la dieta y exposición a compartimentos abióticos) (Figura 2) (Arnot & Gobas, 2006).

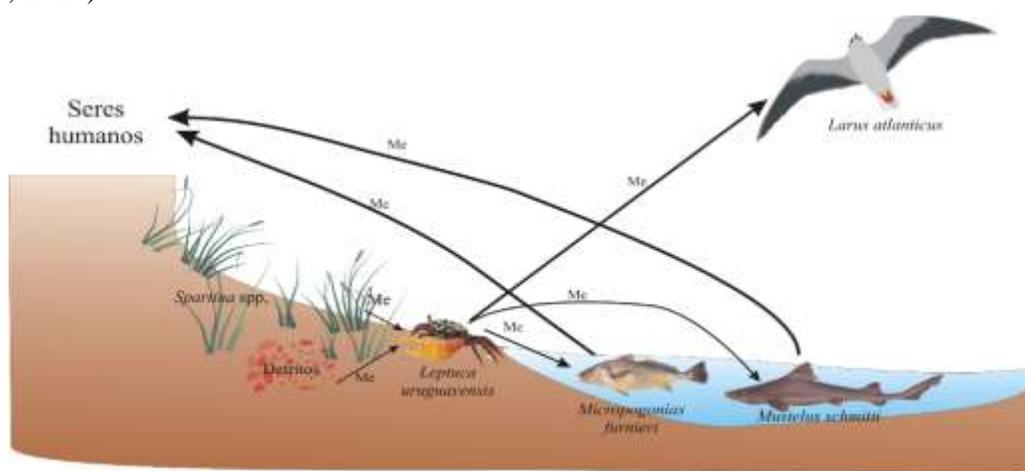


**Figura 2:** Modelo de las vías metabólicas de ingreso, acumulación y egreso de metales en un cangrejo. Abreviación: Me, metal.

El **ingreso** (o “*uptake*”) de los contaminantes al cuerpo de los organismos puede ocurrir por varios mecanismos e implica la dermis, branquias, superficies pulmonares o el tracto digestivo (en especial el intestino). Una vez que el contaminante entra al organismo se convierte en disponible para una posible **biotransformación**, que es la transformación de un compuesto químico a otro mediada por constricciones biológicas. La mayoría de las biotransformaciones involucran catálisis enzimáticas, y por consecuencia, pueden ser sujeto de saturación cinética e inhibición competitiva. Este proceso también puede llevar a la eliminación, detoxificación, secuestro, redistribución o activación de determinados contaminantes, o en el caso de determinados xenobióticos lipofílicos se convierten en compuestos hidrofílicos activos, aumentando la toxicidad de estos contaminantes (Newman, 2014).

Los **metales** también son sujeto de muchas transformaciones biológicas, las cuales resultan en su eliminación (detoxificación) o en su secuestro por parte de los organismos. Los iones metálicos pueden ser unidos de manera rápida a los ligando asociados al plasma y convertirse en disponibles para ser removidos del organismo sin ninguna transformación, tal es el caso de las **metalotioneínas** (MT) y otras proteínas de función similar (MTLPs). Los metales se ligan y son secuestrados desde los sitios de acción por las MT y las MTLPs o en gránulos en tejidos estructurales determinados para ser eliminados (Roesijadi, 1980; Pedersen *et al.*, 1997; Wallace *et al.*, 2003; Chiodi Boudet *et al.*, 2019). Este punto sobre la **detoxificación y secuestro celular** de los metales será descrito con mayor profundidad en el **Capítulo 4**.

Un último concepto para abordar en los compartimentos biológicos es la **biomagnificación**, que es la propagación de una sustancia química a través de la cadena y/o red trófica, donde la actividad termodinámica de un químico en un organismo excede la de su dieta (Arnos & Gobas, 2006), por lo cual el estudio de este proceso debe ser considerado para evaluar posibles riesgos ecológicos para el ser humano (Newman, 2014) (Figura 3). Los predadores tienden a vivir más tiempo que sus especies presa y tienen mayor tiempo para acumular algunos tóxicos que las presas. Como resultado, en los predadores se encontrarán mayores concentraciones de un determinado químico que en una presa, a su vez porque los predadores son frecuentemente más grandes en talla y los efectos alométricos de la bioacumulación de estos químicos puede ser mayor en comparación a las presas (Villagran *et al.*, 2019).



**Figura 3:** Esquema simplificado de la biomagnificación de metales en una red trófica estuarial (Atlántico Sur Occidental). Abreviación: Me, metal.

## 1.2 Biomonitorio, bioindicadores e indicadores de alerta temprana: los organismos bentónicos como modelos de estudio

Con el empleo de organismos en estudios de monitoreo químico, surge la **ecotoxicología** a mediados de los años '80 como una interdisciplina conocida como la “*ciencia de los contaminantes en la biósfera y sus efectos en los constituyentes de la biósfera, incluyendo al ser humano*” (Newman, 2014). La ecotoxicología ha investigado aspectos devenidos de la revolución industrial, la revolución verde, la utilización indiscriminada de químicos, el crecimiento poblacional y las aguas residuales (domésticas e industriales) en organismos y en los seres humanos. Como disciplina científica, ha intervenido en múltiples reglamentaciones sobre los efectos nocivos del uso indiscriminado de determinadas sustancias sobre la salud ecosistémica, basándose en evidencia científica robusta, en especial respecto a los contaminantes persistentes en los ambientes acuáticos (sobre todo los metales, organoclorados, organohalógenos, organofosforados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, PBCs, compuestos organometálicos, entre otros).

De manera tradicional, el análisis químico de las matrices ambientales como el agua y los sedimentos han sido las directrices más utilizadas para determinar el estado de la contaminación por metales en los ambientes acuáticos. Aunque se han producido varios índices geoquímicos para estimar el riesgo ecológico por metales, ninguna de estas medidas ha producido evidencia suficiente acerca de la influencia y posible toxicidad de estos elementos en los organismos que habitan estos ecosistemas. Así, entre los años 80 y 90 surge el “**biomonitorio**” con los primeros aportes al campo de autores como Grady W. Bryan, Philip Rainbow, David Phillips y Michael Depledge (Bryan, 1980; Phillips & Rainbow, 1989; Bryan & Langston, 1992; Depledge *et al.*, 1993; Rainbow & Phillips, 1993, entre otros) como una herramienta científica para evaluar la exposición del ambiente (incluyendo al ser humano) a químicos sintéticos y naturales, basado en el muestreo y análisis de los tejidos y fluidos de un organismo (Zhou *et al.*, 2008).

Esta técnica tiene la ventaja de generar conocimiento disponible para comprender que los químicos que entran a los organismos dejan “marcadores” que reflejan esta exposición, y este marcador puede ser la presencia o ausencia del químico en sí mismo. A su vez, estos marcadores pueden ser alteraciones (a escala bioquímica y fisiológica) u otros cambios biológicos producto de la acción de estos químicos (aislados o en sinergia) (Zhou *et al.*,

2008). Por lo tanto, el biomonitoreo puede ofrecer datos directos acerca de la presencia de estos elementos, los efectos potenciales y su toxicidad, reflejando efectos deletéreos en la escala biológica.

Para Rainbow & Phillips (1993), el término “**biomonitor**” en el estudio de los metales en sistemas acuáticos refiere a aquellos *taxa* que acumulan metales en sus tejidos, y por ello pueden ser analizadas para monitorear la **biodisponibilidad** de tales tóxicos en ecosistemas fluviales, estuariales y marino/costeros. Un biomonitor provee información integrada en el tiempo de los niveles de metales disponibles en el ambiente (tanto en el agua como en el sedimento), respondiendo a la fracción de la carga de metales que tienen relevancia toxicológica directa (es decir, aquellos metales biodisponibles) (Rainbow, 1995).

Los **biomonitores ideales** deben cumplir criterios de selección minuciosos, tales como (i) ser sedentarios, representando la contaminación local; (ii) abundantes en los sitios de interés y en áreas cercanas con una distribución amplia para establecer comparaciones y muestreos repetitivos; (iii) sedentario; (iv) fáciles de identificar y muestrear; (v) grandes en talla como para ser analizados; (vi) resistentes al estrés de la manipulación causado por los estudios de laboratorio o el trasplante en el campo; (vii) tolerantes a la exposición de variaciones ambientales en los parámetros físico-químicos; (viii) con capacidades de acumular grandes concentraciones de tóxicos sin morir; (ix) ciclo de vida largo para realizar comparaciones en distintos estadios de vida; (x) presentar tejidos o células blanco para análisis a nivel microscópico; (xi) ocupar una posición fundamental en la red trófica, (xii) reflejar una buena relación dosis-efecto (Rainbow & Phillips, 1993; Zhou *et al.*, 2008).

De manera más reciente, Newman (2014) sumó a la discusión de los términos el empleo de **biomarcadores** como sinónimo de **bioindicadores** para algunos trabajos científicos y lo definió como una célula, tejido, fluido corporal, cambio fisiológico o bioquímico en un determinado individuo, que es utilizado de manera cuantitativa durante el biomonitoreo ya sea para implicar la presencia de contaminantes significativos o como un sistema de alerta temprana para efectos inminentes.

Markert *et al.* (2013) proponen que ambos términos identifican la presencia de una sustancia química en un organismo, pero que un **bioindicador** es un indicador activo de contaminación, mientras que un **biomonitor** es un indicador pasivo, es decir, uno es un indicador de efecto, mientras el otro es un indicador de acumulación. Para estos autores y

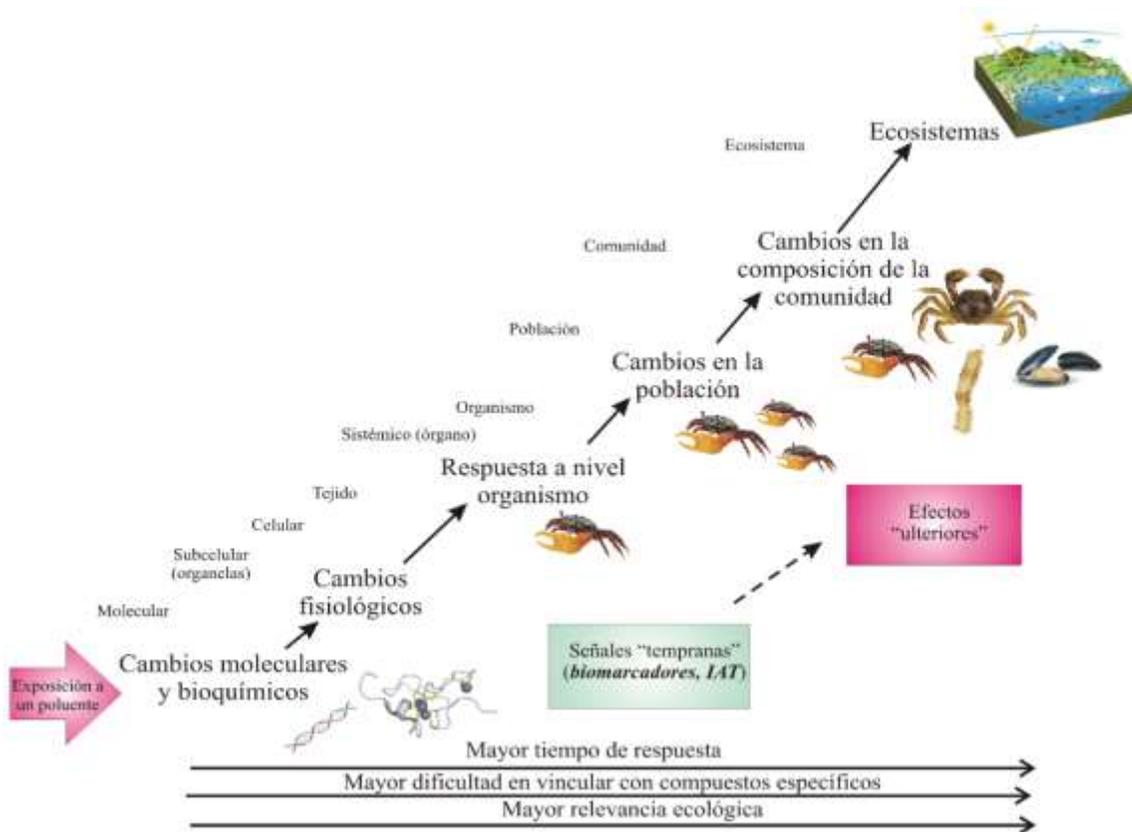
autoras, las diferencias conceptuales no son contraposiciones, sino que reflejan dos aspectos diferentes de un mismo análisis que resulta complementario. Así, la acumulación de una sustancia por un organismo es una reacción de exposición al compuesto/químico/elemento, que resulta un reflejo cuantitativo de su presencia en un “indicador de efecto” (cambios morfológicos, bioquímicos, celulares, gránulos metálicos en invertebrados, entre otros) (Markert *et al.*, 2013). No obstante, en la literatura aún no hay consenso sobre cuando utilizar uno u otro término. A los efectos de la presente tesis, se utilizara el término biomonitor propuesto por Rainbow & Phillips (1993) y respaldado por Markert *et al.* (2013), en lugar de bioindicador.

Los **biomarcadores** son parámetros biológicos medibles a nivel sub-organísmico (genético, enzimático, fisiológico, morfológico), en los que los cambios estructurales o funcionales indican la influencia del ambiente en general y de los tóxicos en particular, en términos cualitativos, y a veces también en forma cuantitativa (por ejemplo, la inducción de determinadas enzimas específicas como Citocromo P450 o MT a hidrocarburos y metales, respectivamente) (Markert *et al.*, 2013). La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (ATSDR, 1994), define un biomarcador o marcador biológico como una: “*alteración inducida por un xenobiótico en algún componente celular o bioquímico, o bien en un proceso, estructura o función que es medible en un sistema biológico o en una muestra que son clasificados de acuerdo a su exposición, efecto y susceptibilidad*”. Los biomarcadores también pueden identificar que un tóxico determinado estuvo en cantidades suficientes por un tiempo determinado como para desencadenar respuestas o un efecto en un organismo (Newman, 2014). Ya que los químicos tienen un efecto cascada en los distintos niveles de organización ecológicos, los biomarcadores se han desarrollado para medir los efectos en dichos niveles (Tabla 1, Figura 4).

**Tabla 1:** Tipos de biomarcadores en distintos niveles de organización biológica señalando los que se utilizaron en la presente tesis.

<i>Nivel biológico</i>	<i>Ejemplo de biomarcador</i>
<i>Moléculas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Actividades y/o contenido enzimático</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• mRNAs específicos</li> <li>• Aductos de ADN</li> </ul> </li> </ul>

<i>Células</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteraciones estructurales y funcionales de organelas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferación de retículo endoplasmático <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Gránulos celulares</u></li> </ul> </li> <li>• Aberraciones cromosómicas</li> <li>• Formaciones de micronúcleos</li> </ul> </li> </ul>
<i>Órganos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Índice hepatosomático</u></li> <li>• Índice gonadosomático</li> <li>• Alteraciones histopatológicas</li> </ul>
<i>Individuos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parámetros fisiológicos <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Factor de condición</u></li> <li>• Fertilidad e <i>imposex</i></li> </ul> </li> </ul>
<i>Poblaciones</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frecuencia de genes</li> <li>• Estructura de edades</li> </ul>
<i>Ecosistemas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Índices de diversidad</li> <li>• Parámetros funcionales</li> </ul>



**Figura 4:** Estresores ambientales y respuestas fisiológicas en el tiempo. Organismos bentónicos estuariales a modo de ejemplo.

Hay diferentes  **criterios de clasificación**  de los biomarcadores según la literatura. Para Mayer *et al.* (1992) se identifican los  **no específicos**  que integran impactos simultáneos de múltiples tóxicos o factores ambientales (enzimas vinculadas a la peroxidación lipídica, defensas antioxidantes y biotransformación, y transaminasas) y los  **específicos** , que a su vez pueden ser órgano-específicos (transaminasas en hígado u órgano homólogo) o tóxico específico (por ejemplo, acetil-colinesterasa –AChE- en respuesta a ciertos plaguicidas y herbicidas, Cit P450 como respuesta a los hidrocarburos y metalotioneínas en el caso de los metales). No obstante, hace varios años se ha discutido la especificidad ya que se ha demostrado que biomarcadores como la AChE también son inhibidos por la contaminación metálica (Frasco *et al.*, 2005). Por lo tanto, Adams (2002) identificó biomarcadores de  **exposición** , que son respuestas que indican que la exposición a un compuesto o una clase de compuestos ocurrió, pero no informa de los efectos adversos; de  **efecto**  que refieren a las respuestas que indican que la exposición y los efectos adversos han ocurrido, y de

**susceptibilidad** que son respuestas utilizadas para evaluar la limitante adquirida o inherente de un organismo a sobrellevar la exposición a un compuesto químico o a un elemento.

De manera frecuente suelen utilizarse los biomarcadores a nivel bioquímico porque un entendimiento de los efectos a este nivel puede proveer algunas ideas sobre la raíz que pueda causar efectos cascada en los siguientes niveles. Además, la comprensión de los mecanismos bioquímicos puede predecir de manera más efectiva la toxicidad sin testear basados en modelos de acción previamente realizados en químicos que han sido más estudiados. A su vez, si varios contaminantes están presentes, los cambios en los biomarcadores bioquímicos específicos pueden dar cuenta cuál de ellos tiene efectos sobre los organismos. En algunos métodos histoquímicos, la localización de modificaciones bioquímicas en los tejidos también puede proveer información relativa sobre la exposición de un sitio u órgano blanco (Newman, 2014).

En la Tabla 1 se presentan los biomarcadores en distintos niveles de organización, en tanto que la Figura 4 da cuenta de los estresores ambientales y las respuestas fisiológicas en el tiempo de un determinado tipo de compuesto, como los metales. En la presente tesis sólo se implementarán biomarcadores **bioquímicos** (a los que llamaremos **indicadores de alerta temprana, IAT**) y celulares porque los cambios bioquímicos pueden detectarse antes de que los efectos adversos sean visibles a niveles más altos de la organización biológica siendo una herramienta de detección temprana proactiva.

Entre los biomonitores de metales que se han utilizado para la aplicación de biomarcadores en estuarios, se encuentran las plantas (palustres y arraigadas) y los peces. Entre los biomarcadores de las plantas, se han detectado cambios en parámetros morfológicos de las hojas, alteraciones en los tejidos de las raíces y las hojas, enzimas específicas (fitoquelatinas), entre otros (Negrin *et al.*, 2017; Pollicelli *et al.*, 2018; Idaszkin *et al.*, 2019). Los peces han atraído la atención en los biomonitoreos en los años '90 debido a que pueden señalar la contaminación acuática por sus características biológicas especiales como un tamaño del cuerpo relativamente grande, un ciclo de vida largo, fácil de mantener en cultivo, importancia alimenticia, entre otras (Zhou *et al.*, 2008). No obstante, la mayoría de los peces tiene la particularidad de ser migradores y, por ende, de no desarrollar su ciclo de vida en un mismo ambiente, sin poder reflejar los efectos de un contaminante a lo largo de su ciclo de vida.

Por esta razón, para sistemas de agua dulce se han seleccionado especies claves (bentónicas o de tamaño pequeño con capacidad reducida de movilidad) que permitan monitorear los sistemas continentales. Sin embargo, para sistemas costeros y estuariales esto es aún más complejo y en la actualidad se han medido algunos parámetros bioquímicos no específicos como las transaminasas en la “saraquita” (*Ramnogaster arcuata*), que es un pez anfibiótico que desarrolla su ciclo de vida en un mismo ambiente (Blasina *et al.*, 2020). Algunos *taxa* de la fracción planctónica también han sido empleados debido a su gran sensibilidad a los estresores ambientales, y por ser de fácil mantenimiento en cultivo y estar en la base de la red trófica. En estos casos se han medido parámetros fisiológicos, reproductivos (Berasategui *et al.*, 2018), comportamentales y alteraciones enzimáticas e incluso por su ciclo de vida rápido se ha podido generar información a nivel poblacional en ensayos de micro y meso-cosmos.

Sin embargo, los más exitosos han sido los **organismos bentónicos**, en especial grupos como los bivalvos, decápodos y gasterópodos, debido a que cumplen con todos los requisitos que se han presentado en los párrafos anteriores para definir a un buen biomonitor. Los **moluscos** bivalvos filtradores han sido ampliamente utilizados en el estudio de la acumulación de los metales que pueden causar efectos deletéreos a los distintos niveles de organización sub-organismo. A nivel mundial existe el programa de monitoreo “*Mussel Watch*”, que es utilizado para contrastar los datos existentes sobre estos químicos en áreas costeras y estuariales utilizando los bivalvos como organismos “centinela”, ya que son capaces de detectar tendencias en las concentraciones de metales (Zhou *et al.*, 2008).

Aparte de los moluscos, otro grupo que ha sido utilizado como biomonitor han sido los crustáceos **decápodos** debido a poseer escasa movilidad y poseer tejidos abundantes de gran relevancia ecotoxicológica (p.ej., hepatopancreas y branquias). Una vez que los metales son tomados por los crustáceos, a partir de la solución acuosa o por el alimento, forman parte de la fisiología del animal, ya sea siendo transportados por el cuerpo para ser acumulados en un órgano blanco, o para ser excretados (Rainbow, 1998). Las concentraciones de metales acumulados en los órganos y en todo el cuerpo depende de un balance neto entre la ingesta y la pérdida de y desde los diferentes órganos, y de y desde el cuerpo entero. Muchos crustáceos toman más concentraciones de metales del que excretan, y por lo tanto tienen una acumulación neta en todo el cuerpo. Algunos crustáceos, en particular, los decápodos,

parecieran tener una concentración relativamente constante en todo el cuerpo de metales esenciales, como el Cu y Zn en una amplia gama de disponibilidades de metales disueltos. Por otro lado, las concentraciones corporales de los metales no esenciales como el Cd no parecen ser reguladas en los decápodos o en otros crustáceos o invertebrados (Rainbow, 1995), pudiendo ser buenos monitores de estos metales.

### 1.3 Antecedentes

Los trabajos que emplean **biomonitores** costeros y estuariales comenzaron a realizarse en Argentina a finales de la década de 1980 a partir de los trabajos de Jorge Marcovecchio en *taxa* de crustáceos, poliquetos, aves, peces, bivalvos en las costas de la laguna Mar Chiquita (Marcovecchio *et al.*, 1986), donde también se evaluó el potencial de los peces como biomonitor por ser consumidos por el ser humano, concluyendo que ninguno de los taxones empleados era apto para consumo en cuanto a contenidos de Pb y Hg. Con posterioridad, se realizaron trabajos de metales en cetáceos de las costas de Mar del Plata (Marcovecchio *et al.*, 1990) observando biomagnificación del Hg a través de los ítems tróficos y altos niveles de metales en los ejemplares juveniles respecto a estándares internacionales. Los niveles de metales en organismos del estuario de Bahía Blanca comenzaron a ser estudiados por Marcovecchio (1994) y Marcovecchio *et al.* (1998a, b, c; 1990, 1991) en especies de crustáceos y peces como *Paralichtys* sp., *Mustelus schmitti*, *Schroederichthys* (= *Halaelurus*) *bivius*, *Notorynchus cepedianus*, encontrando diferencias en la concentración de metales entre los grupos tróficos de tiburones, por lo cual la dieta fue un factor fundamental en la bioacumulación de metales en estos organismos. A su vez, estos autores y autoras observaron mayores niveles de metales en este estuario respecto a los estudios previos en costas argentinas. En el estuario del Río de la Plata se registraron los primeros estudios de metales en algunos peces como la corvina *Micropogonias furnieri* y la liza o lebranche *Mugil liza* (Marcovecchio & Moreno, 1993; Marcovecchio, 2004), donde se propuso su utilización como biomonitores debido a su importancia como especies de consumo humano.

Respecto al biomonitoreo, el **estuario de Bahía Blanca** fue uno de los pioneros en aplicar esta técnica en distintos organismos planctónicos (Fernández Severini *et al.*, 2009, 2013, 2011, 2017; Villagran *et al.*, 2019), matas microbianas (Spetter *et al.*, 2015a);

macroinvertebrados bentónicos (Simonetti *et al.*, 2012, 2013, 2018; Buzzi *et al.*, 2017; Buzzi & Marcovecchio, 2018; La Colla *et al.*, 2018b), peces (La Colla *et al.*, 2017, 2018c, 2019), plantas (Botté, 2005; Hempel *et al.*, 2008; Negrin *et al.*, 2019), aves (La Sala *et al.*, 2010; Simonetti, 2012; Simonetti *et al.*, 2015) y cetáceos vulnerables (Panebianco *et al.*, 2011, 2013). Sin embargo, los estudios ecotoxicológicos y el biomonitoreo que integre los biomarcadores han sido escasos para este ambiente. Algunos trabajos han analizado la **EC<sub>50</sub>**<sup>1</sup> de algunos metales como el Cd en la diatomea *Thalassiosira curviseriata* (Andrade *et al.*, 2000) sin reportar concentraciones letales ambientales para este organismo. Por otro lado, Ferrer *et al.* (2003, 2006) estudió el **LC<sub>50</sub>**<sup>2</sup> de metales como el Cd, Cu, Zn y Pb en estadios larvales de *Neohelice granulata*. Otros estudios **crónicos** fueron realizados por Buzzi & Marcovecchio (2016) en la misma especie de cangrejo, observando un proceso de reversibilidad de marcadores como las **metalotioneínas** en condiciones de laboratorio con agua de mar artificial, evidenciando que los organismos disminuyen los niveles de estas proteínas en condiciones de laboratorio, luego de estar expuestos a sedimentos en el ambiente con contaminación metálica moderada. Sin embargo, la temática acerca del proceso de **detoxificación** de los metales en organismos bentónicos y el **biomonitoreo integrado con biomarcadores** utilizados como **indicadores de alerta temprano (IAT)**, que puedan dar una perspectiva de los posibles efectos de los metales en el ambiente sobre los organismos, aún no ha sido analizado hasta la presente tesis.

#### 1.4 Objetivos e hipótesis de trabajo

El desarrollo de la presente tesis intenta complementar los modelos clásicos de evaluación de contaminantes inorgánicos como los metales con el análisis de indicadores de alerta temprano, y de esta manera optimizar programas integrales de estudio de contaminación en sistemas costeros, tomando el estuario de Bahía Blanca como caso de estudio. De esta manera, **los objetivos específicos de la tesis son:**

---

<sup>1</sup> Concentración efectiva o de inhibición. Suele utilizarse de forma genérica, luego especificándose el tipo y magnitud del efecto. Por ejemplo, si se trata de la concentración que inhibe el 50% media de la actividad de una enzima o en el crecimiento de algas y plantas (Carriquiriborde, 2021).

<sup>2</sup> Se trata de la concentración que produce una mortalidad/letalidad de 50%.

- 1) Evaluar los niveles de metalotioneínas (MT), indicadores de alerta temprana (IAT) de metales en un organismo representativo del estuario de Bahía Blanca, *Neohelice granulata*.
- 2) Evaluar la posibilidad de aplicar otros indicadores bioquímicos como potenciales IAT de este sistema: catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST), peroxidación lipídica (LPO a través de TBARS), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y glutatión reductasa (GR).
- 3) Analizar los cambios espaciales y temporales del contenido de metales y la expresión de IATs en sedimentos y el organismo seleccionado
- 4) Identificar la actividad de los parámetros hidrológicos que caracterizan este estuario (temperatura, salinidad) como reguladores de la síntesis de estos IAT en el organismo estudiado.
- 5) Evaluar la recuperación de los distintos IATs seleccionados en la misma especie luego de ser sometidos a una fase de depuración.
- 6) Analizar la presencia de gránulos ricos en metales (GRM) como estrategia de reserva y/o de detoxificación de metales en la especie mencionada.

La información generada a partir del desarrollo de los objetivos específicos mencionados, permitirá establecer los ajustes necesarios para la aplicación de esta metodología en cualquier sistema costero marino y/o estuarial de nuestro país. Es por esta razón que los **objetivos generales a alcanzar a largo plazo en esta línea de investigación son:**

- 1) Desarrollar y aplicar protocolos analíticos para la evaluación de IAT de contaminantes inorgánicos en sistemas costeros y estuariales del Mar Argentino.
- 2) Integrar la información obtenida al marco de sistemas de evaluación clásicos para cuantificar las ventajas que estos datos representan en el ambiente elegido como área de estudio.
- 3) Generar un marco piloto integrando ambas metodologías de estudio para diagnosticar con anticipación los potenciales efectos que generan los contaminantes sobre un sistema bajo intervención antrópica, como es el mencionado estuario.

La **hipótesis** que intentaremos sustentar en el siguiente trabajo es:

*Los ambientes bajo presión antrópica de contaminantes inducen la síntesis de IAT en los organismos que los habitan, y el análisis del comportamiento de estas respuestas biológicas*

*permite identificar anticipadamente el inicio de los posibles efectos deletéreos de los tóxicos sobre los sistemas biológicos. Esto, en conjunto, con la realización de análisis químicos y físicos tradicionales, permitiría prever un potencial impacto ambiental y tomar medidas de prevención con tiempo suficiente.*

# Capítulo 2: Materiales y métodos

## Parte I: Área de Estudio. El estuario de Bahía Blanca

### 1.1 Características geomorfológicas, físicas y químicas

La dinámica de los estuarios depende de la geomorfología, contribución de agua dulce, oleaje y condiciones meteorológicas que predominan en el sistema. Basado en las características geomorfológicas, la propagación de la marea hacia el estuario se encuentra fuertemente modificada y puede producir variaciones en la amplitud de la marea a lo largo del canal y de las corrientes de marea resultantes y el transporte residual de sal, sedimentos, nutrientes y contaminantes (Perillo *et al.*, 2008). Desde un punto de vista geomorfológico, la mayoría de los estuarios se encuentran asociados a ríos que permiten una conexión hacia el interior, en especial aquellos que tienen capacidad de navegación. Un menor porcentaje de la mayoría de los estuarios en el mundo no tienen ríos significativos que proporcionan agua y sedimentos. Hasta la fecha, el estuario de Bahía Blanca es una excepción ya que provee escasa agua dulce que esta concentrada en su mayoría en la cabeza y en la zona media del Canal Principal (Perillo & Piccollo, 2021). Aunque no toda la amplitud del estuario constituye un humedal, algunos ambientes intermareales y de aguas someras constituyen humedales y el RAMSAR<sup>3</sup> ubicó a algunos dentro de la clasificación de humedales costeros, donde se incluyen planicies de marea y marismas, ya que cumplen con las características físicas para identificar un humedal:

- El suelo o sustrato debe ser fundamentalmente hidromórfico, no drenado; es decir saturado de agua de manera temporal o permanente.
- Debe presentar una lámina o capa de agua poco profunda o agua subterránea próxima a la superficie del terreno, ya sea permanente o temporal.
- Al menos periódicamente, el terreno debe mantener predominantemente una vegetación acuática o hidrófita.
- La presencia de vegetación y/u organismos únicos adaptados a las condiciones húmedas.

---

<sup>3</sup> <https://creho.org/humedales/tipos-de-humedales/> (Clasificación Ramsar, visto por última vez 21/5/20)

- Zonas de transición entre la tierra y los sistemas acuáticos, el agua constantemente interactúa con la tierra y de esa manera controla el ambiente, así como la vida vegetal y animal asociada.
- Los humedales tienen límites pocos definidos; son espacios de transición, de escasa profundidad y de naturaleza cambiante en tiempo y espacio.

La **marea** es proveedora de más del 80% de la energía necesaria para generar los procesos que ocurren en éstos. Además de ser clave para la introducción de sal y otros elementos marinos, la marea se encuentra asociada a procesos como la erosión, circulación y deposición de los sedimentos aportados por ríos y/o arroyos. De esta manera, la acción de la marea modifica las características del transporte de sedimentos y otras sustancias orgánicas o contaminantes, al igual que cambia las condiciones de la biota que vive en las planicies de marea y marismas asociados (Perillo, 2004).

Según Perillo (2004), el **estuario de Bahía Blanca (EBB)** entra en la clasificación de estuarios **primarios** de antiguos valles fluviales y de planicies costeras. Los estuarios primarios son aquellos en los que su forma es el resultado de procesos terrestres y tectónicos, y la acción del mar no ha producido cambios significativos sobre las formas originales, preservando las características de su formación hasta el presente (Melo, 2004).

Desde el punto de vista **geomorfológico**, el estuario posee una configuración en triángulo con los canales mayores orientados en dirección NO-SE: Principal, Bermejo, Bahía Falsa, Bahía Verde y Brightman (Figura 5). Sobre la costa norte, dos tributarios aportan agua dulce al sistema, siendo el río Sauce Chico el más importante y el que desemboca en la cabecera del estuario. El arroyo Napostá Grande desemboca a 1 km del Puerto de Ingeniero White e incorpora agua junto a una serie de pequeños tributarios que aportan agua al escurrimiento durante las precipitaciones locales, mientras que el resto del tiempo los tributarios se comportan como canales de marea (Cuadrado *et al.*, 2004).

De acuerdo a Montesarchio & Lizasoain (1981), la superficie total del estuario es de 2300 km<sup>2</sup>, de las cuales 410 km<sup>2</sup> corresponden a islas, en tanto el sector intermareal cubre 1150 km<sup>2</sup> y el submareal es de 740 km<sup>2</sup>. Espósito (1986) dividió a la región de estuario en **3 sectores**: a) exterior; b) medio y c) inferior. El sector externo corresponde a la porción externa de la línea que va desde Punta Tejada a Punta Laberinto y está definida por altas planicies de marea separadas del mar por barreras de arena. La porción media posee grandes rasgos

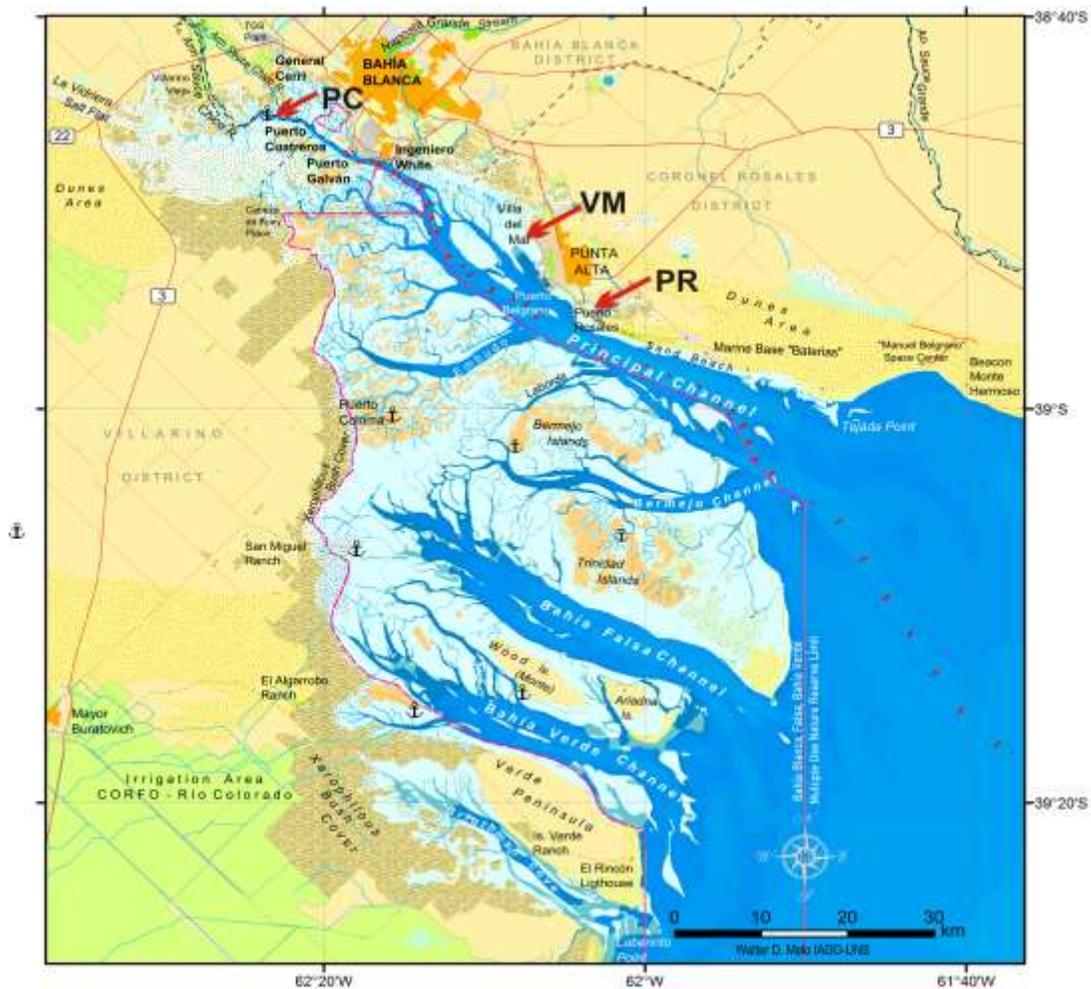
intermareales y se ubica entre la región anterior y la interna (Cuadrado *et al.*, 2004). Mientras que la porción interior está limitada por el continente hacia el oeste y una línea imaginaria que va desde Puerto Belgrano hasta el medio de la Isla Verde, y se caracteriza por extensas planicies de marea y algunas marismas salinas.

Para Cuadrado *et al.* (2004), la cantidad de **sedimento** que sale del sistema estuarial es mayor a la que ingresa y las planicies de marea son ambientes depositacionales para el material más fino (limo y arcilla), así como los bancos submareales para la arena. El estuario está caracterizado por una costa baja formada por amplias planicies de marea (sector intermareal) y canales de diferentes dimensiones, con islas y algunas áreas de marismas salinas. En general, las planicies de marea se encuentran dominadas por la sedimentación de materiales cohesivos (arcillas limosas) mientras que en los sectores más profundos y desembocadura de canales se encuentra principalmente arena en tránsito. En cuanto a al **clima**, el típico patrón climático de la región está dominada por los vientos del O y la influencia del centro de alta presión del Atlántico Sur (Perillo & Piccolo, 2021).

**Químicamente**, el estuario es un sistema hipersalino con registros similares, aunque en ocasiones presenta mayor **salinidad** en la zona interna (donde se ubica Puerto Cuatros) debido a que está más sujeta a procesos de evaporación. En tanto, los valores de la zona interna a la altura de Ingeniero White, suelen ser menores por la influencia de la descarga del arroyo Napostá Grande (Freije & Marcovecchio, 2004). Así, en base a la salinidad, el EBB se trata de un sistema verticalmente homogéneo y horizontalmente heterogéneo con cambios en la salinidad desde la zona interna a la externa (Freije *et al.*, 2008). La **temperatura** del agua está condicionada por la del aire atmosférico ya que es un cuerpo de agua continental somero, en tanto otros parámetros como el **oxígeno disuelto** (OD) son regulados por la alta dinámica del sistema y por lo general las concentraciones de OD son cercanas a los valores de saturación, factor que colabora con la oxidación y remineralización de la materia orgánica presente en el sistema. Estudios previos en el estuario no detectaron zonas anóxicas, pero el Programa de Monitoreo de la Calidad Ambiental de la Zona Interior del Estuario de Bahía Blanca (STAN IADO, 2017) detectó valores por debajo de los sugeridos en una zona con influencia de la descarga cloacal Primera Cuenca.

En cuanto a los **nutrientes** y en base a los análisis históricos, se ha podido determinar que mundialmente, el estuario es uno de los ecosistemas más naturalmente eutróficos (Freije

*et al.*, 2008). También es considerable el aporte de nutrientes al estuario proveniente de las cloacas, en especial de Primera Cuenca y, por otro lado, el aporte de nutrientes es tal que llegan a detectarse en la plataforma de la zona El Rincón. Los **pigmentos fotosintéticos**, en especial la clorofila “a” del estuario, presentan un patrón distinguido en el que se observan valores intermedios en verano con pequeños pulsos. En tanto, en otoño, las concentraciones de pigmentos disminuyen hasta valores similares a los registrados en mar abierto, y hacia fines de junio, comienza el *bloom* fitoplanctónico con una elevada concentración de clorofila “a”, en especial en la zona interna a la altura de Puerto Cuatros (Freije & Marcovecchio, 2004; Popovich *et al.*, 2008; Spetter *et al.*, 2015b).



**Figura 5:** Estuario de Bahía Blanca (EBB). Las flechas indican los sitios de muestreo: **PC**, Puerto Cuatros; **VM**, Villa del Mar; **PR**, Puerto Rosales. Elaboración: Walter D. Melo.

## 1.2 Biota: características generales y énfasis en el cangrejo cavador *Neohelice granulata* (Dana, 1852)

Las **marismas** del estuario son comunidades marinas costeras de plantas vasculares entre las que se destacan *Spartina alterniflora* (que conforman marismas de 192 km<sup>2</sup>), *S. densiflora* y *Sarcocornia perennis* (sectores más pequeños de 72 km<sup>2</sup>). Según Parodi (2004) las marismas poseen funciones ecológicas importantes como la producción primaria, secuestro de CO<sub>2</sub>, fuente de alimentos, provisión de hábitats, estabilización de sedimentos, optimización de la calidad de agua y biofiltración. Es importante destacar que *S. alterniflora* fue introducida en los sectores costeros del Atlántico Sudoccidental como un control de la erosión costera y fue colonizando los sustratos hasta naturalizarse y convertirse en la especie vegetal dominante de las marismas (Bortolus *et al.*, 2015; Pratolongo *et al.*, 2021).

Negrin *et al.* (2015) realizaron una síntesis de los estudios ecológicos de estas comunidades vegetales en el EBB. Entre algunas de las características más relevantes, las autoras exponen que en el sector norte se han perdido aproximadamente 267 hectáreas por año de marismas de *S. alterniflora* desde 1967 hasta 2005 por causas naturales (erosión) y actividades antrópicas como el relleno de tierras para la expansión portuaria e industrial y de los poblados (Pratolongo *et al.*, 2013). La pérdida de estos ecosistemas es preocupante porque la vegetación esta involucrada en el secuestro de carbono orgánico e inmoviliza nutrientes inorgánicos en su biomasa, contribuyendo a la remediación de condiciones eutróficas debido a la baja tasa de descomposición. A su vez, tanto las marismas de *S. alterniflora* como de *S. perennis* pueden actuar en la fitorremediación de metales y otros xenobióticos, secuestrando estos contaminantes de matrices abióticas como sedimentos y agua (Negrin *et al.*, 2019, 2021).

Otro componente importante de estas comunidades del intermareal son las extensas poblaciones del cangrejo cavador *Neohelice granulata*, que es la especie de decápodo dominante en planicies de marea y marismas. Otros cangrejos que se encuentran son el cangrejo de las rocas (*Cyrtograpsus angulatus* y *C. altimanus*) y de manera reciente se registró una población del cangrejo violinista (*Leptuca uruguayensis*) en las planicies de marea de Puerto Rosales (Truchet *et al.*, 2019a) y del anomuro porcelánido *Pachycheles* sp. en el mejillinar de Puerto Cuatrerros (Truchet, inédito). Los cangrejos componen el macrobentos junto a macroalgas, poliquetos, cirripedios (*Balanus* spp.), cnidarios, moluscos

(se destacan el mejillín *Brachidontes rodriguezii* y la ostra invasora del Pacífico, *Magallana gigas*), tunicados y otros crustáceos. Las comunidades macrobentónicas animales constituyen un componente fundamental de la dieta de muchos peces de interés comercial como la corvina rubia (*M. furnieri*), la pescadilla de red (*C. guatucupa*) y el gatuzo (*M. schmitti*) (Chiaromonte & Pettovello, 2000; Sardiña & López Cazorla, 2005a, b) y de aves vulnerables como la gaviota cangrejera (*Larus atlanticus*).

En la presente tesis se utilizó el cangrejo cavador *N. granulata* como organismo biomonitor de metales pesados en el EBB. Spivak (2010) propuso a esta especie como un “animal modelo emergente de países emergentes” dadas sus características de amplia distribución en las costas del Atlántico Sur y la extensa bibliografía e investigaciones que se desarrollaron en distintas ramas (ecología, etología, neurobiología, ecotoxicología, fisiología y bioquímica, entre otras). Luego de especies del Hemisferio Norte ampliamente utilizadas en distintos estudios, como *Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus*, *Scylla serrata* y el género *Cancer*., *N. granulata* es la especie más estudiada en el mundo con mayor número de publicaciones de acuerdo a la base de datos de Scopus (Spivak, 2010).

Este cangrejo pertenece al orden Brachyura, el cual posee muchas características ecológicas que lo hacen un buen biomonitor (Arya *et al.*, 2014) (Figura 6). Estos organismos poseen hábitos cavadores, son semiterrestres y habitan los manglares, marismas y planicies de marea de humedales costeros de todo el Atlántico Sudoccidental desde Brasil (22°57'S; 42°50'O) hasta el Golfo San José en Argentina (28°25'S; 64°36'O). Las **cuevas** son un recurso crítico para estos crustáceos ya que proveen refugio de las condiciones ambientales adversas y de ataques predatorios de diversas especies de aves y peces (Spivak & Sánchez, 1992; Blasina *et al.*, 2010). También son consideradas como un área para los encuentros reproductivos, sitios seguros para que las hembras críen sus huevos y ofrecen protección para los estadios de muda donde estos organismos pueden ser más vulnerables (Luppi *et al.*, 2013; Nuñez *et al.*, 2018).

En el EBB, Angeletti (2017) registró un máximo de 144 cuevas activas en Puerto Cuatrerros por m<sup>2</sup> en relación a otros humedales del estuario como Villa del Mar (88 cuevas activas por m<sup>2</sup>), donde coexisten tanto juveniles como adultos. Esta autora determinó que la especie cubre tanto los sustratos altos con vegetación como los bajos y que las cuevas forman densos agregados superando a los registrados en otros humedales estuariales argentinos como

Mar Chiquita (hasta 60 por m<sup>2</sup>). A su vez, en el estuario también se observó que el efecto bioturbador de *N. granulata* modifica características del **sedimento**, como el porcentaje de humedad, los nutrientes, la materia orgánica, y la composición de los granos del sedimento (Angeletti, 2017; Angeletti *et al.*, 2018a).

En cuanto a otras características ecológicas de esta especie, la actividad de *N. granulata* en las planicies de marea y marismas depende de los ciclos de marea, y la mayoría de las actividades que realizan son en marea baja, cuando los sedimentos de la planicie están expuestos al aire, permitiéndole alimentarse, reproducirse y construir sus cuevas (Luppi *et al.*, 2013). La posición **trófica** de esta especie ha sido difícil de establecer ya que la información cualitativa indicaba que se trataba de una especie omnívora, principalmente detritívora, pero el canibalismo también ha sido observado en casos de individuos grandes sobre los pequeños (Luppi *et al.*, 2001), probablemente debido a la presencia de dietas pobres en proteínas en el campo que son suplantadas por la estrategia canibalista (Bas *et al.*, 2019). En un estudio de los estómagos de esta especie realizado por Barutot *et al.* (2011) en el Atlántico Sudoccidental de Brasil, se hallaron sedimentos, restos de *Spartina* sp. y otras plantas, restos de animales correspondientes a crustáceos y moluscos, siendo *Spartina* sp., el principal ítem trófico que fue constante durante todo el año. En Argentina, Botto *et al.* (2005, 2011) también identificaron a *Spartina* sp. como ítem principal y, a través de firmas de C/N, pudieron demostrar que el cangrejo se alimenta de depósitos, siendo relevantes los restos de las halófitas para su dieta, lo cual también fue corroborado a través de la actividad de la enzima celulasa en estos organismos.

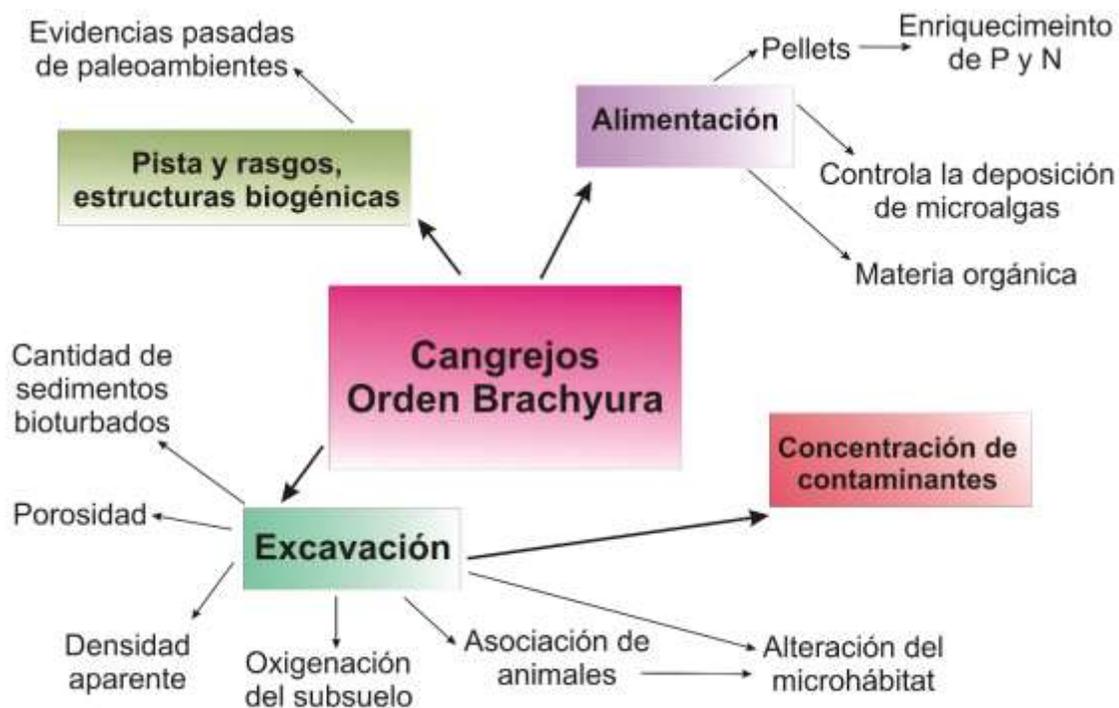


Figura 6: Rol de los cangrejos braquiuros en los ecosistemas. Modificado de Arya et al. (2014)

### 1.3 Servicios ecosistémicos, impacto antrópico y la emergencia de conflictos ambientales

En cuanto a los servicios ecosistémicos que aporta el EBB, Speake *et al.* (2020) identificaron la pesca artesanal, regulación hídrica y depuración del agua, regulación de la calidad del aire, moderación de eventos extremos, control biológico, identidad/herencia cultural, conocimiento científico y recreación. No obstante, para las mismas autoras las presiones en el estuario en las últimas décadas, como la concentración de infraestructura en el borde costero, el dragado y relleno artificial de los humedales, la contaminación ambiental y la invasión de especies exóticas han llevado al deterioro de estos servicios.

Desde la rama de la ecología política, Noceti (2017) y Truchet (2018) han expuesto que el accionar de las políticas neoliberales de cortes extractivistas a partir de los años '90 han llevado al deterioro de la calidad ecosistémica del estuario a partir de estrategias políticas generadas por empresas del Polo Petroquímico y el consorcio de puertos, que se sumaron a la ya creciente urbanización de la región. A principios de los '90, el Polo Petroquímico de

Bahía Blanca (PPBB), que había surgido décadas atrás bajo la administración del Estado Nacional, atravesó mutaciones hacia su privatización bajo grandes empresas multinacionales. Este proceso también llevó a la refundación del Puerto Galván con un dragado portuario para el ingreso de grandes buques de carga. Al respecto, Heredia Chaz (2014) comenta que la ampliación del polo en los '90 demandó una inversión de millones de dólares destinados no sólo a infraestructura y el dragado portuario para el ingreso de buques de exportación, sino también a generar discursos y prácticas políticas que favorecieron industrias extranjeras, extractivas y contaminantes, despojando al estuario de su cultura y naturaleza

Noceti (2017) identificó el conflicto pesquero desarrollado a partir del 2009 como uno de los primeros conflictos socioambientales que devinieron en el EBB por el accionar de las empresas del PPBB y las cloacas sin tratamiento. Las familias de pescadores argumentaron experimentar una gran merma del producto pesquero que afectaba sus economías y principales ingresos económicos y lo atribuían a la contaminación del estuario por las empresas del PPBB, las cloacas y los dragados constantes. El conflicto duró años hasta que, en 2012, se produjo la reconversión pesquera por la cual se indemnizó a muchas familias para que dejen de pescar y a otras se les proveyó de mejores embarcaciones para navegar estuario externo, donde las condiciones del oleaje son más agrestes. Sin embargo, los pescadores de Punta Alta, Villa del Mar, General Daniel Cerri y Villarino reclaman que no fueron parte de ese acuerdo, ya que vendieron sus licencias, pero no recibieron ninguna indemnización ni mejora en sus embarcaciones como la cámara de Ingeniero White (Truchet *et al.*, 2019b, Truchet & Noceti, 2021). Esto devino en un enfrentamiento entre las distintas cámaras pesqueras, y hoy algunos pescadores continúan con su reclamo legal en pos de que las empresas dejen de contaminar el estuario.

#### **1.4 Sitios de muestreo y su impacto antrópico**

Los trabajos de campo de la presente tesis fue realizada en 3 sitios con distinto grado de impacto antrópico: Puerto Cuatreros (ubicado en General Daniel Cerri, Partido de Bahía Blanca), Villa del Mar (Partido de Coronel Rosales) y Puerto Rosales (Próximo a la ciudad de Punta Alta, Partido de Coronel Rosales) (Figura 5). **Puerto Cuatreros (PC)** está localizado en el sector más interno del EBB y se caracteriza por poseer amplias planicies de marea y parches de marismas de *S. densiflora*, y *S. perennis* asociadas a las descargas de

Sauce Chico, junto a extensos cangrejales de *N. granulata*. El puerto solía ser de importancia económica a principios del siglo XX, donde se lo dragaba de manera continua para el ingreso de grandes buques (Noceti *et al.*, 2021). No obstante, el proyecto luego fue abandonado y estas tareas fueron relegadas a Puerto Galván y Puerto Rosales, de manera que PC en la actualidad es un puerto de pesca recreativa, deportiva y artesanal (Truchet & Noceti, 2021) y funciona como una estación científica permanente hace más de 40 años.

Su dinámica físico-química está influenciada por las descargas del arroyo Sauce Chico, uno de los grandes aportes de agua dulce del estuario (62%) (Limbozzi & Leitao, 2008). En verano, en PC los procesos de evapotranspiración predominan por sobre las lluvias y el aporte fluvial, e incrementan la salinidad de la zona interna. PC pertenece al área urbana del distrito de Bahía Blanca (donde el 92,3% de la población pertenece a la ciudad de Bahía Blanca y el 5,4% a los pueblos de Ingeniero White y General Daniel Cerri), siendo los cascos urbanos los principales puntos de contaminación del estuario. De esta manera, los principales impactos del área son por los aportes de efluentes sin tratar de la planta “Tercera Cuenca”, de la planta TGS en General Daniel Cerri (que aportan aguas residuales de los laboratorios provenientes de la planta transportadora de gas) y del arroyo Sauce Chico. En el último caso, los usos del suelo en el área se vinculan a la ganadería bovina como principal actividad económica, seguido de extensas tierras destinadas a la horticultura, lo que conlleva a una gran aplicación de agroquímicos como herbicidas, fertilizantes, pesticidas, biocidas y antiparasitarios que son depositados en los cursos de agua dulce que desembocan en el estuario (Limbozzi & Leitao, 2008; Buzzi & Marcovecchio, 2018; Girones *et al.*, 2019).

**Villa del Mar (VM)** pertenece al sector interno del estuario, en su parte más externa y es un pueblo (327 hab.) habitado, en su mayoría, por familias de pescadores artesanales (Truchet & Noceti, 2021). Entre los años ‘50 y ‘60 tuvo un gran auge de turistas que utilizaban el área como uno de los balnearios más importantes del sudoeste bonaerense, pero la actividad mermó y hoy solamente es utilizado por los locales (Noceti, 2017). El área se caracteriza por poseer extensas marismas de *S. alterniflora* y *S. perennis* con cangrejales de *N. granulata*, y en ocasiones se realizan visitas guiadas con fines educativos por las organizaciones no gubernamentales que se encuentran en la villa. A su vez, VM se encuentra frente a la Reserva de Usos Múltiples “Reserva Natural Bahía Blanca, Bahía Falsa y Bahía Verde” que alberga casi 30000 ha pertenecientes a los partidos de Villarino, Bahía Blanca y

Coronel Rosales, donde se protegen especies carismáticas y vulnerables como el delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei*, diversas especies de tortugas y la gaviota cangrejera *L. atlanticus* (Speake *et al.*, 2020). Si bien la zona parecería indicar que no posee grandes impactos humanos, aún resulta desconocido porque se encuentra en las proximidades de los puertos de Coronel Rosales, Ingeniero White y de las desembocaduras de las cloacas.

Finalmente, **Puerto Rosales (PR)** está ubicado en el sector medio del estuario enfrentado al canal “El Embudo” un área destinada a la pesca artesanal y donde suelen depositarse los refulados del dragado del canal principal y Puerto Galván (Truchet *et al.*, 2019b). El área se caracteriza por poseer amplias planicies de marea con cangreiales dominados por *N. granulata*, seguidos de *L. uruguayensis* en el intermareal superior con una composición de sedimentos más arenosos (Truchet *et al.*, 2019a). En el sector del intermareal, también se ha registrado *Escherichia coli* asociada al microfitorobentos, posiblemente proveniente de las cloacas de Punta Alta (Pan *et al.*, 2013; Spetter *et al.*, 2015a). También se observan algunos parches de *S. alterniflora* en el intermareal y de *S. perennis* en el supramareal (Negrin *et al.*, 2019, 2021). PR es el segundo puerto comercial más importante del EBB, luego de Puerto Galván y también funciona, en menor medida, como puerto pesquero para los pescadores del partido de Coronel Rosales, en especial de la ciudad de Punta Alta (Truchet *et al.*, 2019b; Noceti *et al.*, 2020). En esta área del estuario, los impactos provienen de las actividades portuarias, pesqueras, tráfico marítimo constante, basurales, efluentes industriales de una planta aceitera y cloacales de la ciudad de Punta Alta (Limbozzi & Leitao, 2008; Spetter *et al.*, 2015a; Buzzi *et al.*, 2021).

## **Parte II: Diseño de investigación**

### **2.1 Diseño de muestreo, toma de muestras y disección de los organismos**

Las muestras para la presente tesis se tomaron estacionalmente en una planicie de marea de PC y PR y una marisma de *S. alterniflora* de VM (Figura 7) desde la primavera 2017 hasta el verano 2021<sup>4</sup> (Tabla 2). En cada sitio y estación del año se tomaron los parámetros físico-químicos del agua mediante una sonda multiparamétrica HANNA HI 9828. A su vez, se colectaron muestras de cangrejos hembras y machos adultos de *N. granulata* con > 15 mm

---

<sup>4</sup> Durante el año 2020 no se realizó ningún muestreo de campo debido a la pandemia de COVID-19 y los protocolos sanitarios aplicados por CONICET.

de caparazón de acuerdo a Luppi *et al.* (2004), y sedimentos provenientes del cangrejal. Los cangrejos fueron colectados empleando una red “mediomundo” cuando fue posible desde un muelle en pleamar (Figura 8a) utilizando carne vacuna como cebo, o a mano de los sedimentos expuestos de los cangrejales (Figura 8b). Se recolectaron 60 machos y 120 hembras ya que las últimas son más pequeñas en tamaño, peso y tejido (Buzzi & Marcovecchio, 2016) y 3 réplicas de sedimento superficial del cangrejal. Los cangrejos fueron colocados en recipientes con agua de mar del lugar y los sedimentos se guardaron en doble bolsa plástica rotuladas y se los refrigeró hasta llegar al laboratorio donde se los colocó en frío hasta procesarlos. En el caso de los cangrejos, una vez trasladados al laboratorio se los dejó por 24 horas antes de su disección en frío (Buzzi & Marcovecchio, 2016).

Se confeccionaron 10 pooles de cangrejos de cada sexo, en el caso de los machos cada uno compuesto por 6 organismos y para las hembras por 12. Una mitad de los pooles (5) de cada sexo se utilizó para el análisis de los metales pesados y la otra (5) para el análisis de los IAT. Los cangrejos fueron anestesiados por aproximadamente 20 minutos en frío a  $-20^{\circ}\text{C}$  y diseccionados en frío para evitar posibles movimientos de los metales (Wiech *et al.*, 2017) y degradación enzimática por cambios de temperatura. Previamente a la disección, se los pesó (g) en balanza analítica OHAUSS ( $\pm 0,001$  g de precisión) y se midió el ancho de caparazón con un calibre de alta precisión ( $\pm 0,01$  mm) a partir de la segunda espina (Figura 9). De los pooles de organismos para la evaluación de metales pesados, se extrajeron y pesaron: branquias, hepatopáncreas, caparazón y gónadas con instrumental de disección previamente acondicionado. Este material fue guardado en frío a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a excepción del caparazón que fue secado en estufa a  $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante<sup>5</sup>. En el caso de los pooles de organismos para la determinación de los IAT, se extrajo y pesó el hepatopáncreas y cada pool fue guardado en tubos eppendorf y refrigerado en ultrafreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) hasta su análisis. El mismo procedimiento se siguió para el ensayo de depuración una vez concluido el mismo.

---

<sup>5</sup> En base al incendio ocurrido en el Área de Oceanografía Química del IADO no se realizaron los análisis del resto de los tejidos y sólo se pudo utilizar el hepatopáncreas. No obstante, el resto de las muestras fueron guardadas para análisis futuros.



**Figura 7:** Sitios de muestreo, **a)** planicie de marea de Puerto Cuatrerros (PC), **b)** planicie de marea de Puerto Rosales (PR), **c)** marisma de Villa del Mar (VM)



**Figura 8:** Toma de muestras de cangrejos: **a)** por mediomundo desde un muelle en pleamar y **b)** recolección manual



**Figura 9:** Medida del ancho de caparazón (AC) a partir de la segunda espina en un ejemplar de *N. granulata* de PR (EBB)

## 2.2 Ensayos de detoxificación

Los ensayos de depuración fueron realizados para los dos sexos en primavera en PC, en verano en PR y en otoño en VM (Tabla 2). En cada caso, se recolectaron 120 machos y 240 hembras. Con la mitad de los cangrejos de cada sexo se procedió igual que en la sección anterior y fueron destinados para la cuantificación de metales pesados ( $n= 5, 6$  machos y 12 hembras cada pool) y análisis de biomarcadores ( $n= 5, 6$  machos y 12 hembras cada pool) correspondiendo a los pooles sin tratar (ND). El resto de los cangrejos fueron colocados en peceras con agua de mar artificial (Marine Mix, salinidad: 30)<sup>6</sup>. Para los machos se utilizaron 8 peceras y para las hembras 16 (8 cangrejos por pecera) y se colocaron en cámaras de cultivos programadas para las temperaturas de día/noche y fotoperiodo de acuerdo a la estación climática del EBB según sea el caso (Buzzi & Marcovecchio, 2016).

Cada pecera se encontraba dividida por septos perforados para evitar las peleas entre los organismos (un comportamiento habitual en la especie) y para permitir la circulación y oxigenación del agua suplementada por aireadores (Figura 10). Durante el ensayo, los cangrejos fueron alimentados con pellets de alimento de conejo<sup>7</sup> (el alimento representó el 1% del peso corporal total) cada dos días (Beltrame *et al.*, 2008). Las peceras fueron

---

<sup>6</sup> El uso de este tipo de agua para ensayos con metales pesados fue propuesto por varios autores (Atkinson & Bingman, 1997; Rodríguez *et al.*, 1992, 2000; López Greco *et al.*, 2001; Medesani *et al.*, 2004; Buzzi & Marcovecchio, 2016, entre otros y otras.)

<sup>7</sup> Un alimento rico en fibras vegetales, baja concentración de metales esenciales y <LDM de metales no esenciales.

limpiadas (con detergente no iónico, agua corriente, un enjuague de HNO<sub>3</sub> 0,7% y tres enjuagues de agua destilada) el día posterior a la alimentación para evitar cualquier tipo de contaminación en el agua por las excreciones urinarias y de las heces. El procedimiento fue continuado por 25 días hasta que el experimento fue completado. Finalmente, los organismos fueron seleccionados al azar en 10 pools de 6 organismos machos (M) y 10 pools de 12 hembras (H). Estos pools corresponden a los cangrejos bajo tratamiento o detoxificados (D). Se los anestesió a -20°C, se tomaron las medidas biométricas y se realizó la disección para obtener 5 pools de hepatopáncreas para la determinación de metales y 5 para la determinación enzimática, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de los cangrejos ND. Durante todo el procedimiento se tomaron medidas para evitar una posible contaminación cruzada por metales del material y los organismos y todo el material fue lavado y acondicionado de acuerdo al **apartado 3.3**.



**Figura 10:** Disposición de los cangrejos en las peceras y las peceras en las cámaras de cultivos (Laboratorio de Cultivos, IADO, CONICET-UNS)

**Tabla 2:** Meses, años, estaciones y matrices donde se realizaron las tareas de campo en el EBB indicando las fechas de los ensayos de depuración en *N. granulata*

<b>Sitio de muestreo</b>	<b>Matriz</b>	<b>Mes y año</b>	<b>Estación</b>	<b>Ensayo de depuración</b>
<i>Puerto Cuatrerros (PC)</i>	Cangrejos machos y sedimentos	10/2017	Primavera	Machos de <i>N. granulata</i>

<i>Puerto Rosales (PR)</i>	Cangrejos machos y sedimentos	02/2018	Verano	Machos de <i>N. granulata</i>
<i>Villa del Mar (VM)</i>	Cangrejos machos y sedimentos	04/2018	Otoño	Machos de <i>N. granulata</i>
<i>Puerto Cuatrerros (PC)</i>	Cangrejos hembras y sedimentos	10/2018	Primavera	Hembras de <i>N. granulata</i>
<i>Villa del Mar (VM)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	11/2018	Primavera	
<i>Puerto Rosales (PR)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	11/2018	Primavera	
<i>Puerto Rosales (PR)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	02/2019	Verano	
<i>Puerto Cuatrerros (PC)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	03/2019	Verano	
<i>Villa del Mar (VM)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	03/2019	Verano	
<i>Villa del Mar (VM)</i>	Cangrejos hembras y sedimentos	04/2019	Otoño	Hembras de <i>N. granulata</i>
<i>Puerto Cuatrerros (PC)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	05/2019	Otoño	
<i>Puerto Rosales (PR)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	05/2019	Otoño	
<i>Puerto Cuatrerros (PC)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	08/2019	Invierno	
<i>Villa del Mar (VM)</i>	Cangrejos machos,	09/2019	Invierno	

	hembras y sedimentos			
<i>Puerto Rosales (PR)</i>	Cangrejos machos, hembras y sedimentos	09/2019	Invierno	
<i>Puerto Rosales (PR)</i>	Cangrejos hembras y sedimentos	01/2021	Verano	Hembras de <i>N. granulata</i>

### Parte III: Protocolos de laboratorio

#### 3.1 Determinación de metales en sedimentos y tejidos: Cd, Cu, Pb, Zn, Ni, Mn, Cr, Fe

La **determinación** de metales en sedimentos se realizó siguiendo el protocolo de Marcovecchio & Ferrer (2005) con modificaciones para sedimentos y macroinvertebrados por Buzzi *et al.* (2017). Las muestras de sedimentos fueron secadas en estufa  $60 \pm 5$  °C hasta peso constante, el material fue molido con un mortero y se removieron las piezas de otros organismos como conchillas de caracol y restos de vegetación. Luego se realizó un tamizado de los sedimentos hasta obtener la fracción más fina correspondiente a  $<63$   $\mu\text{m}$ . En el caso de los cangrejos, el tejido blando de cada pool (en el caso de esta tesis sólo se pudo emplear hepatopáncreas) fue liofilizado en las instalaciones del PLAPIQUI (CONICET-UNS) y luego fue molido y homogeneizado con mortero.

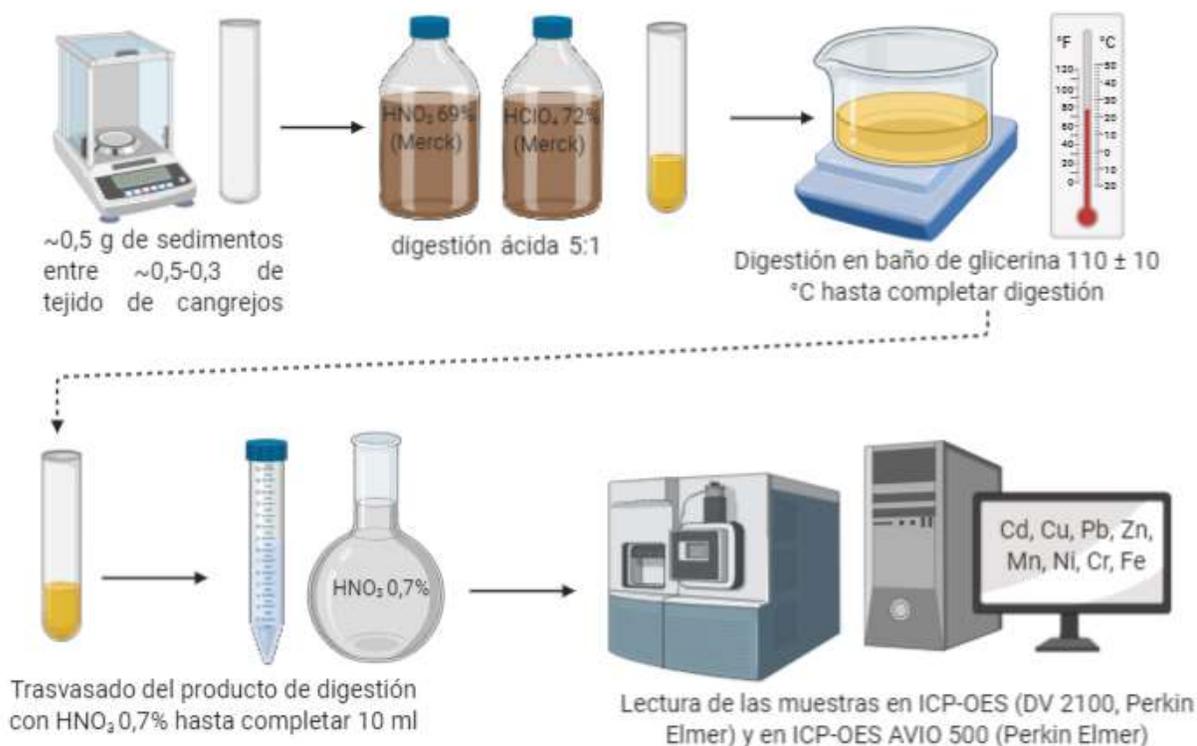
El procedimiento de **digestión de las muestras** es descripto en la Figura 11. Se pesaron submuestras de peso seco de  $\sim 0,5$  g de sedimentos finos y entre  $\sim 0,3-0,5$  g de tejido de cangrejos en balanza analítica OHAUSS. En ambos casos se realizó una predigestión con 5 ml de  $\text{HNO}_3$  (69% pureza analítica, Merck) por 24 horas en tubos de ensayo junto a los blancos del tratamiento que contenían sólo el ácido. Transcurrido este período, se les adicionó 1 ml de  $\text{HClO}_4$  (70-72% pureza, Merck) y los tubos con las muestras y blancos fueron colocados en un baño de glicerina a  $110 \pm 10$  °C hasta completar la digestión. El extracto final de 1 ml fue trasvasado con pipeta Pasteur a un tubo de centrifuga y se agregó  $\text{HNO}_3$  diluido al 0,7% hasta completar los 10 ml. Finalmente se realizó la lectura de los metales (Cd, Cu, Pb, Zn, Mn, Ni, Cr, Fe) en las muestras en ICP-OES (DV 2100, Perkin Elmer y

AVIO 500, Perkin Elmer) en las instalaciones del Área de Oceanografía Química del IADO (CONICET-UNS) y de Perkin Elmer Argentina.

Se utilizaron blancos de referencia, material certificado y reactivos de calidad analítica para el control de calidad. El porcentaje de recuperación de los metales en el material de referencia (n°6, NIES Tsukuba, Japón, harina de tejido de mejillón, y n°2 NIES, Japón, sedimentos) fueron mayor al 90% en los siguientes rangos: Cd: 92,4–98,7%; Cu: 93,1–97,9%; Pb: 95,3–99,8%; Zn 94,1%–97,3%; Mn: 93,4–95,5%; Ni: 94,1–96,3%; Cr: 95,3–98,2% y Fe: 96,1–98,8%.

### **3.2 Estimación de los límites de detección del método (LDM)**

El límite de detección del método (LDM) fue calculado para cada metal multiplicando la desviación estándar de 10 blancos de reactivo por el valor *t-Student* a un nivel de confianza del 99% (n-1° de libertad) de acuerdo al Federal Register (1984) y a la EPA (2016). Para las dos matrices (sedimentos y cangrejos), el LDM obtenido fue el siguiente ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ): Cd: 0,16; Cu: 1,37; Pb: 1,86; Cr: 1,65; Zn: 2,82; Mn: 17,34; Ni: 1,94 y Fe: 31,1. Para los análisis estadísticos, en el caso en que las concentraciones de metales no hayan superado el LDM obtenido, fueron remplazados por la mitad de su valor (LDM/2).



*Figura 11: Protocolos de laboratorio para la determinación de metales pesados en sedimentos finos y cangrejos*

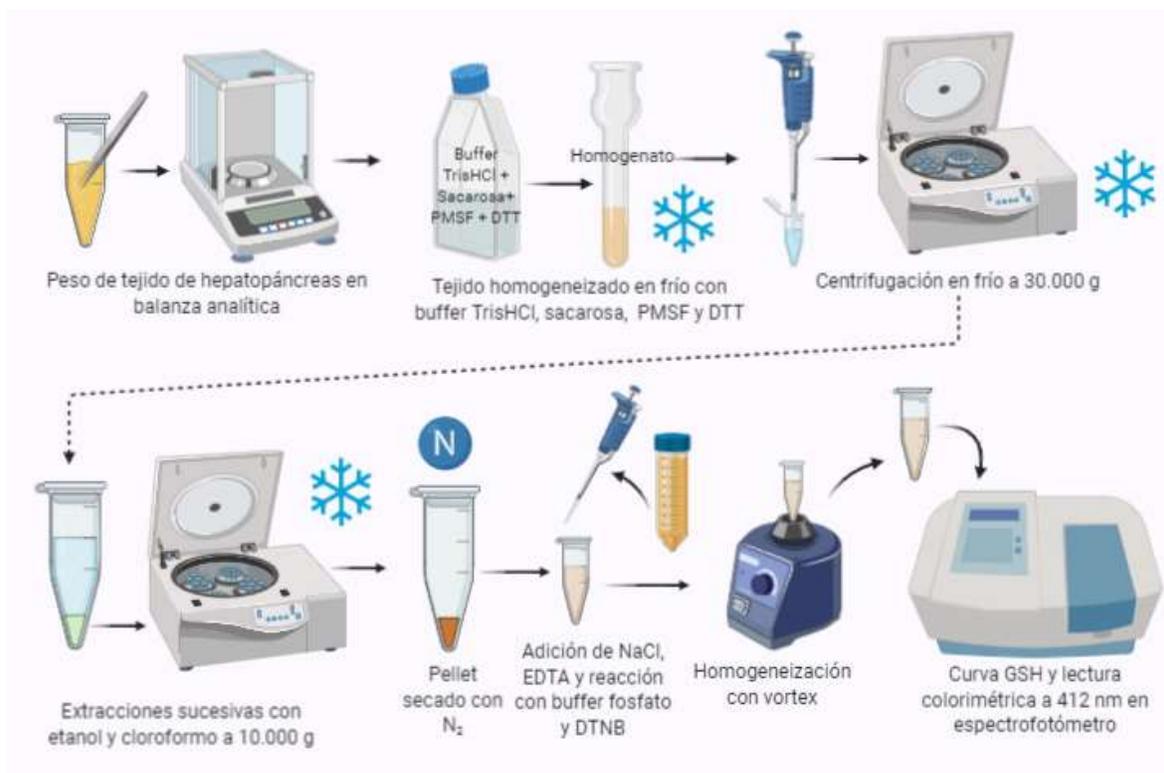
### 3.3 Acondicionamiento del material de laboratorio

Todo el material de laboratorio utilizado durante la obtención y manipulación de muestras, como en la determinación de metales pesados fue **acondicionado** siguiendo la normativa internacional de APHA (1998). Los procedimientos incluyeron el lavado del material con detergente no iónico, 3 enjuagues con agua corriente y 3 enjuagues con agua destilada. En el caso de los elementos de vidrio (tubos de ensayo, Erlenmeyer, vasos de precipitados, peceras, matraces, otros), plástico (tubos de centrifuga, cucharas, otros recipientes) y porcelana (morteros), se los colocó en un baño de  $\text{HNO}_3$  al 5% por 24 h y los elementos de metal (pinzas, bisturís, tijeras) fueron enjuagados con  $\text{HNO}_3$  0,7%. Luego el material fue enjuagado nuevamente 3 veces con agua destilada y se lo dejó secar en estufa y/o en el laboratorio resguardado de las circulaciones de aire para evitar una contaminación cruzada.

### 3.4 Determinación de indicadores de alerta temprano (IAT)

### 3.4.1 Metalotioneínas (MT)

Las metalotioneínas (MT) fueron determinadas a partir del protocolo propuesto por Viarengo *et al.* (1997) con modificaciones de Buzzi & Marcovecchio (2016) y en el esquema de la Figura 12, se representan las etapas principales del protocolo. Los pools del hepatopáncreas de cangrejos hembras y machos fueron homogeneizados en frío usando un homogeneizador Potter–Elvehjem en proporciones 1:4 de un buffer de Tris-HCl 0,02 M (pH 8,6), sacarosa 0,5 M, Ditioneitol (DTT) 1 mM, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 30000 g por 45 minutos a 4°C en las instalaciones del CERZOS (CONICET-UNS). Luego, fueron purificadas por dos extracciones sucesivas con etanol puro y cloroformo. Los pellets obtenidos fueron secados bajo un flujo suave de N<sub>2</sub> y disueltos con NaCl 250 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 4 mM. Finalmente, se adicionó el reactivo de Ellman (DTNB, Sigma) 0,43 mM en buffer fosfato 0,2 M y se procedió a su lectura en espectrofotómetro (Jenway 6500 UV/VIS) a 412 nm. Se utilizó una solución de glutatión reducido (GSH, Sigma 307,32 g mol<sup>-1</sup>) como estándar de referencia. La concentración de MTs se determinó por triplicado y se calculó en base al contenido de cisteínas reportado para la mayoría de los crustáceos decápodos (18 cisteínas residuales por mol) (Serra-Batiste *et al.*, 2010), asumiendo un contenido similar del grupo tiol (SH) en *N. granulata*. Los valores fueron reportados como nmol de MT por gramo (g) de peso húmedo (ph) (Buzzi & Marcovecchio, 2016).



**Figura 12:** Protocolo de laboratorio para la cuantificación de metalotioneínas (MTs) en el hepatopáncreas de los cangrejos. Metodología adaptada de Viarengo et al. (1997).

### 3.4.2 Proteínas y estrés oxidativo: CAT, GST, GR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS (LPO)

Para la determinación de las proteínas, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y la actividad enzimática vinculada al estrés oxidativo, se pesaron aproximadamente 25 mg de tejido del hepatopáncreas que se homogeneizaron en frío con un homogeneizador Potter–Elvehjem utilizando un buffer fosfato 0,1 M (pH 6,5), EDTA 1 mM, DL-ditioeritritol (DTE) 14 mM y glicerol al 20% siguiendo la metodología propuesta por Wiegand *et al.* (2000). Los homogenatos fueron centrifugados en las instalaciones del INALI (CONICET-UNL) a 10000 g por 10 minutos a 4°C, y los sobrenadantes de cada pool fueron guardados a -80°C hasta ser analizados.

La determinación bioquímica fue realizada utilizando un lector de microplaca Biotek Synergy HTK, y cada ensayo fue realizado por triplicado para cada pool. La actividad de la glutatión-S-transferasa (GST) fue determinada a 340 nm, de acuerdo a Habig *et al.* (1974), utilizando 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB, Sigma) como sustrato. La catalasa (CAT) fue leída a 240 nm basado en la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo a Claiborne (1985).

Mientras que la actividad GR se determinó en base a Tanaka *et al.* (1994) con modificaciones para microplaca puesta a punto en el Laboratorio de Química del INALI (CONICET-UNL). A la muestra se le adicionó una solución mezcla (GSSG+NADPH) y buffer Fosfato de Sodio 0,1 M (pH 7,5) y la actividad se leyó a 340 nm durante 10 minutos. La actividad de GST, CAT y GR fue expresada como U por mg de proteína (U mg<sup>-1</sup> prot.).

El contenido de proteína fue determinado siguiendo el protocolo de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar y lectura a 595 nm de longitud de onda. En tanto el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (expresado en μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fue cuantificado a 560 nm de acuerdo a Bellincampi *et al.* (2000), basado en la oxidación de Fe<sup>+2</sup> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido por la reacción de Fe<sup>+3</sup> con naranja xilenol (Sigma) (Negro *et al.*, 2019).

En el caso de TBARS, para los homogenatos se utilizó un buffer fosfato de pH 7,4 obtenido a partir de un fosfato básico (con fosfato dipotásico, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y fosfato ácido (con fosfato monopotásico, H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>). A cada muestra se le adicionó butilhidroxitolueno (BHT 4%) y ácido tricloroacético (TCA 20% P/V), para una posterior centrifugación a 8.000 rpm durante 5 min. Luego, se le agregó ácido tiobarbitúrico (TBA 0,7% P/ V) y se centrifugó. Por último, las muestras fueron colocadas en un baño a 100 °C durante 1 h, para su posterior lectura final en espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm. La actividad de TBARS fue expresada como nmol TBARS mg de proteína<sup>-1</sup> (Fatima *et al.*, 2000; Cazenave *et al.*, 2014).

### 3.4.3 Respuesta integrada de biomarcadores: Índice IBR

Los biomarcadores analizados fueron combinados en un “índice de estrés” general, conocido como “índice de respuesta integrada de biomarcadores” o IBR (por sus siglas en inglés “*integrated biomarker response index*”) (Beliaeff & Burgeo, 2002) que presenta el nivel de estrés en cada sitio y estación de estudio. En esta tesis 6 biomarcadores (CAT, GST, GR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LPO y MT) fueron integrados en el índice IBR. Para cada biomarcador, el procedimiento empleado fue el siguiente (Diodato *et al.*, 2021):

- 1) Se calculó la media y el desvío estándar para cada sitio y estación;
- 2) Se estandarizaron los datos de cada sitio y estación como  $X'_i = (X_i - \text{media } X) / S$ , donde  $X'_i$  = es la media del valor del biomarcador en cada estación y sitio y  $S$  = es la

desviación estándar calculada para cada biomarcador de acuerdo a la estación y el sitio. Esto da una varianza de 1 y una media de 0.

- 3) Usando los datos estandarizados, se computó  $X$  como  $+X'_i$  en el caso de la activación y  $X'_i$  en el caso de la inhibición. Luego, el valor mínimo de cada sitio y estación para cada biomarcador fue obtenido y sumado a  $Z$ . Finalmente, el valor de  $B$  fue calculado como  $B = Z + |\min|$  donde  $B \geq 0$  y todos los biomarcadores se trataron de la siguiente manera:
- 4) Se calcularon las áreas *star plot* multiplicando los valores obtenidos de cada biomarcador ( $B_i$ ) con el valor del siguiente biomarcador, dividiendo cada cálculo por dos y,
- 5) Sumando todos los valores  $[(B1 \times B2) / 2] + [(B2 \times B3) / 2] + \dots [(Bn-1 \times Bn) / 2]$ , lo cual resultó en el *IBR* (promedio de los diferentes cálculos del set de biomarcadores).

Cada biomarcador estandarizado fue graficado como vector en un *star plot* (o gráfico radial). El *IBR* fue definido por el área encerrada en el polígono formado unido por el extremo de cada vector (Broeg & Lehtonen, 2006).

### **3.5 Secuestro celular y detoxificación: gránulos metálicos (GRM)**

La determinación de los GRM se realizó en base a la propuesta de Chiodi Boudet *et al.* (2019). Los GRM en el tejido de hepatopáncreas (~ 0,2 mg) se obtuvieron a partir de múltiples centrifugaciones utilizando NaOH 1 y 0,5 M. La fracción obtenida fue digerida en una proporción 1:3 de HNO<sub>3</sub> y HClO<sub>4</sub> para determinar los metales unidos a esta fracción subcelular. Las muestras fueron leídas en ICP-OES (CENPAT, CONICET) y se expresaron como  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo.

## Parte IV: Análisis de datos

Para esta tesis se realizaron análisis de datos descriptivos en las matrices y biomarcadores analizados como gráficos del tipo boxplot para evaluar tendencias espaciales y estacionales en el software *R Core Team* (2020). Los datos obtenidos se trataron estadísticamente de acuerdo al diagrama que se muestra en la Figura 13 empleando el mismo software estadístico. Cuando hubo interacción entre los factores se utilizó un ANOVA de una o varias vías para los factores. Para las variables que no cumplieron los supuestos necesarios para aplicar el ANOVA y otras pruebas paramétricas (*t-Student*) se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Se obtuvieron las siguientes medidas de resumen: media, error estándar (EE), desvío estándar (DE) y rangos (valores máximos y mínimos) y se realizaron análisis multivariados en los casos necesarios (correlaciones, análisis de componentes principales, similitud por clúster k-medias) utilizando *R Core Team* (2020).

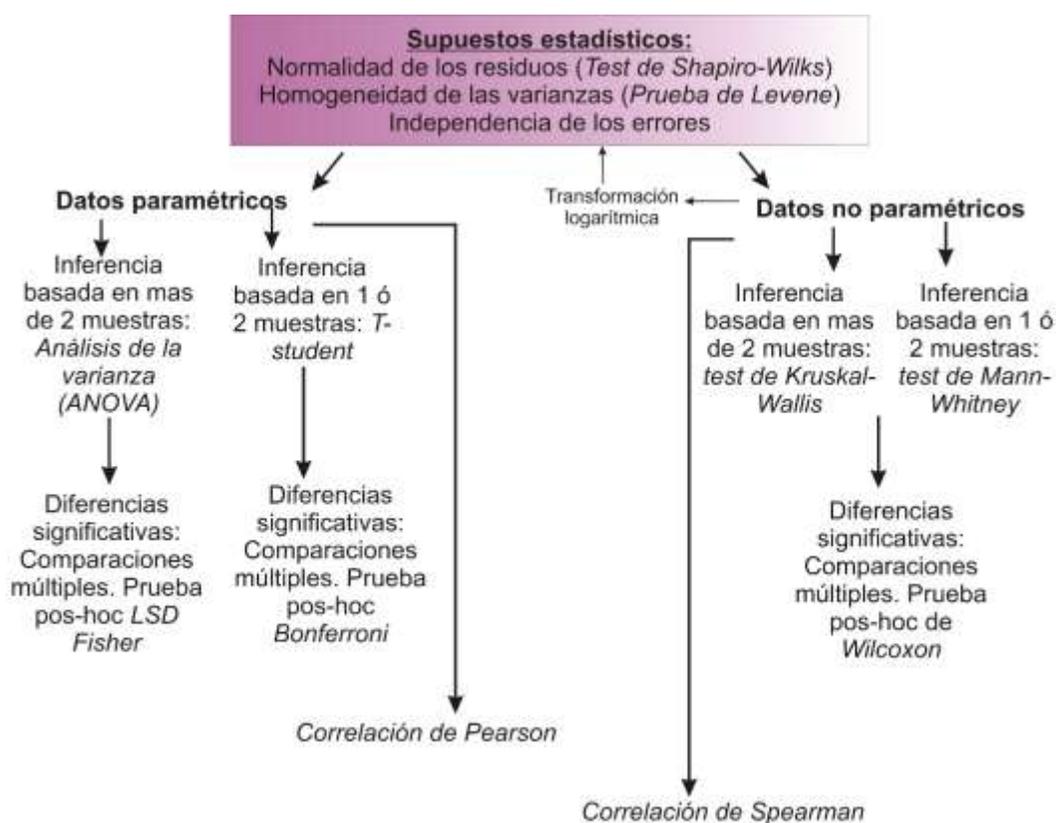


Figura 13: Decisiones y pruebas estadísticas básicas para una o más variables independientes

# Capítulo 3. Biomonitorio integrado de metales en organismos bentónicos: *N. granulata* como organismo modelo

## 3.1 Introducción

Las áreas costeras y estuariales son lugares esenciales para los seres humanos ya que se constituyen como áreas de importancia económica a partir de las pesquerías y de los servicios ecosistémicos que proveen, principalmente la regulación climática (Martinetto *et al.*, 2019). Sin embargo, estas zonas también son el último receptáculo de contaminantes y otras sustancias. En grandes ecosistemas marinos, como los comprendidos en el Atlántico Sudoccidental, las descargas de sustancias y elementos potencialmente tóxicos se han visto incrementadas en áreas costeras debido a los modelos productivos económicos con extensas áreas destinadas a la agricultura, ganadería, industrias, puertos, urbanización y asentamientos urbanos informales (Kopprio *et al.*, 2015; Barletta *et al.*, 2019; Häder *et al.*, 2020). Algunos estudios han demostrado que la restauración de los sistemas costeros y estuariales debido a presiones humanas llevaría al menos cientos de años en comparación con los ecosistemas dulceacuícolas (Borja *et al.*, 2010). A largo plazo, estos problemas en conjunto con los efectos del cambio climático serán difíciles de superar y tendrán impactos en la salud humana, ecosistémica y en las pequeñas economías azules (Allison *et al.*, 2009).

Para evaluar el impacto por metales pesados *in situ* en estos ecosistemas, se ha recomendado el uso de múltiples indicadores y biomarcadores bioquímicos como IAT para su monitoreo, conservación y posible restauración (Martín-Díaz *et al.*, 2008). En tal sentido, la bioacumulación de metales se considera como un biomarcador de exposición e incluye la detección de compuestos en un órgano blanco, aunque no brinda información sobre su significancia toxicológica (Cazenave *et al.*, 2021). Los organismos toman metales de los sedimentos, columna de agua y presas; y el principal ingreso está vinculado a su tipo de alimentación y hábitos ecológicos. En especial, los decápodos son capaces de acumular metales hasta altas concentraciones corporales, dependiendo de la relación entre la captación de metales, y la excreción y la tasa de dilución del crecimiento corporal (Rainbow, 2008).

Cuando un contaminante ingresa al sitio de acción de un organismo, este es susceptible de ser biotransformado, es decir, ser modificado por la acción biológica de determinadas enzimas que pueden contribuir a distintos procesos de detoxificación como la eliminación directa, secuestro, redistribución e incluso la activación del contaminante haciéndolo más tóxico, lo cual se da en el caso de la mayoría de los pesticidas organofosforados de uso actual (Carriquiriborde, 2021). Particularmente, los metales pueden ser biotransformados, secuestrados (unidos a ligandos específicos como las metalotioneínas, MT) o biomineralizados en gránulos celulares. Luego de que en la **fase I** de biotransformación ocurran reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis de los compuestos químicos que desenmascaran o adicionan un grupo funcional reactivo a su molécula, se da lugar a la **fase II**. Esta etapa tiene por objetivo la detoxificación y es en donde se producen reacciones de conjugación, mediante la adición de moléculas endógenas al compuesto químico contaminante con un papel relevante de la GST (Cazenave *et al.*, 2021).

Una vez en el organismo, los metales pueden desencadenar procesos de estrés a los que responden parámetros de **estrés oxidativo**, que ocurren por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Frías-Espéricueta *et al.*, 2022). Cuando las defensas celulares capaces de neutralizar el exceso de ERO no logran ser eficientes, se produce un daño celular (por lo general medido a nivel de lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN) (Figura 14). La producción de ERO se debe al metabolismo aeróbico de los organismos, que utilizan oxígeno como el aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondriales (un proceso esencial), pero que también puede generar algunos radicales libres.

Los **parámetros bioquímicos** (que en esta tesis se emplearán como IAT) proveen información de los efectos de los metales del ambiente en los organismos; y juegan un rol único ya que su detección puede prevenir efectos adversos en niveles de organización supraorganismo (Van der Oost *et al.*, 2003). La exposición de animales marinos a los metales en campo y en condiciones experimentales de laboratorio ha probado la inducción de estrés oxidativo y los organismos han desarrollado mecanismos de defensas antioxidantes a lo largo de su historia natural a través de su actividad enzimática que pueden interceptar e inactivar las ERO para proteger a las dianas moleculares del daño oxidativo.

Algunas de estas enzimas son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasas (como la glutatión peroxidasa, GPx) y la glutatión-S-transferasa (GST). A modo de ejemplo, la SOD convierte el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en tanto la CAT degrada el  $H_2O_2$ , la GPx detoxifica el  $H_2O_2$  y la GST conjuga los contaminantes con glutatión reducido (GSH) para facilitar la excreción, lo que implica una habilidad de biotransformación de esta enzima de tipo II (Regoli *et al.*, 2002). En la degradación del  $H_2O_2$  por la GPx, se utiliza el poder reductor del GSH que se oxida a glutatión disulfido (GSSG, glutatión oxidado), molécula que puede ser reducida nuevamente a GSH por acción de la enzima glutatión reductasa (GR) (Monserrat, 2021). Cuando falla el sistema y se produce daño oxidativo, se genera peroxidación de los fosfolípidos de las membranas, por lo cual se evalúa el daño a través de la medición de los subproductos de la peroxidación lipídica (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS) como un biomarcador de efecto (Gorbi *et al.*, 2008; Cazenave *et al.*, 2021).

Por otro lado, las **metalotioneínas** (MT) son biomarcadores que aún se consideran específicos de metales ya que son proteínas ricas en cisteína con la habilidad de secuestrar y detoxificar los excesos de los metales esenciales y no esenciales, protegiendo al organismo contra los posibles daños causados por los excesos de estos elementos en los órganos y tejidos (Viarengo *et al.*, 1985). Por otra parte, algunos estudios también demuestran la capacidad antioxidante de las MT en invertebrados acuáticos, aunque esta función se encuentra menos estudiada que la anterior. Al respecto, un estudio de Bertrand *et al.* (2015) en el camarón de agua dulce, *Palaemonetes argentinus*, demostró la inducción de MT luego de la exposición a Zn, pero también una disminución de estas proteínas cuando el organismo se expuso al insecticida clorpirifós, que podría implicar un posible mecanismo alternativo activado para prevenir daños oxidativos (Bertrand *et al.*, 2015, 2016). De esta manera, las MT también poseen una acción dentro de la primera línea antioxidante, previniendo la generación de ERO (Gagné *et al.*, 2008).

Sin embargo, los biomarcadores no sólo aumentan o disminuyen su actividad o son inducidos por la contaminación, ya que son una defensa natural que han desarrollado los organismos a lo largo de su evolución para enfrentar factores adversos. Por lo tanto, también son influenciados por factores estacionales, los cambios en los parámetros físico-químicos y los procesos biológicos naturales que son reflejados en la fisiología de los organismos

(Giarratano *et al.*, 2011; Capparelli *et al.*, 2019a). De esta manera, es fundamental generar herramientas integrales que tengan por objetivo monitorear el estrés ambiental producido por la contaminación metálica pero que también incluyan los posibles efectos causados por los parámetros estacionales e hidrológicos del ambiente en la fisiología de los organismos.



**Figura 14:** Diagrama del efecto de estrés oxidativo: especies reactivas del oxígeno, defensas celulares. Adaptado de Cazenave *et al.* (2021)

En los últimos años, se ha destacado la utilización de los **invertebrados bentónicos** como organismos **biomonitor** ya que son uno de los primeros eslabones de las redes tróficas, desencadenando controles ecológicos de “*bottom-up*”. Estos animales son sésiles o con movilidad limitada que se encuentran en contacto estrecho con el sedimento, lo que les permite indicar contaminación local. Además, son fáciles de muestrear y muchos son fáciles de manipular en condiciones de laboratorio, y se encuentran adaptados a los cambios en los parámetros ambientales, y algunos de ellos son fáciles de identificar a un nivel taxonómico más detallado (Rainbow, 2002).

No obstante, en las costas del Atlántico Sudoccidental, y en especial en sistemas del Mar Argentino, la información acerca de los biomonitores e IAT es escasa en comparación a otras regiones del mundo, a pesar de la importancia que presenta este sistema debido a su gran productividad primaria y presencia de especies ictícolas de relevancia económica (Martinetto *et al.*, 2019; Ferronato *et al.*, 2021). En este gran ecosistema, los mejillones y almejas han sido los macroinvertebrados bentónicos más utilizados en términos de efectos

bioquímicos en respuesta al impacto por metales, específicamente en las costas patagónicas y de Tierra del Fuego (Comoglio *et al.*, 2011; Giarratano *et al.*, 2011, 2013; Di Salvatore *et al.*, 2013, entre otros).

Los sistemas estuariales del Mar Argentino han sido aún menos estudiados que otras áreas costeras, tal como es el caso del EBB. El EBB es parte y provee suministro de nutrientes al área “El Rincón”, una de las pocas y primeras áreas marítimas protegidas a nivel global de gran relevancia ecológica y comercial (Delgado *et al.*, 2019; Ferronato *et al.*, 2021), y por lo tanto es crítico comprender y conocer su estado de salud ecológico. Como se ha mencionado en el **Capítulo 2**, en el EBB, la especie de macroinvertebrado dominante es *N. granulata*. Estudios recientes sobre la contaminación metálica en este ecosistema, han considerado el hepatopáncreas de esta especie como el principal órgano que, entre otras funciones, acumula estos contaminantes para ser detoxificados, en comparación con otros tejidos y órganos como las branquias, caparazón y el uso de tejido total (Simonetti *et al.*, 2020), y por lo tanto es un órgano esencial para los estudios toxicológicos (Buzzi & Marcovecchio, 2016).

De esta manera, el biomonitoreo estacional y espacial del EBB a través de *N. granulata*, sus patrones de bioacumulación de metales e IAT bioquímicos, proveen a los tomadores de decisiones de información fundamental para manejar, conservar y proteger a este estuario. Por lo tanto, los **objetivos** del presente **capítulo** son: I) Analizar la concentración espacial y estacional de metales pesados (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni, Mn, Cr, Fe) en sedimentos finos y su potencial riesgo ecológico a través de índices geoquímicos; II) Analizar los patrones de bioacumulación espacial y estacional de metales pesados en el *N. granulata*; III) Evaluar los biomarcadores bioquímicos como potenciales IAT de este sistema: MT, CAT, GST, GR, LPO (a través de TBARS) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y analizar sus cambios espaciales y temporales; IV) Identificar la actividad de los parámetros hidrológicos que caracterizan al EBB (temperatura, salinidad, otros) como posibles reguladores de la síntesis de estos IAT en *N. granulata*.

En este **capítulo** se muestran los resultados estacionales de la concentración de metales en el sedimento fino de los puntos de estudio seleccionados y la bioacumulación de estos elementos en *N. granulata*. A su vez, se exponen los resultados de las variables físico-químicas de la columna de agua y los IAT determinados. Se discute la influencia de los metales en la inducción de los IAT y la posible influencia estacional de los parámetros físico-

químicos y del sexo de los organismos sobre los IAT seleccionados. Consideramos que generar este tipo de información es fundamental para obtener una fotografía global acerca de la dinámica de los procesos de contaminación por metales y conocer si la estacionalidad afecta la respuesta de los IAT en vez de las presiones antrópicas, como suele ser esperado, o si podría ser una sinergia entre ambos en conjunto con otros contaminantes y sustancias que se presentan en el ambiente.

## 3.2 Materiales y métodos

La **metodología** de campo para la recolección de cangrejos y sedimentos se encuentra detallada en el apartado **2.1** del **Capítulo 2: Materiales y métodos**. A su vez, la toma de muestras espacio-temporal se encuentra especificada en la **Tabla 2** del mismo capítulo. En tanto, en el mismo capítulo se hallan los protocolos de disección de los cangrejos, de determinación de metales pesados y de determinación de los IAT en los apartados **2.1**, **3.1** y **3.5**, respectivamente.

Los valores de metales pesados en las distintas matrices fueron agrupados por **sitios y temporalidad** para evaluar posibles **tendencias** en la distribución espacio-temporal de los **metales**, y de la misma manera, se prosiguió con los **IAT** en los cangrejos y los parámetros **físico-químicos**. Los datos fueron tratados estadísticamente según el apartado *IV: Análisis de datos* del **Capítulo 2**, a su vez en el caso de los metales y los IAT en cangrejos se analizó la posible interacción estadística de sexo, estación y sitio de muestreo.

Se calculó el IBR (**Capítulo 2, punto 3.2.3**) para cada sitio y sitio\*estación, y se lo graficó a través de un *star plot* o gráfico radial. La similitud entre metales y los sitios estudiados y estaciones para los sedimentos y cangrejos fue analizada mediante un análisis de similitud de Clúster y dendograma (utilizando el agrupamiento k-medias con distancia euclidiana). Se evaluó la correlación entre los metales en sedimentos (Me\_S) y los acumulados en el hepatopáncreas de los cangrejos (Me\_C), los IAT y los parámetros físico-químicos a través de una correlación de Pearson utilizando un *Corrplot* para cada sitio y estación. A su vez, estos resultados también fueron evaluados por sitios\*estaciones a través de un Análisis de Componentes Principales (ACP) biplot. Todos los análisis fueron realizados con el paquete *R Core Team (2020)*.

### 3.2.1 Métodos para la evaluación geoquímica de contaminación por metales pesados en sedimentos

Se calcularon una batería de **índices geoquímicos** para establecer la contaminación de los sedimentos finos por metales pesados para los sitios de muestreo. El *índice de geoacumulación* ( $I_{geo}$ ) (Müller, 1981) determina y define la contaminación de metales en los sedimentos:

$$I_{geo} = \log_2 \left( \frac{C_n}{1.5 \times B_n} \right)$$

Donde  $C_n$  es la concentración de un metal  $n$  en la muestra y  $B_n$  su valor de referencia o *background*: Fe 4.1%, Cd 0,2; Cu 32, Pb 16, Zn 95, Mn 720, Ni 68 y Cr 90  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Martin & Maybeck, 1979). Este índice fue distinguido en 7 clases según Müller (1981) y Buccolieri *et al.* (2006):  $I_{geo} \leq 0$ , clase 0, sin contaminación;  $0 < I_{geo} \leq 1$ , clase 1, sin contaminación o contaminación moderada;  $1 < I_{geo} \leq 2$ , clase 2, contaminación moderada;  $2 < I_{geo} \leq 3$ , clase 3, de contaminación moderada a alta;  $3 < I_{geo} \leq 4$ , clase 4, alta contaminación;  $4 < I_{geo} \leq 5$ , clase 5, de elevada a extremadamente contaminado; e  $I_{geo} > 5$ , clase 6, extremadamente contaminado.

El *Factor de Enriquecimiento metálico (FE)* (Szefer *et al.*, 1998) fue calculado comparando la concentración del metal en la muestra con niveles pre-industriales y/o naturales:

$$FE = \frac{\left(\frac{M}{X}\right)_{muestra}}{\left(\frac{M}{X}\right)_{referencia}}$$

Donde  $M$  es la concentración del metal de interés y  $X$  es la normalización del elemento (en este caso, se tomaron los valores de Fe) para las muestras y las referencias geoquímicas, utilizando niveles guías internacionales. Los niveles de contaminación basados en el FE fueron evaluados utilizando la clasificación propuesta por Sutherland (2000), considerando las siguientes 5 categorías: 1)  $FE < 2$ , nulo o mínimo enriquecimiento, sugiere contaminación nula o mínima; 2)  $FE 2-5$ , enriquecimiento moderado, sugiere contaminación moderada; 3)  $FE 5-20$ , enriquecimiento significativo, sugiere una señal de contaminación significativa; 4)  $FE 20-40$ , muy enriquecido, indicando una señal de contaminación elevada; 5)  $FE > 40$ , extremadamente enriquecido, señalando una contaminación extrema (Muniz *et al.*, 2019).

La carga de metales se estimó a partir del *PLI* (*Pollution Load Index*) propuesto por Tomlinson *et al.* (1980). Este índice fue calculado para entender el comportamiento de elementos potencialmente tóxicos (especialmente del Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) en diferentes sitios y estaciones:

$$PLI = \sqrt[n]{(FC_1 \times FC_2 \times FC_3 \dots FC_n)}$$

Donde *FC* es el factor de concentración del metal *n* en los sedimentos respecto al valor *background* en ( $FC = C_{metal}/C_{background}$ ). El *PLI* representa el número de veces en el cual las concentraciones de los metales en el sedimento exceden las concentraciones de referencia o *background*, y el valor > 1 indica contaminación, mientras que < 1 no indica contaminación (Barakat *et al.*, 2012).

El *índice de riesgo ecológico potencial* (*REP*, o *RE*) también ha sido introducido para evaluar el grado de contaminación metálica presente en los sedimentos basado en la siguiente ecuación propuesta por Guo *et al.* (2010):

$$RE = \sum E; E = T \times C; C = C_a/C_b$$

Donde *C* es el factor de contaminación de un elemento, *C<sub>a</sub>* es el contenido de ese elemento en las muestras y *C<sub>b</sub>* su valor de referencia. La sumatoria de todos los valores de *C* para todos los metales examinados representa el grado de contaminación integrado (*C*) del ambiente. *E* es el valor de riesgo potencial de un elemento individual, mientras *T* es el factor biológico tóxico para un elemento individual determinado para el Zn= 1, Cu= 6, Ni=Pb= 5, Cd= 30, Cr= 2 (Hakanson, 1980, Guo *et al.*, 2010). Los riesgos ecológicos asociados con el *RE* pueden ser distinguidos en 4 niveles: *RE* < 150, riesgo ecológico bajo; 150 < *RE* < 300, riesgo ecológico moderado; 300 < *RE* < 600, riesgo ecológico alto, y *RE* > 600, riesgo ecológico significativamente alto (Hakanson, 1980).

Por último, se aplicó el índice de la media del cociente de la mediana de los rangos de efectos (*mERM-Q*) para determinar los efectos biológicos adversos de los metales coexistentes (Long *et al.*, 1998) de la siguiente manera:

$$mERM - Q = \sum (C_i / ERM_i) / n$$

Donde *C<sub>i</sub>* es la concentración del contaminante o del elemento *i*, *ERM<sub>i</sub>* es el valor de la mediana de los rangos de efectos (*ERM*) para el contaminante *i* y *n* es el número de contaminantes. Los valores de *mERM-Q* fueron identificados en 4 categorías según Long (2000): I) ≤ 0,10 no muestra efectos biológicos adversos; II) 0,10–0,50 indica efectos

potencialmente adversos; III) entre 0,50-1,5 indica efectos adversos moderados, y IV) > 1,5 señala efectos adversos significativos.

### 3.2.2 Bioacumulación de metales en *N. granulata*: Factor de acumulación biota-sedimentos (FABS)

Para estimar la proporción en la cual un metal se halla en los cangrejos y en los sedimentos asociados se utilizó el *factor de acumulación biota-sedimentos (FABS)* siguiendo a Lafabrie *et al.* (2007). Cuando el  $FABS \geq 1$ , se considera que dicho metal ha sido acumulado por los organismos a partir de los sedimentos:

$$FABS = \frac{\text{concentracion del metal en el hepatopáncreas } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ ps})}{\text{concentracion del metal en los sedimentos } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ ps})}$$

### 3.2.3 Índices morfológicos en *N. granulata*

Los siguientes índices morfológicos fueron aplicados en los cangrejos: Factor de Condición (FC) y el Índice Hepatosomático (IHS):

$$FC = \frac{\text{peso húmedo corporal (g)}}{\text{ancho del caparazón (cm)}}$$
$$IHS = \frac{\text{peso húmedo del hepatopáncreas (g)}}{\text{peso húmedo corporal (g)}} \times 100\%$$

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos para cada sitio de muestreo en las distintas estaciones se encuentran presentados en la Tabla 3. En el caso de PC y VM, la temperatura fue mayor en las estaciones de otoño y verano, mientras que en PR las mayores temperaturas se registraron en primavera y verano. En general, los valores de turbidez fueron mayores en PR y VM, con el mayor valor registrado en otoño en VM. Los valores de salinidad siempre superaron los 30 psu, a excepción del invierno en PC. Los valores de pH estuvieron

comprendidos entre 6,7 y por encima de 8, con el menor valor registrado durante el invierno en PR y el mayor valor en otoño en VM. En cuanto al OD, los menores valores se registraron durante el verano de PC y PR, y el mayor en invierno de PC.

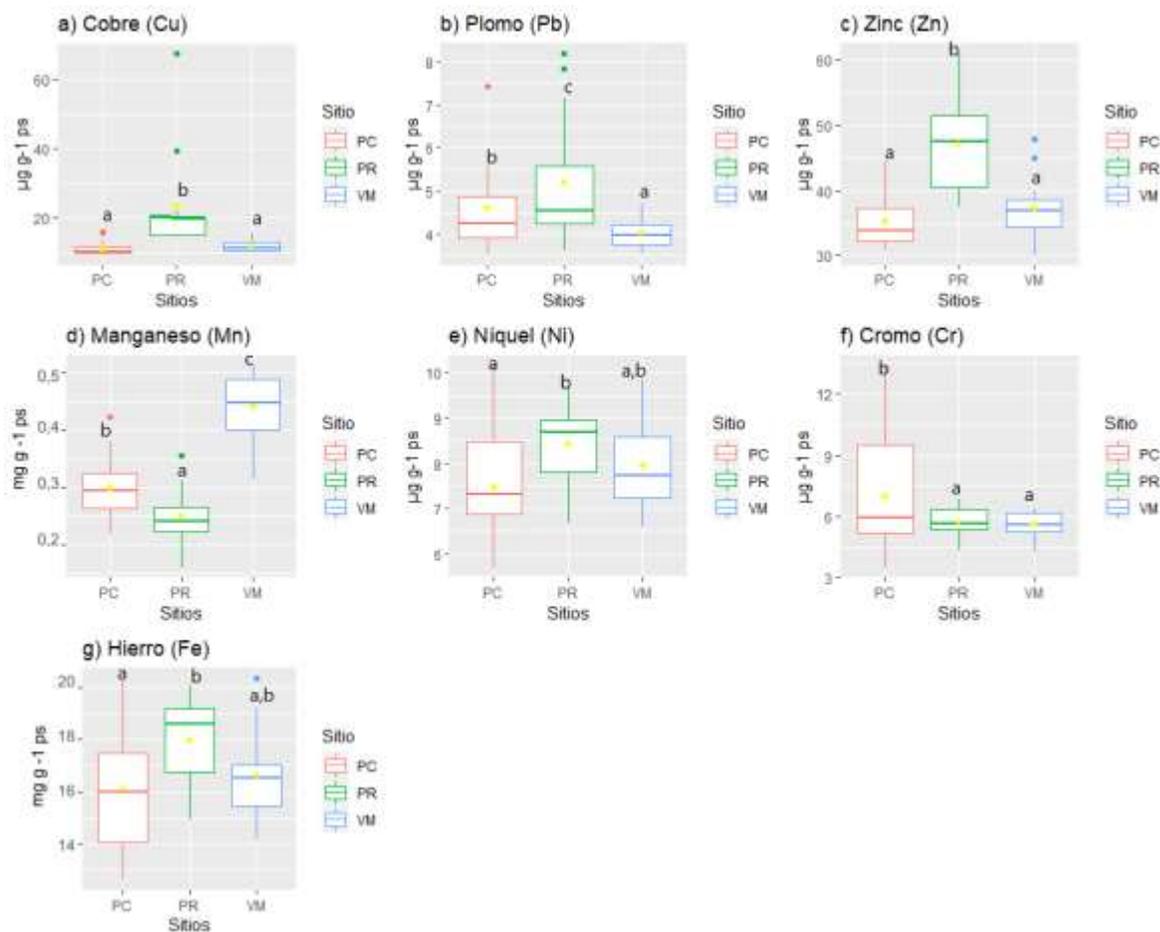
*Tabla 3: Parámetros físico-químicos estacionales de la columna de agua de cada sitio de muestreo*

<i>Sitio</i>	<i>Estación</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Salinidad (psu)</i>	<i>pH</i>	<i>Oxígeno disuelto (OD, mg L<sup>-1</sup>)</i>
<i>PC</i>	Otoño	18,2	19,61	35,8	8,3	7,9
	Invierno	9,2	30	24,88	8,03	8,4
	Primavera	15,4	29,1	35	7,6	7,1
	Verano	18,08	25	39	7,2	6,8
<i>PR</i>	Otoño	17,19	20	35,5	8,07	8,1
	Invierno	14,1	40	32	6,7	8
	Primavera	18,2	25	32,5	8,1	6,7
	Verano	21	28,54	38,1	8,02	5,8
<i>VM</i>	Otoño	19	76	31	8,49	8,3
	Invierno	14,2	30	35,5	7	8,2
	Primavera	15,2	45	35,18	8,4	8
	Verano	18,2	50	36,28	8,14	7,4

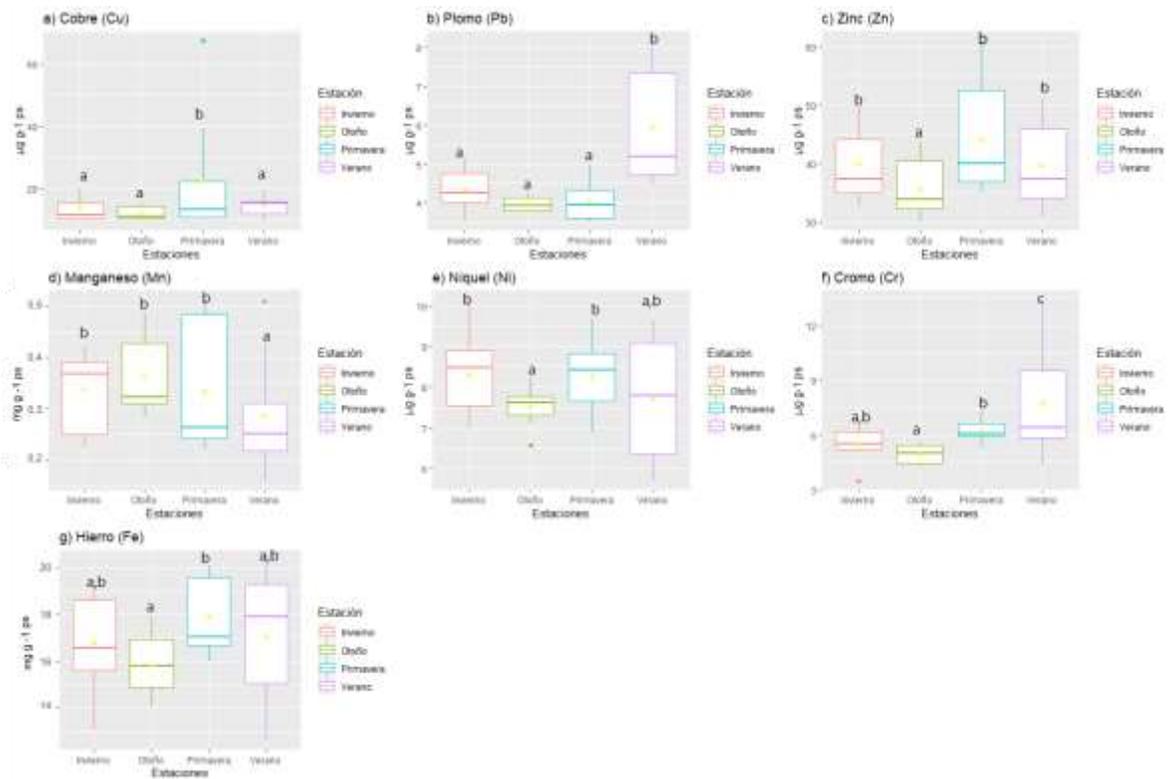
### 3.3.2 Metales en sedimentos intermareales superficiales

El Cu presentó mayores valores en PR, en tanto PC y VM no presentaron diferencias significativas en sus valores, que fueron más bajos que los registrados en PR (Figura 15a). Estacionalmente, la primavera fue la estación con mayores concentraciones de Cu (Figura 16a), lo que fue reflejado, en especial, en el caso de PR (Tabla 5). El Pb también presentó valores estadísticamente mayores y significativos en PR (Figura 15b) y estacionalmente en verano (Figura 16b), en especial en PR y PC (Tabla 4). El Zn también presentó mayores valores en PR seguido de VM y PC (Figura 15c), su presencia en invierno, primavera y verano no presentaron diferencias significativas (Figura 16c) y el mayor valor de este metal fue registrado en PR en la estación primaveral (Tabla 5). El Mn fue mayor en VM seguido de PC y en menor medida en PR (Figura 15d) y no presentó diferencias en la mayoría de las estaciones, a excepción del verano que su concentración tendió a disminuir (Figura 16d) y el mayor valor de este metal se registró en primavera en VM (Tabla 4). El Ni presentó mayores

valores en VM y PR (Figura 15e), aunque no presentó ningún patrón estacional con diferencias marcadas en las concentraciones (Figura 16e) y las mayores concentraciones de este elemento se observaron principalmente en invierno de PC, verano y otoño de VM y primavera e invierno de PR (Tabla 4). El Cr fue mayor en PC (Figura 15f) y los patrones estacionales indicaron una marcada diferencia de las concentraciones de Cr en verano (Figura 16f), en especial en PC (Tabla 4). Finalmente, el Fe presentó mayores concentraciones en PR y VM, pero este último sitio no presentó diferencias con PC (Figura 15h). Estacionalmente, los valores de este metal no presentaron diferencias (Figura 16h) y en cuanto a la interacción sitio\*estación, el mayor valor se observó en primavera de PR, pero sin diferencias significativas con otras estaciones\*sitios analizados (Tabla 4).



i **Figura 15:** Box-plot de metales en sedimentos finos de acuerdo a la estación de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )



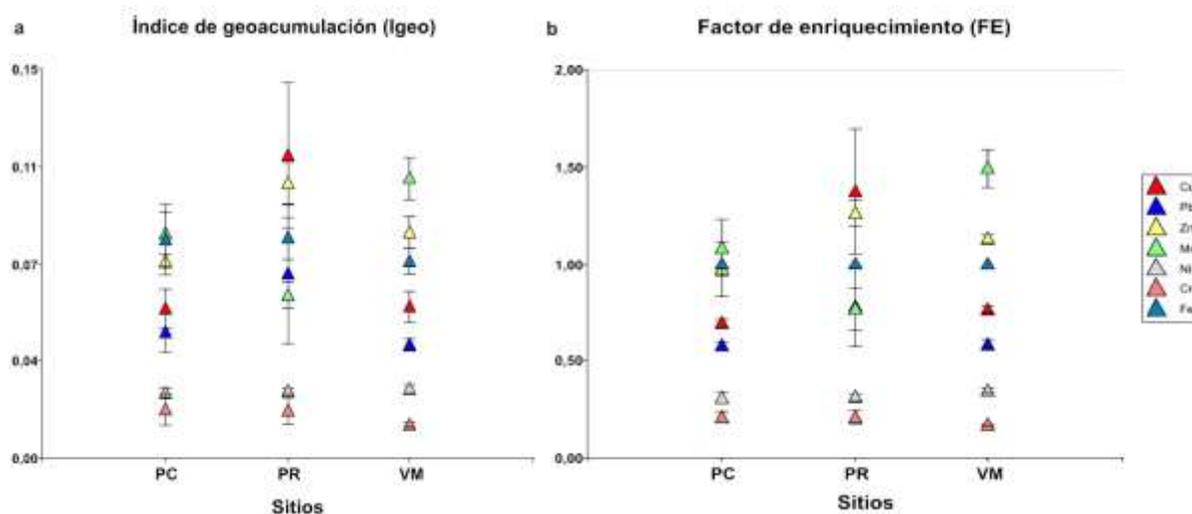
**Figura 16:** Box-plot de metales en sedimentos finos de acuerdo a la estación de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

**Tabla 4:** Media ( $\pm$ DE) de metales en sedimentos finos intermareales ( $<63 \mu\text{m}$ ) por sitio y estación de muestreo ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps). Letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ). En negrita se señalan las concentraciones estadísticamente mayores. \* valores expresados como  $\text{mg g}^{-1}$  ps

Sitio	Estación	Cu	Pb	Zn	Mn*	Ni	Cr	Fe*
PC	Otoño	9,98 $\pm$ 0,44 a	3,93 $\pm$ 0,17 a	32,7 $\pm$ 1,03 a	0,29 $\pm$ 0,02 b,c	7,51 $\pm$ 0,21 a	4,63 $\pm$ 0,46 a	15,34 $\pm$ 1,59 a
	Invierno	11,58 $\pm$ 1,35 a	4,52 $\pm$ 0,53 a	38,38 $\pm$ 5,28 a,b,c	0,39 $\pm$ 0,031 d,e	9,13 $\pm$ 0,98 d,e	4,95 $\pm$ 1,29 a,b	16,56 $\pm$ 3,14 a,b,c
	Primavera	11,19 $\pm$ 2,07 a	3,98 $\pm$ 0,76 a	38,03 $\pm$ 5,51 a,b,c	0,27 $\pm$ 0,023 a,b,c	7,56 $\pm$ 0,96 b,c	6,44 $\pm$ 0,75 c	17,57 $\pm$ 2,18 a,b,c
	Verano	11,42 $\pm$ 2,98 a	5,65 $\pm$ 1,22 b	33,01 $\pm$ 3,09 a	0,26 $\pm$ 0,04 a,b,c	6,17 $\pm$ 0,63 b,c	<b>10,76 <math>\pm</math> 1,82 d</b>	15,29 $\pm$ 3,65 a
PR	Otoño	14,84 $\pm$ 0,6 a	4,08 $\pm$ 0,26 a	41,56 $\pm$ 1,89 b,c,d	0,33 $\pm$ 0,03 c,d	7,91 $\pm$ 0,31 b,c	5,34 $\pm$ 0,33 a,b,c	16,87 $\pm$ 1,03 a,b,c
	Invierno	18,44 $\pm$ 2,74 a	4,7 $\pm$ 0,38 a	46,07 $\pm$ 5,41 d	0,24 $\pm$ 0,01 a,b	8,45 $\pm$ 0,78 c,d,e	5,97 $\pm$ 0,77 a,b,c	18,01 $\pm$ 1,52 a,b,c
	Primavera	<b>43 <math>\pm</math> 22,87 b</b>	4,31 $\pm$ 0,68 a	<b>56,08 <math>\pm</math> 4,44 e</b>	0,24 $\pm$ 0,01 a,b	9,29 $\pm$ 0,43 e	6,52 $\pm$ 0,35 c	19,42 $\pm$ 0,8 c
	Verano	18,02 $\pm$ 2,78 a	<b>7,72 <math>\pm</math>0,53 c</b>	44,92 $\pm$ 6,93 c,d	0,2 $\pm$ 0,03 a	8,1 $\pm$ 1,28 b,c,d	5,15 $\pm$ 0,73 a,b,c	17,62 $\pm$ 2,38 a,b,c
VM	Otoño	11 $\pm$ 0,76 a	3,92 $\pm$ 0,19 a	32,81 $\pm$ 3,07 a,b	0,46 $\pm$ 0,03 e	7,15 $\pm$ 0,59 b	4,85 $\pm$ 0,6 a,b	15,21 $\pm$ 1,2 a,b
	Invierno	10,79 $\pm$ 0,49 a	3,75 $\pm$ 0,24 a	34,96 $\pm$ 2,31 a,b	0,39 $\pm$ 0,02 d,e	7,31 $\pm$ 0,37 b	5,54 $\pm$ 0,51 a,b,c	15,73 $\pm$ 0,78 a,b
	Primavera	11,79 $\pm$ 1,26 a	3,86 $\pm$ 0,23 a	38,31 $\pm$ 1,58 a,b,c	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,01 f</b>	7,96 $\pm$ 0,4 b,c	5,7 $\pm$ 0,35 a,b,c	16,78 $\pm$ 0,39 a,b,c
	Verano	14,67 $\pm$ 1,47 a	4,6 $\pm$ 0,14 a	43,24 $\pm$ 5,56 c,d	0,42 $\pm$ 0,1 e	9,38 $\pm$ 0,43 e	6,37 $\pm$ 0,04 b,c	18,88 $\pm$ 1,65 b,c

### 3.3.3 Índices geoquímicos

En cuanto a los sedimentos, el  $I_{geo}$  siempre se ubicó en valores comprendidos entre 0 y 1 para todos los metales analizados, indicando una contaminación mínima o moderada, que fue mayor en el caso del Cu de PR seguido del Zn en el mismo sitio y el Mn en VM (Figura 17a). En el caso del FE, los mayores enriquecimientos metálicos se observaron para el Mn de PC y VM y el Cu de PR. No obstante, ninguno de los metales superó la línea de corte en 2, indicando nulo o mínimo enriquecimiento de los metales analizados (Figura 17b).



**Figura 17:** Media ( $\pm$  EE) del **a)** índice de geoacumulación ( $I_{geo}$ ) y **b)** el factor de enriquecimiento (FE) para los metales en sedimentos finos de acuerdo a los sitios de muestreo. El Cd no se encuentra graficado ya que se presentó  $<LDM$  en todos los casos analizados.

En la Tabla 5 se presentan las medias de los índices geoquímicos (PLI, RE, mERM-Q) y la caracterización de su grado de contaminación de acuerdo a la bibliografía que se mencionó en el apartado 3.2.1 del presente capítulo. El **PLI** indicó que los sedimentos no presentaban contaminación por metales en ninguno de los sitios analizados, y el **RE** señaló un riesgo ecológico bajo. Sin embargo, a través del empleo del **mERM-Q** se observó que los sedimentos podrían poseer posibles efectos adversos para los organismos.

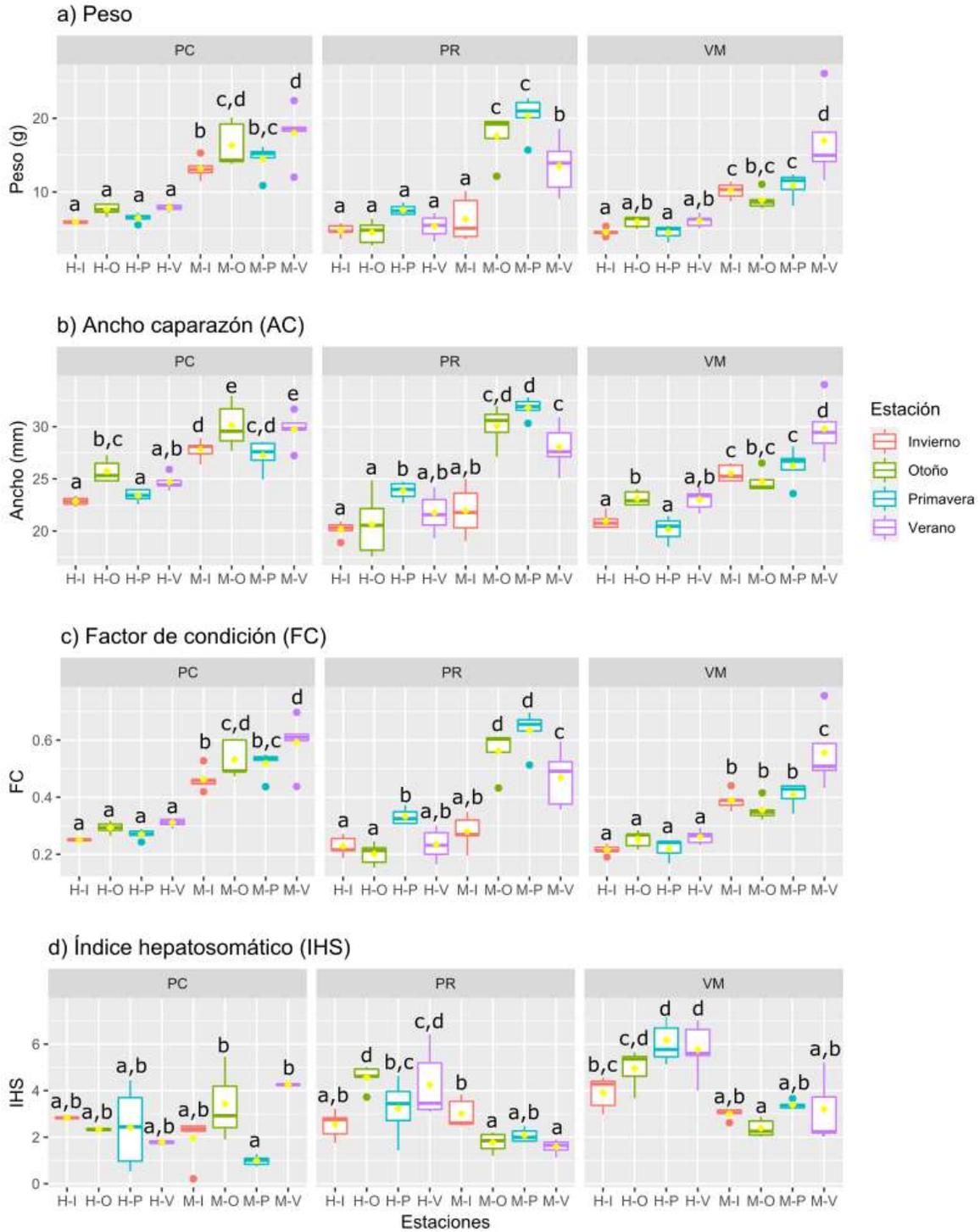
**Tabla 5:** Media ( $\pm$  EE) de índices geoquímicos para los metales de los sedimentos analizados y caracterización de acuerdo a su grado de contaminación. Magnitudes adimensionales.

<i>Sitio</i>	<i>Índices</i>	<i>Media <math>\pm</math> EE</i>	<i>Grado de contaminación</i>
<i>PC</i>	PLI	0,24 $\pm$ 0,06	Sin contaminación
	mERM-Q	0,11 $\pm$ 0,02	Efectos biológicos adversos
	RE	3,92 $\pm$ 0,95	Riesgo ecológico bajo
<i>PR</i>	PLI	0,29 $\pm$ 0,06	Sin contaminación
	mERM-Q	0,17 $\pm$ 0,03	Efectos biológicos adversos
	RE	6,9 $\pm$ 1,74	Riesgo ecológico bajo
<i>VM</i>	PLI	0,23 $\pm$ 0,03	Sin contaminación
	mERM-Q	0,1 $\pm$ 0,02	Efectos biológicos adversos
	RE	3,62 $\pm$ 0,53	Riesgo ecológico bajo

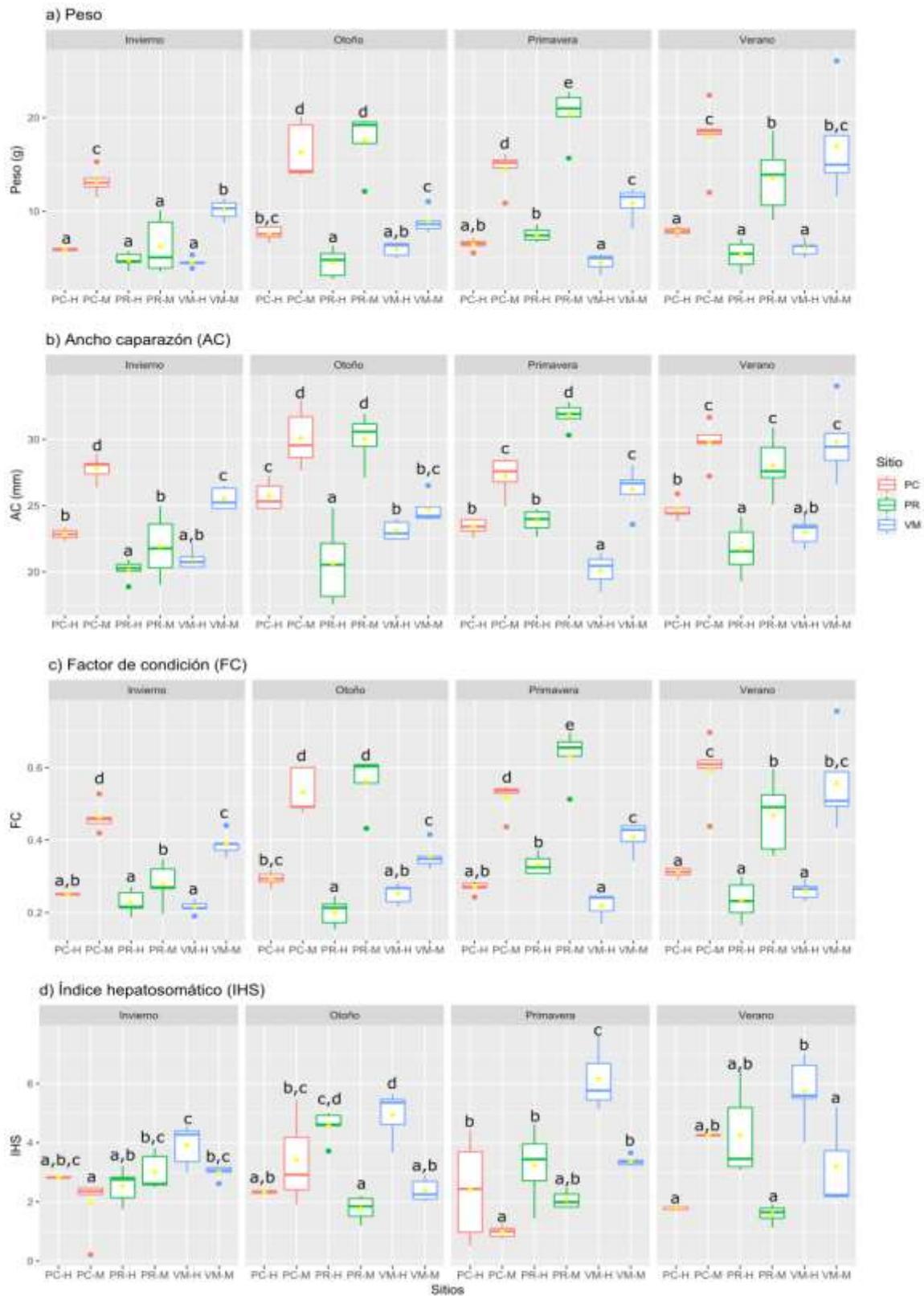
### 3.3.4 Medidas biométricas e índices morfológicos en *N. granulata*

Las medidas e índices morfológicos en machos y hembras de *N. granulata* para los distintos sitios de muestreo y estaciones se encuentran resumidos en las Figuras 18 y 19. En cuanto a las estaciones por sitios (Figura 18a,b), indicó que el peso y el AC para los tres sitios fue mayor en los machos respecto a las hembras, en especial para las estaciones más cálidas y el otoño. El FC (Figura 18c) también fue mayor en los machos en comparación a las hembras para los tres sitios, con mayores valores en otoño, primavera y verano; a excepción de VM, donde el mayor valor se registró durante el verano. En tanto, el IHS (Figura 18d) no presentó diferencias entre machos y hembras de PC, aunque los mayores valores se presentaron en otoño y verano en machos. Finalmente, tanto en PR como en VM, las hembras exhibieron mayores valores de IHS con mayores valores en otoño y verano de PR, y primavera y verano de VM.

El análisis de los sitios\*estaciones (Figura 19), indicó que el peso, AC y FC exhibieron mayores valores en machos de PC en invierno y otoño, mientras que en primavera y verano también se presentaron mayores valores en machos de PR y VM (Figura 19a,b,c). En tanto, el IHS (Figura 19d) presentó los mayores porcentajes en las hembras de VM, independiente de la estación.



**Figura 18:** Medidas biométricas en hembras (H) y machos (M) de *N. granulata* de acuerdo a la estación por sitio de muestreo: **a)** peso (g); **b)** ancho de caparazón (AC, mm); **c)** factor de condición (FC) y **d)** índice hepatosomático (IHS, %). Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 19:** Medidas biométricas en hembras (H) y machos (M) de *N. granulata* de acuerdo a los sitios por estación de muestreo: **a)** peso (g); **b)** ancho de caparazón (AC, mm); **c)** factor de condición (FC) y **d)** índice hepatosomático (IHS, %). Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.5 Metales en *N. granulata*

La concentración de metales en el hepatopáncreas de hembras y machos de los cangrejos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) por sitios para cada estación se graficó en la Figura 20. En general, la concentración de metales evidenció el siguiente orden en PC:  $\text{Cu} > \text{Fe} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Ni}$  ( $\text{Pb}$ ,  $\text{Cr}$  y  $\text{Mn} < \text{LDM}$ ), mientras que, en PR, los metales se distribuyeron en  $\text{Cu} > \text{Fe} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cd}$  ( $\text{Pb}$  y  $\text{Cr} < \text{LDM}$  y el  $\text{Mn}$  sólo se registró en 2 estaciones) y en VM el orden fue el siguiente:  $\text{Cu} > \text{Fe} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Ni} > \text{Cd}$  ( $\text{Cr}$  y  $\text{Pb} < \text{LDM}$ ).

La partición de los análisis estadísticos en cada sitio por sexo\*estación para el **Cd**, demostró que, en PC, las hembras acumularon mayores concentraciones de este metal, en especial durante la estación de invierno. En el caso de PR, hembras y machos acumularon Cd por igual con un mayor valor en las hembras de primavera. En VM se observó el mismo patrón y, en general, las hembras acumularon más Cd con el mayor valor en invierno, aunque no fue estadísticamente significativo respecto a otras estaciones (Figura 20a).

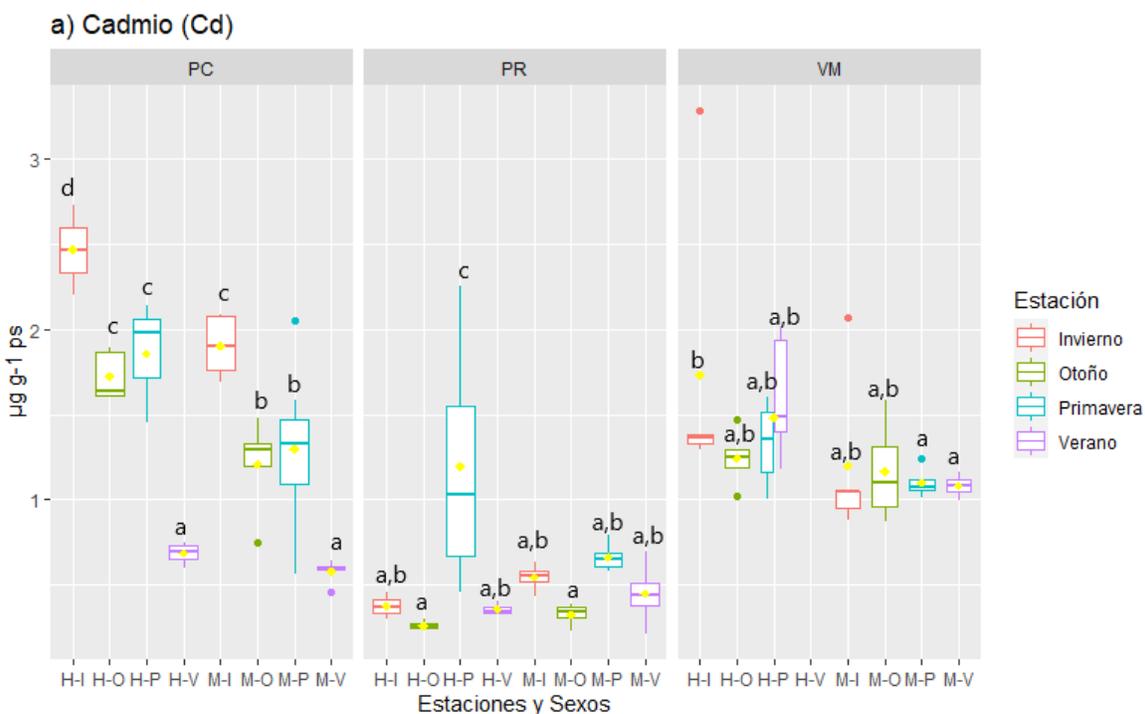
En cuanto al **Cu**, en PC, las hembras presentaron mayores concentraciones, en especial en otoño, aunque en esta estación no presentaron diferencias significativas con los machos. En el caso de PR, por lo general, los valores estacionales no presentaron diferencias, aunque se observó una tendencia en mayor acumulación en los machos en las estaciones de primavera-verano. En tanto, en VM, se observó el mismo patrón que en PC, ya que los valores fueron mayores en otoño, sin diferencias para machos y hembras (Figura 20b).

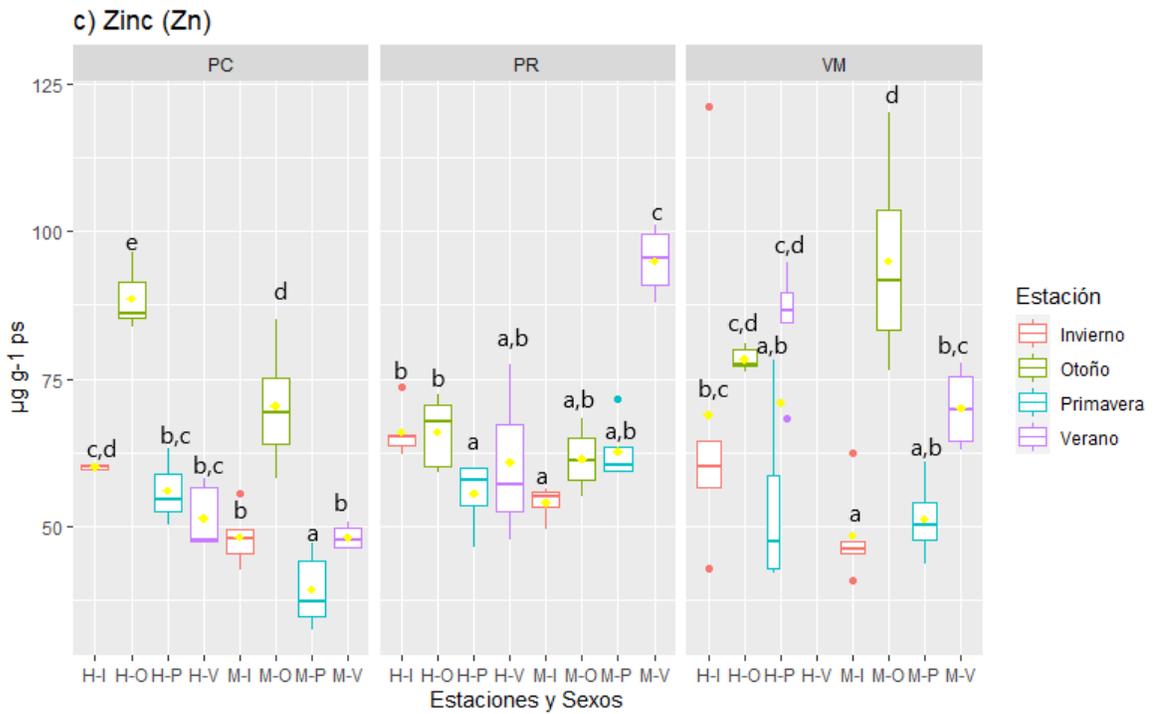
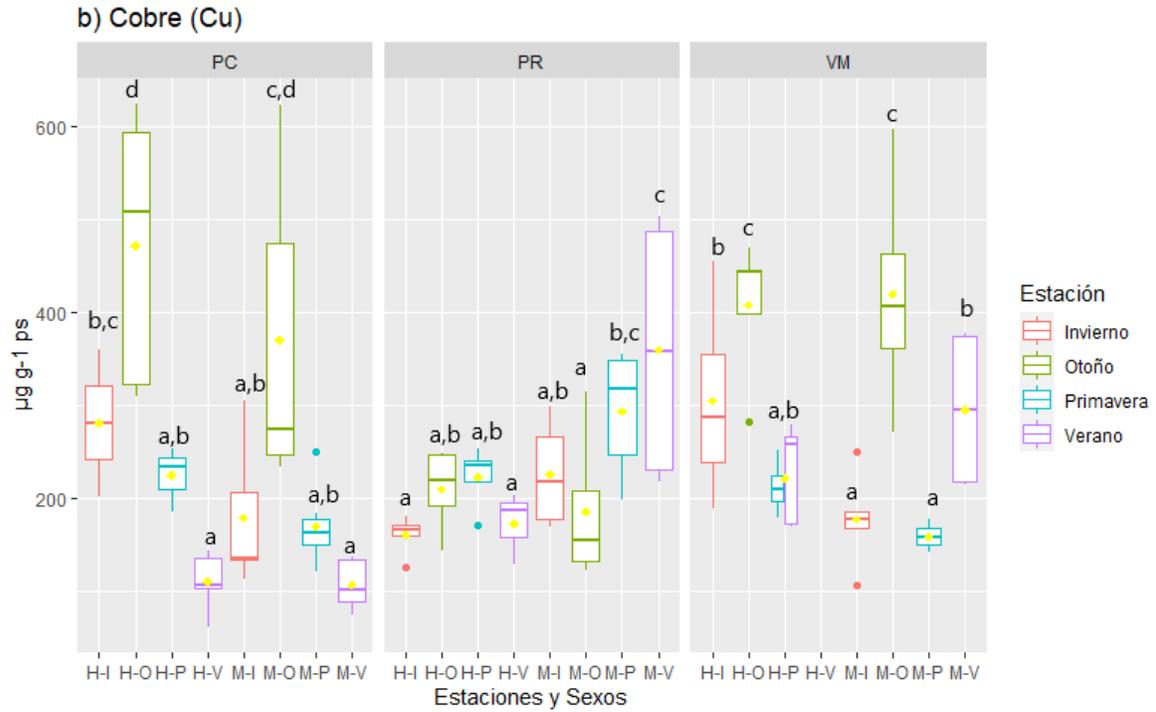
El **Zn** en PC también presentó mayores concentraciones en otoño y en cuanto a los sexos, la acumulación del metal fue significativamente mayor en las hembras. En PR, la mayor acumulación de Zn también fue observado en las hembras, aunque en este sitio se observó que en verano los machos presentaron mayores valores de este elemento. En VM, no se observaron diferencias para este metal entre la estación de verano y otoño ni entre los machos y las hembras (Figura 20c).

El **Mn** estuvo presente en VM en todas las estaciones y sexos y sólo presentó diferencias con las hembras de otoño, donde sus valores estuvieron  $< \text{LDM}$ . En PR, este elemento sólo estuvo presente en primavera (en hembras y machos) y en verano, donde las hembras presentaron la mayor concentración. Por último, en PC no fue registrado, a excepción de concentraciones bajas en las hembras de verano (Figura 20d).

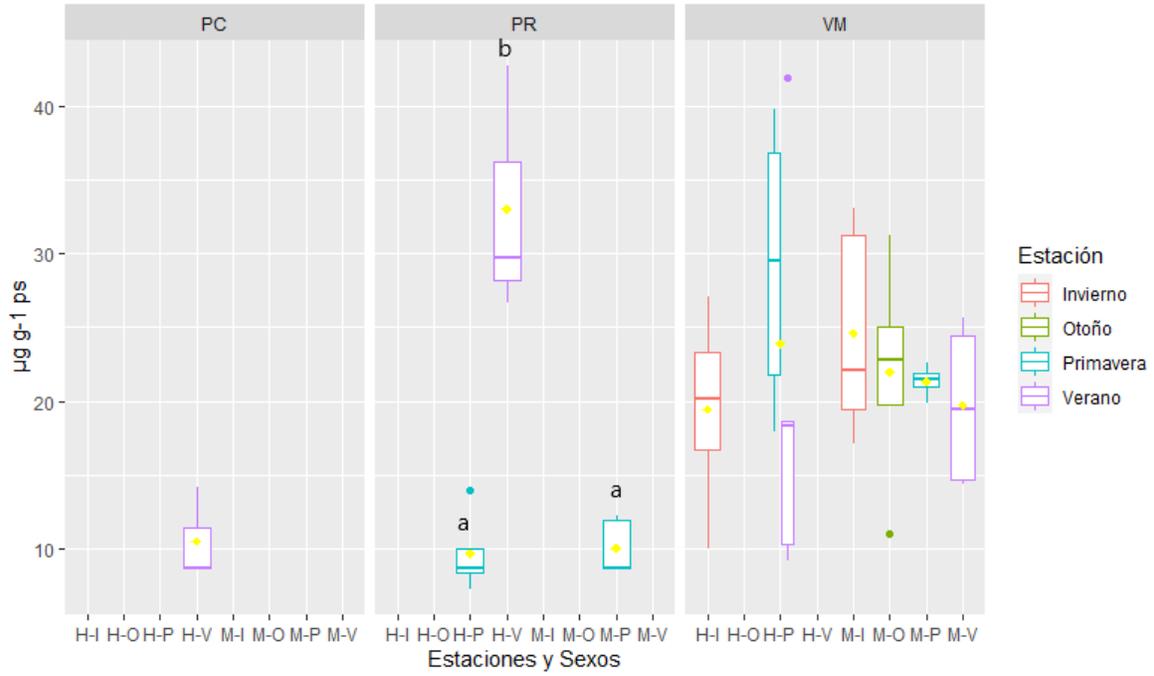
El **Ni** sólo estuvo presente en los machos de PC en invierno y presentó valores <LDM para el resto de los sexos en las distintas estaciones. En PR, el metal estuvo <LDM en hembras y machos de primavera e invierno, respectivamente, y presentó mayores valores en machos y hembras de verano y otoño. En VM, el Ni estuvo presente en todas las muestras analizadas, con mayores valores en hembras y machos de otoño (Figura 20e).

Otro metal esencial como el **Fe**, se encontró sin diferencias entre machos y hembras en PC. En PR el análisis de las interacciones estación\*sexo para este sitio, da cuenta de que el mayor valor de Fe se halló en hembras de verano, machos de primavera y en machos y hembras de otoño. Finalmente, en VM tampoco se encontraron diferencias entre machos y hembras, pero las mayores concentraciones para ambos sexos se detectaron en la estación de otoño (Figura 20f). Otros metales como el Pb estuvieron por debajo de los valores del LDM, a excepción de las hembras de primavera de PR ( $2,94 \pm 4,63$ ), mientras que el Cr, siempre se encontró <LDM.

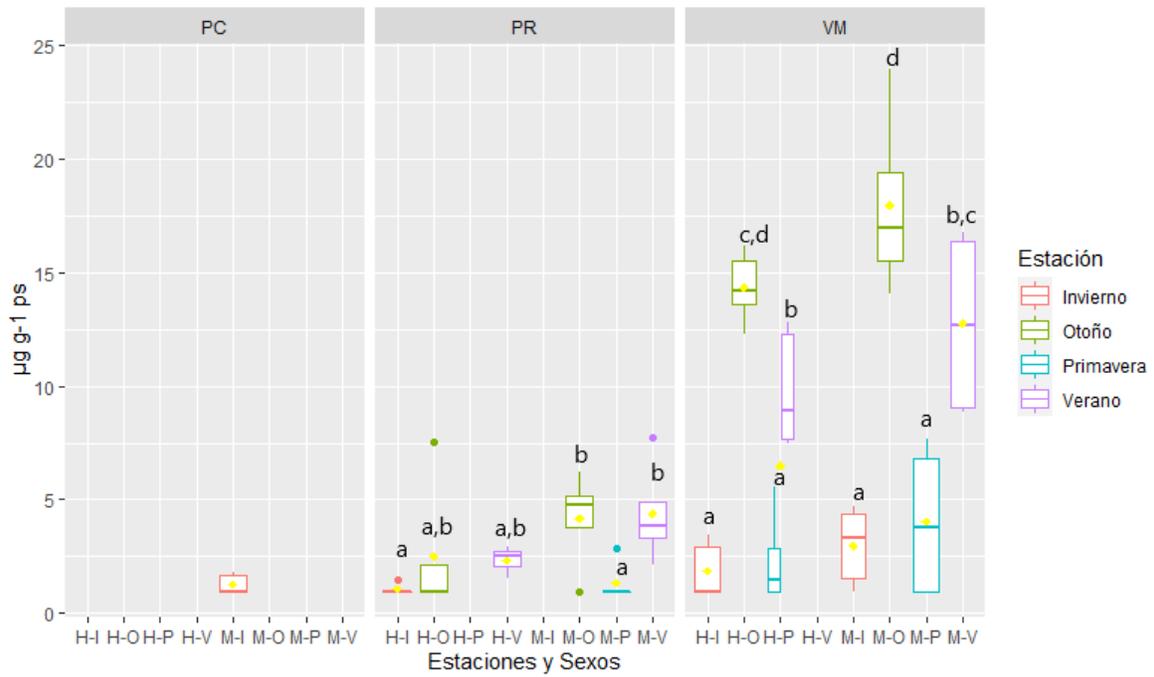


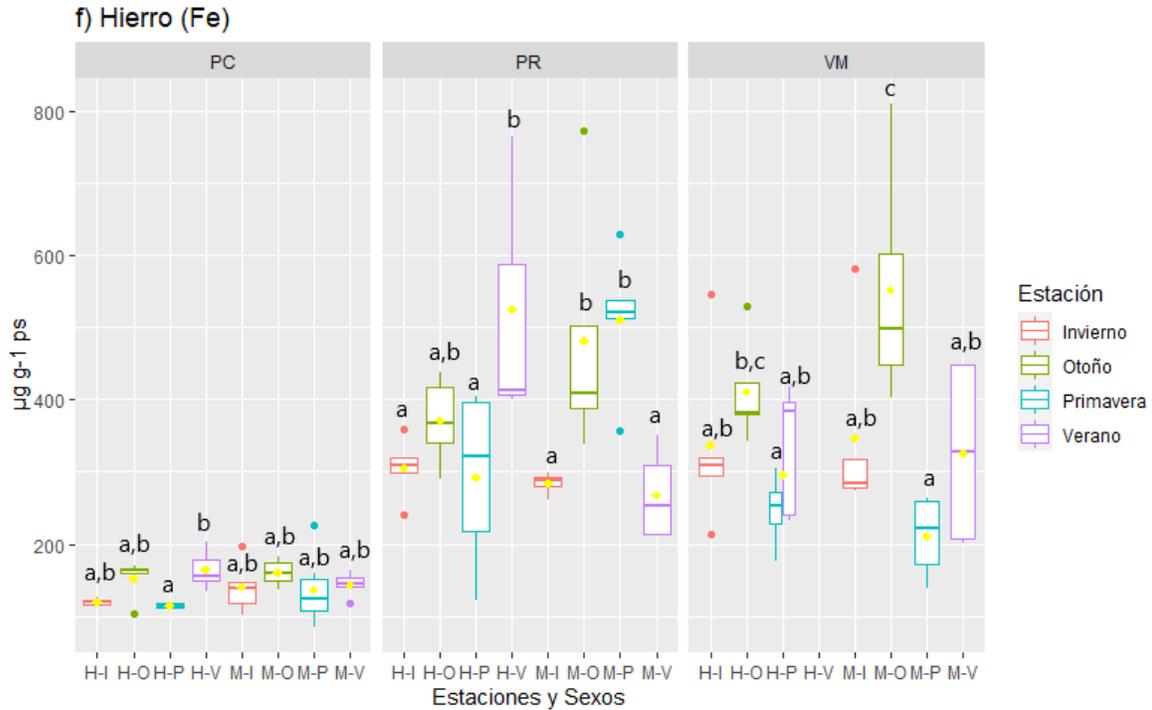


d) Manganeso (Mn)



e) Niquel (Ni)





**Figura 20:** Box-plot de metales ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) en cangrejos por estaciones y sexos para cada sitio. Abreviaciones: hembras (H) y machos (M) de acuerdo a la estación: Invierno (I), otoño (o), primavera (p), verano (v). Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Donde no se graficaron datos, los valores se encontraban  $< \text{LDM}$

En el caso de la partición de los análisis estadísticos de sitios\*sexo según la estación, demuestran que, en invierno, para el **Cd**, los mayores valores se registraron en PC en hembras y machos (Figura 21a). En otoño, también se observó el mismo patrón para este metal, en tanto que, en primavera, las concentraciones de Cd en PC y VM no presentaron diferencias significativas. En verano, las hembras presentaron mayores valores de Cd, en especial en VM, donde se registraron las mayores concentraciones (Figura 20a).

En otoño, el **Cu** (Figura 21b) fue mayor en PC y VM en los dos sexos. En invierno, no presentó diferencias entre sexos y sitios, aunque el mayor valor se observó en las hembras de VM (sin diferencias con hembras de PC y machos de PR). En primavera, los mayores valores se observaron en PR, en especial en las hembras. Finalmente, en la estación de verano, VM y PR presentaron los mayores valores de Cu en ambos sexos.

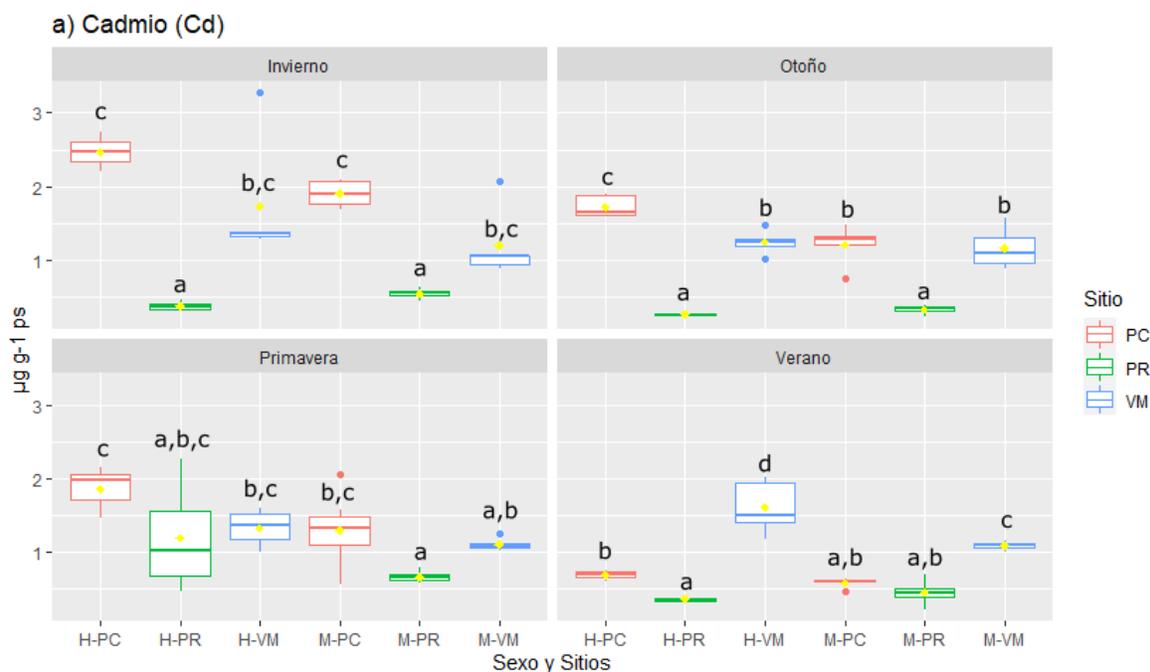
En invierno, el **Zn** (Figura 21c) no presentó diferencias entre sexos y sitios. En otoño, PC y VM presentaron los mayores valores en hembras y machos, respectivamente. En primavera, en PR registró las mayores concentraciones de Zn con diferencias significativas

con PC y VM (este último no presentó diferencias con ninguno de los dos sitios). En especial, los machos de PC presentaron los valores estadísticamente más bajos de Zn.

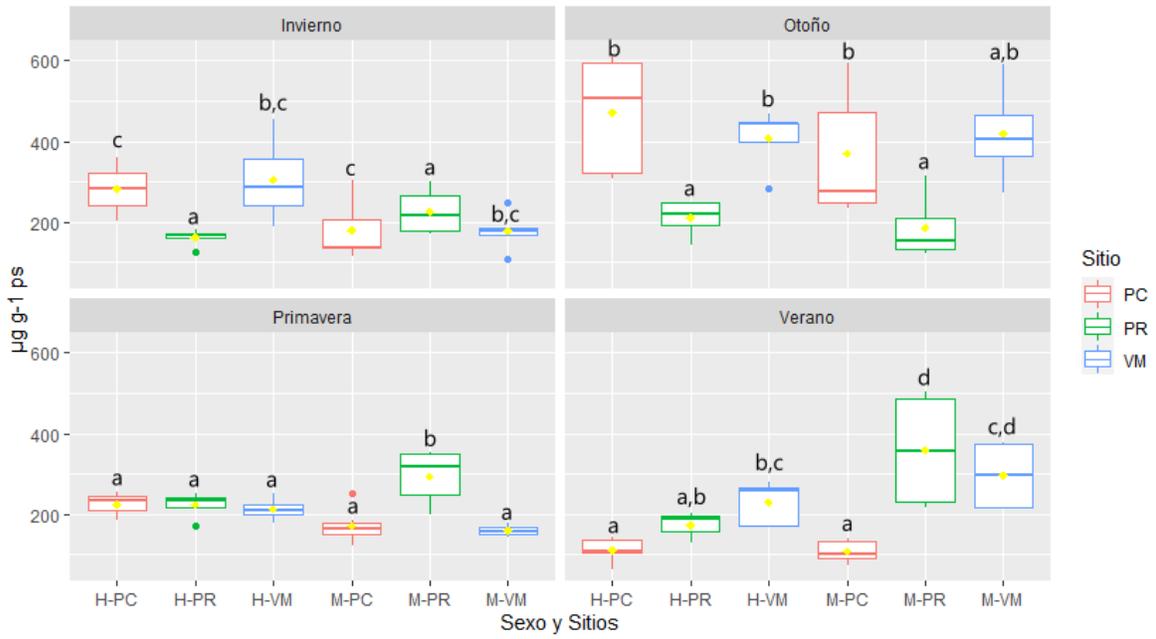
El **Mn** (Figura 21d) se registró sólo en los organismos de los dos sexos de VM y en los machos del mismo lugar en las estaciones invernales y otoñales. En primavera, este metal estuvo <LDM en PC y el mayor valor fue registrado en hembras de VM, seguido por los machos del mismo lugar. En verano, se encontró <LDM en machos de PC y PR, y el mayor valor estadísticamente significativo se observó en hembras de PR.

En otoño y verano, las concentraciones de **Ni** (Figura 21e) estuvieron <LDM en PC y con mayores valores en organismos de VM seguidos de PR. En invierno, se registró la misma tendencia en VM y las concentraciones de Ni se hallaron <LDM en hembras de PC y machos de PR. Mientras que primavera, el Ni también se halló <LDM en PC junto a hembras de PR, y los mayores valores también fueron observados en VM.

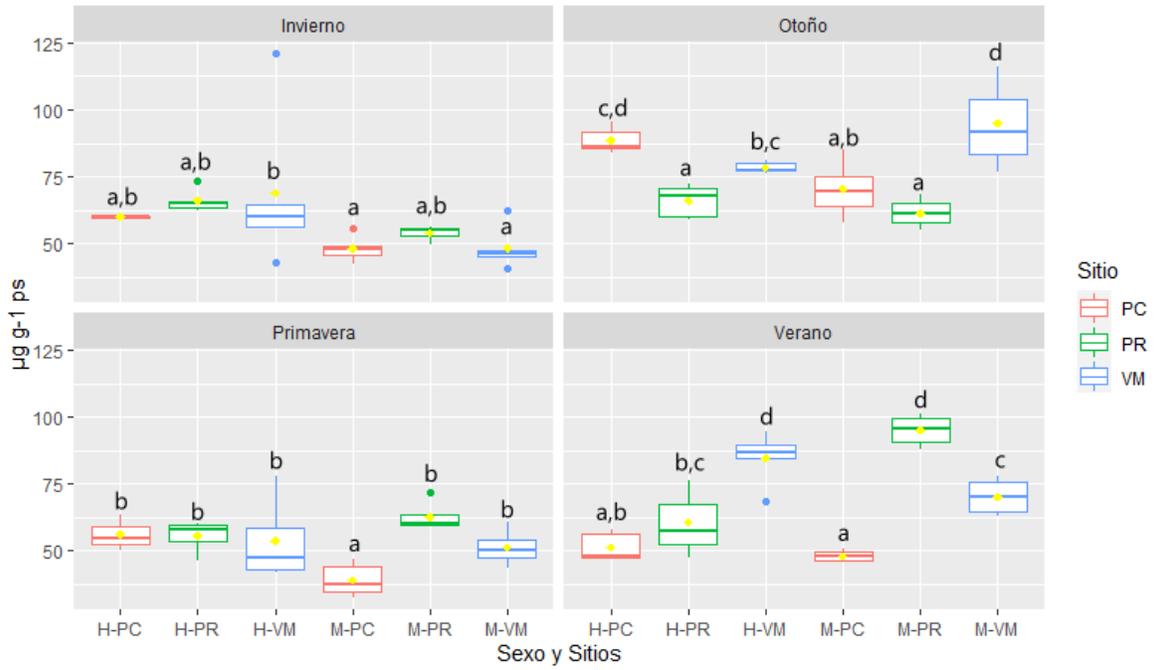
Finalmente, en el caso del **Fe** (Figura 21f), en invierno, se registraron las mayores concentraciones en PR y VM. La misma tendencia espacial se observó en invierno y primavera, donde los machos concentraron mayor Fe. Sin embargo, en verano, si bien en PR y VM se registraron los mayores valores de Fe, fueron más concentrados por las hembras.



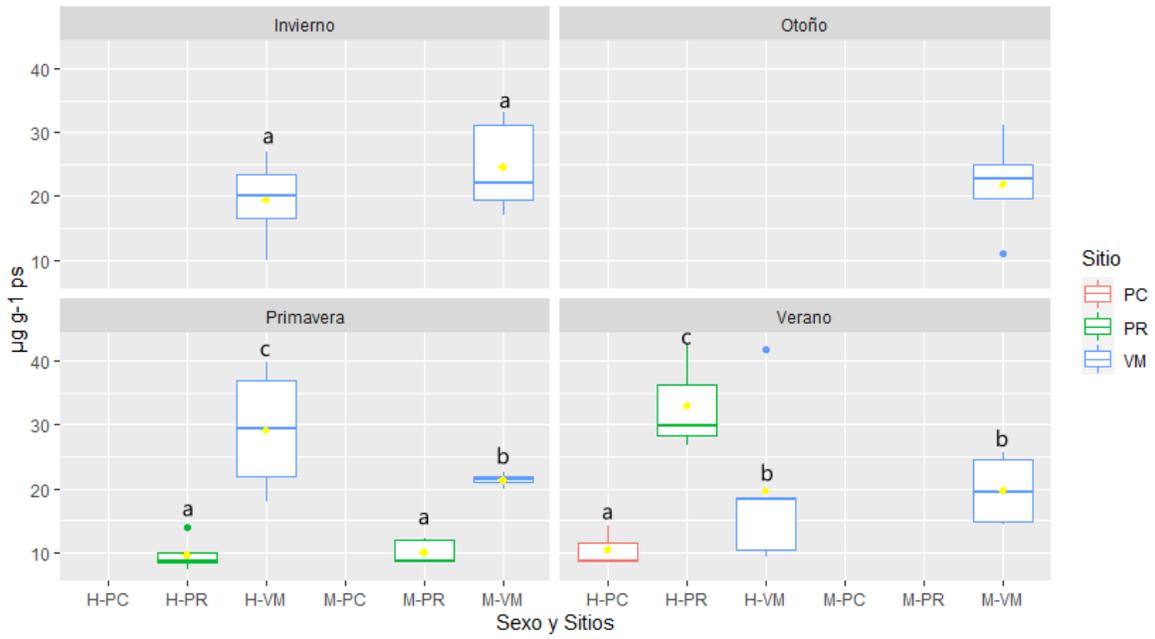
**b) Cobre (Cu)**



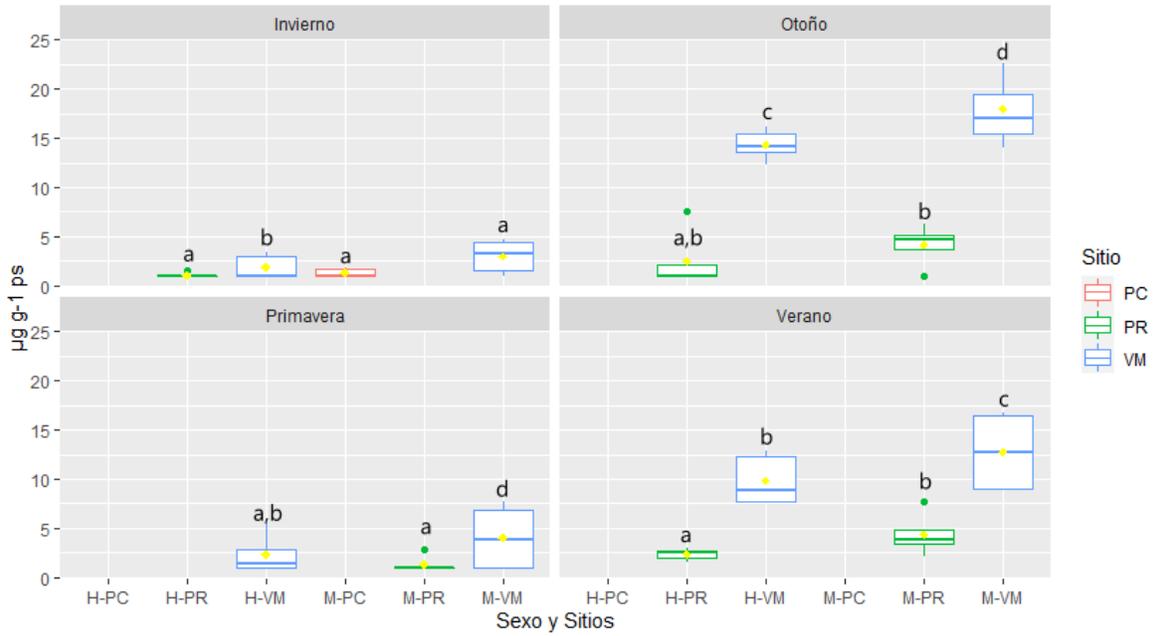
**c) Zinc (Zn)**

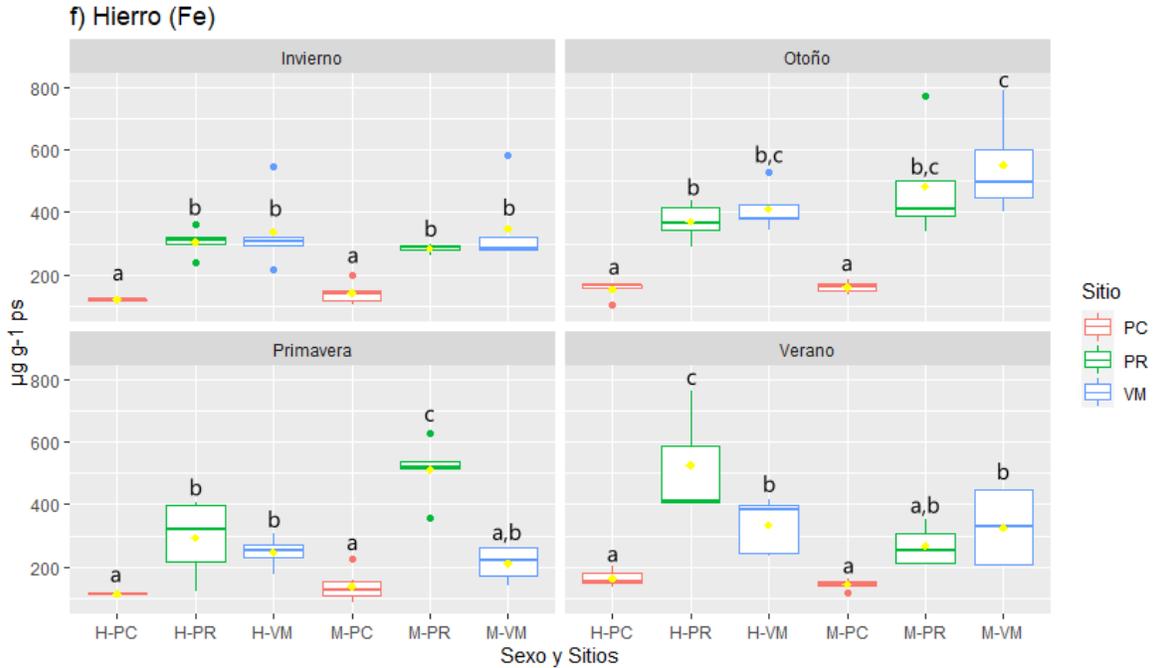


d) Manganeso (Mn)



e) Niquel (Ni)





**Figura 21:** Box-plot de metales ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ ) en cangrejos por sexos y sitios según la estación. Abreviaciones: hembras (H) y machos (M) de acuerdo al sitio (PC, PR, VM). Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Donde no se graficaron datos, los valores se encontraban  $< \text{LDM}$ .

### 3.3.6 Factor de Acumulación Biota-Sedimentos (FABS)

La relación de acumulación de metales biota-sedimento estimada a partir del **FABS** según el sitio y estación para los dos sexos se encuentran en las Figuras 22 a y b, respectivamente. En líneas generales, la mayor bioacumulación se dio en hembras tanto considerando sitios como estaciones. En el caso de los sitios\*sexos, se observó que el Cu fue el metal más bioacumulado por los cangrejos de ambos sexos, seguido del Zn, con mayores valores para las hembras de PC y VM (Figura 22a). En el caso del análisis de estación\*sexo, el Cu también fue el metal más bioacumulado, con mayores valores en otoño y los más bajos en primavera (Figura 22b), mientras que el Zn tuvo valores más bajos, pero siempre encima de 1. El Mn, Ni y Fe se encontraron entre los metales con valores por debajo de 1, lo cual indicaría que estos metales no se encuentran entre los rangos de bioacumulación a partir de los sedimentos.

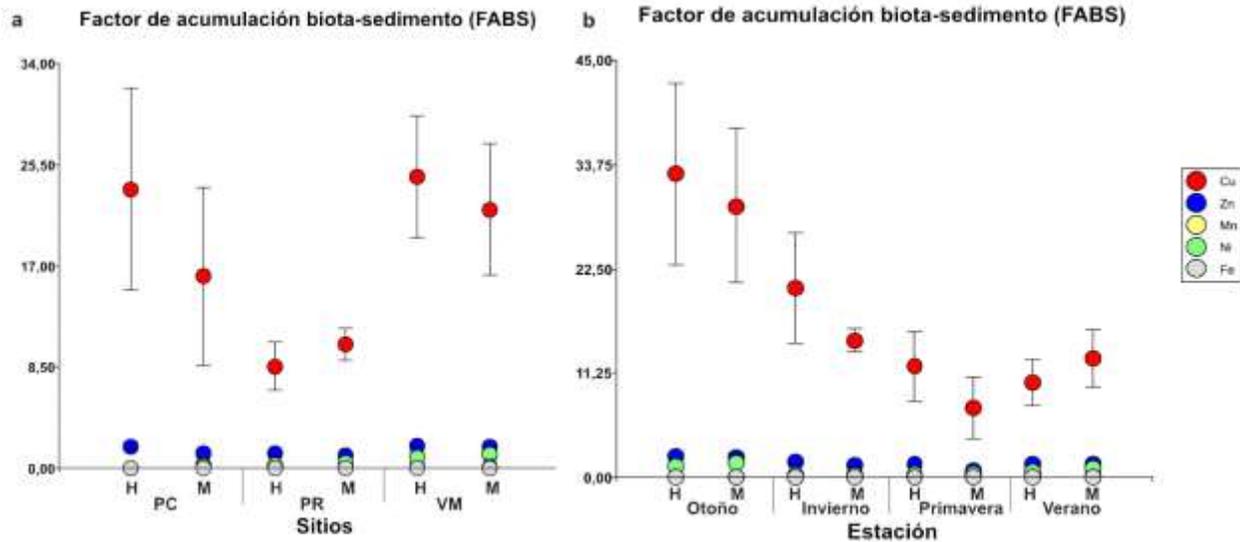


Figura 22: Media ( $\pm$  EE) del factor de acumulación biota-sedimento para hembras (H) y machos de *N. granulata* según a) sitios\*sexos y b) estación\*sexos. El Pb y Cr no se graficaron al estar <LDM en cangrejos y el Cd al encontrarse <LDM en sedimentos

### 3.3.7 Utilización de IAT e índice IBR

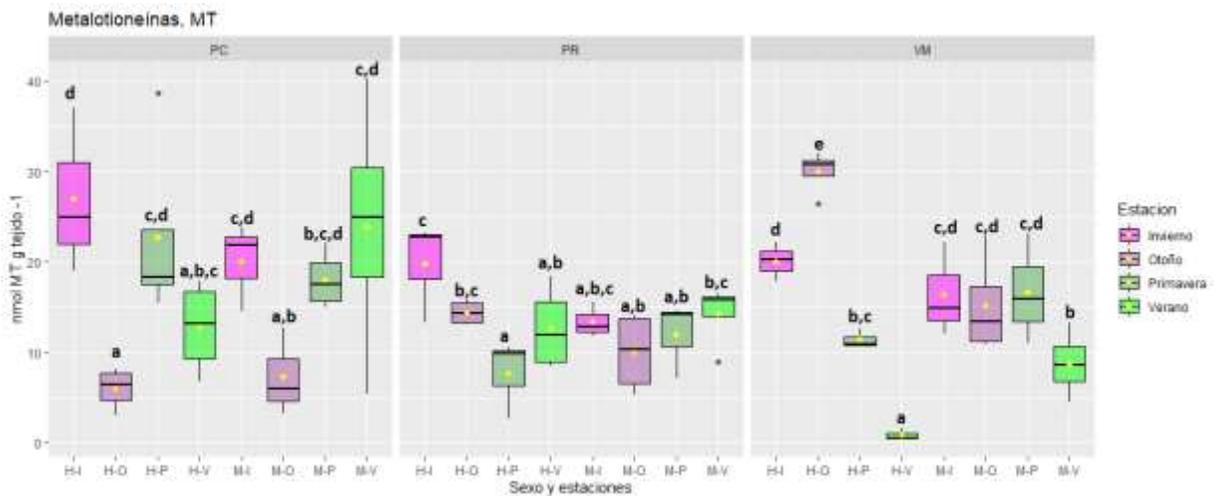
#### 3.3.7.1 Metalotioneínas (MT)

En la Figura 23 se encuentra esquematizada la concentración de MT registrada para cada sitio, según la estación\*sexo de *N. granulata*. En el caso de **PC**, no se observaron diferencias entre hembras y machos y las distintas estaciones. Las concentraciones de estas proteínas tendieron a ser menores en machos y hembras de otoño. Los máximos valores de MT se presentaron en las hembras de invierno que no registraron diferencias significativas con los machos de la misma estación, machos y hembras de la primavera y machos del verano.

En **PR**, en general tampoco se observaron diferencias significativas entre los sexos y las estaciones analizadas, aunque en invierno en ambos sexos se detectaron los mayores valores de MT. Sin embargo, sin diferencias significativas con los machos de verano y hembras de otoño.

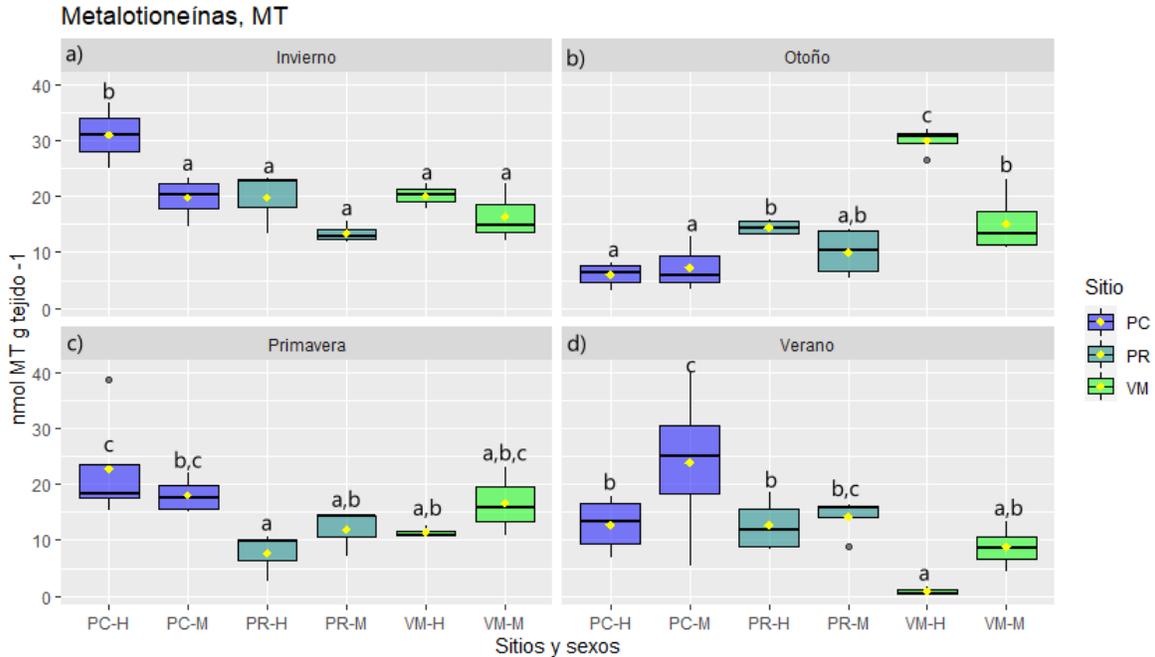
Por último, en **VM** se observaron diferencias significativas considerando ambos factores. Las concentraciones de MT que fueron significativamente mayores en las hembras de otoño y significativamente menores en hembras de verano. Finalmente, los machos

siempre fueron relativamente menores en todas las estaciones en comparación a las hembras, excepto en el verano donde fueron mayores los valores de MT en los machos.



**Figura 23:** Concentración estacional de metalotioneínas ( $\text{nmol MT g tejido}^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

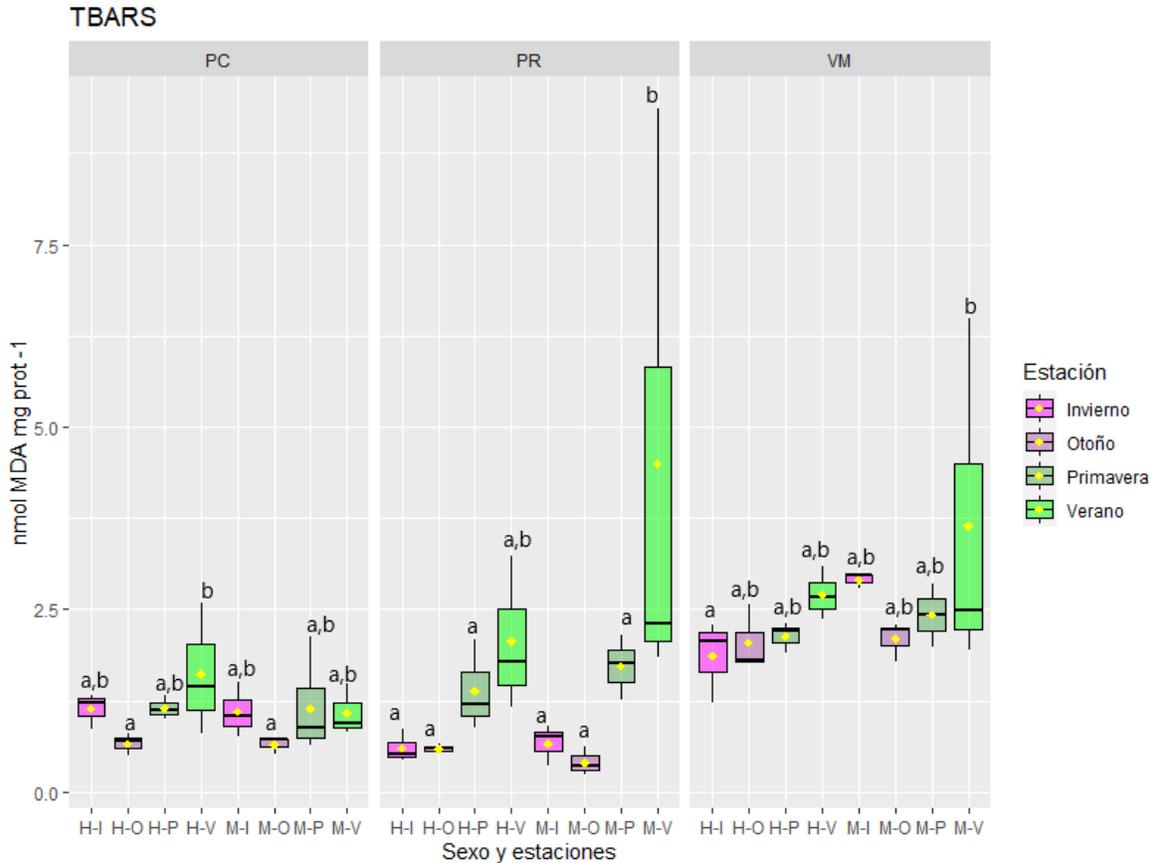
En la Figura 24 se encuentran diagramadas las concentraciones de MT para cada sitio\*sexo según la estación. En el caso del invierno, las MT fueron mayores en las hembras de PC respecto a los otros sitios\*sexos (Figura 24a). En otoño se registraron mayores concentraciones de MT en las hembras de VM (Figura 24b). En tanto, en primavera, las hembras de PC también presentaron la mayor concentración de MT, pero sin diferencia significativa con los machos del mismo sitio y los de VM (Figura 24c). Finalmente, en el verano, los machos de PC presentaron mayor concentración de MT sin diferencias con los machos de PR (Figura 24d).



**Figura 24:** Concentración estacional (a, invierno; b, otoño; c, primavera; d, verano) de metalotioneínas (nmol MT g tejido<sup>-1</sup>) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

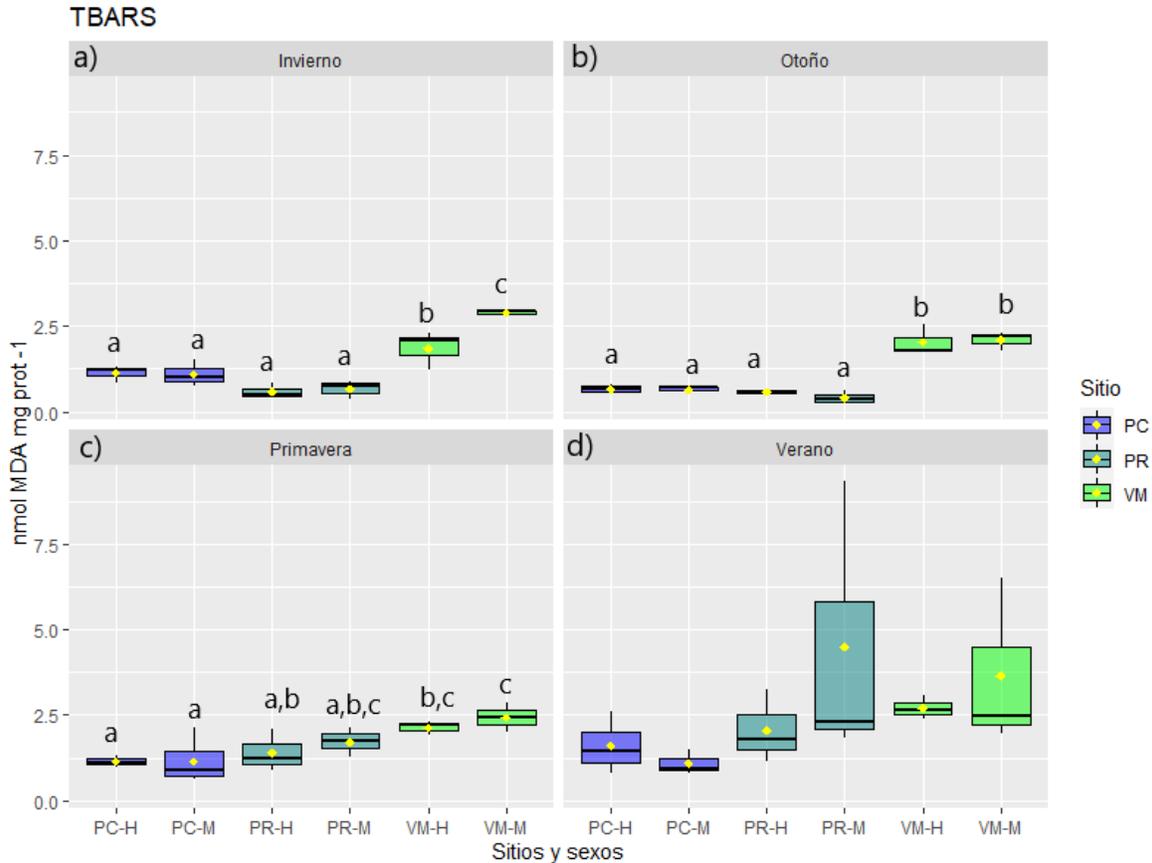
### 3.3.7.2 Biomarcadores de estrés oxidativo: TBARS, CAT, GST, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y GR

En la Figura 25 se encuentra esquematizada la peroxidación lípida (LPO) cuantificada a partir del nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para cada sitio, según la estación\*sexo de los cangrejos. En el caso de PC, el mayor valor se registró en las hembras de verano, pero no presentaron diferencias significativas con el resto de las estaciones\*sexos, a excepción de las hembras y machos de otoño con menores valores de TBARS. En PR, el mayor nivel de TBARS se observó en los machos de verano que no presentaron diferencias con las hembras de la misma estación. En tanto, en el resto de los sexos de las otras estaciones, los niveles fueron más bajos y similares entre sí y sólo con las hembras de verano. En VM, los mayores niveles se registraron en los machos de verano que sólo fueron estadísticamente diferentes a las hembras de invierno y similares al resto de los sexos en las diferentes estaciones.



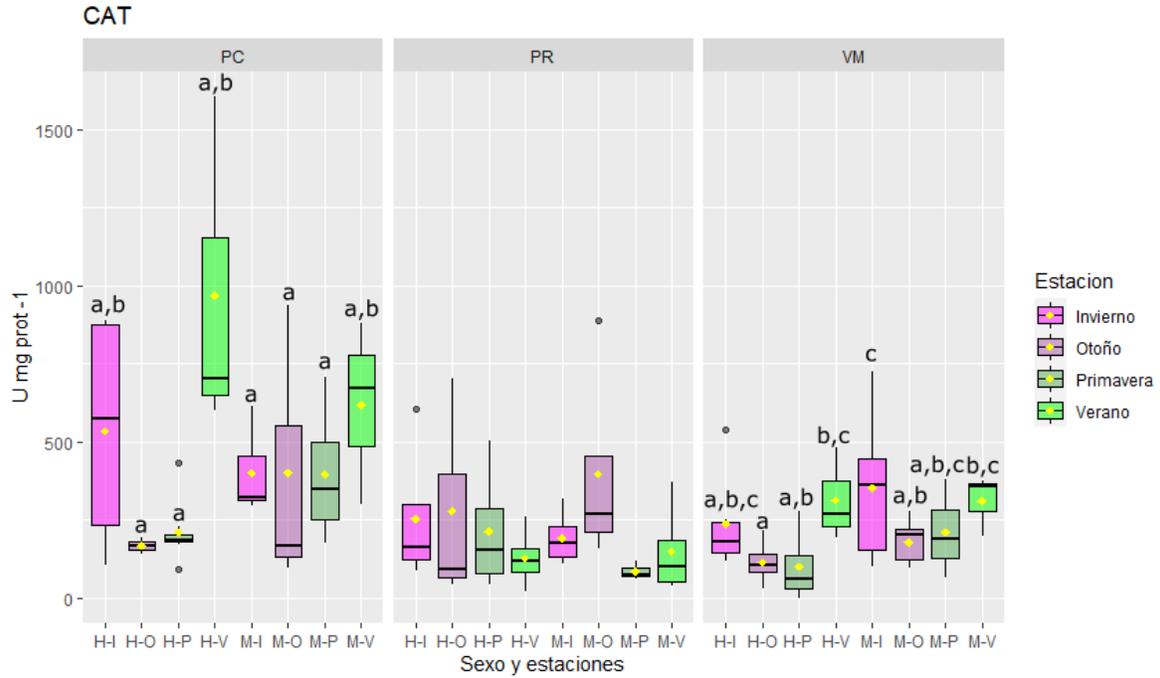
**Figura 25:** Concentración estacional de TBARS (nmol MDA mg proteínas<sup>-1</sup>) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 26 se graficaron los niveles de TBARS para cada sitio\*sexo según la estación. En el caso del invierno, los niveles fueron mayores en los machos de VM, seguidos de las hembras del mismo sitio y ambos estadísticamente diferentes de los otros sitios\*sexos, con niveles más bajos (Figura 26a). En otoño también se registraron mayores niveles de TBARS en ambos sexos de VM (Figura 26b). En tanto, en primavera, en VM también se registraron mayores valores para ambos sexos, siendo significativamente mayor con respecto a machos y hembras de PC. (Figura 26c). Finalmente, en el verano, no se observaron diferencias entre los sitios (Figura 26d).

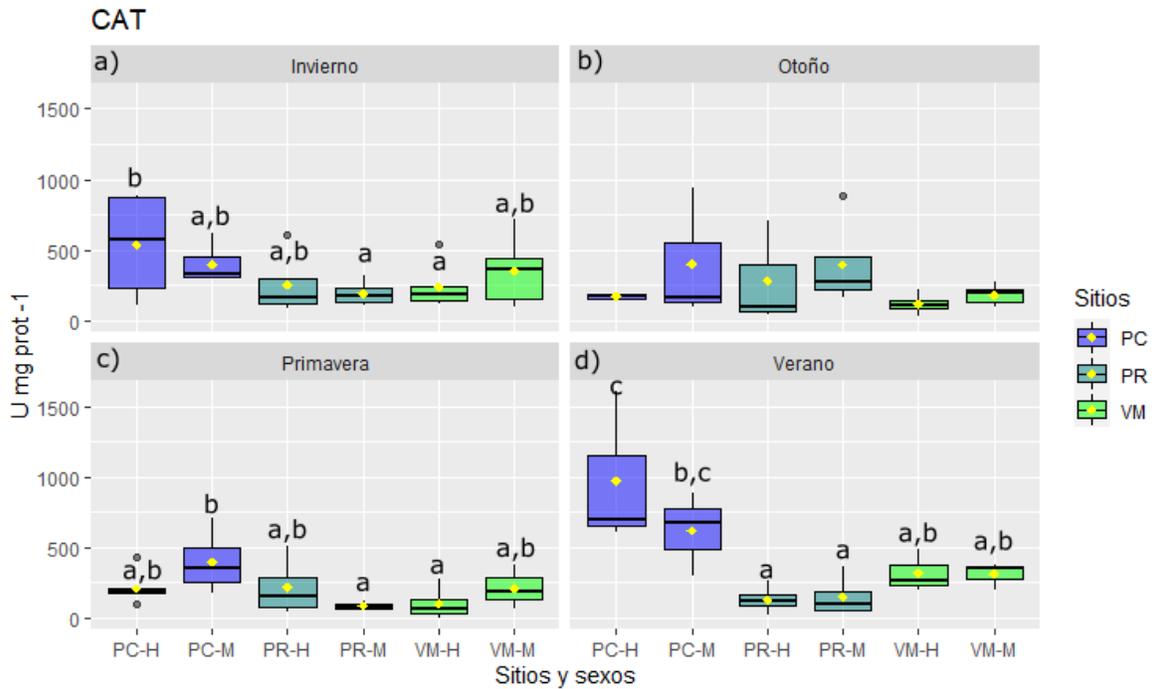


**Figura 26:** Concentración estacional (a, invierno; b, otoño; c, primavera; d, verano) de TBARS (nmol MDA mg proteínas<sup>-1</sup>) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 27 se encuentra graficada la actividad enzimática de **CAT** para cada estación\*sexo según el sitio. En el caso de PC, el mayor valor se registró en las hembras de verano, pero sin diferencias significativas con los machos de verano y hembras de invierno. En PR, no se observaron diferencias significativas entre las estaciones, mientras que en VM la actividad CAT fue mayor en machos de invierno, seguida por la estación de verano, que a su vez no presentaron diferencias significativas con las hembras de invierno y machos de primavera. De acuerdo al sitio\*sexo (Figura 28) según la estación, fue posible observar que en invierno CAT fue mayor en PC junto a hembra de PR y machos de VM. En la estación otoñal no se observaron diferencias, mientras que, en primavera, se registró mayor actividad en machos de PC, VM y hembras de PR; en tanto en verano, se observaron mayores valores en PC.

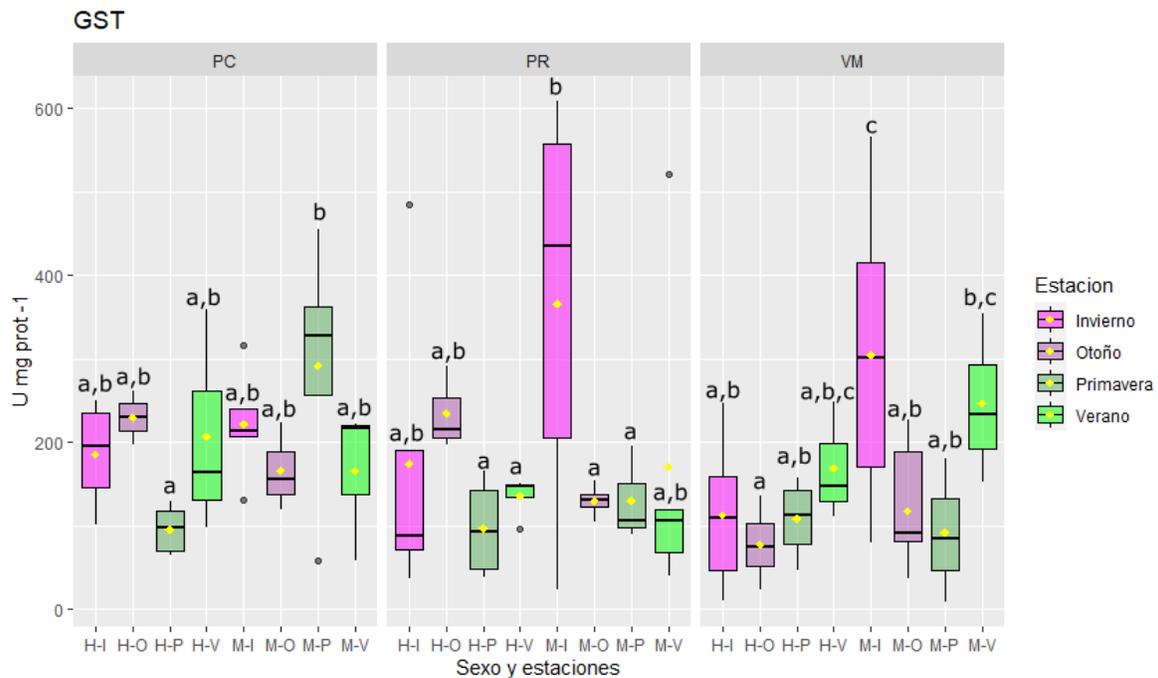


**Figura 27:** Actividad CAT ( $U\text{ mg proteínas}^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

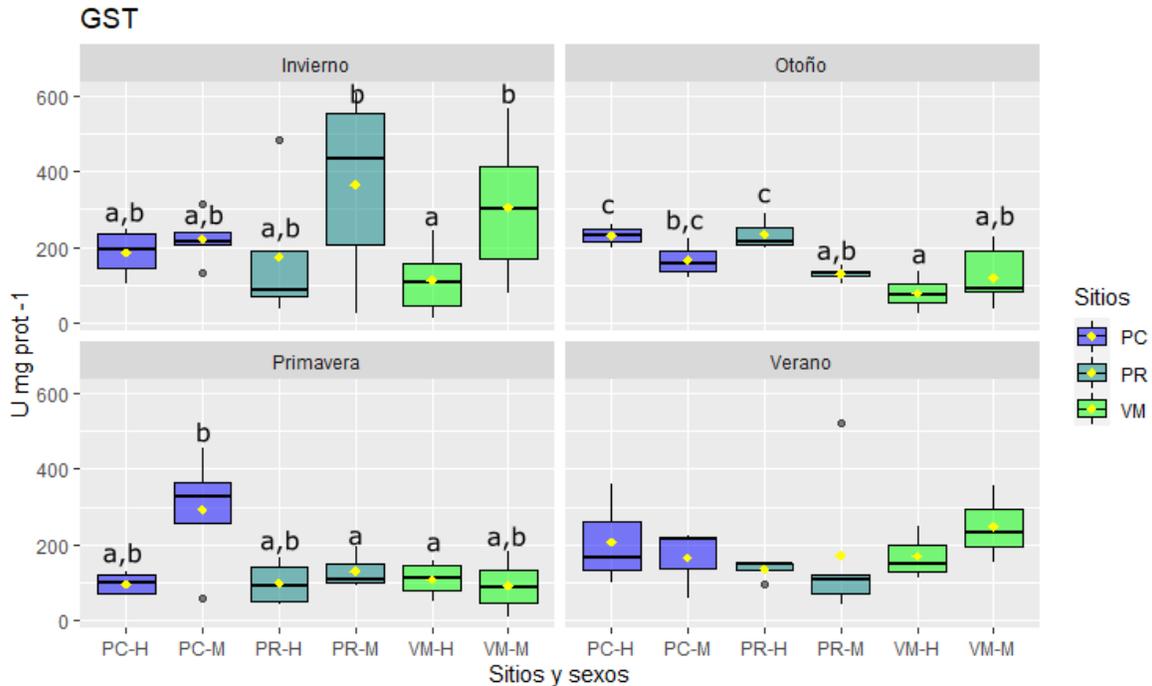


**Figura 28:** Actividad CAT (a, invierno; b, otoño; c, primavera; d, verano) ( $U\text{ mg proteínas}^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

En cuanto a la **GST** (Figura 29), el análisis de la varianza por sitios para PC, indicó una mayor actividad en machos de primavera, sin presentar diferencias significativas con el resto de los sexos\*estaciones, a excepción de las hembras de primavera con el menor valor. En PR, tampoco se observaron diferencias entre las estaciones, a excepción del mayor valor en los machos de invierno. En tanto que en VM, los mayores valores de GST se registraron en machos de invierno, siendo significativamente mayor que las hembras de la misma estación, en machos de verano y en hembras de verano. En base a las estaciones (Figura 30), en invierno, los valores de GST fueron mayores en machos de PR y VM, sin diferencias con PC y las hembras de PR. En otoño, se observó una mayor actividad en PC junto a las hembras de PR, mientras que los valores más bajos se presentaron en VM. En primavera, se registraron mayores valores de GST en machos de PC, sin diferencias con las hembras del mismo sitio, hembras de PR y machos de VM. Finalmente, en verano, no se presentaron diferencias en la actividad de esta enzima.

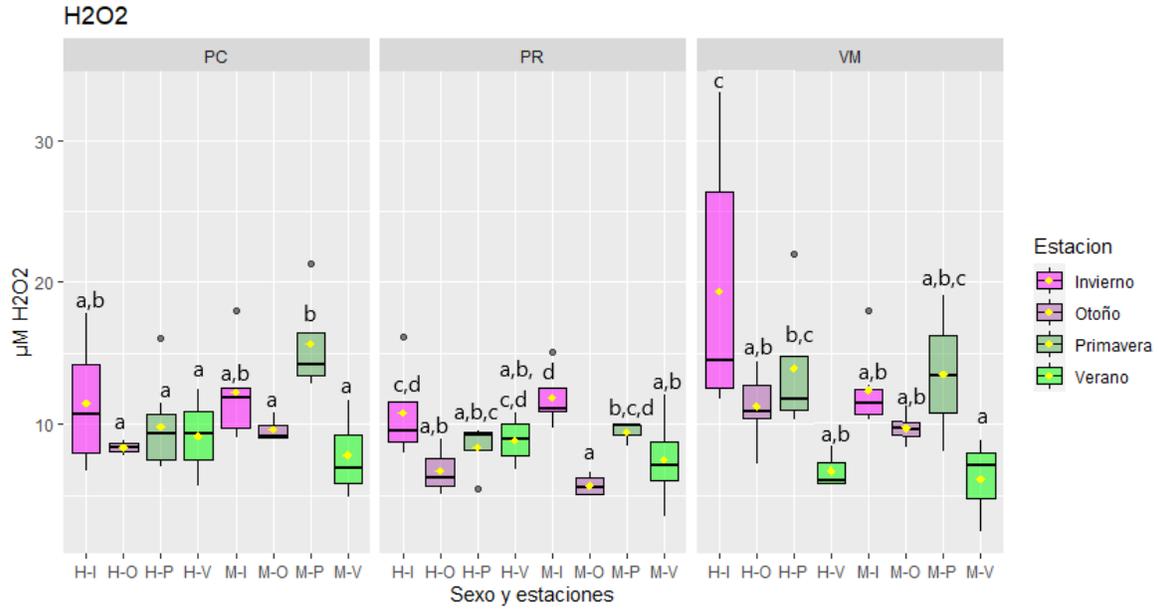


**Figura 29:** Actividad GST ( $U\ mg\ proteínas^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

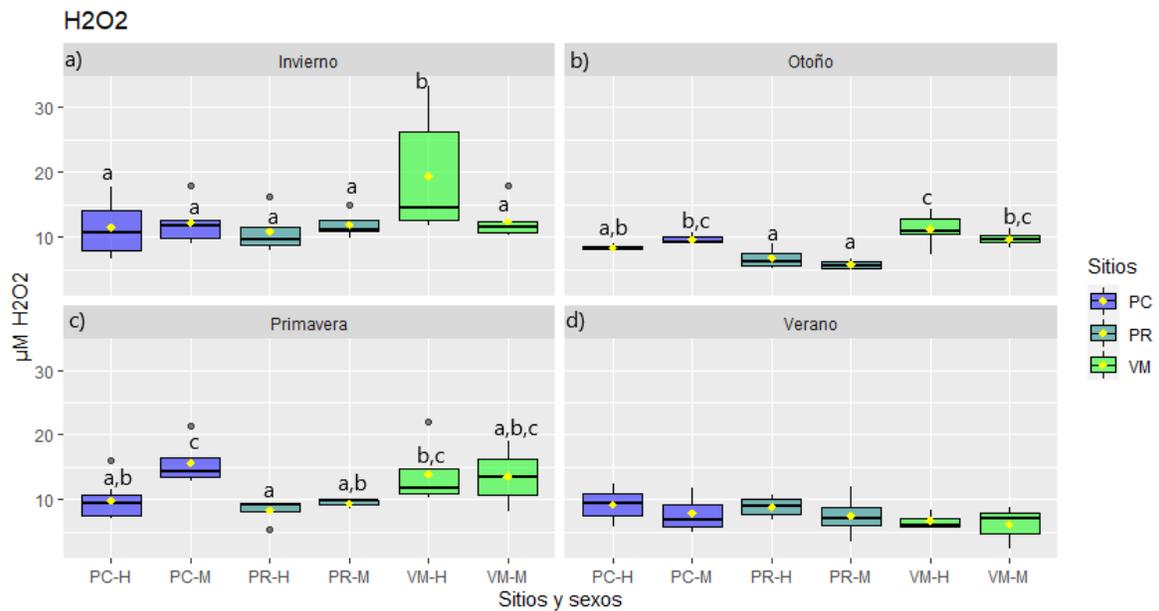


**Figura 30:** Actividad GST (*a*, invierno; *b*, otoño; *c*, primavera; *d*, verano) ( $U\text{ mg proteínas}^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Como medida de una especie reactiva de oxígeno, se analizaron las diferencias en el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por sitios (Figura 31) y estaciones (Figura 32). En PC, el contenido fue mayor en los machos de primavera sin diferencias con la estación invernal. En PR, esta especie fue mayor en invierno, aunque no presentó diferencias con machos y hembras de primavera y verano, respectivamente. En VM, la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue mayor en hembras de invierno que no presentaron diferencias con machos y hembras de primavera. Los análisis estacionales (Figura 32), indicaron que en invierno esta especie fue mayor en hembras de VM a diferencia de los otros sexos\*sitios. En otoño, también se observaron mayores concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en VM, seguido de los machos de PC; mientras que, en primavera, las concentraciones también fueron mayores en los machos de PC junto a ambos sexos en VM. Finalmente, en verano, no se observaron diferencias significativas en el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

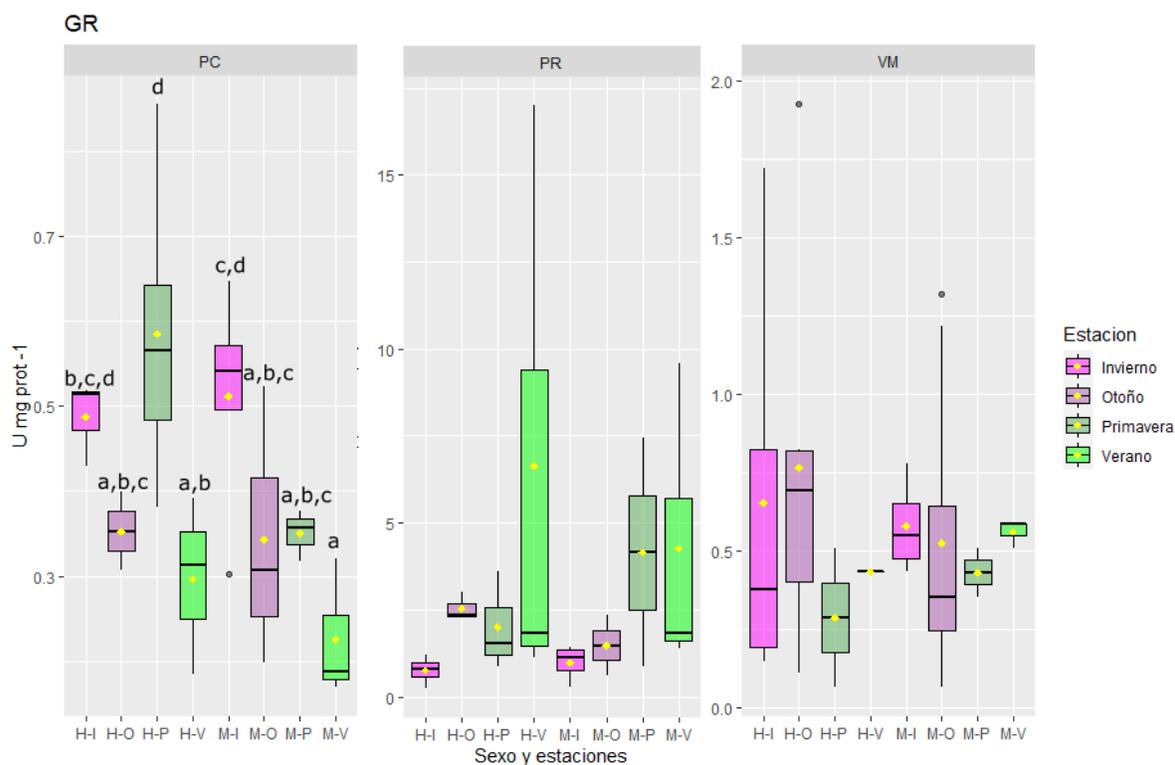


**Figura 31:** Contenido de peróxido de hidrógeno ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

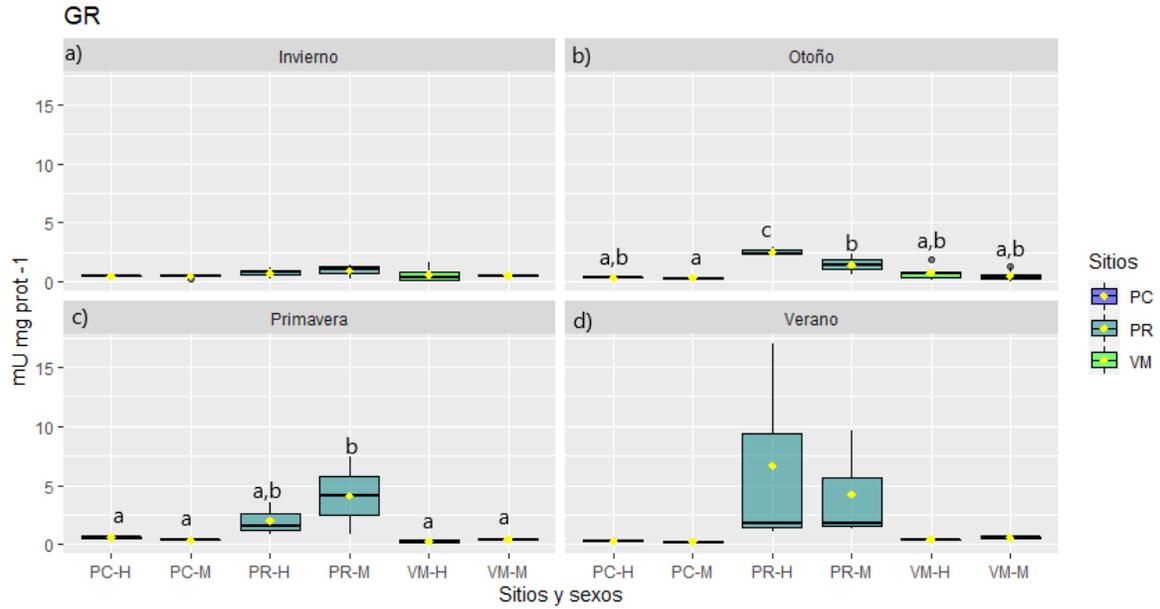


**Figura 32:** Contenido de peróxido de hidrógeno (*a*, invierno; *b*, otoño; *c*, primavera; *d*, verano) ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

De acuerdo a los sexos\*estaciones por sitio de muestreo, la actividad de **GR** fue mayor en hembras de primavera e invierno, seguido de machos de invierno. En tanto, en PR y VM la actividad de esta enzima no presentó diferencias significativas entre las estaciones de muestreo (Figura 33). El análisis de los sexos\*sitios según la estación de muestreo no indicó diferencias significativas en invierno y verano (Figura 34), mientras que, en otoño, se observó una mayor actividad en hembras de PR, seguido de los machos del mismo sitio que, a su vez, no presentaron diferencias significativas con las hembras de PC y ambos sexos de VM. Finalmente, en primavera, se presentó una mayor actividad de GR en PR.



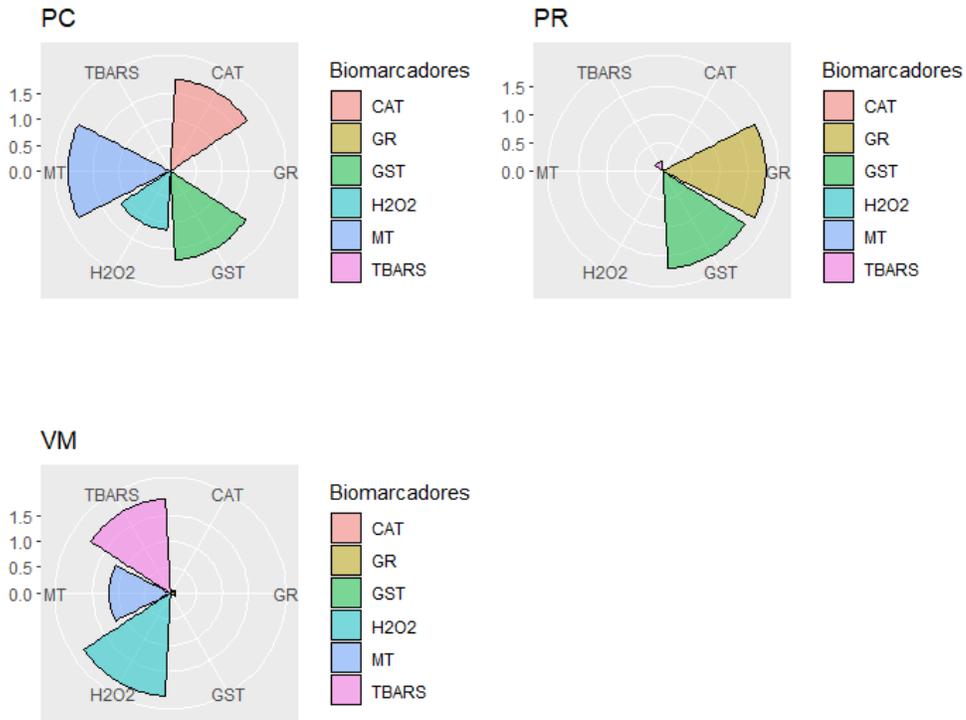
**Figura 33:** Actividad de GR ( $U\text{ mg proteínas}^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



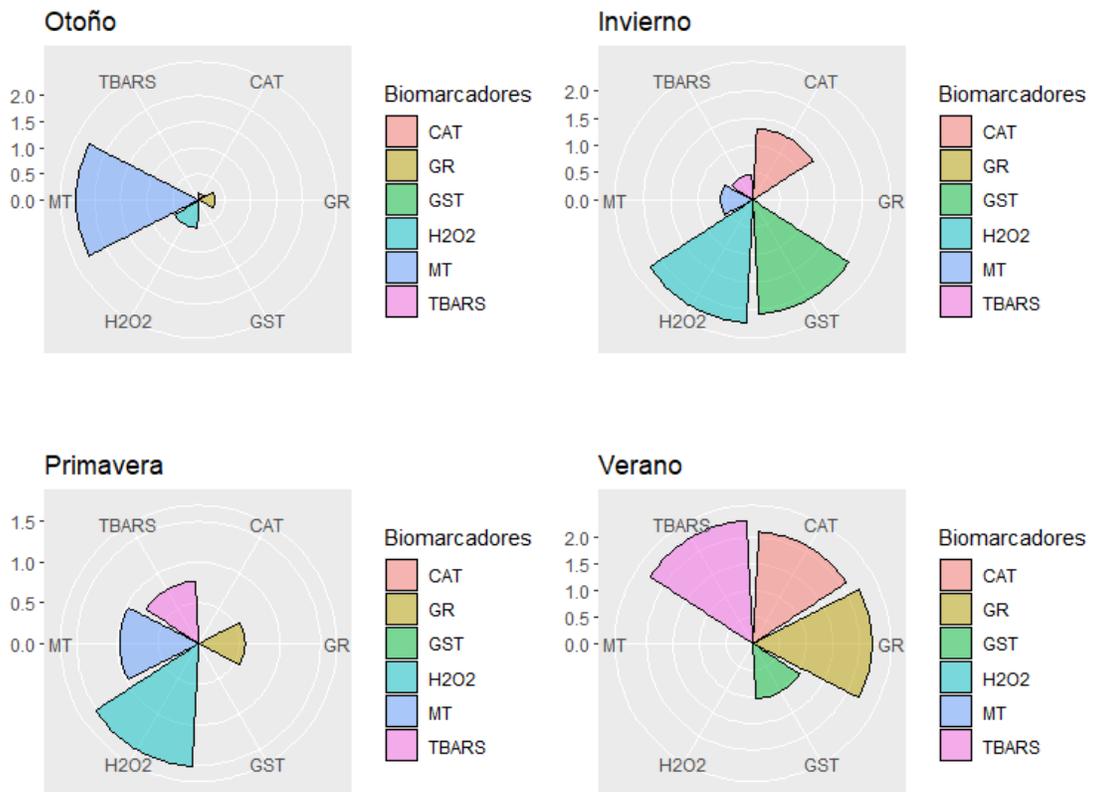
**Figura 34:** Actividad de GR (**a**, invierno; **b**, otoño; **c**, primavera; **d**, verano) ( $U\text{ mg proteínas}^{-1}$ ) en hembras y machos de cada sitio de muestreo. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

### 3.3.7.3 IBR

De acuerdo a las figuras esquematizadas para los biomarcadores que conforman el IBR de sitios (Figura 35), se puede observar que en PC dominaron las MT seguida de la actividad CAT y GST. En PR, predominó la GST y GR, en tanto en VM, el  $H_2O_2$  junto a TBARS. En base a la estacionalidad (Figura 36), en otoño predominaron las MT, en invierno el  $H_2O_2$  seguido de la GST. En las estaciones más cálidas, se registró una dominancia del  $H_2O_2$  en primavera, mientras que en verano predominaron TBARS, GST y GR.

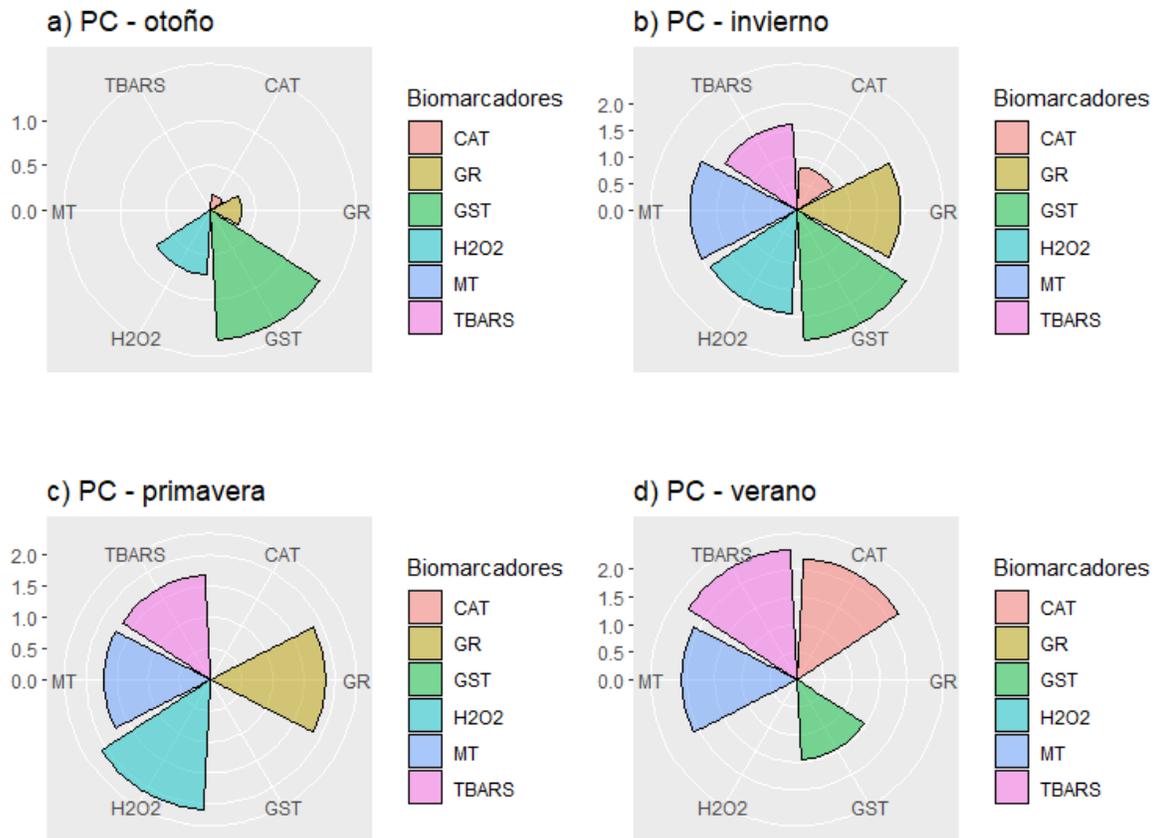


**Figura 35:** Respuesta integrada de biomarcadores (IBR) según el sitio de muestreo.



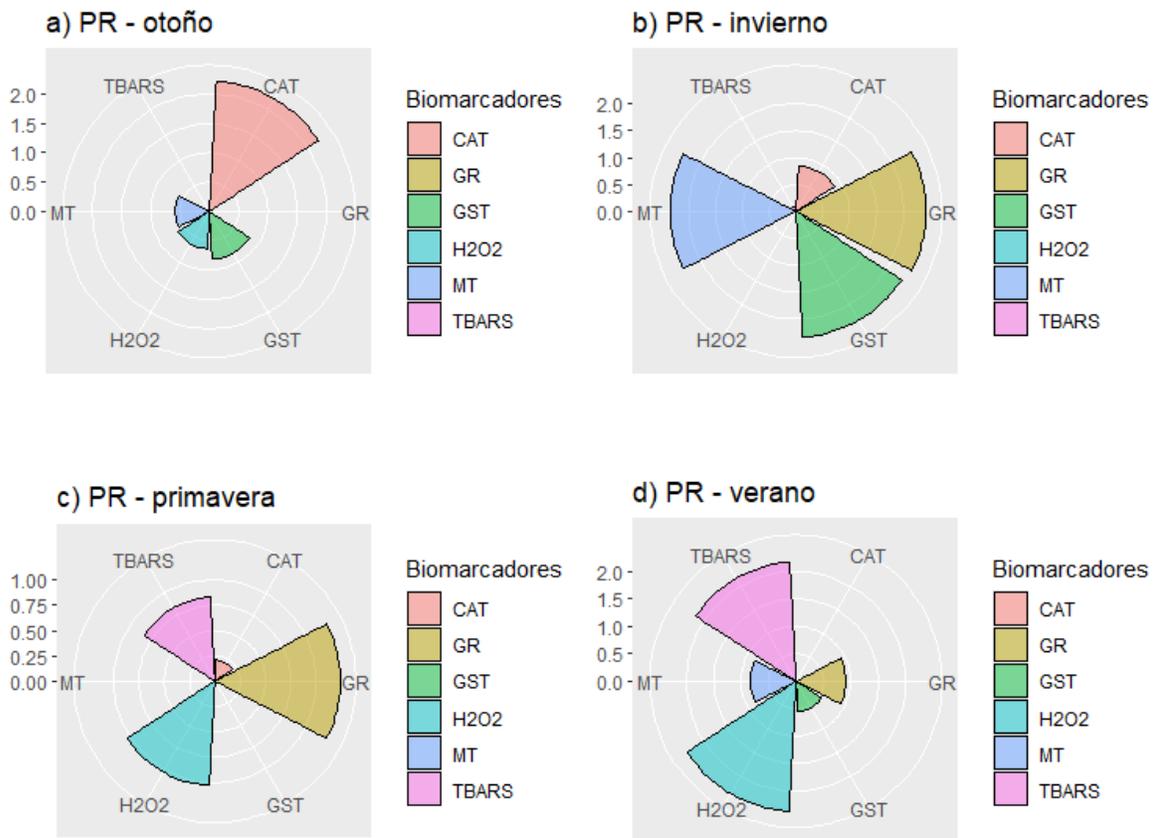
**Figura 36:** Respuesta integrada de biomarcadores (IBR) según las estaciones de muestreo.

Un análisis más detallado de los biomarcadores que componen el IBR en PC se muestra en la Figura 37. En otoño predominó la GST (Figura 37a), en invierno, la GST seguida MT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y GR (Figura 37b). Mientras que en primavera fue superior el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de GR, MT y TBARS; y en verano fue mayor TBARS en conjunto con CAT y MT (Figuras 37c, d).



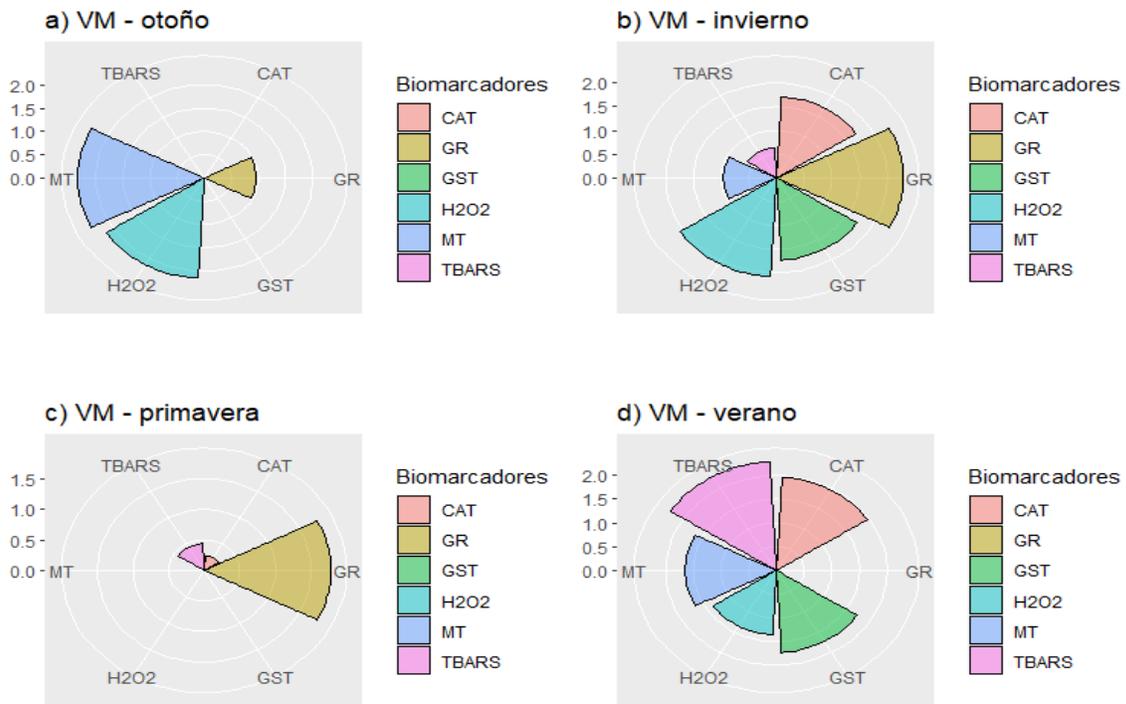
**Figura 37:** Respuesta integrada de biomarcadores (IBR) en las estaciones de PC.

De acuerdo al IBR para PR (Figura 38), en otoño predominó la CAT (Figura 38a), en invierno, la GST, GR y MT (Figura 38b). En tanto, en primavera fue superior la GR, y en verano dominó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y TBARS (Figuras 38c, d).



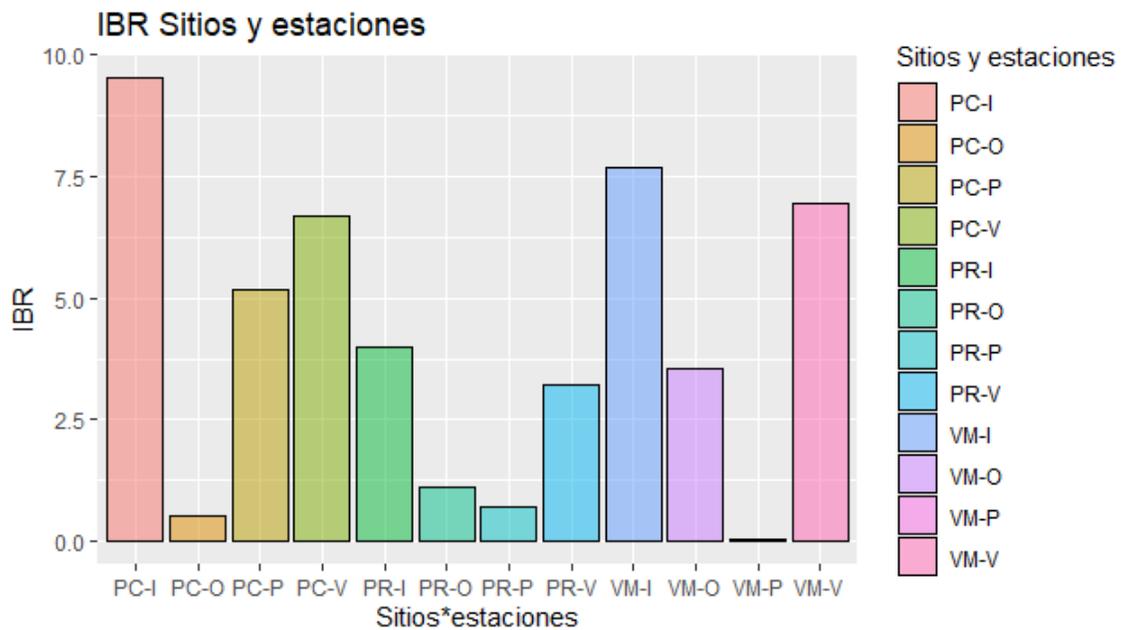
**Figura 38:** Respuesta integrada de biomarcadores (IBR) en las estaciones de PR.

Para VM (Figura 39), se observó una predominancia de MT seguida del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 39a), en tanto en invierno, fue mayor la GR, seguido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT y GST (Figura 39b). En primavera fue superior la GR, y en verano TBARS, seguido de CAT y GST (Figuras 39c, d).



**Figura 39:** Respuesta integrada de biomarcadores (IBR) en las estaciones de VM.

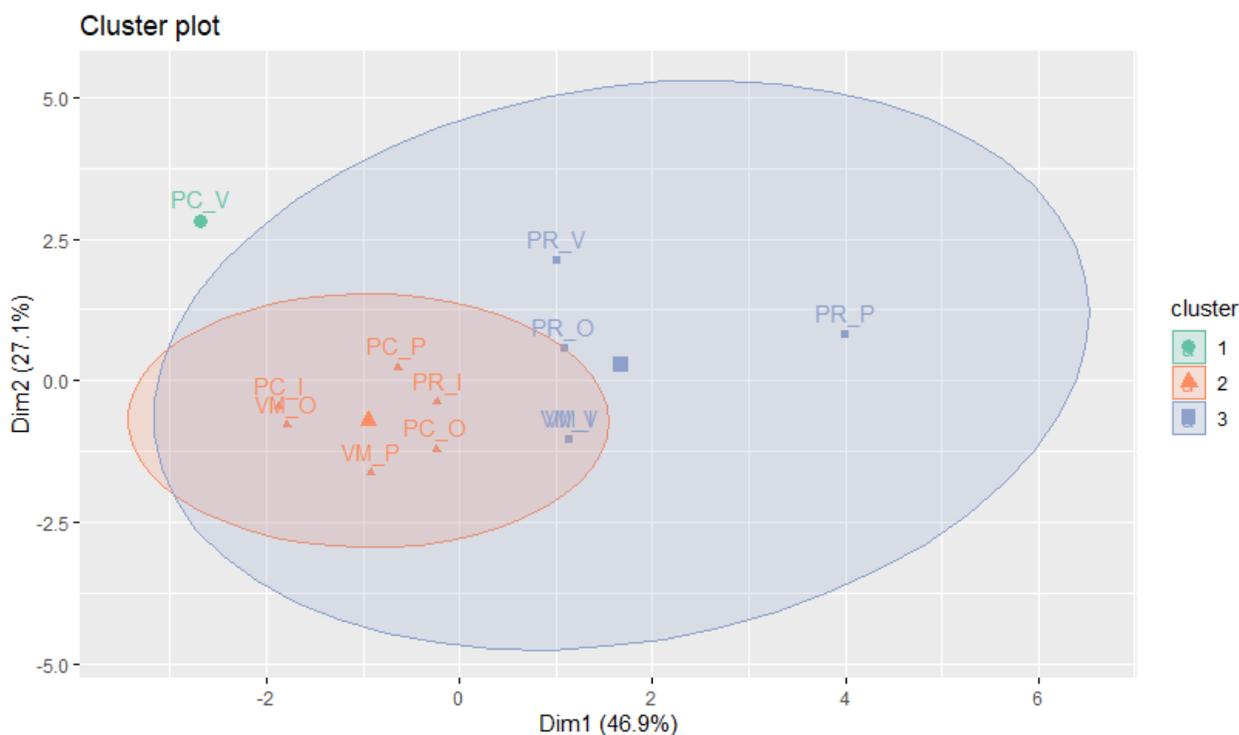
En el caso del IBR para todas las estaciones de los sitios muestreados denotaron un mayor valor del índice en invierno de PC, PR y VM, seguido por la estación de verano (Figura 40).



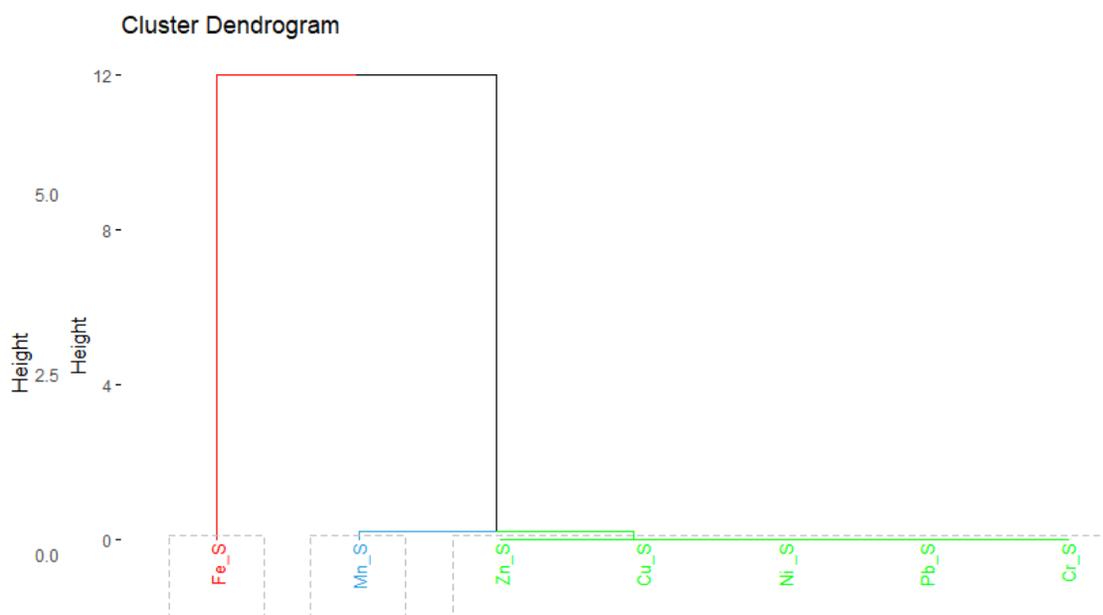
**Figura 40:** Índice IBR para todos los sitios por estaciones de muestreo.

### 3.3.8 Análisis multivariados: parámetros físico-químicos, biometría, metales y biomarcadores

En base a los análisis multivariados, el **clúster basado en k-medias** para los sedimentos (Figura 41) demostró un agrupamiento entre las estaciones en PC (a excepción del verano), VM y PR\_I (invierno) que luego se agrupó dentro de otro clúster con PR. Este análisis fue apoyado por el dendograma (Figura 42) que distinguió cuatro grupos: el primero compuesto por el invierno de VM y PC y el verano de VM y PR. También fue posible observar otros tres grupos compuestos por las estaciones restantes de PR, VM y PC. Sin embargo, es necesario señalar que, a pesar de estas agrupaciones, los subgrupos formados no presentaron gran disimilitud entre sí. En el caso de los metales en los sedimentos (Figura 43), el Fe se distinguió del resto de los metales, y el Mn se distinguió de otros metales como el Zn, Cu, Ni, Pb y Cr.

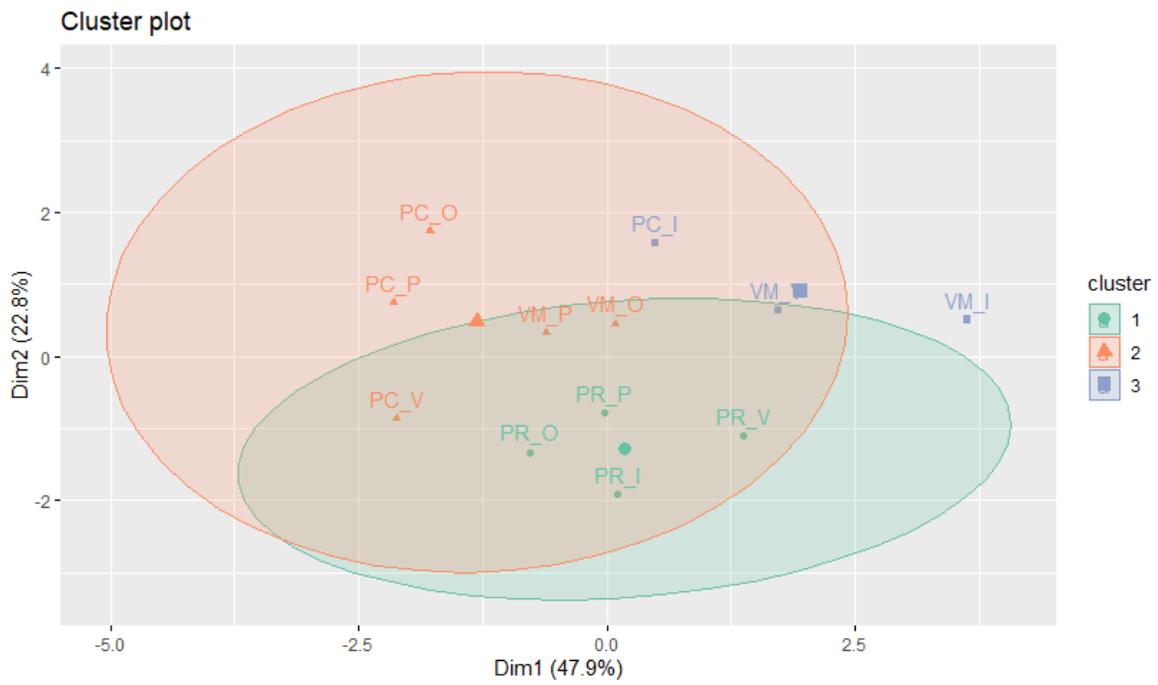


**Figura 41:** Clúster obtenido con el agrupamiento k-medias (distancia euclidiana) de los metales en los sedimentos para cada sitio\*estación

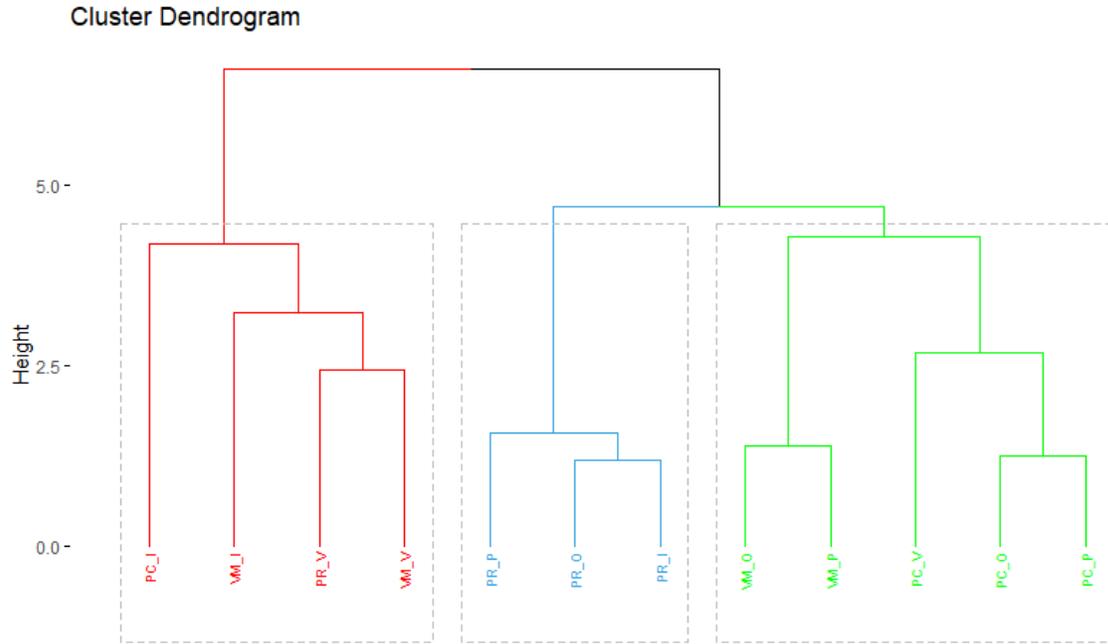


**Figura 43:** Dendograma obtenido por el agrupamiento *k-medias* (distancia euclidiana) de los metales en los sedimentos.  
**Fig** por sitios\*estación

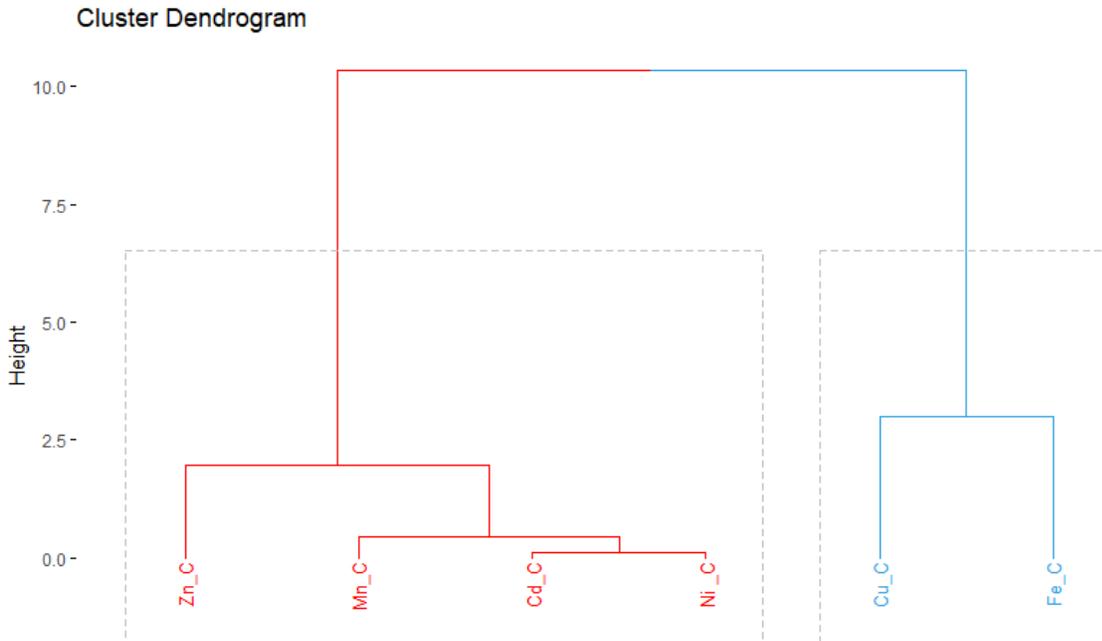
En el caso de los **metales en los cangrejos**, se distinguieron dos clústeres en el que se ubicaron las estaciones de PR y un segundo que agrupó este sitio con VM y PC (a excepción de los metales en VM\_I) (Figura 44). El dendograma, al igual que para los sedimentos, indicó un primer agrupamiento entre el invierno de VM y PC y el verano de PR y VM, un segundo grupo entre las estaciones restantes de PR y un último grupo entre las otras estaciones de PC y VM (Figura 45) y en este caso los grupos tampoco presentaron gran disimilitud. Los metales en los cangrejos presentaron dos grupos: uno entre el Cu y Fe, y otro para el Zn, Mn, Cd y Ni (Figura 46).



**Figura 44:** Clúster obtenido con el agrupamiento *k*-medias (distancia euclidiana) de los metales en los cangrejos para cada sitio\*estación



**Figura 45:** Dendrograma obtenido por el agrupamiento *k-medias* (distancia euclidiana) para los metales en cangrejos por sitios\*estación



**Figura 46:** Dendrograma obtenido por el agrupamiento *k-medias* (distancia euclidiana) para los metales en cangrejos.

Las **correlaciones de Pearson** entre los parámetros físico-químicos de la columna de agua, Me\_C, Me\_S e IAT para **PC** se encuentran en la Figura 47. Para los metales (Ni, Cd, Cu, Fe, Mn), se observaron correlaciones fuertes y positivas con parámetros como temperatura, la salinidad y pH. Se observaron correlaciones entre metales en sedimentos, como en el caso del Mn y Ni, que, a su vez, se correlacionaron con el Mn y Ni de los cangrejos. Y, en el caso de los cangrejos, se observó una correlación Mn, Ni y Cd. En cuanto a los biomarcadores y los metales en los cangrejos, el Cd presentó correlaciones con GR, TBARS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las medidas morfométricas como el FC se correlacionaron con CAT y GST e IHS con GST. En tanto, entre los biomarcadores, se observaron correlaciones entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GR y TBARS, y entre GR y TBARS.

En **PR** (Figura 48) se distinguieron correlaciones positivas entre la temperatura y metales como el Pb de los sedimentos, y Cu, Zn y Mn de los cangrejos. A su vez, este parámetro se vinculó a marcadores bioquímicos, como GR y TBARS. El OD presentó correlaciones con biomarcadores vinculados al estrés oxidativo (CAT, GST y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los metales en los sedimentos presentaron mayor correlación que en el caso de PC. Entre los metales en los cangrejos, el Cd se correlacionó con el FC; Cu con GR y TBARS; el Zn con Mn y ambos con GR y TBARS. Mientras que, entre los biomarcadores, las MT se correlacionaron con GST y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; la GST se correlacionó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y CAT; y la GR con TBARS.

Para **VM**, (Figura 49), entre los parámetros, se destaca la salinidad que se correlacionó con metales esenciales. La mayoría de los metales en los sedimentos se correlacionaron entre sí, y se observaron correlaciones entre el Ni de los sedimentos con el de los cangrejos. En el caso de los metales en cangrejos, el Cd se correlacionó con CAT y GST, y los metales esenciales entre sí. El FC se correlacionó con IHS y TBARS y negativamente con MT; y entre los biomarcadores, las MT se correlacionaron positivamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y negativamente con TBARS. Mientras que la CAT presentó correlaciones positivas con GST y TBARS

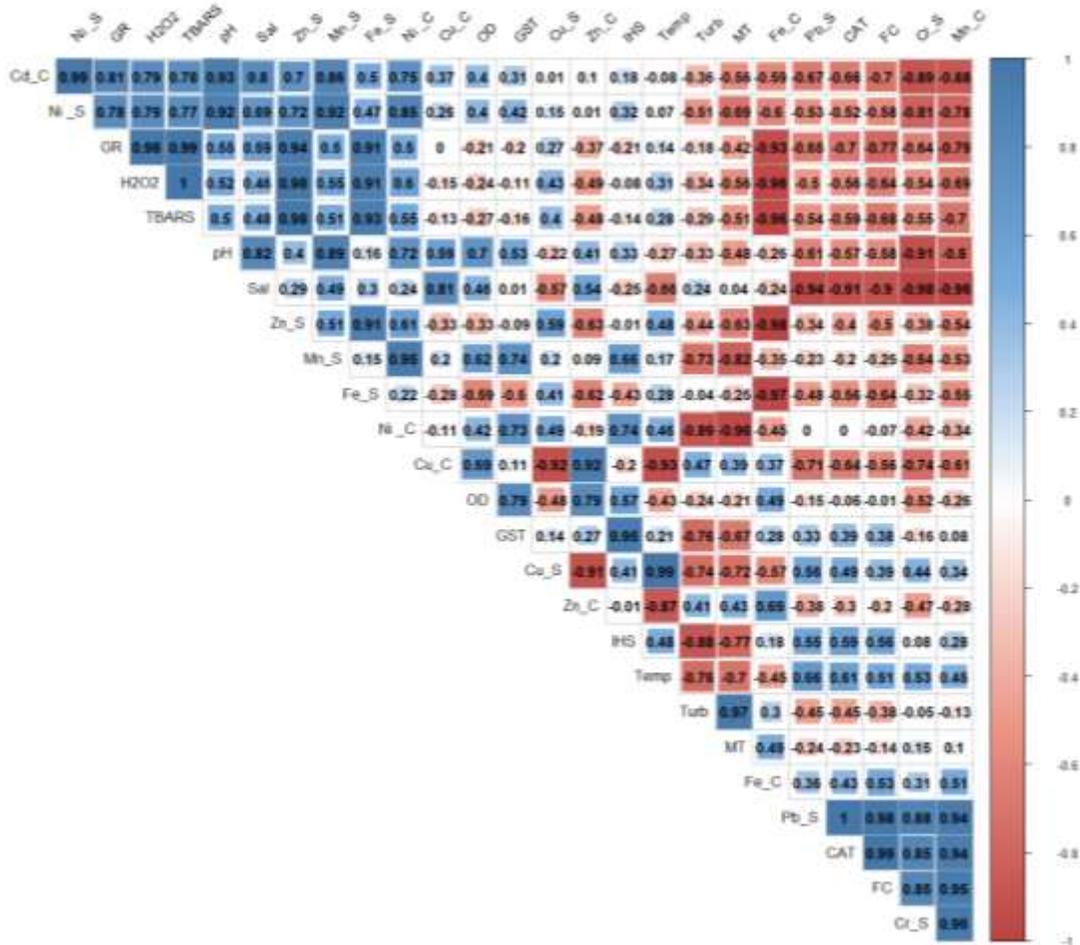


Figura 47: Corrpilot de Pearson para PC entre los metales de sedimentos (MeS), cangrejos (MeC), biomarcadores y parámetros físico-químicos de la columna de agua. Las correlaciones positivas son más fuertes en azul

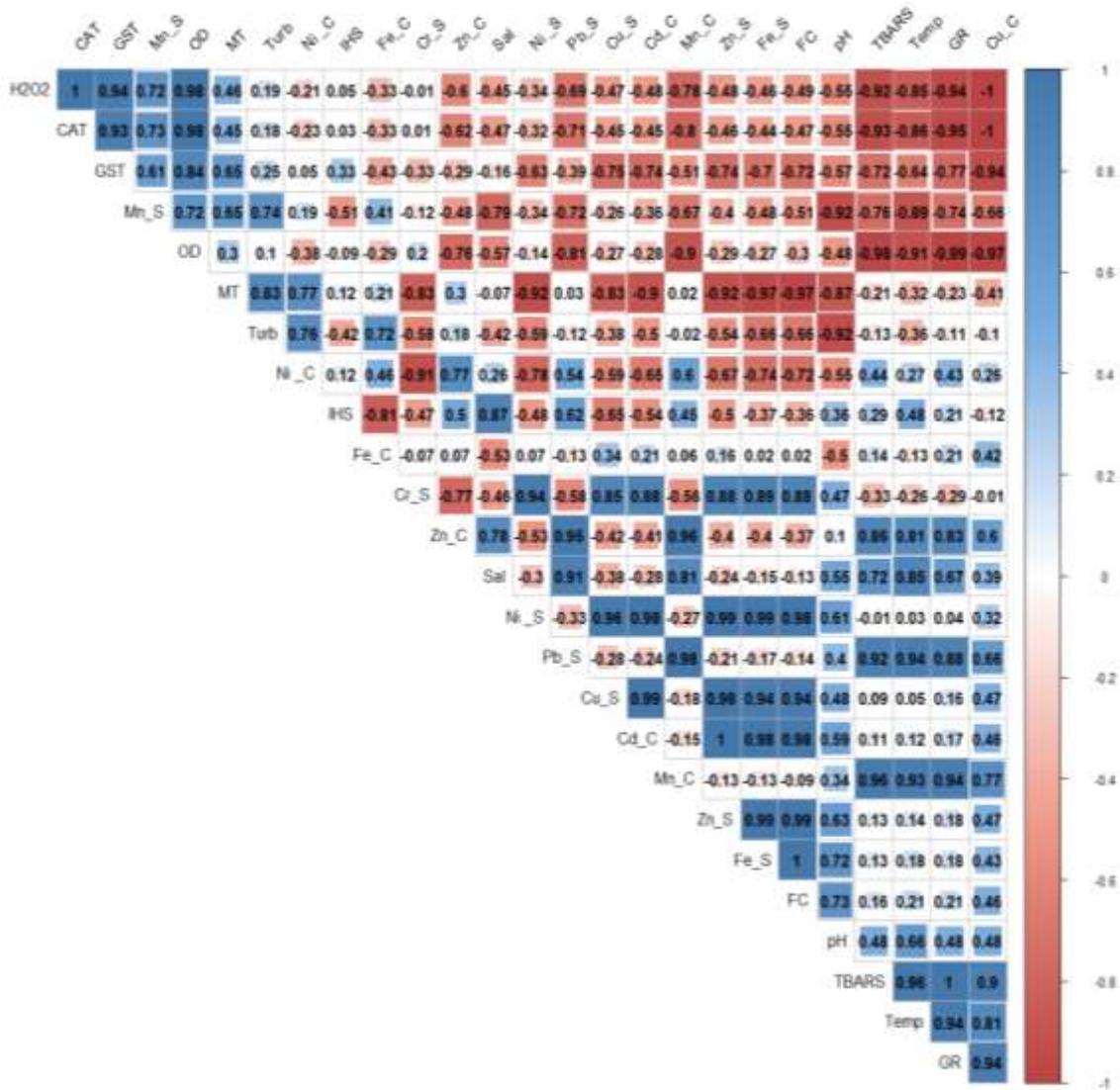
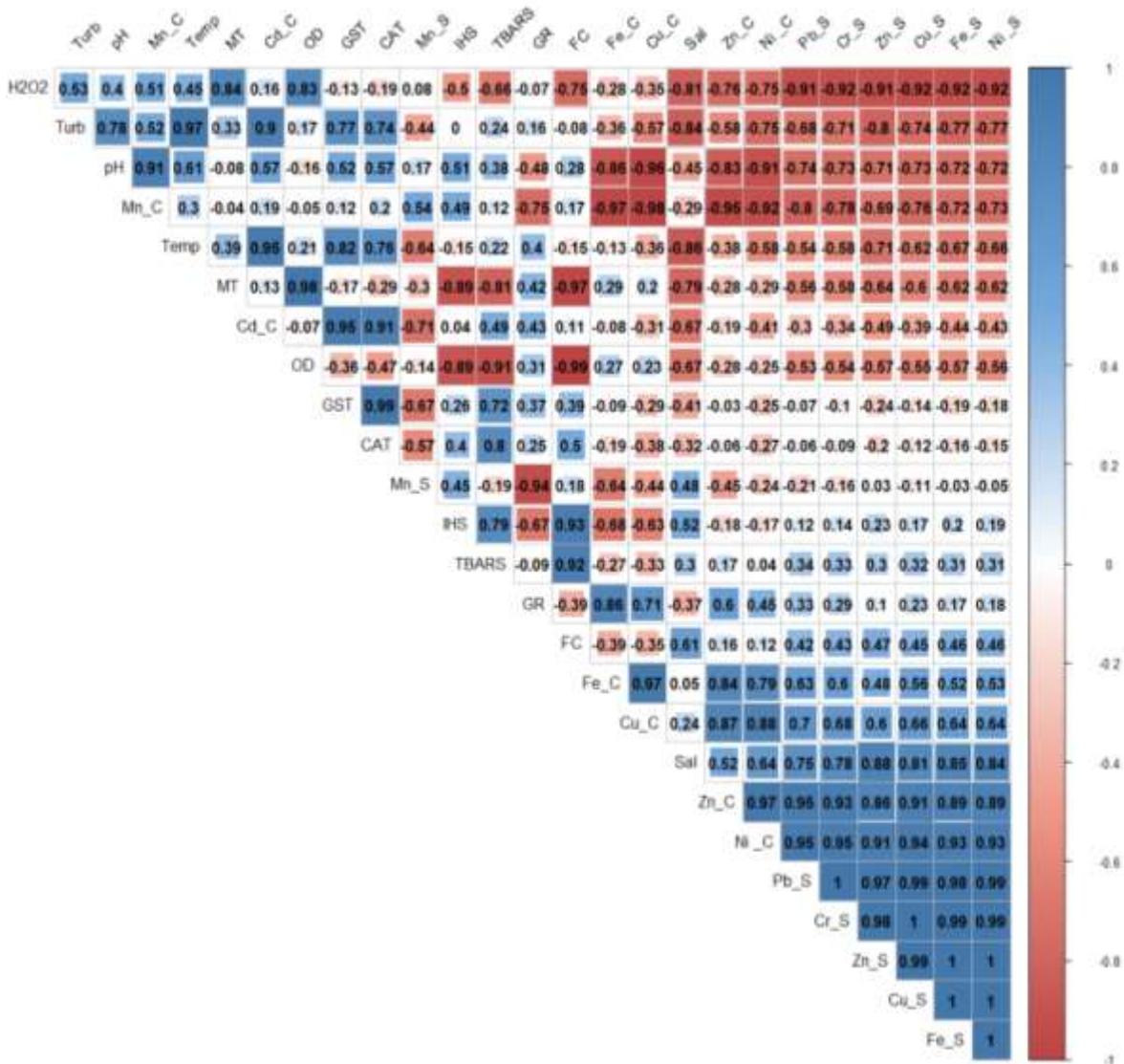


Figura 48: Corrplot de Pearson para PR entre los metales de sedimentos (MeS), cangrejos (MeC), biomarcadores y parámetros físico-químicos de la columna de agua. Las correlaciones positivas son más fuertes en azul



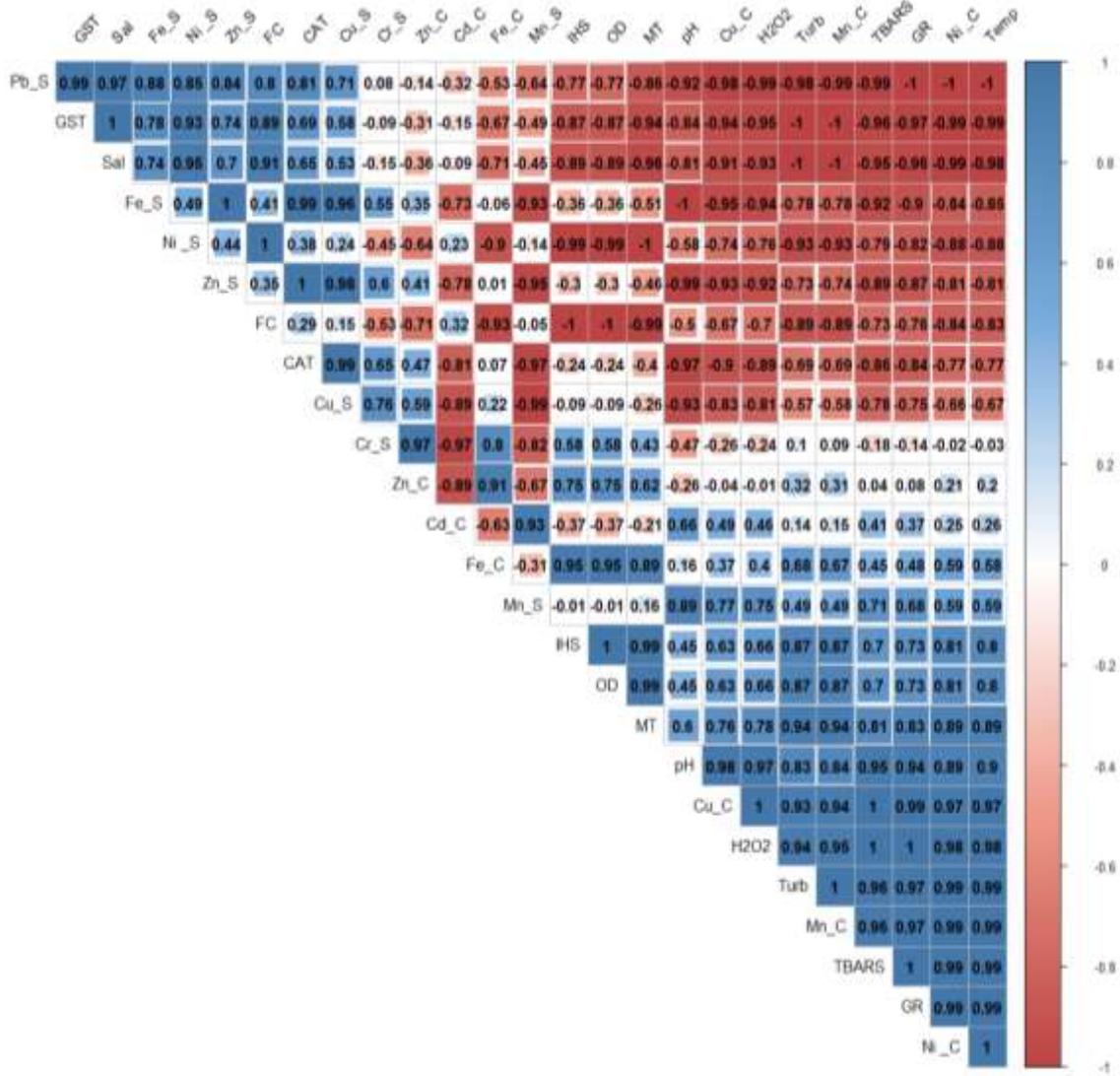
**Figura 49:** Corrplot de Pearson para VM entre los metales de sedimentos (MeS), cangrejos (MeC), biomarcadores y parámetros físico-químicos de la columna de agua. Las correlaciones positivas son más fuertes en azul.

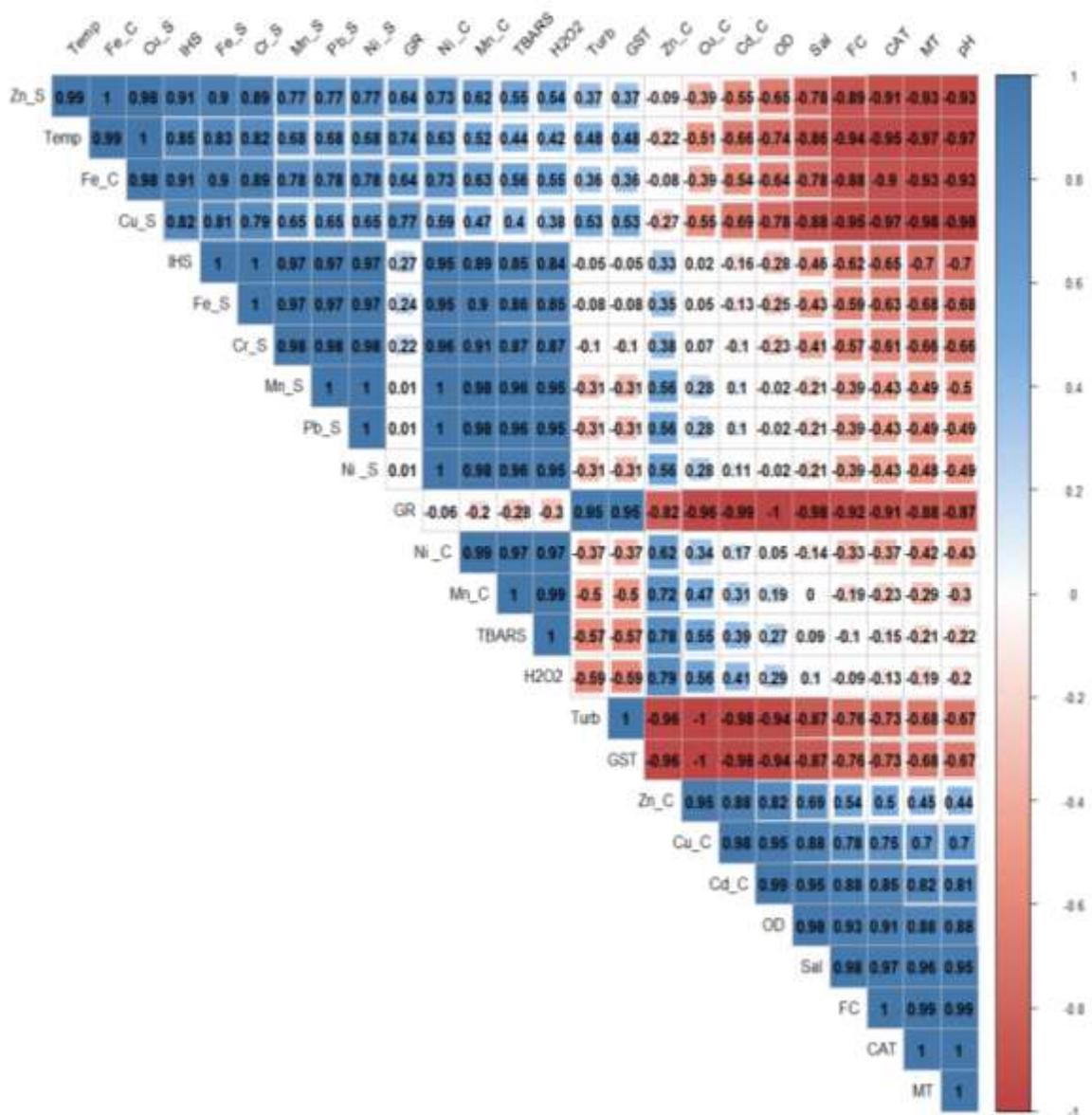
Entre las Figuras 50-53 se observan las correlaciones según estaciones. En **otoño** (Figura 50), los parámetros del agua se correlacionaron entre sí, y algunos metales en sedimentos (Cu, Pb, Mn, Ni, Zn) también se correlacionaron entre sí y con algunos biomarcadores como MT, CAT, GST y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el caso de los metales en los cangrejos, los elementos esenciales se correlacionaron entre sí y con biomarcadores de estrés oxidativo. El FC se correlacionó con las MT, mientras que, entre los biomarcadores, se observaron correlaciones entre sí (MT, GR, TBARS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

En **invierno** (Figura 51), la temperatura presentó correlaciones positivas con algunos metales en los sedimentos (Cu, Zn, Cr), y la salinidad y el pH se correlacionaron con algunos parámetros, Cd y Cu de los cangrejos, y MT y CAT. La mayoría de los metales en sedimentos se correlacionaron entre sí, y en el caso de los metales en cangrejos, se registraron correlaciones entre Cd, Cu y Zn, y del Cu con metales esenciales. Estos metales presentaron correlaciones con TBARS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y las MT con Cd. Medidas morfológicas como el FC evidenciaron correlaciones con MT y CAT, y el IHS con TBARS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entre los biomarcadores, se observaron correlaciones entre las MT y parámetros de estrés oxidativo.

En **primavera** (Figura 52), la temperatura se correlacionó con varios metales en sedimentos y GR. En esta estación, se observaron correlaciones entre los metales en sedimentos y en los cangrejos, y en particular, entre los metales en cangrejos, el Cd se correlacionó con MT y CAT. Mientras que el Cu con GR; el Mn y Ni con TBARS, y Fe con GR. El IHS se correlacionó con TBARS, y entre los biomarcadores se observaron correlaciones de las MT, CAT y GST.

Finalmente, en **verano** (Figura 53), también se observaron correlaciones importantes entre los metales de los sedimentos y los presentes en los cangrejos, y de algunos parámetros (salinidad, pH y OD) con biomarcadores (GR, TBARS, CAT). La mayoría de los metales en sedimentos se correlacionaron con la GR, y entre los metales presentes en los organismos, el Cd presentó correlaciones con la CAT; los esenciales con TBARS. Y entre los biomarcadores, las MT se correlacionaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





*Figura 51: Corplot de Pearson para invierno entre los metales de sedimentos (MeS), cangrejos (MeC), biomarcadores y parámetros físico-químicos de la columna de agua. Las correlaciones son más fuertes y positivas en azul*

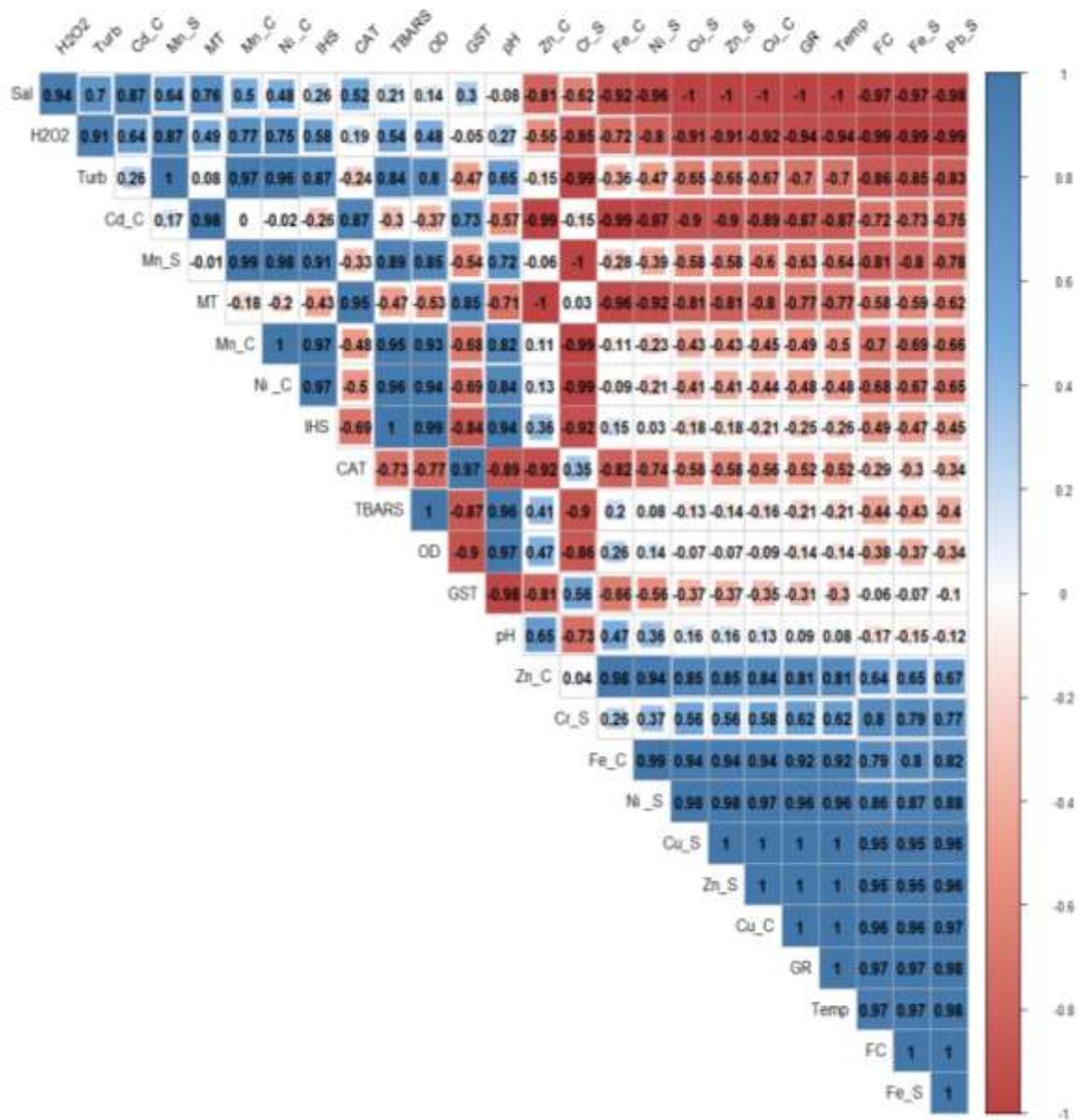
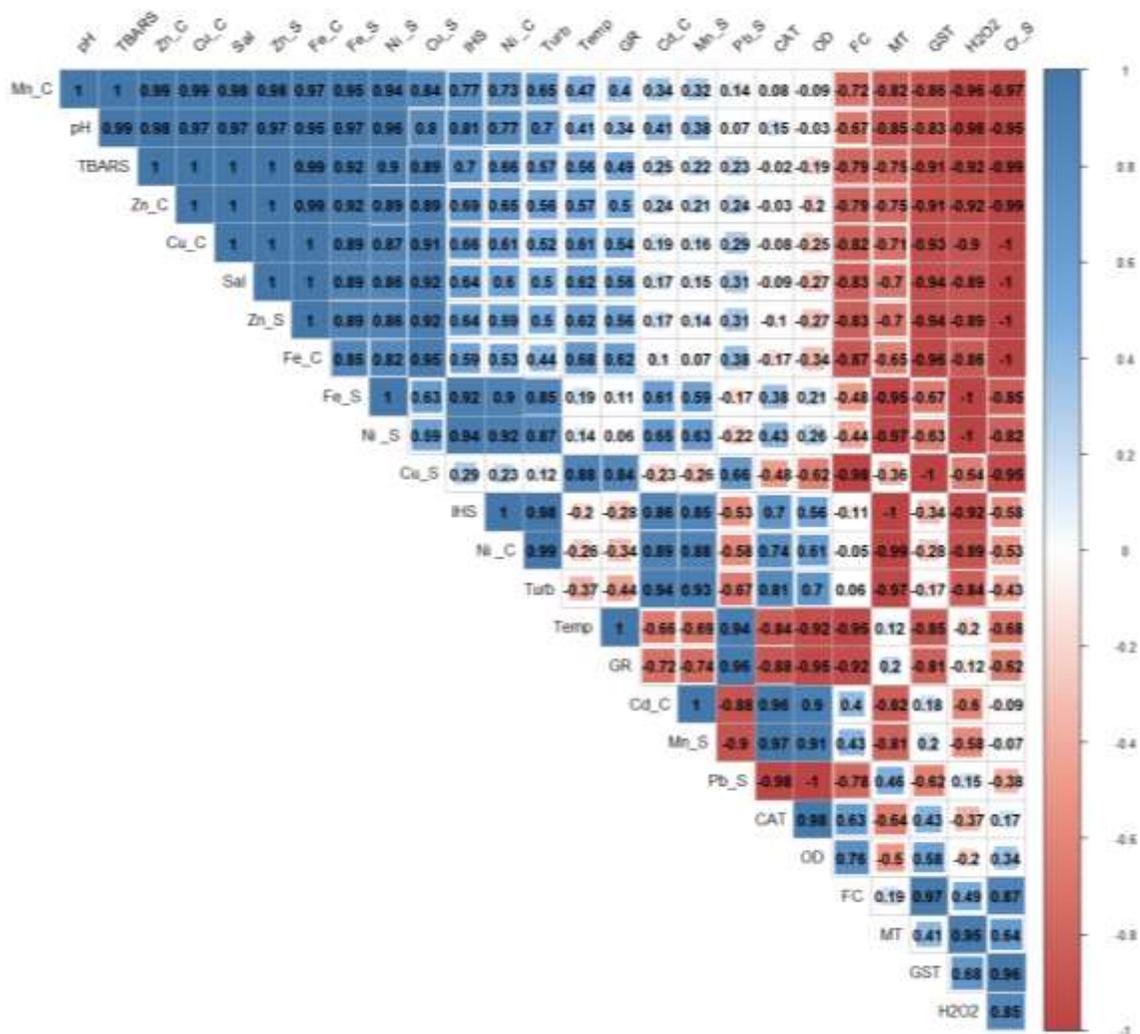


Figura 52: Corplot de Pearson para primavera entre los metales de sedimentos (MeS), cangrejos (MeC), biomarcadores y parámetros físico-químicos de la columna de agua. Las correlaciones son más fuertes y positivas en azul



**Figura 53:** Corrplot de Pearson para verano entre los metales de sedimentos (MeS), cangrejos (MeC), biomarcadores y parámetros físico-químicos de la columna de agua. Las correlaciones son más fuertes y positivas en azul

El **ACP biplot** diferenciado entre sitios\*estación (Figura 54) demostró que el componente 1 explicó el 25,6% de las variables, mientras que el 2 el 19,9%, representando el 45,5% total de las variables con una correlación cofenética de 0,82. En el caso del componente 1, las MT se antepusieron a varios metales en sedimentos (Zn, Ni y Fe) y en cangrejos (Zn, Mn, Ni y Fe) y biomarcadores como GR y TBARS. En el componente 2, metales en sedimentos (Cu, Pb, Zn), el FC y GR se antepusieron a la turbidez y el Mn de los sedimentos y de los cangrejos.



### 3.4. Discusión

Los estudios que han analizado el potencial riesgo ecológico de la contaminación por metales en matrices abióticas como los sedimentos, han sido registrados de manera global (Caeiro *et al.*, 2005, 2009; Li *et al.*, 2012; Muniz *et al.*, 2019; Williams & Antoine, 2020). Pero en estos trabajos, las propiedades geoquímicas de los sedimentos han sido evaluadas de manera separada de organismos biomonitores y del empleo de biomarcadores bioquímicos como sistemas de alerta temprana. O de manera contraria, el uso de biomonitores y biomarcadores no suele ser complementado con baterías de indicadores geoquímicos que permitan obtener un panorama completo de los procesos de contaminación en los sistemas costeros (Drouot *et al.*, 2007; Martín-Díaz *et al.*, 2008; Giarratano *et al.*, 20016; Capparelli *et al.*, 2019a, b). En estuarios bajo intensas presiones humanas, pocos estudios han concretado el objetivo de evaluar el riesgo ecológico de metales integrando sedimentos, índices geoquímicos, patrones de acumulación en especies residentes y su efecto a través de IAT (p.ej., Pereira *et al.*, 2009; Comoglio *et al.*, 2011; Aljahdali & Alhassan, 2020). De esta manera, el presente **capítulo** constituye una **primera aproximación integral** a los estudios de contaminación metálica en el EBB, en el cual se utilizan datos de metales en sedimentos para conocer la implicancia biológica que tienen estos contaminantes sobre una especie bentónica nativa, como el cangrejo cavador *N. granulata*. A su vez, se relacionaron los resultados de los sitios de muestreo –expuestos a diferentes presiones antrópicas- con la estacionalidad y los parámetros físico-químicos de la columna de agua.

#### 3.4.1 Metales en sedimentos y riesgo ecológico asociado

A diferencia de la columna de agua, los **sedimentos** pueden absorber químicos y tóxicos persistentes hasta concentraciones más altas que las fases acuosas, por lo que representan una buena herramienta para el biomonitoreo de ecosistemas costeros, ofreciendo un panorama **histórico** de los procesos de contaminación en los sistemas. A su vez, el **limo** (< 63 µm) que corresponde a la fracción fina (la más abundante del EBB) de los sedimentos exhibe grandes áreas superficiales, por lo cual ocurre una mayor adsorción de los metales. En el caso de los elementos detectados en los sedimentos de esta tesis, los valores indican contaminación por **Cu** en PR, ya que excedieron los valores de metales en sedimentos propuestos por el NOAA y la SQGs (en especial el **TEL**), con posibles efectos adversos en

la biota (Tabla 7). En especial, en la estación primaveral de PR se observaron los mayores rangos de contaminación metálica por el Cu; mientras que el resto de los metales no se halló en ninguno de los rangos que indicaran contaminación de los sedimentos bajo los lineamientos internacionales en los sitios estudiados.

En términos generales, los **índices geoquímicos** exhibieron que los sitios muestreados se encontraron dentro de los rangos de mínima a moderada contaminación por metales, y el uso de una batería de índices geoquímicos permitió obtener diferente información sobre el estado de salud del ambiente. A modo de ejemplo, el PLI no indicó contaminación en los sitios analizados y, de acuerdo al RE, los sedimentos poseían un riesgo ecológico bajo. Mientras que  $I_{geo}$  se halló entre valores de la clase 1, indicando una contaminación nula a moderada en todos los sitios, en tanto el mERM-Q indicó potenciales efectos adversos para la biota. Los valores del FE sugirieron un enriquecimiento nulo a mínimo de los sedimentos por los metales analizados, y el Cu presentó los valores más elevados de este índice.

El mayor **enriquecimiento por Cu** y los posibles efectos adversos de este metal, en especial en PR, pueden deberse a las actividades industriales (como una planta aceitera), portuarias (pinturas anti-incrustantes de embarcaciones ricas en Cu) y urbanas (cloacas sin tratamiento) que se desarrollan en el área (Spetter *et al.*, 2015a; Buzzi *et al.*, 2021). De esta manera, en la literatura internacional, varios estudios (Aljahdali & Alhassan, 2020; Buzzi *et al.*, 2021) remarcan la necesidad de utilizar una batería de índices que se complementen entre sí y que permitan una mejor comprensión de los procesos de contaminación por metales, sus fuentes antropogénicas y su efecto probable sobre la biota.

Los análisis de **clústers** demostraron que las cargas de metales están más influenciadas por sitios que por estaciones, aunque la disimilitud entre las estaciones fue baja. VM fue más similar a PC, posiblemente por los depósitos de sedimentos de la erosión del área interna en marismas más externos, como VM (Perillo & Piccolo, 2021). Entre los metales, el **Fe** presentó mayor disimilitud respecto al resto de los metales, posiblemente indicando una fuente natural de este metal.

La tendencia de alguno de los metales (Cu, Pb, Zn, Cr) a incrementarse en los meses **cálidos** probablemente se encuentra influenciada por la mayor actividad de **especies bioturbadoras**, como poliquetos, anfípodos, bivalvos y el mismo cangrejo *N. granulata* en

el intermareal, que pueden resuspender sedimentos y aumentar la disponibilidad de nutrientes, MO, metales y otros contaminantes (Menone *et al.*, 2006; Mendez Casariego *et al.*, 2011; Zapperi, 2015; Angeletti *et al.*, 2018a,b; Buzzi *et al.*, 2021; Toniolo *et al.*, 2021). A su vez, el incremento de consumo de MO en las estaciones cálidas por especies bentónicas (Zapperi, 2015), como el cangrejo cavador, producen **pellets** de heces que son reingresadas al sistema (Mendez Casariego *et al.*, 2011) y cambian la composición del sustrato, el contenido de MO y los metales asociados (Arya *et al.*, 2014).

La ocurrencia de la **bioturbación** de sedimentos, en este caso por *N. granulata*, en todos los sitios de muestreo, podría tener un efecto complejo sobre el ciclo de los metales de los sedimentos y los flujos bentónicos, permitiendo que los metales secuestrados se oxiden y mejoren su removilización y solubilización (Burdige, 2011). En el EBB, Zapperi (2015) identificó que el acoplamiento bento-pelágico (proceso que une los sedimentos bentónicos y la columna de agua, permitiendo el intercambio de energía, masa y nutrientes) modifica las propiedades físico-químicas de los sedimentos, el potencial redox y el enriquecimiento de los sedimentos con MO, que son incrementados en este ambiente somero.

En cuanto a la bioturbación y su relación con los metales, Andrade *et al.* (2019) señalaron que la presencia e interacción interespecífica de especies bentónicas con fuertes efectos bioturbadores incrementa la biodisponibilidad de metales asociados a los sedimentos. Más aún, He *et al.* (2018) indicaron que la actividad bioturbadora puede remover MO y metales depositados en los sedimentos en formas disueltas (como en el caso del Cd, Cu y Zn), recirculando estos elementos en los ecosistemas acuáticos.

Una misma situación podría darse en el EBB, en especial en las planicies de marea por el efecto de *N. granulata*, ya que Angeletti *et al.* (2018b) han determinado que estos cangrejos extraen, atrapan y erosionan más sedimentos de sus cuevas como consecuencia de la alta densidad de población y la movilidad de sedimentos cohesivos. De acuerdo a estos autores y autoras, los sedimentos en el intermareal de PC se mantienen en la columna de agua por más tiempo que los de marismas, como VM, donde predominan procesos depositarios. Este mayor tiempo de residencia se encuentra asociado a las características geomorfológicas e hidrodinámicas, características del área más interna del estuario, donde se hallan numerosos canales de marea y ocurren fenómenos de retención antes de la entrada del Canal Principal.

En cambio, en VM los sedimentos se encuentran afectados por una mayor profundidad y mayores velocidades de las corrientes de marea (Pratolongo *et al.*, 2010). Además, el oleaje producido por los vientos suele ser un factor determinante en la evolución de los sedimentos biodisponibles en la columna de agua (Pratolongo *et al.*, 2010). Los procesos de bioturbación generados en la construcción de cuevas por *N. granulata* en las planicies de marea durante las estaciones cálidas influyen la removilización, especiación y distribución de los metales asociados, siendo la explicación más plausible para los incrementos de algunos metales, como el Cr en los sedimentos en las estaciones de primavera-verano de PC con respecto a VM, que resultan ser sitios menos urbanizados. En tanto, en PR la actividad bioturbadora en las estaciones cálidas, sumada a las descargas antrópicas (cloacas y puertos) podrían explicar por qué en este sitio suelen encontrarse mayores concentraciones de metales como el Cu en los sedimentos.

En cuanto a los metales por **sitios**, en **PC**, sólo el Cr se halló en mayores concentraciones (Tabla 7) respecto a los otros sitios, pero se mantuvieron entre los rangos detectados por Simonetti *et al.* (2017). Los incrementos de estos metales pueden deberse a los procesos sedimentológicos previamente descriptos –ya que en PC predominan los procesos erosivos- y a la influencia de actividades humanas, como las contribuciones a través de Sauce Chico a provenientes de áreas agrícolas y las cercanías de PC a la planta de tratamientos cloacales “Tercera Cuenca”, en donde se hallaron valores históricos de Cr en los sedimentos similares a los detectados en PC (Truchet *et al.*, 2022).

Otros elementos como el Cu, Pb, Zn y Fe fueron más elevados en **PR** y la mayoría de los metales en los sedimentos en la Dim1 del ACP también explicaron este sitio durante la estación primaveral. A su vez, los agrupamientos por k-medias y las matrices de correlaciones indicaron fuertes correlaciones entre los metales en sedimentos, lo cual permitiría inferir un mismo origen de estos elementos en este sitio, tal como fue observado por otros estudios en la misma zona (Negrin *et al.*, 2021). Un posible ingreso de los metales pueden ser las descargas cloacales sin tratamiento de la ciudad de Punta Alta y las actividades portuarias que se desarrollan en este sitio (p.ej., a través de pinturas anti-incrustantes para barcos pesqueros y buques comerciales que contienen metales como el Cu, Cr y Pb) (Ali *et al.*, 2022). El mismo patrón de mayor concentración de metales en sedimentos de este sitio respecto a otras áreas ha sido registrado por otros autores y autoras (Spetter et

*al.*, 2015a; Simonetti *et al.*, 2017; Negrin *et al.*, 2019), aunque los rangos obtenidos para el Cu, Pb y Zn en la presente tesis son incluso mayores a los registrados por otros trabajos en el mismo sitio (Tabla 7).

**PR** fue el área más externa de los sitios que se han analizado en esta tesis, y estudios previos en sedimentos intermareales por Simonetti *et al.* (2017) y Buzzi & Marcovecchio (2018) encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de metales de la zona interna y media, con mayores valores en la zona asociada a PR. Estas diferencias probablemente se dan tanto por las **condiciones geomorfológicas e hidrodinámicas** que presiden los procesos sedimentarios de los sitios de muestreo, como también por las distintas presiones humanas que reciben. En PR dominan los procesos de retención de sedimentos erosionados de la zona más interna (Perillo & Piccolo, 2021) y también se da un fuerte aumento de los metales asociados a la descarga cloacal y los aumentos MO de origen alóctono (Spetter *et al.*, 2015a; Buzzi *et al.*, 2021), que establecen un ambiente meso-oligotrófico en una planicie de marea semicerrada (Buzzi *et al.*, 2021). Estos sedimentos finos con un gran contenido de MO son capaces de captar iones metálicos, lo que influye en la dinámica de estos elementos en los sedimentos de PR (Negrin *et al.*, 2019, 2021).

En el caso de **VM**, se detectaron mayores valores de Mn y Ni (Tabla 7). Para el EBB, Hempel *et al.* (2008), reportaron que en las marismas de VM se hallaron grandes niveles de Mn en los sedimentos asociados a las raíces de *S. alterniflora*, en comparación con los suelos de planicies de mareas, desprovistos de vegetación. A su vez, estos autores y autoras consideraron que las características de los sedimentos, como el pH y el potencial redox (Eh) afectan la dinámica de los metales en estas marismas. Así, las concentraciones altas de metales como el Mn y el Ni pueden estar vinculados a los **aportes de la senescencia de esta planta halófito y condiciones edáficas** diferentes a las observadas en los otros sitios. Es importante señalar que en este trabajo no se pudieron medir las condiciones de los suelos, que por lo general suelen gobernar la dinámica de los metales, pero las mismas ya han sido reportadas en numerosos trabajos de la zona (p.ej., Spetter *et al.*, 2015a; Fernández *et al.*, 2016; Simonetti *et al.*, 2017; Negrin *et al.*, 2019, 2021; Buzzi *et al.*, 2021, entre otros).

Uno de los aspectos más remarcables de VM es que se trata de una de las marismas más extensas dentro del estuario y de acuerdo a Pratolongo *et al.* (2010), en esta zona se dan **eventos de deposición de sedimentos** (probablemente por la erosión de la zona interna)

gracias a los efectos combinados de las mareas, oleajes/vientos y la presencia de extensas áreas de vegetación. Así, los sedimentos depositados en VM no se originan por resuspensión local (Pratolongo *et al.*, 2010), por lo que podría resultar en una explicación de por qué en este sitio -que no presenta presiones antrópicas marcadas- se encuentran mayores concentraciones de algunos metales en los sedimentos, como el Mn y Ni, respecto a PR y PC.

Sin embargo, también es fundamental considerar que a pesar de ser un área que no presenta impactos antrópicos evidentes, VM está ubicada en las cercanías de otros puertos de importancia como Puerto Rosales y de la cloaca y basurales de Punta Alta. Varios autores y autoras (Williams & Antoine, 2020; Ali *et al.*, 2022) indicaron que los puertos son uno de los principales *inputs* metálicos en sedimentos de ambientes estuariales. A su vez, en las inmediaciones de VM y PR, se encuentra Canal el Embudo que suele recibir los refulados del dragado. Aunque al momento no se han realizado estudios de la posible contribución de metales por materiales removidos por dragados en la zona, estudios internacionales han confirmado que la remoción y deposición de grandes depósitos de sedimentos incrementan la presencia de ciertos contaminantes como los metales con efectos a nivel bioquímico en los organismos bentónicos residentes (Bocchetti *et al.*, 2008; Hedge *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2018). Por último, en VM, el resto de los metales no se encontraron en concentraciones altas respecto a los otros sitios. Esto puede deberse a que algunos metales presentes en los sedimentos pueden ser tomados y **secuestrados por las plantas** que componen las extensas marismas de la zona (Hempel *et al.*, 2008; Negrin *et al.*, 2015, 2019).

Como se ha detallado previamente, en los sedimentos se detectaron todos los metales, a excepción del Cd y los dominantes fueron el Fe, Cu, Zn y Mn. El mismo patrón fue observado en otros estudios en el EBB (Tabla 6), a excepción de algunas investigaciones (Simonetti *et al.*, 2017; Buzzi & Marcovecchio, 2018) donde se detectó Cd en bajas concentraciones en PC que recibe descargas fluviales del arroyo Sauce Chico. También se registró en PR, pero sólo por uno de los trabajos citados en la Tabla 6 (Buzzi *et al.*, 2021) y probablemente se encuentre asociado a las descargas cloacales y a los basurales. En el caso de PC, el Cd está asociado al uso de agroquímicos que pueden llegar a las aguas estuarinas en la forma disuelta o particulada (MPS) de tributarios como Sauce Chico, que se encuentran bajo la presión de actividades agrícolas y ganaderas. Una vez que estos metales conforman

parte del *pool* de metales asociados al MPS en la columna de agua, pueden ser luego depositados en el lecho de los sedimentos (Fernández Severini *et al.*, 2013; La Colla *et al.*, 2015; Villagran *et al.*, 2019). La ausencia de grandes asentamientos de agricultura cerca de otros sitios podría explicar que los valores de este metal se encuentren <LDM, a pesar de ser registrados en la biota<sup>8</sup>.

En el caso del estuario, Grecco *et al.* (2006, 2010) establecieron valores de metales en sedimentos finos considerados como *background* ya que provienen de estudios de una planicie de marea funcional en una isla alejada de presiones antrópicas y de planicies de marea relictuales depositadas entre hace 3500 y 3300 años (Tabla 6). De acuerdo a estos autores y autoras, las concentraciones que se encuentren por encima de estos valores podrían pertenecer a fuentes de metales antrópicas. En la presente tesis, sólo el Cd, Pb y Ni no superaron los valores considerados como *background*, de manera que estos metales podrían atribuirse, en parte, a la meteorización de minerales volcánicos naturales (Grecco *et al.*, 2010), lo que resulta fundamental de considerar en estudios de monitoreos ambientales, si bien las contribuciones humanas de estos metales no deben ser descartadas (La Colla *et al.*, 2015). Mientras que otros elementos, como el Cu, Mn, Cr, Zn, Fe superaron ampliamente estos valores, por lo que podrían estar asociados al malfuncionamiento de plantas de efluentes cloacales e industriales, a los asentamientos urbanos y a las descargas de ríos contaminados.

En comparación con **otros sistemas estuariales** y costeros que componen parte del Mar Argentino, el EBB tiene rangos de concentraciones de metales mayores o equivalentes a otros ecosistemas, a excepción del Cu, que supera los rangos de los estudios que se resumen en la Tabla 6, y del Cd que ha sido registrado en escasas ocasiones. Aunque el Cu es un metal esencial, su presencia en grandes concentraciones se encuentra asociada a actividades industriales y portuarias y asentamientos urbanos (Comoglio *et al.*, 2011). En tanto, el Cd, suele ser registrado en grandes rangos en el área costera de Mar Chiquita ubicado en el partido de Coronel Vidal, y autores y autoras como Beltrame *et al.* (2009) atribuyen su presencia a los agroquímicos utilizados en el cordón frutihortícola más extenso de Argentina.

No obstante, los valores de todos los metales en el presente estudio son incluso menores comparados a otros **ambientes marinos mundiales**, en especial, aquellos estudios realizados en países con economías emergentes (p.ej., Brasil, Irán, Pakistán, Uruguay) y áreas

---

<sup>8</sup> Una posible explicación del Cd en la biota será detallada en la sección siguiente de la discusión

industrializadas de potencias económicas como China (Tabla 6). Es importante señalar que más allá de las posibles fuentes litogénicas, estas áreas se encuentran afectadas de manera severa por presiones humanas como industrias, guerras, minerías, puertos, agricultura y ganadería a gran escala, basurales, cloacas, entre otras. Estas actividades son comunes en países industrializados y en vías de desarrollo y pueden actuar como fuentes potenciales de metales en sistemas costeros y estuariales. Por lo tanto, resulta esencial continuar monitoreando la contaminación por metales en países emergentes con economías en vías de desarrollo y grandes tasas demográficas y de urbanización, ya que las presiones humanas pueden afectar el estado de salud de estos ecosistemas.

En cuanto a la influencia de los **parámetros físico-químicos de la columna de agua** sobre los metales en la fracción fina de los sedimentos, la mayoría de los coeficientes de correlación de Pearson indicaron correlaciones entre los metales, la temperatura y la salinidad. A su vez, el ACP señaló correlaciones bajas de los parámetros y los metales, a excepción de la salinidad y la temperatura. Para el EBB, Simonetti *et al.* (2017) indicó que el pH junto a la MO se correlacionó con metales como el Fe de PC y el Cr de PR. En esta tesis, es posible que la salinidad y la temperatura (esta última relacionada a la actividad bioturbadora de organismos bentónicos durante estaciones cálidas) también rigieran las dinámicas de ciertos metales (Truchet *et al.*, 2022), así como su movilidad, biodisponibilidad y potencial toxicidad (Simonetti *et al.*, 2017).

La **salinidad** puede tener un efecto en el comportamiento de los metales y su movilidad y, además, incrementa el **pH** del agua a lo largo de sistemas costeros como estuarios, con repercusiones sobre la biodisponibilidad y toxicidad de los metales en los sedimentos (Souza Machado *et al.*, 2015, 2018; Truchet *et al.*, 2022). Por lo tanto, el pH puede tener una influencia en los metales a salinidades bajas en las zonas más internas de los estuarios, con mayores aportes fluviales (Souza Machado *et al.*, 2015, 2018). Así, la salinidad del estuario podría tener efectos en el pH –indicada por las correlaciones entre los dos parámetros– y, en consecuencia, en algunos metales (como el Cu, Ni, Fe) de la zona interna donde se ubica PC. En esta zona, la salinidad se encuentra modificada en estaciones con mayores precipitaciones que disminuyen sus valores, y en verano, donde predominan los procesos de evaporación, estos valores suelen incrementarse (Freije *et al.*, 2008; Simonetti *et al.*, 2017). Sin embargo, consideramos que es fundamental continuar estudiando la relación

con características edáficas de los sedimentos y físico-químicas de la columna de agua con la concentración de metales en sedimentos en ambientes costeros complejos como el EBB.

### **3.4.2 *N. granulata* como biomonitor de metales: morfología, patrones de bioacumulación e indicadores de alerta temprana**

#### *3.4.2.1 Morfología*

*N. granulata* es un cangrejo varúnido y como en todos los decápodos, su hepatopáncreas cumple diferentes funciones metabólicas y fisiológicas, tales como la detoxificación, ya que es un órgano que sintetiza concentraciones significativas de MT con un papel esencial en el metabolismo y regulación de metales (Buzzi & Marcovecchio, 2016). Así, las características de este órgano fomentan su utilización en estudios de biomonitoreo y toxicológicos en los que se utilizan ciertos **índices morfológicos** para evaluar la salud de estos organismos. En base a estas medidas, el **FC** constituye una respuesta a nivel organismo que generalmente suele ser influenciada por la calidad del alimento, patógenos y la exposición a contaminantes. En tanto, el **IHS** da información sobre el estado de salud del hepatopáncreas, por lo que suele ser más efectivo en estudios de biomonitoreo ya que los cambios en el peso del hepatopáncreas debido a factores ambientales se detectan más rápido que los cambios en el peso y talla a nivel organismo (Ferreira *et al.*, 2006).

En general, en PC se hallaron los cangrejos con mayores pesos y AC, ambas métricas correlacionadas con el FC. En PR, los machos también presentaron un AC significativamente alto y similar a PC, pero el peso y los valores del FC no fueron tan elevados como en PC. Aunque en VM, por lo general, se registraron pesos, AC y FC más bajos que en los otros sitios, el IHS fue mayor. Esto implica un **mejor estado de salud** del hepatopáncreas de los cangrejos que habitan en estas marismas, en especial en **estaciones cálidas** como la primavera, donde consumen mayor alimento por los costos energéticos reproductivos. A su vez, de acuerdo al ordenamiento de las variables a través del ACP biplot, el IHS tuvo mayor correlación con la mayoría de los metales en sedimentos y cangrejos y se encontró asociado a VM. Por lo que a través del análisis multivariado también se podría inferir que el IHS resultó ser el mejor índice morfológico para describir el estado de salud de los cangrejos.

Buzzi & Marcovecchio (2016) y Buzzi *et al.* (2021) también reportaron valores similares de FC e IHS para PC y PR en las mismas estaciones (otoño y estaciones cálidas).

López Greco & Rodríguez (1999) determinaron que el mayor IHS en *N. granulata* se da en hembras durante marzo, luego de la estación reproductiva y se encuentra asociado a la acumulación de reservas antes de la muda en abril y mayo. Esta relación coincide con los resultados aportados por esta tesis, ya que los mayores valores del IHS se observaron en las estaciones otoñales y cálidas de primavera y verano en las hembras, lo que podría ser explicado por reservas energéticas para los períodos reproductivos. No obstante, estos índices no han sido utilizados en otros trabajos con la misma especie y su relación con los metales en otras áreas costeras del Mar Argentino para establecer comparaciones que permitan sustentar esta idea (p.ej., Giarratano *et al.*, 2016; Marinho *et al.*, 2018; Márquez & Idaszkin, 2021).

#### 3.4.2.2 Patrones de acumulación de metales

Los análisis multivariados basados en el agrupamiento por k-medias para hembras y machos de los sitios\*estaciones estudiados indicaron el mismo patrón que los sedimentos, y los cangrejos se agruparon de acuerdo a los sitios y no estrictamente a las estaciones. Esto indicó que la **espacialidad** cumple un rol importante en los patrones de acumulación de metales en los cangrejos, si bien la **estacionalidad** es fundamental en la acumulación fisiológica y metabólica de estos elementos. No obstante, es necesario señalar que la disimilitud entre los sitios\*estaciones fue bastante baja, lo que coincide con otros estudios por Beltrame *et al.* (2009), que indicaron que la estacionalidad juega un papel más esencial en la fluctuación de los metales que los sitios de muestreo en Mar Chiquita. Estos autores y autoras indicaron que el Cd, Cr, Cu y Mn aumentan en el hepatopáncreas de los cangrejos en las estaciones cálidas de primavera y verano, en coincidencia con las estaciones reproductivas.

De manera reciente, para la especie de cangrejo estuarial *Macrophthalmus depressus*, Saher & Saddiqui (2019) demostraron que las **variables ambientales de la columna de agua** (salinidad, temperatura) y de los sedimentos (MO, granulometría) cumplen un rol fundamental para la acumulación de metales en crustáceos decápodos. Ya los primeros trabajos de Rainbow (1995) dieron cuenta de que, si bien existe una relación intrínseca entre los sedimentos y la bioacumulación en crustáceos, no necesariamente en los sedimentos se encuentren fracciones biodisponibles para ser acumuladas (Rainbow *et al.*, 1990). Por lo que

futuros trabajos tendrán que considerar las condiciones edáficas de los sedimentos, en especial la MO, granulometría y potencial redox que influyen en la partición geoquímica de los metales en sedimentos y en su biodisponibilidad trófica.

El aumento de la concentración metales en *N. granulata* en las estaciones de **otoño** (en especial Cu, Zn y Fe) en cada sitio probablemente se encuentre vinculado a las **necesidades energéticas y fisiológicas** de esta especie (Beltrame *et al.*, 2009). En el caso de las hembras, la adquisición de la madurez fisiológica implica la adquisición de ovarios maduros, lo cual comienza luego del crecimiento inicial y el desarrollo de los oocitos consistentes en material autóctono (vitelogénesis primaria) de las reservas que son guardadas en el hepatopáncreas y luego movilizadas al ovario (Sal Moyano *et al.*, 2020).

Debido a que esta especie se distribuye en un rango latitudinal amplio, los períodos en los que se reportan las etapas reproductivas varían desde Brasil hasta Argentina. Ya que la temperatura decrece con la latitud, el periodo reproductivo es más corto en latitudes mayores, en tanto en la mayoría de las poblaciones de Brasil, las hembras se encuentran ovígeras todo el año. En el EBB, el periodo reproductivo de *N. granulata* se observa desde octubre hasta febrero, que también se asocia a la calidad de la MO disponible en el ambiente (Sal Moyano *et al.*, 2020). De esta manera, los cangrejos –en especial las hembras– comienzan a aumentar sus reservas de metales en otoño, previo a la temporada de reproducción y vuelven a aumentarlas en el período reproductivo por la disponibilidad de MO de calidad. Aunque, en algunas ocasiones, las bajas concentraciones de MO en los sedimentos pueden favorecer la biodisponibilidad de los metales, y los sedimentos con menor contenido de MO pueden conducir a un aumento en la tasa de ingestión de organismos para satisfacer su requerimiento de nutrientes y, por lo tanto, aumentar la bioacumulación de metales en los cangrejos (Atkinson *et al.*, 2007, Eça *et al.*, 2013; Saher & Saddiqui, 2019).

En general, se espera que el nivel de exposición a metales en los sedimentos desencadene una mayor acumulación de metales en un organismo en el ambiente contaminado si los porcentajes de fracciones biodisponibles en los sedimentos son elevados. En el caso del análisis por estaciones, en otoño no se observaron correlaciones positivas significativas Me\_C/Me\_S y en invierno se observó una correlación con el Fe, Mn y Ni. Mientras que, en primavera del Cu, Zn y Fe, y en tanto, en verano también se observó la misma tendencia en conjunto con el Ni. Esta presencia de mayores correlaciones en las

estaciones cálidas podría estar asociada a que los organismos bioturbadores se encuentran más activos en el intermareal durante la primavera-verano, removiendo sedimentos (Zapperi, 2015), que podrían ser incorporados.

Una correlación positiva entre los metales en los cangrejos puede sugerir que tienen una asociación, una fuente común y un comportamiento similar (Saher & Saddiqui, 2019) y, por lo tanto, la relación positiva entre los metales esenciales podría indicar requisitos fisiológicos y metabólicos. Sin embargo, la correlación y competencia entre los elementos esenciales y no esenciales puede darse para compartir vías de absorción atribuibles a las propiedades químicas similares, ya que los no esenciales interactúan y compiten con los metales esenciales, posiblemente explicando las correlaciones negativas, como se observó en los casos del Mn y Ni con el Cd.

En base a los **sitios**, se registraron mayores concentraciones de metales como el Cu y Fe en PR, que probablemente estén asociadas a las actividades portuarias y urbanas, a pesar de su importancia fisiológica como elementos esenciales. El aumento de Mn, Cd, Zn y Ni en los cangrejos de algunas estaciones de VM puede ser explicado a partir de la gran extensión de esta marisma, la deposición de sedimentos alóctonos (Pratolongo *et al.*, 2010) y la retención de metales en sedimentos que pueden ser potencialmente bioacumulados por los organismos bentónicos. Otra posible explicación es la **presencia de *S. alterniflora***, que es el ítem trófico por preferencia de los cangrejos y secuestra metales de los sedimentos (Hempel *et al.*, 2008; Negrin *et al.*, 2019), y a través de su ingesta los cangrejos podrían incorporar estos elementos.

VM también fue el único sitio en el que el Mn permaneció constante durante todos los períodos analizados. El Mn posee funciones enzimáticas esenciales como ser cofactor de MT, carboxilasas, SOD, entre otras, aunque resulta tóxico en altas concentraciones, causando histopatologías y alteraciones musculares y genéticas en crustáceos (Baden & Eriksson, 2006). Según Rainbow (2002), algunos metales esenciales como el Cu, Zn y Mn no se acumulan en crustáceos decápodos hasta que se alcanzan ciertos umbrales ambientales. Por lo cual no resulta inesperado que no existan regulaciones de este metal en VM, tal como también fue señalado por Beltrame *et al.* (2009) para *N. granulata* en Mar Chiquita. Cabe destacar que el Mn se convierte en biodisponible como Mn (II) en el agua cuando es reducido por condiciones de hipoxia/anoxia en los sedimentos (Baden & Eriksson, 2006) y puede

resultar tóxico. En general, la solubilidad y biodisponibilidad del Mn aumenta con disminuciones en la presión parcial de oxígeno y el pH, pero no con la temperatura (Baden & Eriksson, 2006), y estas ideas podrían respaldar las correlaciones fuertes entre el Mn de los cangrejos y el pH ambiental.

El **Cd** se presentó en mayores concentraciones en las hembras de PC respecto a los otros sitios. Estos valores pueden ser explicados a través de la presencia de Cd proveniente de detritos y restos vegetales consumidos que resultan parte de la ruta dietaria del ingreso de metales. En tanto, los menores rangos de incorporación de Cd en los cangrejos de PR pueden deberse a la ausencia de *S. alterniflora* en esta planicie de marea. A su vez, en el caso de esta tesis, es posible que el mayor secuestro del Cd por los cangrejos de PC podría provenir, en menor medida de la fase disuelta, y en mayor medida de la fase particulada de la columna de agua rica en Cd por los aportes de arroyos (La Colla *et al.*, 2015; Fernández Severini *et al.*, 2018; Villagran *et al.*, 2019; Buzzi *et al.*, 2021). No obstante, sería de interés estudiar otras posibles hipótesis como las interacciones entre metales, ya que Liu & Wang (2013) demostraron que los aumentos de una exposición a Zn en el ambiente, tienen efectos en la distribución subcelular y bioacumulación de Cd en los tejidos y órganos (principalmente como MTLP y GRM) de organismos bentónicos, como en la ostra *Magallana hongkongensis*, ya que este metal posee grandes afinidades al grupo tiol (-SH) de las MTLP, y los aumentos en la asimilación de ciertos metales puede estar atribuido a la inducción de estas proteínas. Por tanto, se debería experimentar si procesos similares podrían darse para *N. granulata* en el EBB.

Estudiar las concentraciones de Cd en decápodos es fundamental ya que acumulan este metal en todas sus formas, con bajas o nulas tasas de excreción (Rainbow *et al.*, 1990). El Cd acumulado, generalmente se asocia a MT y gránulos que pueden representar formas detoxificadas. Las concentraciones corporales de Cd en decápodos costeros aumentan en regiones de biodisponibilidad de Cd altas, y la eventual mortalidad de estos organismos se puede producir cuando cualquier sistema de detoxificación falla y no logra restringir la liberación de metal metabólicamente disponible (Rainbow *et al.*, 1990).

A partir de **las correlaciones por sitios**, se podría inferir que, en **PC**, los metales en los cangrejos no se encuentran vinculados de manera estrecha a la carga metálica de los sedimentos, y que el Cu y el Zn en estos organismos podrían provenir de una misma vía, ya

que resultan esenciales para los cangrejos: el Zn es un componente clave de muchas enzimas, como la anhidrasa carbónica, y el Cu es una parte funcional de la proteína respiratoria hemocianina. La escasez de correlaciones positivas entre metales y sedimentos de cangrejos en PC indicarían que las rutas sedimentarias de *uptake* no serían tan significativas como la dieta en la bioacumulación de metales (Wiech *et al.*, 2020), y/o la fase particulada o disuelta.

En **PR**, un mayor número de metales en *N. granulata* se correlacionaron con los metales en los sedimentos, y las concentraciones de metales esenciales como el Mn, Cu y Zn en estos organismos se correlacionaron, lo que también podría indicar un mismo origen por el hecho de que actúan como cofactores enzimáticos. En **VM**, existieron aún más correlaciones positivas entre los metales de los sedimentos y de los cangrejos, mientras que también se observaron correlaciones entre los metales esenciales (Cu, Zn, Ni), también indicando una misma posible fuente asociada a requerimientos fisiológicos. En cuanto al Ni de VM, Negrin *et al.* (2021), encontró porcentajes relativamente elevados de biodisponibilidad en sedimentos del estuario, explicando las posibles correlaciones entre Ni\_S/Ni\_C.

A su vez, en este sitio, la temperatura y la turbidez se correlacionaron de manera positiva con el Cd en los cangrejos y el pH con el Mn\_C. Como se ha expuesto con anterioridad, Beltrame *et al.* (2009) explicó que el Cd incrementa en *N. granulata* en las estaciones cálidas debido a los aumentos de la tasa metabólica que incrementa la asimilación de metales, pero no de manera significativa. Esto se debe a que para los crustáceos aún no se ha registrado una regulación de los metales no esenciales como el Cd en el cuerpo (Rainbow, 1985; Legras *et al.*, 2000; Chiodi Boudet *et al.*, 2019), por lo que se necesitarían reevaluar las posibles interacciones de este metal en el cuerpo de los cangrejos en base a la temperatura.

Al respecto de las **variables ambientales y su relación con los metales en los organismos**, en el caso del **Cd**, Wiech *et al.* (2020) estudiaron los factores ambientales y biológicos que afectan la bioacumulación de este metal en *Cancer pagurus*. Estos autores y autoras no encontraron patrones basados en la estacionalidad, pero sí correlaciones con el tamaño. Por lo cual, al tratarse de un metal no esencial y potencialmente tóxico para los organismos, se deberían continuar monitoreando las variables que interaccionan en su acumulación. Sin embargo, Beltrame *et al.* (2010) expuso que los cambios en la salinidad incrementan la toxicidad de metales como el Cd y el Zn en estadios juveniles de *N. granulata*,

observando cómo salinidades altas implican menor toxicidad de estos metales y menores salinidades incrementan la toxicidad de estos contaminantes, en especial en el caso del Cd, aunque esta idea no ha sido estudiada en estadios adultos.

En general, las correlaciones entre el Cu y el Zn en sedimentos y cangrejos fueron positivas. De acuerdo a ello, el **FABS** indicó mayor acumulación del **Cu** en hembras de PC y VM, y en las estaciones más frías y en menor medida del Zn. El Cu resulta esencial para el desarrollo de organismos bentónicos como bivalvos y decápodos, ya que es el principal constituyente de la hemolinfa y junto al Zn es utilizado para la síntesis de MT y MTLP. No obstante, una exposición de estos elementos a un tiempo prolongado a concentraciones relativamente elevadas en el ambiente puede ocasionar efectos adversos en los organismos. En el caso del Zn, Beltrame *et al.* (2010) concluyó que concentraciones ambientales elevadas de este metal tienen un efecto biológico negativo en la muda y el peso de juveniles de *N. granulata*, lo que podría comprometer la estabilidad de la población en ambientes estuariales.

En Brasil, Capparelli *et al.* (2020) estudiaron los efectos en *Minuca rapax* de concentraciones ambientalmente relevantes de Cu en la dieta. Estos autores y autoras concluyeron que, a exposiciones altas de Cu, la concentración de este metal disminuye en la hemolinfa y el hepatopáncreas, pero aumenta en las branquias. Según esta investigación, la exposición al Cu a través de la dieta (alimento artificial enriquecido en Cu) posee un impacto biológico en las capacidades osmorreguladoras de los cangrejos estuariales, cuyo alimento se encuentra relacionado de manera estrecha a los sedimentos contaminados por este metal, tal como es el caso de *N. granulata*.

En el caso particular de *N. granulata*, Sabatini *et al.* (2009) estudiaron los efectos de una dieta a base de algas enriquecida con Cu a diferentes salinidades (2% y 30%) durante 5 semanas. La salinidad es otro factor que puede influir en los patrones de bioacumulación de metales en los invertebrados acuáticos, ya que la disminución de la salinidad aumenta tanto la biodisponibilidad como la toxicidad de los metales (Beltrame *et al.*, 2008). Los resultados de este trabajo demuestran que esta especie acumula grandes cantidades de Cu a partir de su dieta, y que los cangrejos mantenidos en salinidades bajas acumularon en promedio un 40% más de Cu en comparación con los cangrejos mantenidos a 30% de salinidad durante una exposición crónica. Esto indica que aumenta la asimilación de este metal en tanto la salinidad disminuye, con incrementos en el MDA, el contenido de carbonilo, la actividad de la SOD y

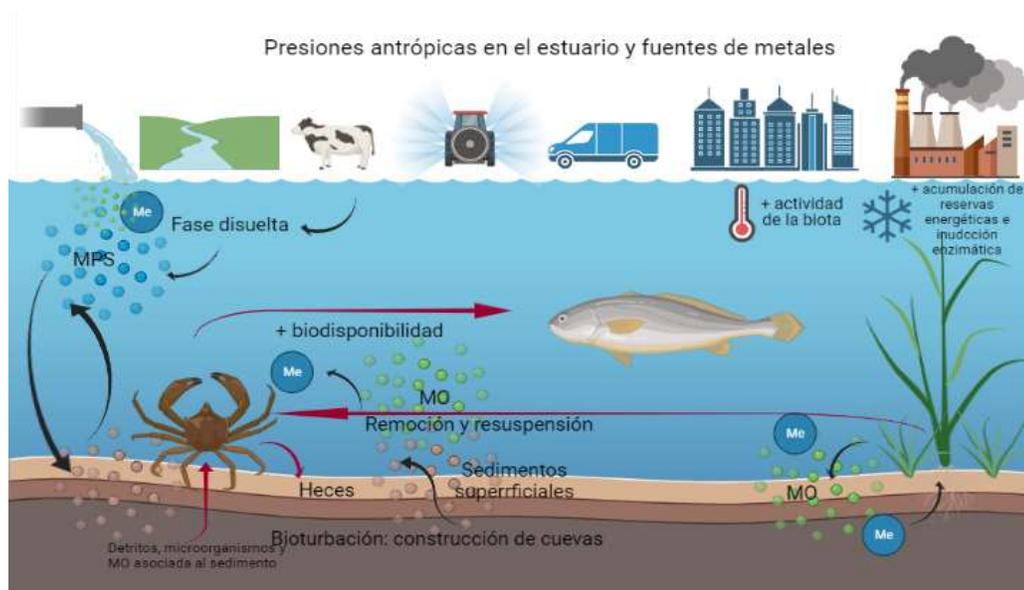
GSH. Por lo cual, en condiciones de salinidad relativamente normales para ambientes estuariales, los alimentos enriquecidos en Cu también juegan un rol importante en el *uptake* de este metal por los organismos, y en una eventual toxicidad a través de la ruta trófica. Finalmente, es importante remarcar que, para el EBB, se han registrados porcentajes por encima del 80% de biodisponibilidad de Cu en los sedimentos, en especial en PC (Marcovecchio & Ferrer, 2005; Negrin *et al.*, 2021), lo cual también explicaría el elevado valor del FABS y de la mayoría de las correlaciones.

La Tabla 7 muestra la acumulación de metales en *N. granulata* del EBB, otros sistemas costeros argentinos, así como comparaciones con otros invertebrados bentónicos del Mar Argentino. En esta Tabla también se resumen algunas de las concentraciones de metales halladas en otros cangrejos costeros y estuariales en ecosistemas mundiales. En comparación a otros *taxa* bentónicos del EBB, como los bivalvos, *N. granulata* acumula mayores cargas de metales (a excepción del Cr), por lo que sería un biomonitor adecuado para evaluar la contaminación por metales en este sistema. En contraste, un metal tóxico como el Pb fue más alto en cangrejos de la Bahía de San Antonio, probablemente debido a las actividades mineras y metalúrgicas desarrolladas en esa área. Otros metales como Cu y Cd se registraron en niveles más altos en la laguna costera de Mar Chiquita y en Bahía Samborombón, ambas zonas estuarinas afectadas por extensas actividades agrícolas.

Una mirada mundial a otros cangrejos costeros y de estuarios determinó que los valores de Cd y metales esenciales como Cu y Zn son aún más altos en nuestro estudio. Finalmente, otros elementos tóxicos como Pb, Ni y Cr son más altos en las especies de cangrejos de las áreas costeras de países en desarrollo e industrializados como Brasil, Pakistán, Irak y Taiwán con derrames de petróleo, prácticas mineras inadecuadas, altas tasas demográficas, condiciones de pobreza y de los cuales, algunos han sido sometidos a guerras sucesivas recientes (Tabla 7).

Por último, es necesario recordar que el rol de *N. granulata* como biomonitor también se vincula a su rol fundamental en las redes tróficas estuariales. Esta especie es consumida por peces carcinófilos de importancia ictícola (como *Micropogonias furnieri* y *Mustelus schmitti*) y por aves en situación vulnerable, tal como la gaviota cangrejera o de Olrog (*Larus atlanticus*), por lo que es fundamental analizar la concentración de metales en estos cangrejos para evaluar una posible biomagnificación de estos contaminantes en la biota. Al respecto,

La Colla *et al.* (2018c) detectaron niveles de metales tóxicos como el Cd en el hígado de *M. furnieri* mayores a los registrados en *N. granulata*, muchas veces superando los valores permitidos para consumo humano. En tanto otros metales como el Cu, Zn, Ni, Fe y Mn en peces carcinógenos del EBB no resultaron mayores a los registrados por los cangrejos en este estudio (La Colla *et al.*, 2017, 2018c; STAN IADO, 2017). Por lo tanto, resulta esencial continuar con el biomonitoreo de metales a través de una especie ecosistémica clave como *N. granulata*, así como su **biomagnificación** en especies de consumo humano. Finalmente, en la Figura 55 se propone un esquema simplificado de los resultados discutidos hasta este apartado en relación al ciclo de los metales, su deposición en los sedimentos, la influencia de ciertos parámetros (MO, temperatura) en la absorción de metales y la incorporación de metales en los cangrejos por diferentes vías.



**Figura 55:** Esquema simplificado del rol ecológico de *Neohelice granulata* en el EBB. Se señala la incorporación de metales desde diferentes vías de ingreso y transferencia a través de las tramas tróficas (flechas en rojo).

### 3.4.2.3 Biomarcadores bioquímicos como indicadores de alerta temprana (IAT) para evaluar la contaminación por metales

#### 3.4.2.3.1 Variación espacial y relación con metales

Las mediciones a nivel bioquímico y fisiológico pueden detectar de manera más rápida y específica la presencia de compuestos o elementos tóxicos, permitiendo identificar los cambios de manera temprana, antes que los efectos deletéreos alcancen a niveles de organización biológica mayores. Aunque en el caso del biomonitoreo, es recomendado el uso

de los IAT, puede darse una falta de especificidad de determinados biomarcadores de exposición (Montserrat *et al.*, 2007; Frías-Espericueta *et al.*, 2022). Y si bien se presenten IAT específicos, como las MT y AChE, incluso la evidencia científica ha demostrado que factores abióticos, como la salinidad, sexo y talla influyen en la especificidad de estos IAT (Legras *et al.*, 2000; Montserrat *et al.*, 2007; Frías-Espericueta *et al.*, 2022). A su vez, esta tarea es aún más compleja en estudios de sistemas estuariales en campo, donde los organismos están sometidos de manera constante a mezclas de contaminantes, cambios hidrológicos, fluctuaciones de los parámetros físico-químicos, salinidad y en su fisiología intrínseca inscripta a factores estacionales, que, en su conjunto, pueden desencadenar respuestas oxidativas. De manera reciente, Frías-Espericueta *et al.* (2022) revisó las **respuestas antioxidantes** frente a los metales en crustáceos decápodos, y expuso que estas respuestas son **variables** dependientes de la especie, la concentración, talla y el tiempo de exposición, por lo cual resulta complejo generalizar los resultados de estas respuestas.

Lo expuesto en el párrafo anterior fue observado en la presente tesis, ya que, en términos generales, los biomarcadores empleados **no indicaron diferencias espaciales significativas**, a excepción de TBARS, que fue mayor en la mayoría de las estaciones de VM; CAT que fue mayor en PC, en especial en verano, mientras que en general, en PR predominó la activación detoxificante de la GR. En cuanto a la respuesta espacial de los invertebrados estuariales en función a la exposición de metales ambientales, se ha reportado una **amplia variabilidad de respuestas antioxidantes** entre sexos, sitios y estaciones (Capparelli *et al.*, 2019b; Diodato *et al.*, 2021).

De esta manera, surge el **IBR** como herramienta que permite obtener un amplio panorama de estas respuestas para dirigir las evaluaciones ambientales de riesgo ecológico (Beliaeff & Burgeot, 2002). El IBR permitió observar una tendencia de mayor actividad bioquímica en los sitios durante el invierno, en especial con mayores valores en PC y VM. La presencia de una mayor expresión de los IAT en VM puede ser explicada a través de la deposición continua de sedimentos finos con una carga de metales y a la presencia de *S. alterniflora* como ítem alimenticio que luego son bioacumulados por los cangrejos. A su vez, los gráficos radiales permitieron observar que en PC predominaron las MT en conjunto con la CAT como defensas antioxidantes. En PR se observó dominancia de la actividad detoxificante de GR y GST; y en VM la ERO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido por un consiguiente daño

lipídico (TBARS). Por lo tanto, en **PC** es probable que la presencia de metales active defensas que contrarresten el estrés oxidativo, mientras que en **PR** la carga metálica estaría más asociada a la presencia de mecanismos detoxificantes vinculados a la glutatión, y en **VM** se destacó el daño causado por exceso en la producción de MDA en presencia de una ERO.

PR presenta las presiones antrópicas más fuertes, pero el posible daño a nivel lipídico, puede reducirse en organismos expuestos continuamente a presiones humanas por la activación de defensas antioxidantes y desintoxicantes. En otras palabras, la CAT y la GST se podrían haber estimulado, deteniendo el proceso de peroxidación lipídica, en coincidencia con estudios de Giarratano *et al.* (2016) para *N. granulata* en ambientes costeros altamente contaminados por metales.

La variabilidad de las respuestas en ambos sitios puede deberse a que los cangrejos presentan distintos **grados de tolerancia** a los metales que resultan hábitat-específico (Giarratano *et al.*, 2016; Jerome *et al.*, 2017), indicando una **presión toxicológica selectiva**. Así, tanto en PC como en PR es probable que los organismos hayan desarrollado estrategias antioxidantes y detoxificantes más eficaces que en VM, donde predominó el daño lipídico causado por un desbalance en el estrés oxidativo. De esta manera, el IBR y la estandarización de los datos de biomarcadores resultaron una herramienta útil que permitieron resumir los datos obtenidos de varios análisis estadísticos.

De forma similar, para las costas fueguinas, Diodato *et al.* (2021) concluyeron que este índice sintetizó los efectos observados de mezclas de contaminantes en *M. chilensis* para comprender como responden estos organismos a los contaminantes del ambiente, siendo un instrumento sencillo para utilizar en programas de monitoreo integrales. No obstante, el método IBR representa una simplificación de situaciones complejas de exposición en el campo, y el índice no debe tomarse como un valor absoluto, sino como otra herramienta para evaluar el riesgo ecológico integrado (Broeg & Lehtonen, 2006; Diodato *et al.*, 2021).

En cuanto a las **correlaciones**, por lo general, no se observaron valores significativos entre los biomarcadores empleados y los metales en los cangrejos y sedimentos por sitios. En **PC**, el **Cd<sub>C</sub>** se correlacionó de manera positiva con la **GR** y en menor medida con TBARS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las correlaciones entre este metal y estos biomarcadores ya han sido reportados por trabajos en varios grupos de invertebrados estuariales expuestos a la contaminación metálica en el ambiente (p.ej., Figueira *et al.*, 2012; Ben-Khedher *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2016). En

especial, Xu *et al.* (2021) identificó a la GR y MDA como biomarcadores óptimos para la evaluación de la exposición subletal al Cd en el cangrejo *Sinopotamon henanense*. En el caso del decápodo *Eriocheir sinensis*, Lin *et al.* (2017) observó que la exposición crónica a este metal puede generar excesos de ERO, tal como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que superan la capacidad de estos organismos de neutralizar estas moléculas. Los excesos de los radicales libres causan LPO, además de bloquear la cadena de transporte de electrones mitocondrial, causando daño a nivel de ADN y celular, con apoptosis y lesiones en órganos como el hepatopáncreas (Xia *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021). También es posible que la presencia de Cd induzca la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con consecuente daño lipídico y la GR promueva la síntesis de GSH para contrarrestar el estrés oxidativo.

Además, en este sitio se registraron correlaciones entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GR y TBARS, indicando que la presencia de los ERO producen LPO, que activa la GR para evitar este estrés. La **GR** es una enzima importante porque cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual es utilizado en reacciones de conjugación (catalizadas por la GST) y en reacciones de degradación del peróxido de hidrógeno (catalizadas por la GPx). A su vez, esta enzima presentó correlaciones negativas con el **Fe** en los cangrejos, indicando que un aumento en este metal podría reducir la actividad de la enzima por su consumo. Esto fue reportado por Ferreira *et al.* (2021) en el caso de la ostra *Crassostrea gasar* en costas brasileras, quienes indicaron la posibilidad de que decrezca la GR en función de los aumentos de Fe. Este metal puede generar ERO tóxicas (anión superóxido) a través de la **reacción de Fenton** que puede dañar la célula, más cuando el Fe no es regulado de manera adecuada (Giarratano *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2021).

En **PR** se observaron mayores correlaciones como en el caso del Cu, Zn y Mn en los cangrejos con **GR** y **TBARS**. También se observaron correlaciones entre MT, GST y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que podría denotar una actividad de primera línea de **defensa antioxidante**, previniendo la generación de radicales libres y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y asociada de manera estrecha a la respuesta de GST. Las correlaciones de enzimas detoxificantes con metales esenciales fueron observadas por Giarratano *et al.* (2016) en *N. granulata* en la Bahía San Antonio. Los altos niveles del **Cu** pueden producir LPO (indicada también por las correlaciones observadas), por lo que es fundamental la actividad detoxificadora de enzimas como la GR frente a estos metales (Giarratano *et al.*, 2011; Jerome *et al.*, 2017). Por otro lado, en PR, TBARS se correlacionó

de manera negativa con CAT y GST, indicando que la actividad de CAT y GST impiden un daño oxidativo posterior. En tanto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se correlacionó con CAT y GST, por lo que aumentos en esta especie implicarían un consecuente aumento en las actividades de estas enzimas.

Al respecto del **Cu**, Cravo *et al.* (2012) explicaron que, para algunos invertebrados bentónicos como bivalvos, este metal puede llevar al decrecimiento/fallo en el sistema enzimático de respuestas antioxidantes. Hasta la fecha, no existe evidencia de la necesidad fisiológica de Cu en *N. granulata* que le permita obtener los requerimientos asociados a las enzimas y a la hemocianina. En otras especies, como *C. maenas*, esta estimación ha sido detectada entre rangos de 31,3 y 38,2 µg g<sup>-1</sup> (Abdennour, 1997), por lo que la regulación del Cu a partir de la inducción enzimática y de MT podría minimizar eventualmente las diferencias estacionales. No obstante, los cangrejos presentes en este estudio, al igual que en el caso de *C. maenas* analizado en otros trabajos (p.ej., Pereira *et al.*, 2010), presentaron niveles superiores al Cu fisiológicamente necesario para algunos decápodos en todas las estaciones de los sitios analizados, por lo que la posible acción tóxica de este metal necesita continuar siendo estudiada.

Un trabajo reciente de Luo *et al.* (2021) sobre la exposición subletal del Cu en el cangrejo de barro *Scylla paramamosain*, encontró que un exceso de este metal en la dieta de los cangrejos causa efectos sobre la coloración (corporal y de la hemolinfa) y el estrés oxidativo, e incluso en la expresión genética de los biomarcadores de las ERO. En este cangrejo, la mayor bioacumulación se dio en el hepatopáncreas donde alcanzó magnitudes de aproximadamente 400 µg g<sup>-1</sup>, y reflejó la utilidad de este órgano en estudios toxicológicos. A su vez, los autores y autoras indicaron que los genes de respuesta a estrés investigados fueron regulados positivamente en respuesta a un alto exceso de Cu en la dieta, por lo que las actividades y los niveles transcripcionales de enzimas antioxidantes clave (SOD, GPx, GSH, CAT, otras) disminuyeron, lo que restringió el mecanismo de defensa antioxidante. De manera que en ambientes donde *N. granulata* se encuentra en relación estrecha con un sedimento y alimento rico en Cu, es fundamental estudiar los mecanismos de toxicidad y regulación de este metal, ya que podría desencadenar efectos nocivos a nivel bioquímico (Sabatini *et al.*, 2009) por la aparente falta de mecanismos de regulación de este elemento.

En **VM**, el **Cd** se correlacionó con **CAT** y **GST**; y la acción de las **MT** se encontró asociada al  $H_2O_2$ ; y la **CAT** y **GST** que poseen funciones para evitar el daño lipídico, indicado por la correlación de ambas con **TBARS**. La activación de la **CAT** y **GST** en presencia del **Cd** también ha sido descripta, ya que, en bajas concentraciones, el **Cd** puede producir un aumento de la actividad **CAT** y **GST** para minimizar el daño oxidativo, como la producción de **MDA** (Figueira *et al.*, 2012). Sin embargo, en otros estudios de biomonitoreo de ecosistemas costeros del Mar Argentino, no se encontraron correlaciones entre la **GST** y los metales acumulados en los organismos bentónicos, por lo que la actividad de esta enzima resulta ser variable en la exposición a metales *in situ* (Giarratano *et al.*, 2011, 2013, 2016; Schvezov & Amin, 2011). A su vez, la **GR** se correlacionó de manera negativa con el **Mn**, otro metal esencial que, como en el caso del **Fe**, si aumenta en exceso y disminuye la **GR**, podrían generar daños oxidativos. La correlación negativa de **TBARS** con **MT**, podría indicar que un aumento de las **MT** disminuye el **LPO**. Considerando que estas proteínas no se correlacionaron con metales y sí con **ERO**, es probable que en este sitio este biomarcador actué para proteger a la célula de especies reactivas, como ha sido propuesto en otros estudios con invertebrados bentónicos (Giarratano *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2021).

En general, las correlaciones que se observaron entre **CAT**, **TBARS**, **GR**,  $H_2O_2$  y **GST** en los cangrejos resulta conforme al **ciclo oxidativo**, ya que los procesos que generan y eliminan **ERO** podrían encontrarse en equilibrio. La **LPO** medida a través de **TBARS** es un proceso complejo donde los lípidos son oxidados generando lípidos hidroperóxidos, como el **MDA**, que genera un daño a nivel bioquímico. La **CAT** y **GST** son enzimas antioxidantes, la **CAT** desactiva el peróxido para evitar daño celular ya que interviene en la descomposición de esta especie, en tanto la **GST** como desintoxicante que cataliza la conjugación del glutatión reducido con los compuestos tóxicos (Diodato *et al.*, 2021). La actividad del  $H_2O_2$  es un biomarcador relativamente emergente, por lo cual es recomendable continuar estudiándolo, ya que su aumento podría conducir a un daño oxidativo en el hepatopáncreas de los cangrejos (Negro *et al.*, 2019), debido a que, a diferencia del resto de las **ERO**, puede cruzar las membranas biológicas con efectos tóxicos (Frías-Espericueta *et al.*, 2022).

#### 3.4.2.3.2 Variación estacional y relación con metales y parámetros físico-químicos

Al igual que el análisis espacial, los biomarcadores presentaron una respuesta variable según las **estaciones**. Por lo que la aplicación del índice **IBR** también fue fundamental para comprender la actividad de los biomarcadores según las estaciones en cada sitio. Algunos trabajos en invertebrados bentónicos de ecosistemas del Mar Argentino, dieron cuenta de que la actividad de ciertos biomarcadores resultan ser diferentes según la época del año (Duarte *et al.*, 2011). A nivel general, en otoño predominaron las MT, en invierno el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la CAT; en primavera el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en verano, TBARS, GR y CAT.

El análisis de las **estaciones** según los **sitios**, indicó que, en **PC**, la GST predominó durante las estaciones frías, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en primavera y el daño lipídico en verano. En **PR** se dio una situación similar, ya que predominó la CAT en otoño como defensa antioxidante, la GR y GST con función detoxificante, y probablemente, las MT también con función detoxificante frente a la acumulación de metales; en tanto la GR también predominó en primavera, mientras que en verano, el peróxido con un consecuente daño lipídico. En **VM**, también predominó la GR en otoño y primavera y el daño lipídico en verano, pero las MT y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en otoño.

La mayor actividad de la CAT y LPO en **verano** fue reportada por trabajos en moluscos de Ushuaia y el Golfo San Jorge (Duarte *et al.*, 2011; Lompré *et al.*, 2019), y según estos estudios el aumento de las tasas metabólicas durante la temporada de desove (primavera), posiblemente podría aumentar la tasa de ERO, resultando en estrés oxidativo durante esta temporada y la de verano, ya que los organismos resultan más sensibles o propensos a los contaminantes. La actividad representada por el **IBR** en **otoño**, podría ser considerada como una fase de reposo post-desove, caracterizada por una baja actividad metabólica (Duarte *et al.*, 2011). Por otro lado, el **invierno** marca el inicio del período de acumulación de reservas para la reproducción, por lo que podría considerarse un período de exposición a contaminantes, indicado por la inducción de la CAT, la GR y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En el caso de la presente tesis, en las **estaciones frías**, se dio un incremento de las defensas antioxidantes y detoxificantes de ERO, por lo cual no predominó el daño lipídico. Varios estudios en cangrejos y bivalvos (Pereira *et al.* 2009, 2010; Duarte *et al.*, 2011; Cravo *et al.* 2012; Capparelli *et al.*, 2016, 2019a) determinaron que en estaciones invernales suele darse un incremento de la línea de defensa antioxidante, lo que podría reducir los niveles de MDA. A su vez, las respuestas bioquímicas de los macroinvertebrados suelen ser mayores

en estas estaciones ya que esta indica el inicio del período de acumulación de reservas energéticas. Por lo que podría considerarse un período de alta exposición, con una mayor ingesta de alimentos en los que se encuentran adsorbidos algunos contaminantes, como los metales, que no pueden ser excretados fácilmente. Al mismo tiempo, los valores más altos de IHS en hembras durante estas estaciones complementan esta explicación referida al aumento de reservas energéticas.

En cambio, en las **estaciones más cálidas** del EBB, el incremento de LPO puede ser debido a la mayor actividad de los cangrejos asociada a un mayor consumo de MO y exposición de sedimentos con metales resultantes de los procesos de bioturbación, con un fallo en la defensa antioxidante. En esta tesis, esta idea fue sostenida a partir de las mayores correlaciones de TBARS con metales en sedimentos y cangrejos en estaciones cálidas.

Un análisis más detallado de la estacionalidad y de la relación de los metales con los biomarcadores y **parámetros físico-químicos** indicó que en **otoño**, el Cd se correlacionó de manera positiva con las MT y de manera negativa con la CAT por lo cual es posible que los aumentos de Cd aumenten las MT como respuesta detoxificante y antioxidante, disminuyendo los niveles de CAT, como se explicó en el apartado anterior. El Fe presentó correlaciones con las MT, que podría explicarse porque resulta un metal esencial para la síntesis de MT, ya que la ausencia de correlaciones con otros biomarcadores, podrían indicar que no actuó como defensa antioxidante en esta estación. El Cu se correlacionó de manera negativa con la GST y CAT y de manera positiva con MT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBARS y GR, señalando que aumentos en este metal pueden contribuir a la síntesis de MT, y a la actividad de GR para sintetizar GSH y evitar el daño oxidativo. Sin embargo, en este caso, la correlación negativa GST-Cu puede indicar que este biomarcador puede disminuir por exposición del Cu en temperaturas otoñales causando un daño lipídico, como ha sido reportado en otros cangrejos estuariales, como *M. rapax* (Capparelli *et al.*, 2019b). Esta explicación puede resultar adecuada, ya que también explicaría las correlaciones negativas de la GST con GR, TBARS, MT y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Otros metales en otoño, como el Mn y Ni, presentaron respuestas similares con correlaciones negativas con GST y CAT y positivas con MT, TBARS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con mecanismos posiblemente similares a los del Cu. Aunque los mecanismos de toxicidad de

estos metales han sido escasamente abordados en cangrejos y otros macroinvertebrados (Baden & Eriksson, 2006; Blewett *et al.*, 2015; Blewett & Leonard, 2017).

En **invierno**, las correlaciones negativas del Cd con MT podrían explicar las correlaciones negativas con GR y GST, ya que es sabido que las MT son sintetizadas para secuestrar iones metálicos y reducirlos junto a las ERO (Figueira *et al.*, 2012). A su vez se dio la misma correlación negativa GST-Cu, propia de épocas frías, y se dio el mismo caso con el Zn, que podrían señalar mecanismos similares de estos metales. El Fe se correlacionó de manera negativa con CAT y MT, indicando que las MT podrían aumentar para secuestrar el Fe y evitar daño oxidativo por la reacción de Fenton, señalado también por la correlación positiva CAT-MT.

Durante las estaciones más **cálidas** como la primavera, el Cd se correlacionó de manera positiva con la CAT y GR como una respuesta protectora a la lesión oxidativa iniciada por este metal, que, como ya se ha discutido, puede resultar altamente tóxico. El Cu, Zn y Fe se correlacionaron de manera positiva con la GR y de manera negativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que sugiere que la GR actúa sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo cual estos niveles se reducen. En verano, el Cd también se correlacionó con la CAT. En general, metales como el Cu, Zn, Mn, Ni y Fe se correlacionaron de manera negativa con las MT, GST y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de manera positiva con TBARS, lo cual indicaría que los principales mecanismos de defensa antioxidante fallaron frente a la exposición de estos metales dando lugar al daño oxidativo, que suele ser frecuente en invertebrados durante las estaciones cálidas por el incremento de los requerimientos de las tasas metabólicas (Duarte *et al.*, 2011).

En biomonitoreos integrales como el de la presente tesis, es fundamental considerar los “**confounding factors**” o factores que generan confusiones en la interpretación de los resultados de los biomarcadores. Entre estos factores se encuentra el estado de salud del organismo, condición, sexo, edad, estatus nutricional, estadio reproductivo, densidad poblacional, estación, temperatura, salinidad, entre otros que pueden llevar a falsos positivos y negativos no asociados estrictamente a los contaminantes que desean monitorear (Montserrat *et al.*, 2007; Kalman *et al.*, 2010; Tankoua *et al.*, 2011; Frías-Espericueta *et al.*, 2022). Para ello, el ACP indicó correlaciones positivas en el componente 1 de la salinidad, la temperatura, GR y TBARS, y negativa con la MT, CAT y GST. En tanto, en el componente 2, la turbidez y OD se correlacionaron de manera negativa con la GR. De manera que

estos parámetros podrían influenciar la actividad de estos biomarcadores y deben ser considerados para los programas integrales de monitoreo ambiental, ya que, por ejemplo, la salinidad suele fluctuar en la zona interna del estuario durante el verano y el estuario también presenta variaciones estacionales marcadas en la temperatura.

Para algunos autores y autoras (p.ej., Gagné *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2018, Ale *et al.*, 2019, entre otros), las **MT** representa la primera línea de defensa contra ERO, ya que un aumento de estas proteínas tiende a reducir la actividad de las ERO. En esta tesis, contrario a lo esperado, las MT no mostraron una mayor afinidad por los metales en el hepatopáncreas de los cangrejos en base al análisis del ACP. En general, la información surgida a partir de este análisis multivariado, podría sugerir que las MT están más relacionadas a la defensa del estrés oxidativo, en particular a la defensa contra el Cd. De esta manera, nuestros resultados también coinciden con los hallazgos de Giarratano *et al.* (2016) que no encontraron relación entre MT y metales en tejidos de *N. granulata*, lo que sugiere que los niveles de estas proteínas podrían sintetizarse para proteger a las células contra el estrés oxidativo, ya que actúan para eliminar los oxirradicales (Viarengo *et al.*, 2000). En suma, la inducción de MT puede resultar en una estrategia que les permita a los organismos quelar iones metálicos en solución, como estrategia para reducir la unión del metal a biomoléculas importantes y el aumento ERO (Figueira *et al.*, 2012).

Para finalizar, el componente 1 del **ACP** explicó la mayoría de las estaciones de VM, verano e invierno de PC y PR durante primavera con actividad de la GR y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los metales en los cangrejos, demostrando ser un buen análisis para explicar el conjunto de múltiples variables analizadas en función de los sitios\*estaciones. No obstante, en sistemas con una mezcla de contaminantes como metales, microplásticos, PCBS, HAPs, TBTs y pesticidas (Arias *et al.*, 2013; Oliva *et al.*, 2015; Quintas *et al.*, 2016; Girones *et al.*, 2019; Villagran *et al.*, 2020; Forero López *et al.*, 2021a, b) en matrices bióticas como abióticas, los biomarcadores podrían indicar contaminación metálica como orgánica o un efecto sinérgico e incluso mostrar alteraciones por contaminantes físicos como el sonido humano (Filiciotto *et al.*, 2018). La acción sinérgica de contaminantes inorgánicos y orgánicos fue observada por varios estudios, entre ellos, Martin-Díaz *et al.* (2008) para la actividad de varias enzimas antioxidantes en los puertos españoles en donde determinaron que el aumento de los niveles

de actividad de las enzimas en invertebrados podría ser inducido por contaminación tanto orgánica (HAPs y PCB) como metálica.

**Tabla 6:** Comparación ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) de los metales en la fracción fina ( $<63 \mu\text{m}$ ) de sedimentos intermareales de los sitios de muestreo de la presente tesis, otros estudios en el EBB, el Mar Argentino y en el mundo. Datos representados en rangos de valores mínimos y máximos. En negrita se indican aquellos valores por encima de las recomendaciones internacionales. \* valores expresados como  $\text{mg g}^{-1}$  ps

Región	Cd	Cu	Pb	Zn	Mn*	Ni	Cr	Fe*	Referencia
PC (planicie de marea, EBB, Argentina)	<LDM	9,28-15,61	3,51-7,41	30,78-44,4	0,22-0,42	5,69-10,15	3,74-13,39	12,6-20,3	Presente tesis
PR (planicie de marea, EBB, Argentina)	<LDM	<b>14,22-67,5</b>	3,63-8,19	37,44-61,03	0,16-0,35	6,66-9,69	4,32-6,82	14,9-20,1	Presente tesis
VM (marisma de <i>Spartina alterniflora</i> , EBB, Argentina)	<LDM	10,48-15,67	3,53-4,69	32,66-47,78	0,3-0,5	6,97-9,86	5,22-6,4	15,02-20,35	Presente tesis
PC (marisma de <i>Sarcocornia</i> sp., EBB, Argentina)	<LDM	12,65-15,36	7,55-8,36	35,29-41,42		9,32-11,12	12,17-14,91	19,83-23,5	Negrin <i>et al.</i> (2021)
PR (marisma de <i>Sarcocornia</i> sp., EBB, Argentina)	<LDM	9,19- 15,18	6,27-9,26	28,42-43,02		6,95-10,63	9,95- 14,9	15,4-22,17	Negrin <i>et al.</i> (2021)
PR (planicie de marea, EBB, Argentina) <sup>a</sup>	0,090±0,027	20,60±3,93	6,30±0,73	33,10±6,33	0,26±0,01	5,33±0,56	7,29±1,30	26,6 ± 3,3	Buzzi <i>et al.</i> (2021)
Diferentes sitios del EBB <sup>a</sup> (Argentina)	0,053±0,006	22,79±1,47	5,40±0,97	37,32± 2,38		8,90 ± 0,49	11,68 ±3,35		Buzzi & Marcovecchio (2018)
PC (planicie de marea, EBB, Argentina)	<LDM - 0,041	8,86–15,51	2,98–12,34	13,61–48,72	0,22–0,52	5,18–11,37	5,18–16,37	18,02 – 24,1	Simonetti <i>et al.</i> (2017)
PR (planicie de marea, EBB, Argentina)	0,04–0,11	<b>19,36–43,69</b>	6,80–11,85	46,54–111,35	0,22–0,38	8,20–12,22	9,18–19,48	18,24 – 26,84	Simonetti <i>et al.</i> (2017)
Planicies de marea alejadas de fuentes de contaminación (EBB, Argentina) <sup>b</sup>	0,90	8,03	8,94	32,66	0,23	11,12	6,15	18,1	Grecco <i>et al.</i> (2010)
Laguna costera Mar Chiquita (marisma, Argentina)	<b>0,98-2,66</b>	3,62-7,74			0,63-0,64		0,53-6,03		Beltrame <i>et al.</i> (2011)
Laguna costera Mar Chiquita (planicie de marea, Argentina)	<b>0,95-2,64</b>	4,5-8,01			0,07-0,65		0,34-7,41		Beltrame <i>et al.</i> (2011)
Golfo San Jorge (Argentina)	<LDM	<LDM-6,98	<LDM-5,48	7,9-46,5		<b>&lt;LDM - 20,8</b>	<LDM - 13,3		Marinho <i>et al.</i> (2013)
Estuario Río de La Plata (Uruguay)	0,19-1,11	<b>22,44-106,95</b>	<b>19,08-87,83</b>	<b>54,89-246,58</b>		<b>2,65-16,74</b>	<b>32,77-115,64</b>		Muniz <i>et al.</i> (2019)

<b>Bahía Sao Marcos (Brasil)</b>	<LDM	2,99-10,32		11,50-32,02		<b>107,92-124,49</b>	10,72-35,09		Jesus <i>et al.</i> (2021)
<b>Golfo de Suez (Egipto)</b>	<LDM-3,32	1,05-7,85	<b>&lt;LDM-89,49</b>	<b>1,47-169,32</b>		<b>20,86-232,57</b>	3,47-99		Ibrahim <i>et al.</i> (2020)
<b>Zona costera del SE de Jamaica</b>		<b>9,8-104,7</b>	<b>4,8-687,4</b>	2,3-131,1			2,8-35,8		Williams & Antoine (2020)
<b>Estuario del río Feni (Bangladesh)<sup>b</sup></b>			6,47			<b>33,27</b>	35,28		Islam <i>et al.</i> (2018)
<b>Península Shandong (China)</b>	0,06-0,34		7,9-26,2	23,2-53,2			16,7-34,6		Lv <i>et al.</i> (2021)
<b>Estuario del río Brisbane (Australia)</b>	0,0003-0,3	<b>10,7-40,7</b>	<b>7,1-43,4</b>	<b>38,8-168</b>		<b>7-17,5</b>	8,5-22,4		Duodu <i>et al.</i> (2017)
<b>Isla Qi'ao (China)</b>	0,6-1,3	<b>65-91</b>		<b>212-247</b>	0,5-1,26		8,8-14		Zhang <i>et al.</i> (2019)
<b>Estuario del río Yellow (China)</b>		<b>15,6-29,9</b>	<b>35,8-51,7</b>	38,2-68,3		<b>17,6-28,4</b>	<b>35,9-54,7</b>		Sun <i>et al.</i> (2015)
<b>Estuario del río Pearl (China)</b>		<b>8,56-94,8</b>	<b>34,5-74,9</b>	<b>55,4-242</b>		<b>23,2-67,7</b>	<b>40,1-99,7</b>		Yang <i>et al.</i> (2014)
<b>Bahía Jinzhou (China)</b>	7,91-105,31	<b>24,45-327,50</b>	<b>29,17-523,45</b>	<b>168,06-2506,33</b>		<b>26,29-85,99</b>			Li <i>et al.</i> (2012)
<b>Golfo Persa (Iran)</b>	17,34-29,63	<b>21,22-64,89</b>	0,26-3,85			<b>9,93-24,7</b>			Bastami <i>et al.</i> (2012)
<b>Estuario Huelva (España)<sup>b</sup></b>	0,15±0,11	9,8±0,5	10,8±0,5	46,87±1,8					Oliva <i>et al.</i> (2012)
<b>Laguna costera de Óbidos (Portugal)</b>	0,15-0,19	<b>40-56</b>	<b>35-39</b>	<b>121-144</b>		<b>33-35</b>	<b>83-89</b>		Pereira <i>et al.</i> (2009)
<b>Bahía Guanabara (Brasil)</b>		<b>2-18840</b>	<b>2-19340</b>	<b>5-755149</b>		<b>1-3515,5</b>	<b>2-41.364</b>		Neto <i>et al.</i> (2006)
<b>TEL-SQGs</b>	0,68	18,7	30,24	124		15,90	52,3		Buchman (1999)
<b>PEL-SQGs</b>	4,21	108,2	112,18	271		42,8	160,4		Buchman (1999)
<b>Sedimentos sin contaminación</b>	0,01-0,2	5-25	5-25	20-100		10-20	30		Bryan & Langston (1992)

<sup>a</sup> Media ± DE

<sup>b</sup> Media (Sin ±DE)

Abreviación: TEL-Q: Threshold Effect Level quotients (cociente del nivel de umbral de efecto); PEL-Q: Probable Effect Level quotients (cociente del nivel de efecto probable) de la Guía de Calidad de Sedimentos (Sediments Quality Guidelines, SQGs).

Tabla 7: Tabla comparativa de concentración de metales ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ps) en *N. granulata*, otros taxa de macroinvertebrados del Mar Argentino y otros cangrejos estuariales del mundo. Datos representados en rangos de valores mínimos y máximos. En negrita se señalan los rangos más altos para el Mar Argentino y otros sistemas.

Región	Taxa		Cd	Cu	Zn	Pb	Mn	Ni	Cr	Fe	Referencia
PC (planicie de marea, EBB, Argentina)	<i>N. granulata</i>	H	0,6-2,73	<b>62,6-623,05</b>	47,04-96,41	<LDM	<LDM-14,12	<LDM	<LDM	104,3-204,25	Presente tesis
		M	0,46-2,08	<b>74,12-621,35</b>	32,51-85,17	<LDM	<LDM	<LDM-1,83	<LDM	85,71-227,15	
PR (planicie de marea, EBB, Argentina)	<i>N. granulata</i>	H	0,23-2,26	126,81-252,83	46,5-77,53	<LDM-8,96	<b>&lt;LDM-42,73</b>	<LDM-7,51	<LDM	122,54-764,98	Presente tesis
		M	0,22-0,79	122,5-503,3	49,45-101	<LDM	<LDM-12,18	<LDM-7,71	<LDM	212,3-772,4	
VM (marisma de <i>S. alterniflora</i> , EBB, Argentina)	<i>N. granulata</i>	H	<b>1-3,28</b>	169-468,7	<b>41,99-121,15</b>	<LDM	<LDM-41,91	<LDM-16,2	<LDM	176-546,73	Presente tesis
		M	0,88-2,07	107,39-595,6	<b>40,82-120,2</b>	<LDM	<b>11-33,12</b>	<b>&lt;LDM-23,94</b>	<LDM	138,12-809,9	
Bahía San Antonio (Argentina)	<i>N. granulata</i>		0,3–1,7	174–438	<b>81–168</b>	0,4–8,0				<b>399–1970</b>	Marinho <i>et al.</i> (2018)
Bahía San Antonio (Argentina)	<i>N. granulata</i>		0,2–2,3	150–380	78–130	<0,2-8,2				380–1800	Giarratano <i>et al.</i> (2016)
Bahía San Antonio (Argentina)	<i>N. granulata</i>		< 0,08		87–102	<b>10-13,2</b>				68–86	Gil <i>et al.</i> (2006)
Bahía Samborombón (Argentina) <sup>a</sup>	<i>N. granulata</i>	H	2,07 ± 1,36	531,62 ± 266,54	90,89 ± 33,86	<LDM					Beltrame <i>et al.</i> (2011)
		M	2,29 ± 2,05	<b>876,79 ± 430,43</b>	76,16 ± 42,10	<LDM					
Laguna costera Mar Chiquita (Argentina)	<i>N. granulata</i>	H	0,33-0,83	<b>61,85-1672,34</b>	46,83-73,27	<LDM-12,4					Beltrame <i>et al.</i> (2011)
		M	<LDM-0,93	49,53-127,45	37,00-45,20	<LDM-6,04					

Diferentes sitios del EBB (Argentina) <sup>a</sup>	<i>B. rodriguezii</i>	1,98±0,27	20,10±1,05	56,93±3,45	<LDM		2,06±0,08	0,64±0,05		Buzzi & Marcovecchio (2018)
Playa de arena Pehuen-Có (Argentina) <sup>a</sup>	<i>B. rodriguezii</i>	<b>3,87±0,12</b>	20,29±1,12	53,07±6,92	<LDM		3,01±0,19	<b>1,19±0,32</b>		Buzzi & Marcovecchio (2018)
EBB y playa de arena Monte Hermoso (Argentina)	<i>Magallana (=Crassostrea) gigas</i>	0,29–0,89	19–81	<b>39–320</b>	<LDM	1,5–15	0,020–0,24	0,042–0,42	12–230	La Colla <i>et al.</i> (2018b)
Canal de Beagle (Argentina)	<i>Mytilus edulis chilensis</i>	1,20–1,71	4,77–6,74	98,32–189,39	<LDM - 3,26				132,63–369,19	Duarte <i>et al.</i> (2011)
Bahía de Ushuaia (Argentina)	<i>M. edulis chilensis</i>	0,51–1,60	3,50–8,09	<b>121,80–390,50</b>	2,53–5,97				133,29–251,93	Comoglio <i>et al.</i> (2011)
Bahía de Ushuaia (Argentina)	<i>Nacella (P) magellanica</i>	0,93–2,71	3,93–7,51	70,08–102,63	3,09–5,91				<b>1623,28–3822,41</b>	Comoglio <i>et al.</i> (2011)
Golfo Persa (Irak)	<i>Parasesarma persicum</i>	1,16–1,47	231–247,38		8,34–12,53					Rahmanpour <i>et al.</i> (2014)
Costa de Karachi (Pakistan)	<i>Macrophthalmus depressus</i>	0,41–3,16	15,80–176,14	81,46–154,87	<b>10,52–102,64</b>		<b>0,43–40,52</b>	<b>5,817–21,75</b>		Saher & Siddiqui (2019)
Laguna costera de Órbidos (Portugal)	<i>Carcinus maenas</i>	0,11–0,17	<b>410–478</b>	106–119	0,10–0,24	21–26	4,6–7,6	0,64–1,1	523–992	Pereira <i>et al.</i> (2009)
Áreas costeras de Portugal	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	<b>0,2–3,48</b>	197,67–147,17	<b>112,67–159,8</b>	<LDM–0,63	23–28,67	5,02–8,02	4,12–7,57	200–450	Álvaro <i>et al.</i> (2016)
Bahía Todos os	<i>Polyonyx gibbesi</i>		2,35–59,8	35,5–,8		<b>32,7 – 287</b>		1,16–4,77	515–1597	Eça <i>et al.</i> (2013)

<b>Santos (Portugal)</b>										
<b>Bahía São Marcos (Brasil)</b>	<i>Ucides cordatus</i> <sup>b</sup>	<LDM	4,02-6,45	53,56-68,83			<LDM - 0,36	0,48-0,68		Jesus <i>et al.</i> (2021)
<b>Estuario Santos-São Vicente (Brasil)</b>	<i>U. cordatus</i>	0,08-0,28	4,40-8,47	2,06-18,32	<LDM			<LDM - 1,79		Pinheiro <i>et al.</i> (2012)
<b>Bahía São José (Brasil)<sup>a</sup></b>	<i>Callinectes ornatus</i> y <i>C. bocourti</i>	1,2 ± 0,11	32,5 ± 3,5	53,3 ± 3,3	0,05 ± 0,01					Pereira Righi <i>et al.</i> (2021)
<b>Costa de Changhua (Taiwan)</b>	<i>Mictyris brevidactylus</i>	<LDM-2,41	13,2-127	7,55-126	<LDM -5,15		2,08-18,0			Yeh <i>et al.</i> (2008)
<b>Bahía Dapeng (Taiwan)</b>	<i>Thalamita crenata</i>	H	0,36-1,54	17,9-57,9	37,8-89,6		4,8-96,9		40,3-125,9	Chen <i>et al.</i> (2005)
		M	0,34-1,84	13,3-97,8	19,2-66,6		3,00-19,68		29,6-121	

<sup>a</sup> Media ± DE

<sup>b</sup> Músculo

# Capítulo 4. Estudios ecotoxicológicos en *N. granulata*. Ensayos de detoxificación: metales, IAT y GRM.

## 4.1 Introducción

En el capítulo anterior, se ha expuesto que, a nivel global, se han desarrollado estudios que analizan la acumulación de metales pesados y su asociación con ERO (Chelomin *et al.*, 2005; Ale *et al.*, 2019), que generalmente se ven aumentadas debido a la exposición prolongada a elementos y químicos xenobióticos que inducen daño intracelular. No obstante, la manera en que los organismos **detoxifican** o eliminan las sustancias y/o elementos tóxicos han sido abordados de manera escasa en ambientes marinos y costeros. Por lo cual, comprender los procesos celulares y bioquímicos de detoxificación en organismos es fundamental, ya que brinda información de lo que ocurre en algunas especies que son de relevancia económica y consumidas por los seres humanos (Anacleto *et al.*, 2015).

En el capítulo 3, se ha discutido que las MT y MTLP pueden reaccionar como secuestradores de metales esenciales y no esenciales para eliminar su exceso y proteger a los organismos de un consecuente daño celular (Won *et al.*, 2008), actuando también como una primera línea de defensa del estrés oxidativo (Mouneyrac *et al.*, 2001; Gagné *et al.*, 2008; Pytharopoulou *et al.*, 2008; Cenov *et al.*, 2018). En primer lugar, las MT y MTLP fueron identificadas en invertebrados marinos en la glándula digestiva de moluscos y hepatopáncreas de crustáceos como proteínas ricas en cisteína de bajo peso molecular que son esenciales para comprender la ruta de metabolismo que interviene en el secuestro celular y molecular de los metales (Roesijadi, 1980; Engel & Brouwer, 1984; Viarengo, 1989).

Como se ha explicado en el apartado anterior, en los **invertebrados marinos**, las funciones de las MT están vinculadas a la detoxificación de metales que resultan tóxicos y a la protección contra ERO (Pedersen *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2004; Pytharopoulou *et al.*, 2008). En tanto, en **vertebrados** marinos, han sido menos abarcadas ya que la mayoría de estos organismos tienen mayor movilidad, dispersión y migración, y por lo tanto son menos representativos de la contaminación local de áreas específicas (Amiard *et al.*, 2006). En estos organismos, las MT fueron estudiadas en branquias de peces e

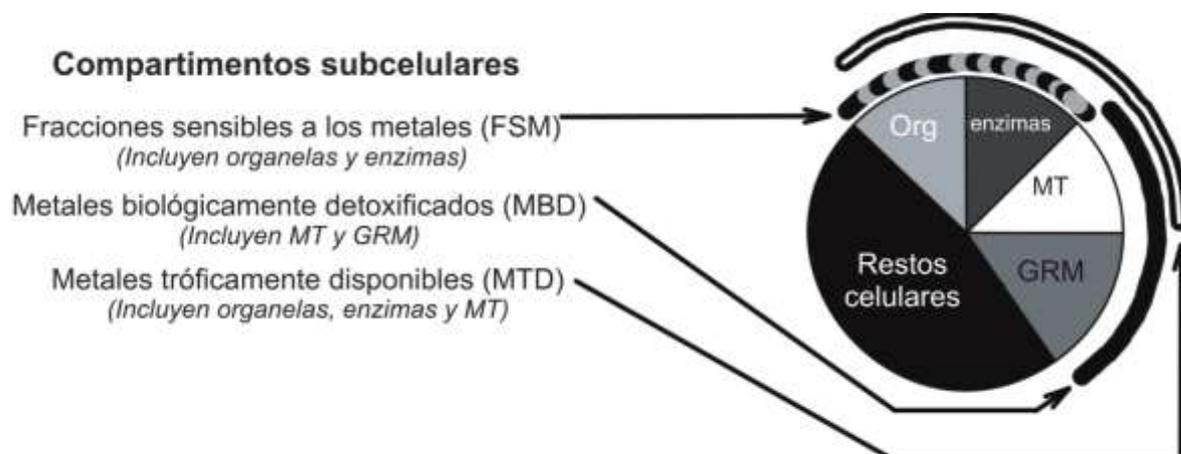
hígado de varios grupos taxonómicos, y de manera reciente también en el cerebro (Wang *et al.*, 2014), donde también se ha establecido que las MT se encuentran envueltas en procesos homeostáticos del Cu y Zn, la protección contra metales tóxicos –como el Cd-, el estrés oxidativo y en mecanismos de neuroprotección (Polizzi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Las MT también conforman una parte de la **partición subcelular** de metales en los invertebrados, que refleja el proceso fisiológico interno que ocurre durante la acumulación de metal y puede proporcionar información valiosa sobre la toxicidad y tolerancia a los metales (Wallace *et al.*, 2003). La partición de los metales en **gránulos ricos en metales** (GRM) y la unión con MT puede reflejar un proceso de desintoxicación del metal, lo cual ha sido vinculado con la tolerancia y resistencia del metal (Roesijadi, 1980). Además, la partición subcelular de los metales en los organismos se puede utilizar para comprender la transferencia trófica de metales a predadores en niveles superiores de la trama trófica, y así predecir su **biodisponibilidad** en los organismos y su eventual **biomagnificación** (Wallace *et al.*, 2003). Esto sucede ya que los metales en fracciones solubles de la presa (en el citosol, enzimas y MT) han demostrado ser más biodisponibles para los predadores (llamados **metales tróficamente disponibles, MTD**) que los metales unidos a fracciones no solubles (debris celular, paredes celulares, exoesqueleto y concreciones metálicas –GRM-) (Wallace & Luoma, 2003; Wallace *et al.*, 2003).

En la Figura 56 se expone un diagrama de partición subcelular de los metales basado en los aportes de Wallace *et al.* (2003). De acuerdo a estos autores, la toxicidad de los metales se discute en términos de partición a componentes sensibles de la célula (como organelas y enzimas). La unión del metal a todos estos componentes celulares podría proporcionar una comprensión integral de los posibles mecanismos de toxicidad. En tal sentido, el metal asociado a organelas y enzimas podría ser comprendido como un compartimento que contiene **fracciones sensibles a los metales (MSF)**. Mientras que la eliminación de los metales puede tener lugar a través de las proteínas de unión a metales como las **MT**, o a través de la precipitación del metal en concreciones insolubles, como los **GRM**.

Tanto las MT como los GRM se encuentran vinculados a una mayor tolerancia a los metales e incluso a una resistencia genética. Aunque se traten de dos vías de secuestro de metales independientes, los elementos secuestrados en MT y GRM se consideran en conjunto como un compartimento subcelular que confiere tolerancia y resistencia al

metal, este compartimento podría referirse a los **metales biológicamente detoxificados (MBD)** (Wallace *et al.*, 2003).



**Figura 56:** Gráfico circular ecotoxicológico generalizado que representa los compartimentos subcelulares en función del significado biológico de las diversas fracciones subcelulares. Las fracciones subcelulares que son potencialmente vulnerables a la exposición a metales (organelas y enzimas) constituyen fracciones sensibles a los metales (FSM: arco punteado). Las fracciones que están involucradas con la detoxificación de metales (es decir, MT y GRM) constituyen un metal biológicamente detoxificado (MBD: arco sólido). Las fracciones que contienen metal fácilmente disponible para los depredadores (organelas, enzimas y MT) constituyen un metal tróficamente disponible (MTD: doble arco). Fuente: modificado de Wallace *et al.* (2003) para macroinvertebrados marinos.

El patrón de acumulación, los biomarcadores, y los mecanismos de secuestro y detoxificación de metales ha sido estudiado de manera escasa en ambientes del Atlántico Sudoccidental (Buzzi & Marcovecchio, 2016; Dolagaratz Carricavur *et al.*, 2018). Aunque comprender este proceso y cómo los organismos se enfrentan a condiciones de una mejor salud ecosistémica y menor concentración de contaminantes, puede generar información esencial para la toma de decisiones en el monitoreo costero y la propuesta de programas de remediación.

En los crustáceos, la excreción de los metales hacia el medio puede ocurrir a través de la glándula antenal (por la orina), branquias, tracto digestivo y durante la muda (Baden & Eriksson, 2006; Bergey & Weis, 2007; Ramos *et al.*, 2021). El hepatopáncreas de los crustáceos decápodos es un órgano dinámico que está relacionado a funciones digestiva y de detoxificación, pero también influye en procesos vitales como el desarrollo gonadal y es responsable de la producción de la vitelogenina, precursora de los huevos (Vogt, 2002). También es conocido por ser un órgano diana o blanco de la detoxificación porque diferentes sistemas, tales como el Cit P450, lisosomas y MT han sido detectados en este órgano (Pedersen *et al.*, 1997; Ahearn *et al.*, 2004). De esta manera, resulta fundamental estudiar los mecanismos de toxicidad y detoxificación de este órgano ya que se ha

demostrado que los metales pueden causar daños desde niveles bioquímicos hasta histopatológicos, modificando sus funciones principales (Wang *et al.*, 2008).

Por lo tanto, los objetivos del presente **capítulo** son: I) Determinar y cuantificar la concentración de los metales (Cd, Cu, Pb, Zn, Mn, Ni, Cr, Fe) en el hepatopáncreas de *N. granulata* antes y luego de ensayos de depuración experimentales; II) Evaluar la recuperación de los distintos *IAT* seleccionados luego de ser sometidos a una fase de depuración/detoxificación, y III) Analizar la presencia de GRM como estrategia de reserva y/o de detoxificación de metales en los cangrejos. En este capítulo se expondrán y discutirán los resultados de los estudios toxicológicos de ensayos de detoxificación en individuos de *N. granulata* de los 3 sitios de muestreo, analizando la acumulación de metales y la inducción o reversibilidad de *IAT* en el hepatopáncreas. Además, se exhibirán la posible recuperación de los niveles de metales en el órgano blanco y en los *IAT* seleccionados. Por último, se expondrán los resultados de los GRM como una posible estrategia de reserva y/o detoxificación de metales en esta especie.

## 4.2 Materiales y Métodos

La metodología que se siguió para este capítulo se encuentra descripta en el **Capítulo 2** en el **punto 2.1**, donde se detalla la recolección de cangrejos en campo y el protocolo de disección de los mismos, y en la **Tabla 2** se presentan los meses de recolección de organismos para el ensayo de detoxificación. La determinación de metales se describe en la **sección 3.1** y de los *IAT* en el **punto 3.4**. En tanto el ensayo de detoxificación es descripto en el **punto 2.2** del mismo capítulo.

También se aplicaron los índices morfológicos (FC, IHS) detallados en el punto **3.2.3** del **Capítulo 3** para evaluar posibles diferencias antes y luego del ensayo. Para evaluar los GRM en los ensayos de detoxificación, parte de los pellets obtenidos del primer paso de la extracción de MT (10000 g a 4°C por 15 min) fueron reservados en ultrafreezer (-80°C). Luego se realizó una digestión suave de acuerdo al protocolo de metales (**sección 3.5, Capítulo 2**) (Chiodi Boudet *et al.*, 2013, 2019) y las muestras fueron leídas en ICP-OES en el Centro Nacional Patagónico (CENPAT, CONICET)

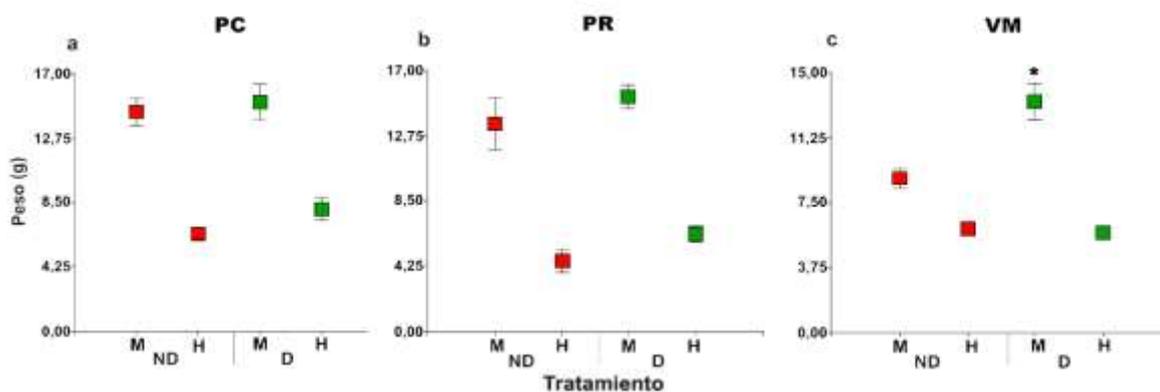
Los datos fueron evaluados estadísticamente de acuerdo al apartado **IV: Análisis de datos** del **Capítulo 2**. Se realizaron pruebas estadísticas en base a la **Figura 12** de la misma sección en donde se evaluó las posibles diferencias estadísticas antes y luego del ensayo en la concentración de metales y en los *IAT* empleados en el hepatopáncreas de los dos sexos de *N. granulata*. También se determinó el IBR de acuerdo al **punto 3.4.3**

del mismo capítulo. Se evaluaron correlaciones (coeficiente de correlación de Pearson) entre los metales de los cangrejos, los índices morfológicos y los *IAT* luego del ensayo de depuración para cada sitio, y un ACP biplot que comprendió los metales en cangrejos, morfología y biomarcadores para todos los sitios después del ensayo.

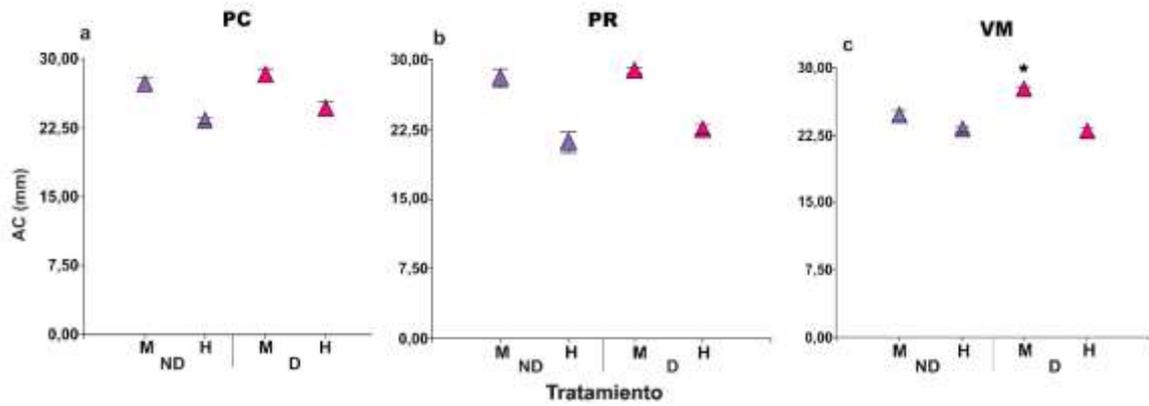
## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Medidas biométricas e índices morfológicos

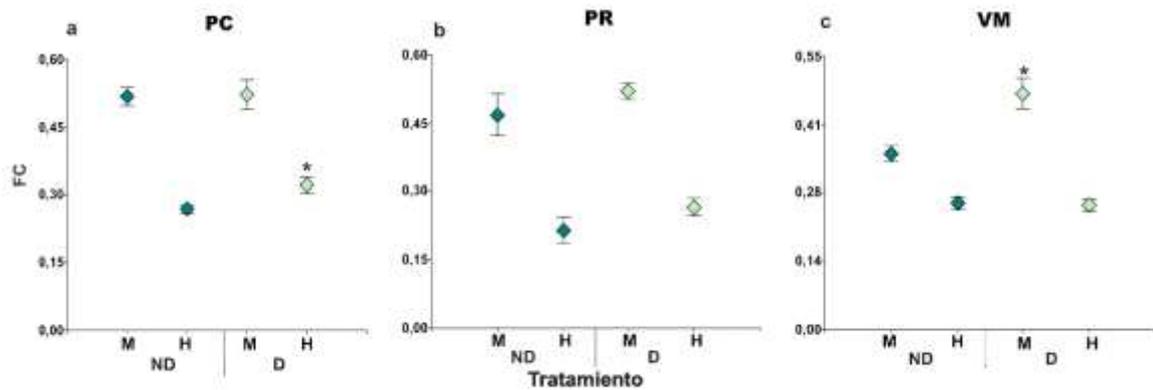
En la Figuras 57 a 60 se muestran las comparaciones de a pares de las medidas biométricas e índices morfológicos de hembras y machos luego del ensayo de depuración para cada sitio de muestreo. En el caso del peso y el AC, es notorio un incremento en los machos de VM (Figuras 57c, 58c), en tanto en el resto de los sitios, los organismos no presentaron diferencias luego del ensayo. El FC también presentó el mismo resultado para los machos de VM, pero las hembras de PC también presentaron un FC significativamente mayor luego del ensayo (Figura 59a, c). En tanto, el IHS, fue estadísticamente más elevado luego del ensayo en ambos sexos en PC y en hembras de VM (Figura 60a, c)



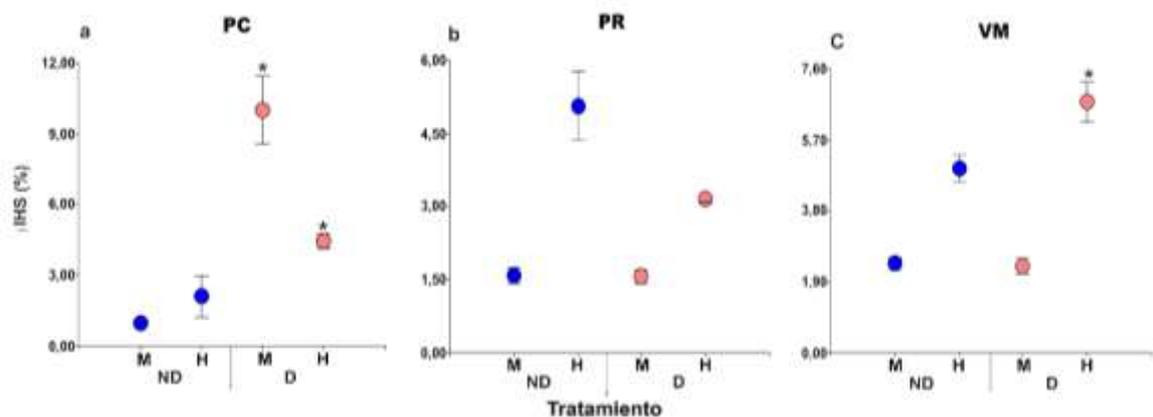
**Figura 57:** Peso (g) de machos y hembras antes (ND) y luego del ensayo de depuración (D) en **a)** PC, **b)** PR, **c)** VM. \* indica diferencias significativas con ND (Prueba t, comparación de a pares,  $p < 0,05$ )



**Figura 58:** Ancho de caparazón (AC, mm) en machos y hembras antes (ND) y luego del ensayo de depuración (D depuración en a) PC, b) PR, c) VM. \* indica diferencias significativas con ND (Prueba t, comparación de a pares,  $p < 0,05$ )



**Figura 59:** Factor de condición (FC) en machos y hembras antes (ND) y luego del ensayo de depuración (D depuración en a) PC, b) PR, c) VM. \* indica diferencias significativas con ND (Prueba t, comparación de a pares,  $p < 0,05$ )



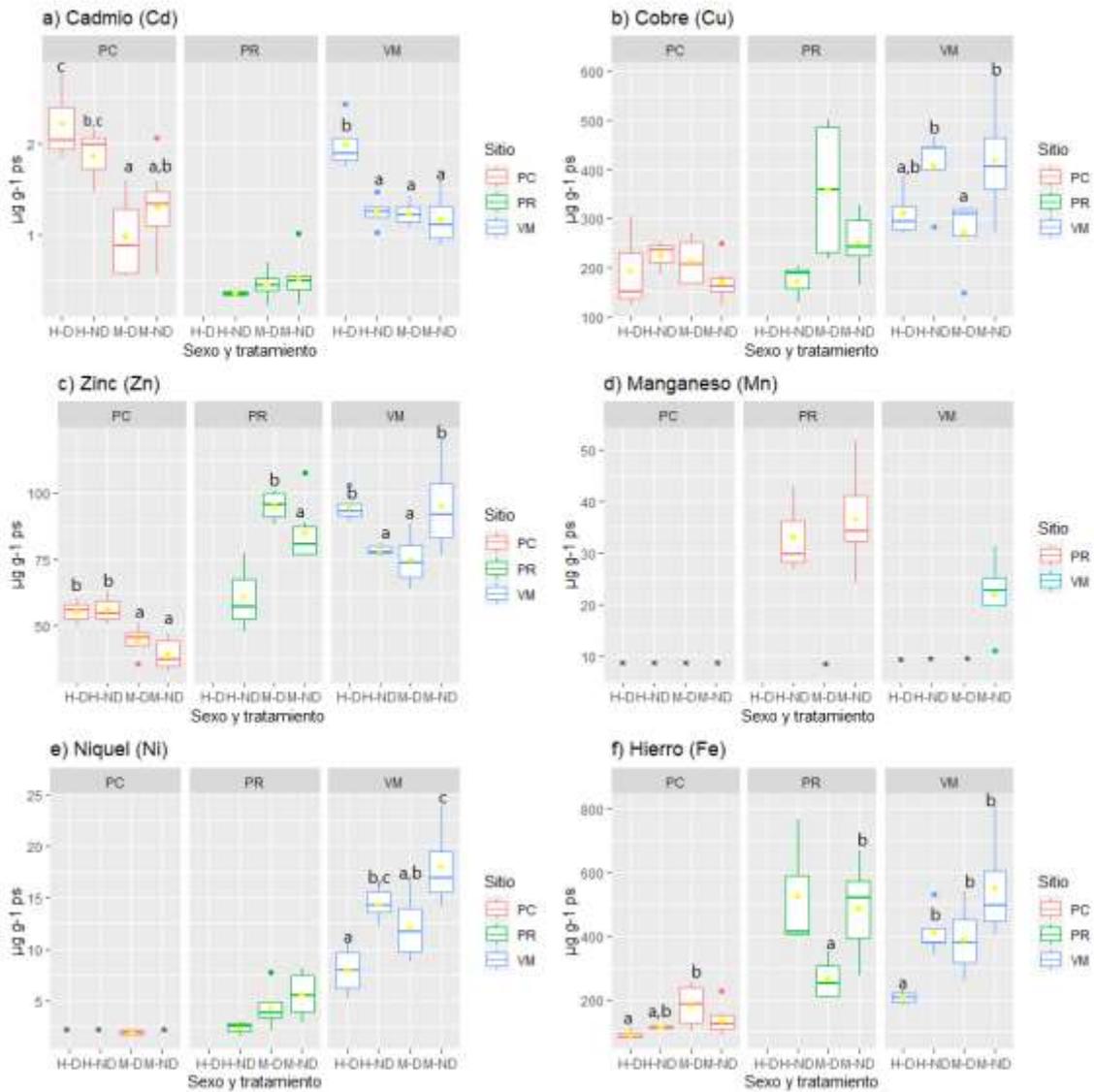
**Figura 60:** Índice hepatosomático (IHS, %) en machos y hembras antes (ND) y luego del ensayo de depuración (D depuración en a) PC, b) PR, c) VM. \* indica diferencias significativas con ND (Prueba t, comparación de a pares,  $p < 0,05$ )

### 4.3.2 Distribución, concentración y/o remoción de metales luego del ensayo de depuración

La distribución de metales en hepatopáncreas antes del ensayo se presentó en PC de la siguiente manera:  $Cu > Fe > Zn > Cd > Ni$  (Cr, Pb y Mn  $<LDM$ ), en PR  $Cu \geq Fe > Zn > Mn > Ni > Cd$  (Cr, Pb, Mn en machos  $<LDM$ ) y en VM  $Cu \geq Fe > Zn > Ni > Cd$  (Cr, Pb y Mn  $<LDM$ , a excepción de machos con  $Mn > LDM$ ). Luego del ensayo de depuración, se registró la misma distribución de metales en el hepatopáncreas de los cangrejos de PC, excepto que se registró  $Mn > LDM$  en los machos. En PR el Mn se registra  $<LDM$  y la distribución del resto de los metales se mantiene. Finalmente, en VM luego de la depuración se registra el Mn sólo en hembras con el siguiente orden  $Cu \geq Fe > Zn > Ni > Mn > Cd$  (Cr y Pb  $<LDM$ ), mientras que en machos se encuentra  $<LDM$ .

La comparación de a pares entre ND y D para hembras y machos en PC no indicó diferencias significativas en la mayoría de los metales analizados luego de la experiencia de depuración. El Cd fue mayor en las hembras, con diferencias significativas con los machos luego de la depuración. El Zn fue estadísticamente mayor en las hembras respecto a los machos, pero sin diferencias entre los tratamientos, y en el caso del Fe, los machos y hembras depurados presentaron diferencias entre ambos (Figura 61a, c, f). En los machos de PR, el Mn y el Fe disminuyeron luego del ensayo en el caso de los machos (Figura 61d, f). Mientras que en las hembras de VM, el Cd y Zn aumentaron luego de la experiencia (Figura 61a, c), en tanto el Cu, Ni y el Fe disminuyeron significativamente (Figura 61b, c, e). Los machos no presentaron diferencias, a excepción del Cu y Mn, que disminuyeron luego del ensayo (Figura 61b, d).

En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de remoción y/o aumento de metales luego del ensayo de depuración. En general, el Cd tendió a aumentar luego del ensayo, a excepción de los machos de PC y PR con bajos porcentajes de remoción. El Cu fue removido en la mayoría de los casos con mayores porcentajes en los machos de PR. El Zn aumentó, a excepción de los machos de VM, y, en el caso de presentarse, el Mn fue removido hasta por debajo de los LDM. Finalmente, el Ni y el Fe fueron excretados con porcentajes generalmente elevados.



**Figura 61:** Metales ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ ) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM. \* indica valores <LDM y letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

**Tabla 8:** Porcentajes (%) de remoción (-) o aumento (+) de metales en hembras y machos de *N. granulata* según el sitio luego del ensayo de depuración

Sitio	Sexo	Cd	Cu	Zn	Mn	Ni	Fe
PC	H	+18,82	-14,09	-1,75	<LDM	<LDM	-18,48
	M	-24,62	+24,9	+13	<LDM	<LDM	-32,83
PR	H <sup>9</sup>						
	M	-13,46	-42,7	+11,54	<LDM	-21,65	-45,21
VM	H	+59,2	-23,6	+20,72	+	-44,67	-49,2
	M	+5,13	-34,99	-21,26	<LDM	-32,48	-29,59

### 4.3.3. Metalotioneínas (MT)

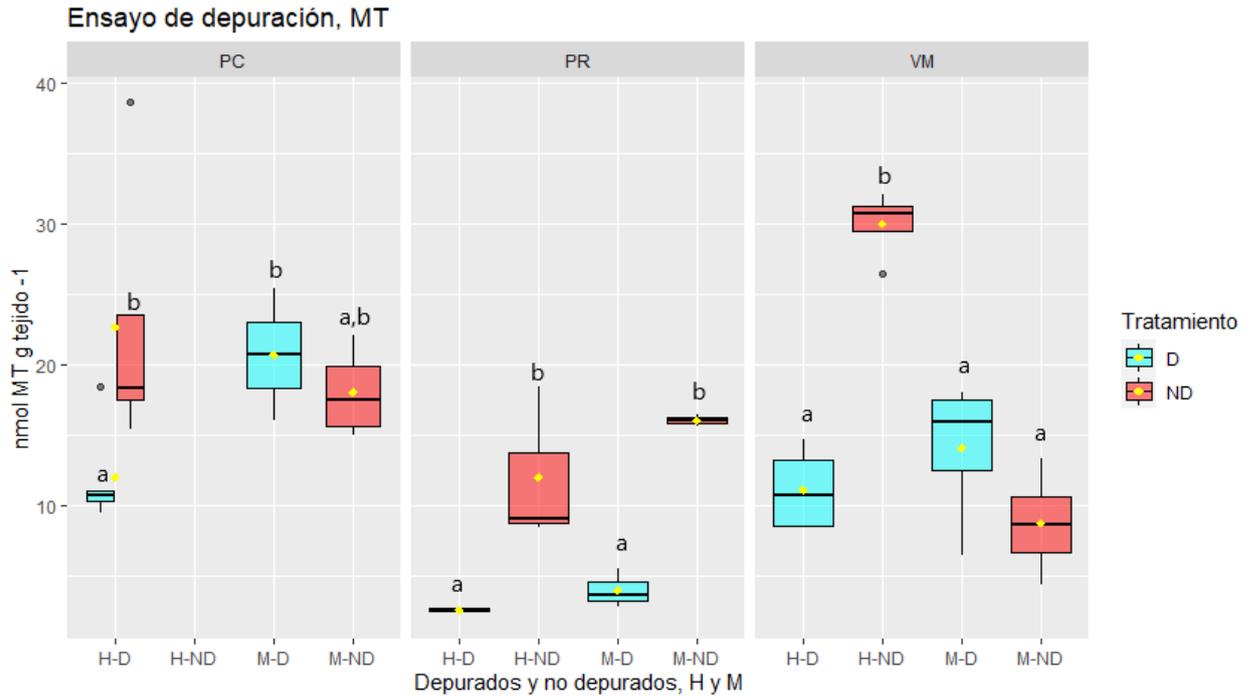
Luego del ensayo de depuración, se observó una disminución significativa de las MT en las hembras de PC mientras que en los machos D de este sitio no se observaron diferencias con los ND (Figura 62). En el caso de PR, luego de la depuración, las MT también disminuyeron significativamente en los dos sexos (Figura 62). Mientras que en VM, sólo disminuyeron en las hembras, que, a su vez, presentaron la mayor concentración de MT respecto de los machos antes del ensayo (Figura 62). En PC, se observó una reversibilidad del 47% de las MT en las hembras y un bajo aumento del 14,68% en los machos. En PR, se registró una reversibilidad del 78,27% y del 75%, para hembras y machos, respectivamente. En tanto, en VM, también se observó un gran porcentaje de reversibilidad en las hembras con 62,89% pero se registró un aumento de la actividad en los machos con 60,89%.

### 4.3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo

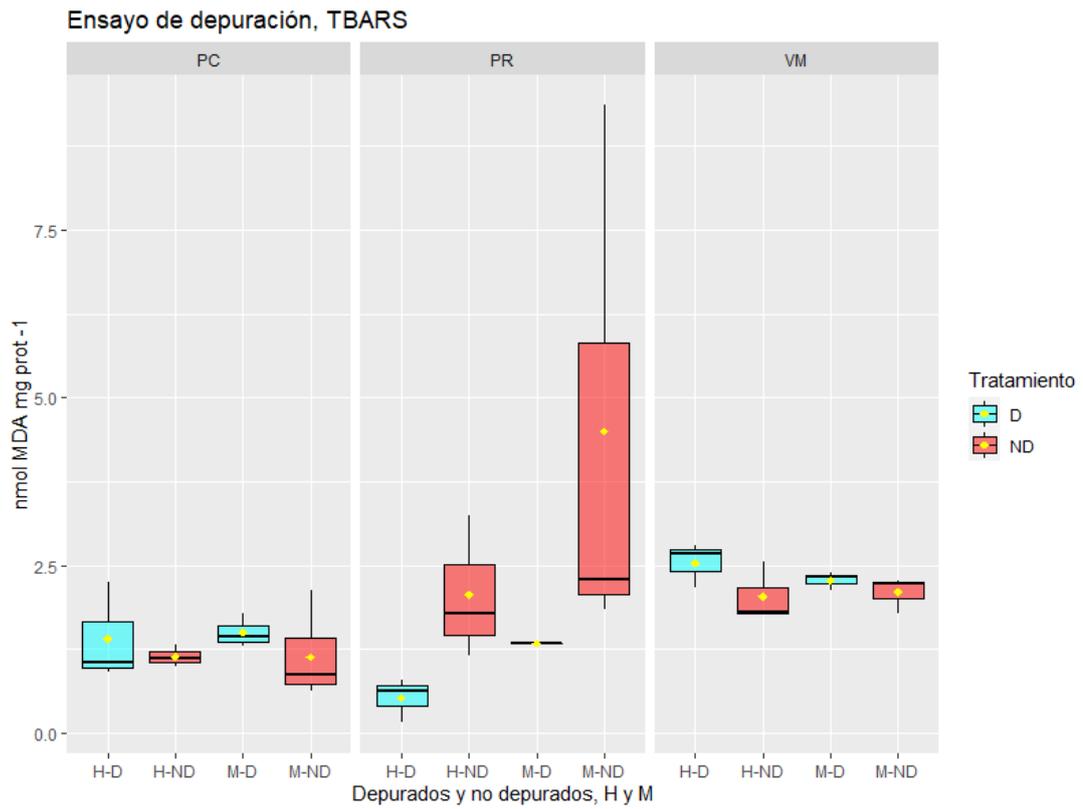
En cuanto a los biomarcadores de estrés oxidativo, para **TBARS** no se observaron diferencias estadísticas en ninguno de los sitios y sexos luego del ensayo de depuración. Sólo en PR se observaron tendencias a la disminución de TBARS luego del ensayo, pero no fueron estadísticamente significativas (Figura 63). En el caso de PC, la actividad **CAT** fue mayor en los dos sexos luego del ensayo de depuración, mientras que, en PR, sólo fue superior en las hembras luego del ensayo, y en VM, fue superior en los machos depurados (Figura 64). En cuanto a la **GST**, en los tres sitios se registraron valores significativamente superiores en hembras luego del ensayo (Figura 65). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<sup>9</sup> Datos de las hembras faltantes ya que se realizó el ensayo, pero las muestras no fueron analizadas por un error en las determinaciones analíticas del CENPAT.

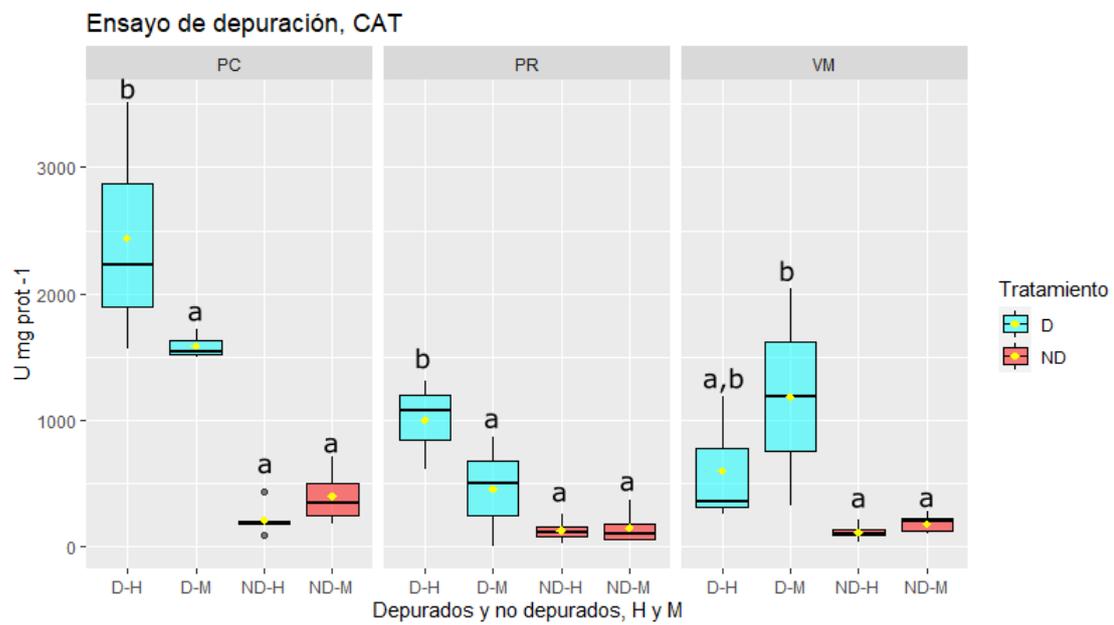
disminuyó en las hembras de PC luego del ensayo y en el resto de los sitios no presentó diferencias significativas luego del tratamiento (Figura 66). Finalmente, la **GR** disminuyó en las hembras después del ensayo de PC, mientras que en los otros sitios no se observaron diferencias (Figura 67).



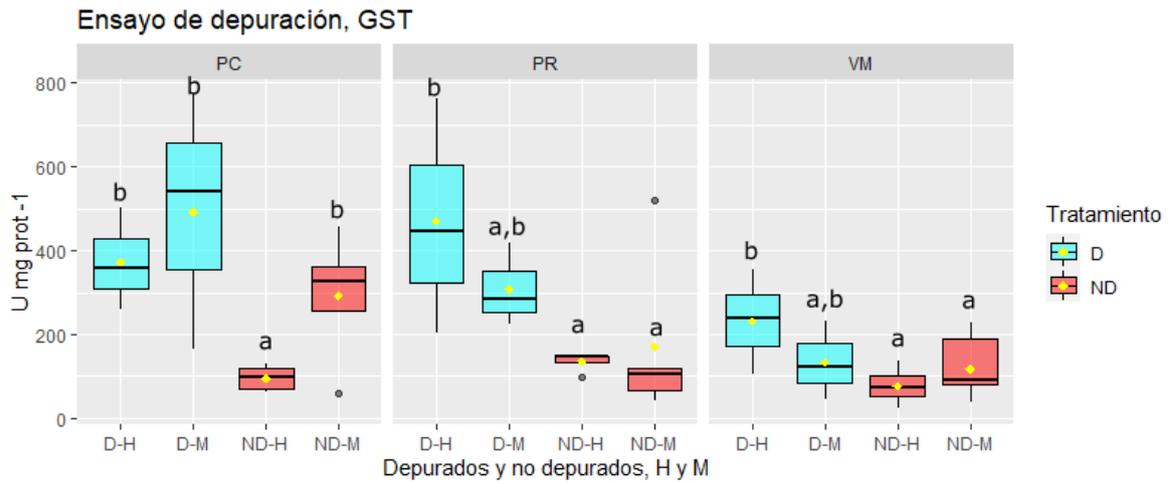
**Figura 62:** Metalotioneínas ( $\text{nmol MT g tejido}^{-1}$ ) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )



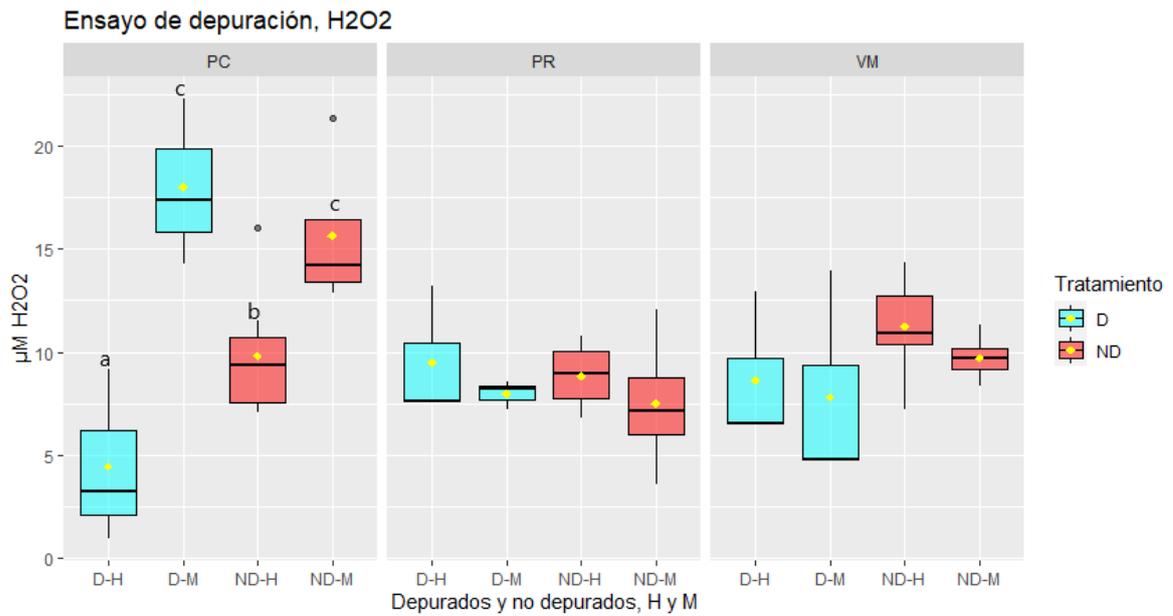
**Figura 63:** Peroxidación lipídica ( $\text{nmol MDA mg proteínas}^{-1}$ ) (TBARS) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM.



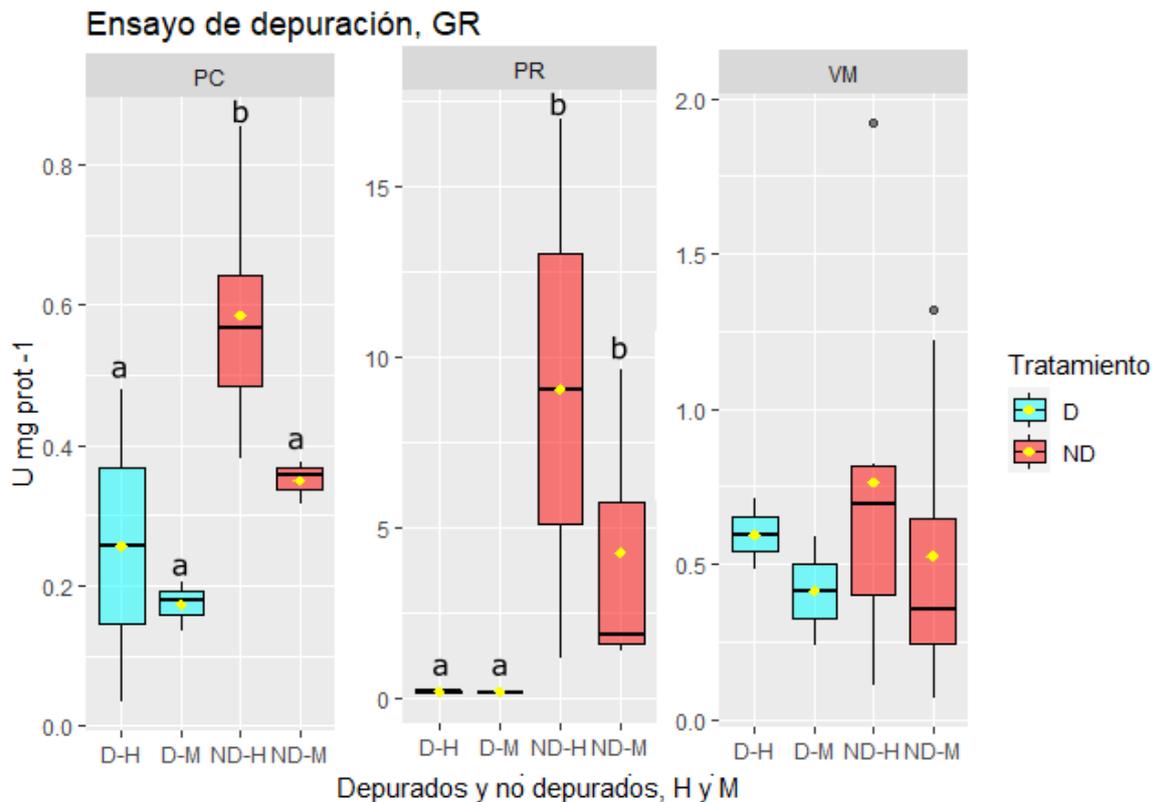
**Figura 64:** Actividad CAT ( $\text{U mg proteínas}^{-1}$ ) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )



**Figura 65:** Actividad GST ( $U\text{ mg proteínas}^{-1}$ ) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )



**Figura 66:** Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )



**Figura 67:** Actividad GR ( $U\ mg\ proteínas^{-1}$ ) antes (no depurado, ND) y luego (depurado, D) del ensayo de depuración en machos y hembras de *N. granulata* para PC, PR y VM. Letras similares no indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

### 4.3.5 IBR

La respuesta integrada de los biomarcadores, indicó que, en **PC**, predominó la actividad CAT y las MT en ND; y la GST y CAT en D (Figura 68a, b). En el caso de **PR**, fue dominante TBARS y GR en ND, y en GST la GST (Figura 68c, d); y en **VM**, en los ND predominaron las MT y en los D, MT y TBARS (Figura 68e, f). En general, el índice IBR para los organismos D fue mayor en PC seguido de VM (Figura 69).

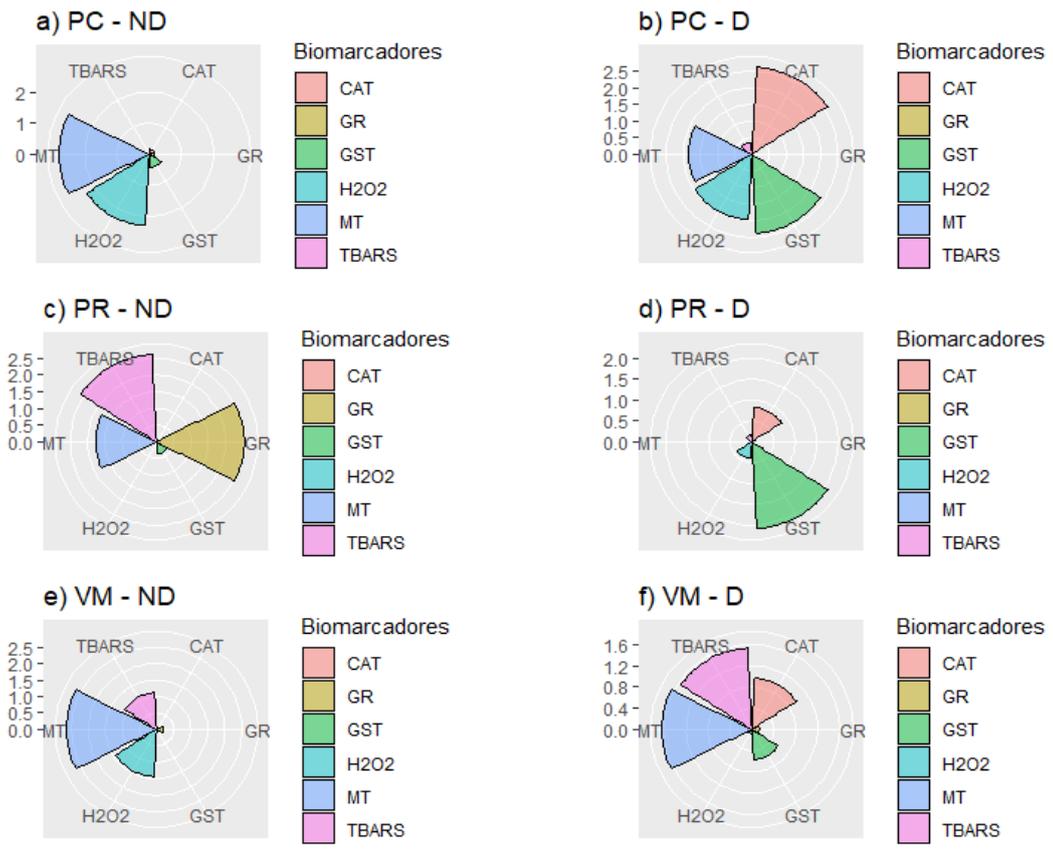


Figura 68: Respuesta integrada de biomarcadores (IBR) según sitio y tratamiento.

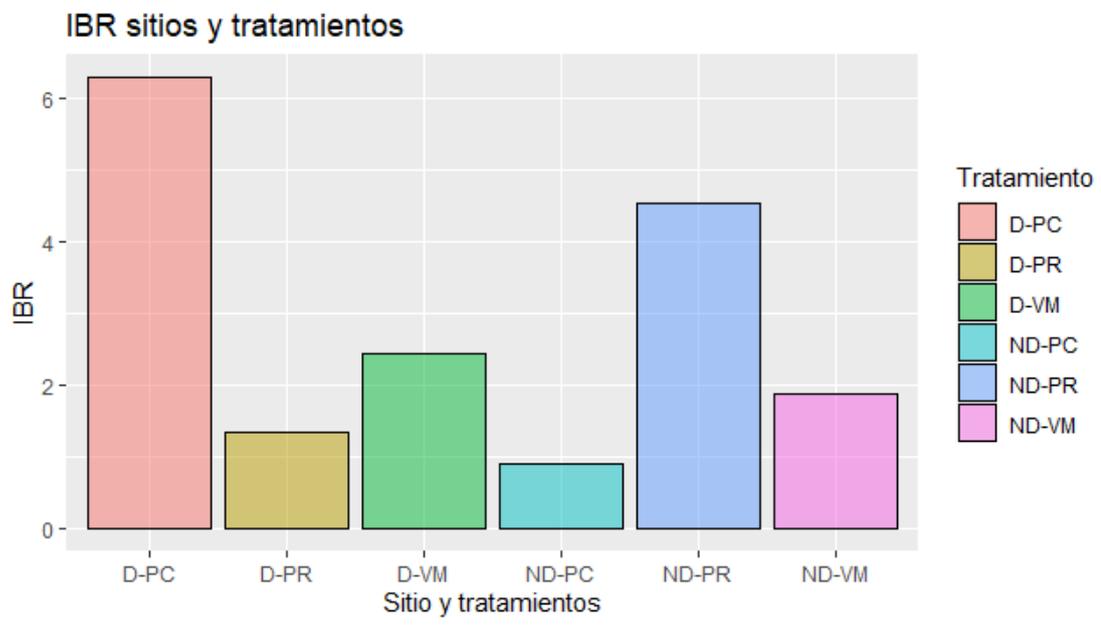


Figura 69: índice IBR según sitios y tratamiento.

### 4.3.6 Gránulos ricos en metales (GRM)

En la Tabla 9 se encuentran resumidos los valores de GRM antes y luego del ensayo de depuración en ejemplares de cangrejos analizados. En términos generales, se observó una disminución del Mn y del Fe en ambos sexos de VM, mientras que sólo en las hembras D en PC. En PR, el Mn aumentó de manera significativa en machos, pero el Fe disminuyó. El resto de los metales no presentó diferencias significativas con los ND de todos los sitios, y el Cd se encontró siempre <LDM.

**Tabla 9:** Media  $\pm$  D.E. de la concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ph) de gránulos ricos en metales para hembras y machos de N. granulata según el sitio antes (ND) y luego (D) del proceso de depuración. \* indica diferencias estadísticamente significativas con ND ( $p < 0,05$ ; comparación de a pares, Mann Whitney)

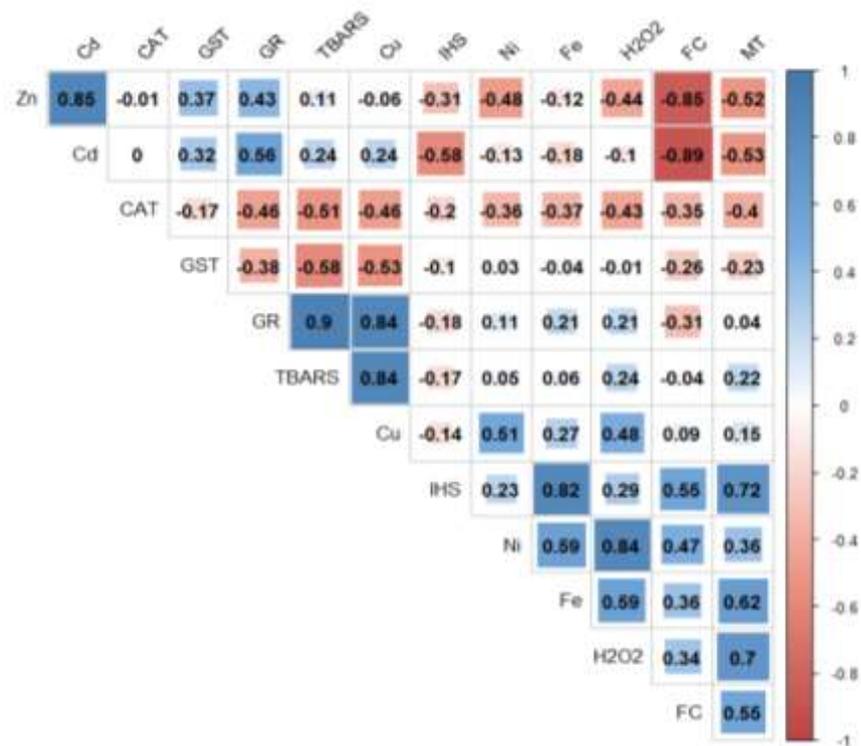
SITIO	Sexo	Tratamiento	Cd	Cu	Zn	Mn	Ni	Fe
PC	H	ND	<LDM	3 $\pm$ 0,49	4,31 $\pm$ 1,1 2	1,93 $\pm$ 0,33	0,22 $\pm$ 0,02	22,55 $\pm$ 3,89
		D	<LDM	1,22 $\pm$ 0,35	3,7 $\pm$ 1,59	<b>0,67<math>\pm</math>0,31*</b>	0,26 $\pm$ 0,14	<b>10,16<math>\pm</math>1,08*</b>
	M	ND	<LDM	1,3 $\pm$ 0,72	2,72 $\pm$ 0,6 3	1,55 $\pm$ 0,68	0,19 $\pm$ 0,04	16,58 $\pm$ 5,26
		D	<LDM	3,91 $\pm$ 5,34	4,02 $\pm$ 1,6	1,32 $\pm$ 0,95	0,9 $\pm$ 1,22	14,47 $\pm$ 5,12
PR	H	ND	<LDM	3,32 $\pm$ 2,49	3,22 $\pm$ 0,0 1	2,15 $\pm$ 1,95	0,17 $\pm$ 0,01	21,04 $\pm$ 8,35
		D <sup>10</sup>						
	M	ND	<LDM	4,33 $\pm$ 2,33	4,45 $\pm$ 1,8 7	1,75 $\pm$ 0,51	0,17 $\pm$ 0,4	24,46 $\pm$ 3,97
		D	<LDM	1,45 $\pm$ 0,58	2,74 $\pm$ 0,2	<b>3,42<math>\pm</math>0,33*</b>	0,13 $\pm$ 0,01	<b>17,27<math>\pm</math>1,17*</b>
VM	H	ND	<LDM	5,56 $\pm$ 2,26	5,28 $\pm$ 1,7 9	4,38 $\pm$ 3,19	0,11 $\pm$ 0,04	22,58 $\pm$ 6,39
		D	<LDM	6,5 $\pm$ 5,06	3,64 $\pm$ 2,5	<b>0,67<math>\pm</math>0,28*</b>	0,11 $\pm$ 0,06	<b>15,06<math>\pm</math>8,33*</b>
	M	ND	<LDM	12,21 $\pm$ 4,65	5,6 $\pm$ 0,92	7,05 $\pm$ 2,19	0,14 $\pm$ 0,07	38,83 $\pm$ 11,9 3
		D	<LDM	5,7 $\pm$ 1,16	5,19 $\pm$ 2,1 8	<b>1,32<math>\pm</math>0,19*</b>	0,1 $\pm$ 0,04	<b>10,15<math>\pm</math>6,64*</b>

### 4.3.7 Análisis multivariados entre metales, biomarcadores y morfología de los cangrejos luego de la depuración

Los *Corrplot* de Pearson para la concentración de metales, la actividad de los biomarcadores y la morfología en cangrejos depurados se encuentran representados en las Figuras 70-72. En base a los metales, en PC, se observaron correlaciones positivas entre el Cd y el Zn. El Cu se correlacionó con GR y TBARS, el Fe se correlacionó con el IHS y MT; y las MT mostraron correlaciones positivas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IHS, y FC. (Figura

<sup>10</sup> Datos faltantes del análisis del CENPAT

70). En PR las MT se correlacionaron de manera positiva con el Cd, Cu y en menor medida con el Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con índices morfológicos como el FC. Se observaron correlaciones positivas entre el Cd, GR, FC, Fe, Cu y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y negativas con la CAT; Mn, CAT y GST; Ni y GST, y CAT GST. GR se correlacionó de manera positiva con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y negativamente con Mn y CAT. En tanto, el Zn presentó un mejor ajuste con el IHS, Mn, GST y CAT (Figura 71). En VM, se observaron correlaciones positivas para Cd-Zn, Zn-Cu, Ni-Mn, Fe-Mn, Ni-Fe y negativas para el Fe-Zn. El FC se correlacionó de manera negativa con el Cd y Zn, y de manera positiva con el Fe. El Cd y Zn se correlacionaron de manera positiva con el IHS y de manera negativa con el Fe, Mn y Ni. GR se correlacionó de manera positiva con el IHS y de manera negativa con el Fe, Mn y Ni. GR se correlacionó de manera negativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la CAT de manera negativa con TBARS y Fe (Figura 72).



**Figura 70:** Corrplot similitud de Pearson para los metales, índices morfológicos y biomarcadores luego de la depuración en PC

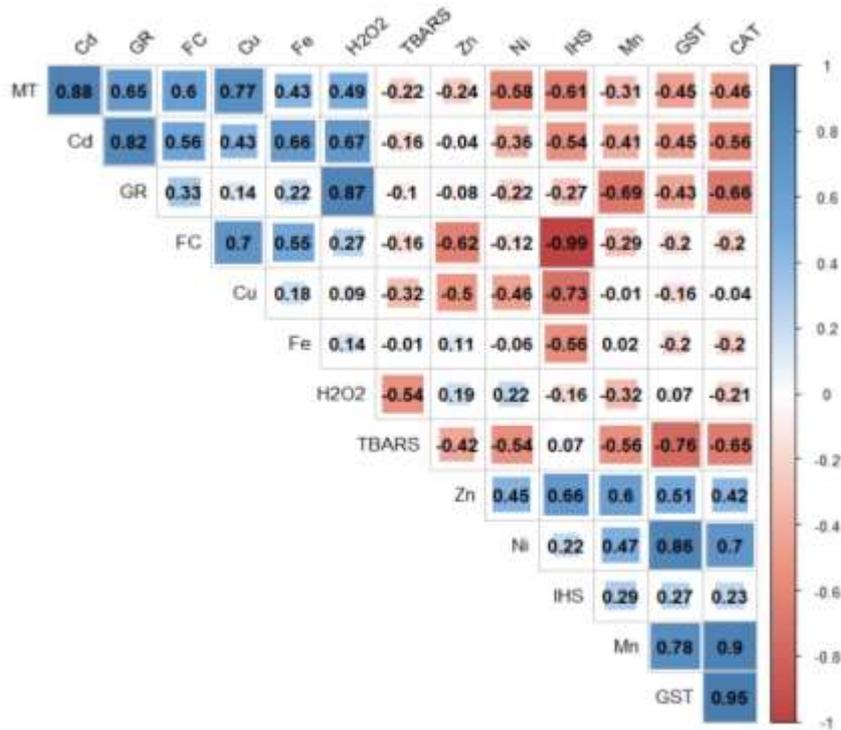


Figura 71: Corrplot similitud de Pearson para los metales, índices morfológicos y biomarcadores luego de la depuración en PR

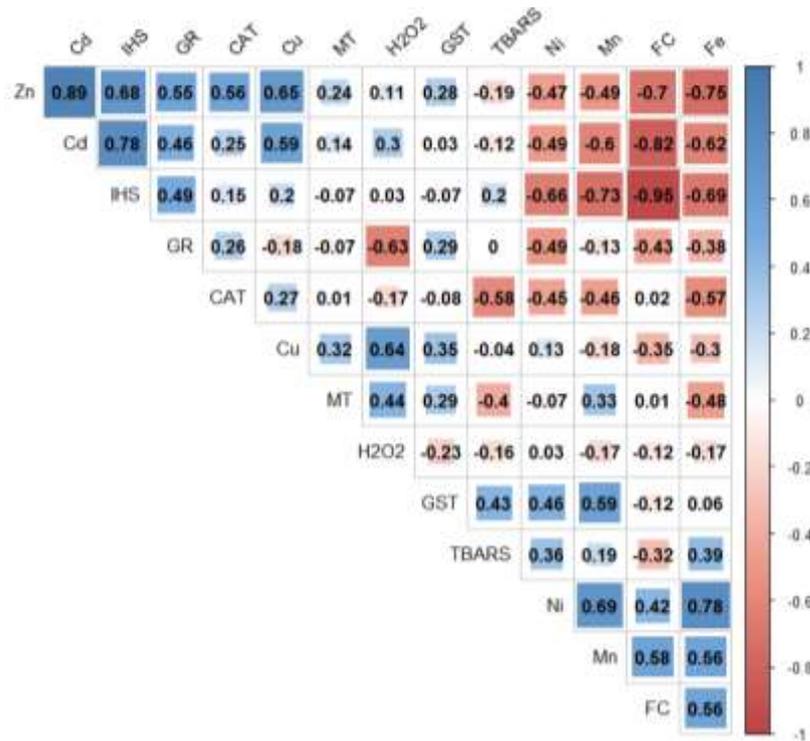
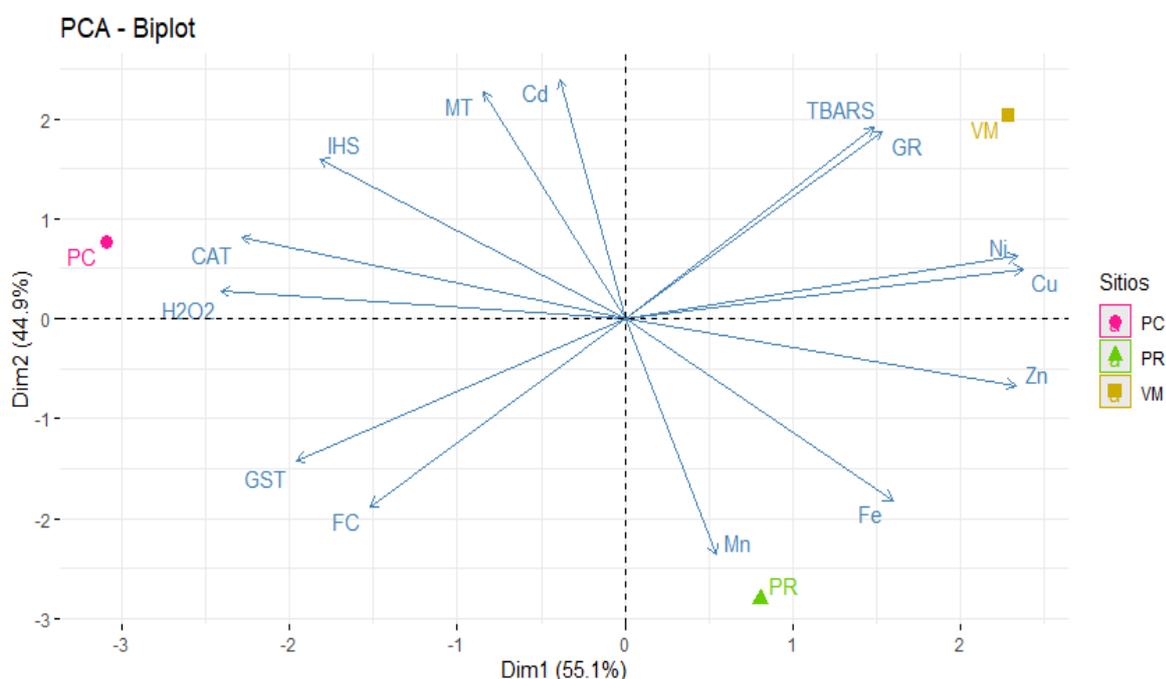


Figura 72: Corrplot similitud de Pearson para los metales, índices morfológicos y biomarcadores luego de la depuración en VM

Finalmente, en la Figura 73 se graficó el **ACP biplot** para los metales, medidas morfológicas y biomarcadores de los cangrejos luego del ensayo de depuración. La dimensión 1 explicó un 55,1% de las variables, mientras la 2 un 44,9% sumando el 100% de las variables entre los dos componentes con una correlación cofenética de 1 y correlaciones mayores entre metales y biomarcadores en la Dim 1. En esta dimensión, cinco variables vinculadas a las medidas biométricas y biomarcadores (FC, IHS, CAT, GST, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se antepusieron al Cu, Zn, Ni, Fe, GR y TBARS. Mientras que en la Dim 2, el Cd, IHS, GR, MT y TBARS se anteponen al Mn, Fe, FC y GST. A través del biplot, se observó que la depuración de PC se explicó por variables como CAT y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; VM por GR, TBARS, Ni y Cu; y PR por Mn y Fe.



**Figura 73:** Análisis de Componentes Principales (ACP) biplot para los metales en cangrejos, biomarcadores y medidas morfológicas luego del ensayo de depuración para cada sitio.

#### 4.4 Discusión

El hepatopáncreas de los crustáceos decápodos resulta fundamental para el desarrollo de estudios ecotoxicológicos. Este órgano está involucrado en actividades vitales como la detoxificación y excreción, y por lo tanto su estructura y funcionamiento pueden verse afectadas cuando estos organismos se encuentran expuestos a ciertos contaminantes como los metales (Wu *et al.*, 2008). También es responsable de la producción de la vitelogenina, ya que los lípidos son almacenados en el hepatopáncreas y luego transportados a los oocitos. Por lo tanto, es posible que un efecto a diferentes niveles de éste órgano

(morfológico, enzimático, metabólico, histológico) debido a diferentes elementos y xenobióticos puedan tener un efecto en la reproducción y en la siguiente generación de cangrejos (Negro & Collins, 2017).

Cuando se alcanza cierto umbral, los metales resultan tóxicos para los organismos y los metales que son incorporados por el organismo, deben ser eliminados para evitar la producción de un potencial efecto tóxico. La toxicidad de un metal para el organismo acumulador no se encuentra directamente relacionada a la concentración acumulada total, ya que las formas acumuladas de los metales son frecuentemente guardadas en formas detoxificadas y no están disponibles para interactuar en sitios donde podrían ejercer un efecto tóxico (Rainbow & Luoma, 2011).

Las MT han sido utilizadas como IAT de los efectos biológicos por metales, que representan una fuente importante de contaminación en sistemas costeros (Viarengo *et al.*, 1997). Los debates que se han generado en torno a su especificidad y función como ligandos a metales para su detoxificación y su condición como metales biológicamente detoxificados para la célula, junto a los GRM (Wallace *et al.*, 2003; Rainbow & Smith, 2010), han resultado interesantes hasta la fecha.

Dada la idea de que la toxicidad depende de la tasa de absorción del metal y las tasas comparativas de excreción y desintoxicación, se deduce que en esta tesis es necesario adoptar una aproximación a un enfoque cinético para reconstruir la relación entre bioacumulación, toxicidad y depuración. De esta manera, los estudios de depuración de metales son fundamentales ya que permiten conocer qué formas se encuentran biodisponibles para ser incorporadas en las redes tróficas, y qué formas serán detoxificadas porque no resultan necesarias para el metabolismo.

#### **4.4.1 Medias biométricas e índices morfológicos**

En cuanto a los análisis de los **índices morfológicos**, los resultados indicaron que, en general, la depuración permitió una mejora en las condiciones morfológicas como el peso, AC, FC e IHS en el caso de VM. No obstante, en los otros sitios no se observaron diferencias que señalen que estas medidas sean generalmente condicionadas por la depuración. A su vez, los patrones entre las correlaciones de las medidas morfológicas y los metales luego de la depuración resultaron variables según los sitios, a excepción del **IHS** que siempre se encontró correlacionado de manera positiva con el Zn, un metal que por lo general tendió a aumentar. Esto puede vincularse a que en el hepatopáncreas se encuentran grandes concentraciones de Zn que son utilizadas para la síntesis de MT, en

especial en PC donde incluso se observó una correlación del IHS con las MT. De esta manera, el estudio de las correlaciones permitió obtener una explicación simple acerca de la relación estrecha que existe entre el estado de salud del hepatopáncreas, el Zn y la inducción de MT.

Otros autores y autoras que expusieron a macroinvertebrados como moluscos a condiciones de depuración tampoco observaron cambios significativos en el corto-mediano (semanas) y largo (un año) plazo (Arini *et al.*, 2014; Anacleto *et al.*, 2015). En el bivalvo de interés comercial, *Mytilus galloprovincialis*, Anacleto *et al.* (2015) detectó cambios en el FC luego de la depuración y junto a una gran tasa de remoción de metales, se demostró que la depuración es una buena herramienta para mejorar el estado de salud general de especies de consumo humano.

#### **4.4.2 Ensayo de depuración: distribución de metales, GRM, IAT e IBR**

##### *4.4.2.1 Metalotioneínas (MT)*

Uno de los principales objetivos fue evaluar la capacidad de recuperación de *N. granulata* luego de haber sido traslocado desde el campo -donde se encontraban expuestos a diferentes presiones antrópicas- al laboratorio para exponerlos a agua de mar artificial. Luego de 25 días de depuración para cada sitio y sexo, se observó una tendencia general **a la reversibilidad de las MT** con grandes porcentajes, en especial en PR y hembras de PC y VM. En cuanto a los metales, aunque se registraron diferencias entre los porcentajes de remoción y aumento luego del período de depuración, esto no significa que los organismos no puedan detoxificar estos elementos, sino que probablemente se necesite de un mayor tiempo, ya que los adultos poseen sistemas de detoxificación más elaborados que juveniles y larvas (Wallace *et al.*, 2003). A su vez, los aumentos y la disminución de algunos metales también pueden deberse a adaptaciones fisiológicas propias ya que, en el ambiente, los organismos se encuentran expuestos a fluctuaciones de las concentraciones de metales y por eso se dan incrementos de los elementos seguidos de períodos de pérdida (Wallace *et al.*, 2003).

Los resultados de la reversibilidad de las MT luego de la depuración coinciden con el patrón detectado por Buzzi & Marcovecchio (2016) para la misma especie en PC, quienes observaron una reversibilidad del 28% luego de la depuración. No obstante, en nuestro estudio para el mismo sitio, las MT tendieron a aumentar en machos PC, aunque no de manera significativa, y se observó una mayor reversibilidad en hembras. Además, en la

presente tesis, en este sitio, las MT se correlacionaron de manera positiva con el Fe luego de la depuración, y no presentaron correlaciones significativas con metales tóxicos, como el Cd. Considerando que el Fe tendió a disminuir luego del ensayo y el Cd a aumentar, las MT probablemente estarían implicadas en la homeostasis del Fe (indicado por la reversibilidad en las hembras) (Giarratano *et al.*, 2016), pero no actuarían como detoxificadoras del Cd.

En el caso de PR, se puede inferir que las diferencias en la actividad de estas proteínas en nuestros resultados se pueden haber visto afectadas por los altos niveles de metales y otros xenobióticos, y en ocasiones la inducción de las MT suele ser menores por el desarrollo de una **tolerancia fisiológica** que se da en ambientes altamente impactados por la actividad humana (De Almeida Duarte *et al.*, 2019). De acuerdo a esta idea, para Chiodi Boudet *et al.* (2013, 2019), los crustáceos en sitios más contaminados por ciertos metales poseen mayor resistencia y no inducen mayores MT ni otras enzimas de estrés oxidativo, como si puede ser el caso de aquellos que se presenten en sitios con menor presión antrópica con menor tolerancia a los metales. En cambio, los metales pueden ser acumulados como **GRM**, metales inactivados que son reservados de forma no tóxica por mayor tiempo.

#### 4.4.2.2 Zinc (Zn)

De acuerdo a las concentraciones y cinética de los metales en *N. granulata*, en los machos D de PR, sólo el Zn aumentó en tanto el resto de los metales tendió a disminuir con diferencias en el Mn y Fe. En este sitio, se observaron correlaciones altas entre las MT y metales como el Cd y Cu, por lo cual es probable que la reversibilidad de estas proteínas esté correlacionada con la remoción de estos metales para depurarlos, probablemente con una influencia de otros mecanismos de detoxificación, como los **GRM** (Wallace *et al.*, 2003). A pesar de que las MT necesitan mayor costo energético para sintetizarse, pueden depurar los metales de manera más rápida, mientras que los gránulos son reservados por mayor tiempo en las células.

Respecto a los posibles **aumentos de Zn** luego de la depuración, estudios realizados en la masa visceral de la almeja asiática, *Corbicula fluminea* por Arini *et al.* (2014) explicaron que la regulación de metales esenciales como el Zn es rápida y ocurre con la correspondiente síntesis de MT. Estos autores y autoras observaron simultáneamente un aumento de Zn en la masa visceral y un descenso de este metal en las branquias luego de 28 días de depuración. Esta observación fue explicada a través de la transferencia de

metales desde otros tejidos hacia la masa visceral que es el sitio principal de síntesis de MT. Luego, desde el día 180 al 365, el contenido de Zn en la masa visceral fue significativamente menor que los controles y la concentración de MT también disminuyó a valores similares a los controles. De acuerdo a estas investigaciones en bivalvos, es posible que una explicación similar se pueda dar en *N. granulata* para los incrementos de Zn observados luego de la depuración. Este metal podría ser traslocado desde diferentes partes del cuerpo hasta el hepatopáncreas, el principal órgano excretorio, con concentraciones en aumento en las primeras semanas de depuración, y luego podrían ser fácilmente excretados. Sin embargo, son necesarios más estudios en la **cinética** a corto y a largo plazo de depuración para corroborar estas hipótesis.

Como se ha explicado, en conjunto con el Cu, el Zn es un elemento esencial que actúa como cofactor enzimático para la síntesis de MT en vertebrados e invertebrados, con un rol vital en la homeostasis de elementos esenciales (Viarengo, 1989; Anacleto *et al.*, 2015; Arini *et al.*, 2015). El Zn posee diferentes comportamientos en los organismos bentónicos ya que se reduce, aumenta o mantiene luego de la depuración, lo cual ha sido registrado aún luego de períodos largos de detoxificación (Amaral *et al.*, 2005; Bergey & Weis, 2007; Arini *et al.*, 2014; Anacleto *et al.*, 2015). La habilidad de presentar **diferentes cinéticas** puede estar vinculada a la disponibilidad de los metales, indicado una depuración más acelerada en los metales que se encuentran en la **forma disuelta**, en tanto aquellos que se encuentran como **gránulos amorfos** pueden ser almacenados por más tiempo en los tejidos y órganos (Wallace *et al.*, 2003; Reichmuth *et al.*, 2010).

Otra explicación para los aumentos de Zn luego de la depuración se puede encontrar en los aportes de Reichmuth *et al.* (2010) para *C. sapidus*. Según esta investigación, a pesar de que el agua sea cambiada constantemente, los cangrejos pueden tomar metales rápidamente excretados (como el Zn) a través de las branquias, por lo cual las concentraciones de este metal pueden ser similares e incluso superiores que los niveles de los ND. Esta idea se apoya en estudios previos en bivalvos donde el Zn es eliminado en pocas horas y días (p.ej., El-Gamal, 2011; Anacleto *et al.*, 2015). Por otro lado, en estudios en *Palaemon elegans* se hipotetizó que los excesos de Zn acumulados se equiparan a los removidos, pero en otros crustáceos como los cirripedios, no es necesariamente removido y se mantiene en forma de GRM (Rainbow, 2002; Rainbow *et al.*, 2007). Sin embargo, los excesos de Zn deben ser monitoreados a partir de los estudios de depuración, ya que los crustáceos pueden percibir efectos tóxicos de este metal si su

biodisponibilidad es tal que su tasa de absorción excede la de detoxificación de la reserva metabólicamente disponible y no hay contribución de la excreción (Rainbow, 2002).

#### 4.4.2.3 Cadmio (Cd)

La depuración del **Cd** no resultó significativa en PR, con una remoción de sólo el 40% en los machos, mientras que en la mayoría de los ensayos y en los casos de las hembras de PC y VM tendió a aumentar. En general, para los casos analizados en otros macroinvertebrados como *C. fluminea*, *C. maenas*, *Mytilus* spp. y *Gammarus pulex*, la remoción de elementos no esenciales como el Cd, pueden resultar difícil de establecer a nivel organismo (Viarengo, 1989; Pedersen & Lundebye, 1996; Khan *et al.*, 2012; Arini *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021). Por ejemplo, para *C. fluminea*, Wang *et al.* (2021) determinó que luego de una exposición al Cd, aunque los organismos depuren el metal, no pueden recuperarse de los daños producidos a nivel fisiológico e histológico por la exposición previa a este metal. A su vez, estos autores y autoras registraron niveles elevados de activación de la actividad enzimática de la CAT, GST y GR luego de la depuración, por lo que las exposiciones a este metal –a pesar de resultar pequeñas- pueden activar el sistema de defensa antioxidante por la evidente generación de ERO y no presentar diferencias significativas con los organismos depurados (Wang *et al.*, 2021).

Respecto a la **actividad antioxidante** inducida por el Cd en PC, la correlación entre este metal y GR puede ser explicada a través de la regeneración de GSH en respuesta a este metal para disminuir posibles aumentos de la peroxidación lipídica. Mientras que en VM, las disminuciones del Cd pueden estar vinculadas con disminuciones en GR, que promueven el consumo de GSH, explicando la correlación negativa de la GST con TBARS, ya que esta enzima estaría actuando para reducir el MDA en la célula.

Mediante el uso de técnicas de radioisótopos y autorradiografías, Cresswell *et al.* (2017), estudió la **bioacumulación**, **translocación** y **depuración** del Cd en el camarón *Macrobrachium australiense*. Según este estudio, las concentraciones de Cd se removieron rápidamente de las branquias y hepatopáncreas luego de que los individuos fueran sometidos a un período corto de exposición, pero cuanto más prolongado era el tiempo de exposición al metal, más prolongado era el de depuración. Esto sugiere que la duración de la exposición a este metal interviene en las tasas de depuración del organismo, demostrando que la duración del tiempo de exposición influencia la bioacumulación interna, el tiempo de excreción y el potencial riesgo tóxico de los metales. Esta podría ser

otra explicación de por qué el Cd no es removido o es removido a bajas tasas que no resultan significativas en comparación con los organismos ND de *N. granulata*.

Más estudios vinculados a la depuración del Cd y el Zn por autorradiografía e isótopos estables se realizaron en el camarón de cristal australiano *Paratya australiensis* por McDonald *et al.* (2020) quienes expusieron a los organismos a múltiples pulsos acuosos (por separado y en mezcla) y luego los sometieron a una depuración corta de 7 días. En este estudio se determinó que la depuración del Zn era mayor que la del Cd, que resultaba más lenta, tanto en mezcla como luego de la exposición por separado, lo que refuerza estudios previos de varios autores y autoras en cuanto a la baja tasa de remoción de los metales no esenciales en crustáceos (p.ej., Rainbow, 1985, 2002; Rainbow & Depledge, 1990).

Para el caso de algunos bivalvos (Raftopoulou & Dimitriadi, 2011), en la depuración se dan **efectos antagónicos** entre metales esenciales en respuesta a la acumulación de metales no esenciales. Por lo cual, los efectos de metales esenciales, cumplen una función protectora en la depuración de metales, en especial en órganos blanco. Sin embargo, en la presente tesis, se observaron correlaciones positivas entre el **Cd-Zn-Cu** en los tejidos de los cangrejos de sitios como PC y VM, y su remoción o aumento pueden ser explicadas de acuerdo a la idea de Liu & Wang (2013) para *M. hongkongensis*. Estos autores encontraron que la exposición al Zn aumenta las concentraciones tisulares de Cd y Cu y que estas concentraciones poseen una alta correlación entre sí. Además, según este trabajo, los aumentos en la bioacumulación del Cd y Cu resultaron, principalmente, de la acumulación y distribución crecientes en dos fracciones subcelulares (MT y GRM) en la ostra. De esta manera, un aumento de la biodisponibilidad del Zn en el ambiente, no sólo aumentaría las concentraciones de Zn en los tejidos, sino que también incrementaría la bioacumulación general del Cd y Cu. Los autores también explicaron que, en ambientes donde no se observa esta relación, es probable que sea debido a una alta tasa de Cu en los organismos por una alta pre-exposición en el campo a este elemento.

Mediante la aclimatación fisiológica/adaptación genética a largo plazo a un estrés metálico alto, las poblaciones pueden haber desarrollado una fuerte capacidad de detoxificar Cu a través de MT (Liu & Wang, 2013). Esto podría explicar la correlación Cd-Zn y los aumentos de ambos metales luego de la depuración y posiblemente la ausencia de correlaciones con el Cu en PC. Sin embargo, en este sitio, las MT sólo se correlacionaron con el Fe, por lo que probablemente participen del proceso de

homeostasis de este metal y, en la defensa antioxidante, respaldada por la correlación positiva MT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Algunos estudios de Chiodi Boudet *et al.* (2015, 2019) registraron niveles significativos de **remoción del Cd** en el camarón dulceacuícola *Palaemon argentinus* luego de un período corto de depuración. Por lo tanto, es posible que la habilidad de detoxificación del Cd sea variable y especie-específica y que algunas especies posean mecanismos de detoxificación más rápidos que en los casos registrados por moluscos y algunos crustáceos, gracias a la acción de MT y MTLP y formas más solubles de los elementos en las células. Así, en una misma especie de crustáceo pueden darse distintas formas de detoxificación del Cd: en primer lugar, en aquellos sitios con mayor contaminación, los organismos pueden acumular Cd como GRM para luego excretarlos y no inducir MT, y en otros sitios con menor contaminación en donde los individuos poseen menor tolerancia, ante la presencia de este metal, se puede activar la síntesis de MT para detoxificarlo de manera más eficiente (Chiodi Boudet *et al.*, 2013, 2015, 2019).

La posibilidad de las MT como mecanismo de detoxificación del Cd en PR indica que, en este sitio, los organismos poseen mecanismos eficientes de depuración de este metal a diferencia de los otros sitios donde este metal no se encontró vinculado a las MT ni en forma de gránulos. A su vez, la ausencia general de este elemento en GRM estaría indicando que se encuentra en su forma biodisponible para ser incorporado por otros depredadores de los cangrejos, y así biomagnificarse a través de las redes tróficas del estuario.

La hipótesis de la **tolerancia a metales** según el sitio en invertebrados marinos ya había sido estudiada por Rainbow *et al.* (2007), quienes sugirieron que no sólo la historia de contaminación de los sitios influye sobre la asimilación y excreción, sino también factores físico-químicos del agua y de los sedimentos. Del mismo modo, De Almeida Duarte *et al.* (2019) estudiaron la tolerancia al Cd de una especie centinela de cangrejo, *Ucides cordatus*, explicando que la especie tiene una gran capacidad de inmovilizar este metal en una forma no tóxica para el organismo. En este estudio se tomaron cangrejos de sitios con mayor y menor impacto humano, se depuraron y se los volvió a exponer a concentraciones de Cd disueltos en el agua. Los cangrejos que habitaban sitios menos contaminados acumularon Cd en formas tóxicas (en especial en las branquias), mientras que aquellos individuos que habitaban sitios con mayor contaminación resultaron ser más resistentes a este metal, presentaron menor daño genotóxico y acumularon mayores concentraciones en el hepatopáncreas, que resulta ser el principal órgano detoxificador.

A su vez, en el sitio más poluído, las formas de concentración de este metal en el hepatopáncreas fueron los GRM y las MTLP en su forma biológicamente detoxificables. Esto demuestra que, a pesar de poseer los mismos rasgos ecológicos, las especies pueden resultar en subpoblaciones con adaptaciones fisiológicas y comportamientos propios del lugar en que habitan.

Ya que el Cd no fue detectado como GRM, es posible que en *N. granulata* **predominen las MT como forma detoxificación de este elemento**. Por lo tanto, la explicación basada en la tolerancia de los organismos puede aplicarse a otros metales y a la escasez de diferencias significativas en el caso de la reversibilidad de las MT en los ensayos, tal como es el caso de PC. De esta manera, es probable que procesos de tolerancia a los metales genere que la inducción de las MT sea más lenta frente a escenarios más contaminados por metales, o con mayor presión antrópica como PR, y la consecuente reversibilidad de estas proteínas también lo sea.

#### 4.4.2.4 Otros metales esenciales (*Mn, Cu, Ni y Fe*) y estrés oxidativo

En los machos de PR y VM, los niveles de metales esenciales como el Fe y el Mn tendieron a disminuir estadísticamente en los cangrejos D, en tanto el Cu y Ni tendieron a disminuir, pero sin diferencias estadísticas en PR. Mientras que en VM, si se observaron diferencias significativas en la depuración del Cu y Ni. Es esencial señalar que el mecanismo de secuestro y depuración de otros metales -a excepción del Cd y Zn- han sido menos estudiados en la literatura. Como se ha explicado en el capítulo anterior, el **Mn** resulta esencial para el metabolismo celular, pero en exceso puede resultar neurotóxico para los animales marinos (Baden *et al.*, 1995; Baden & Eriksson, 2006), o puede causar otros efectos como la enfermedad del caparazón en el cangrejo azul *C. sapidus* (Weinstein *et al.*, 1992) y daño en la morfología intestinal del camarón *Macrobrachium nipponense* (Ding *et al.*, 2020).

En su forma divalente -Mn (II)-, el Mn tiene una afinidad relativamente alta por el azufre o el nitrógeno en grupos funcionales de proteínas y otras moléculas, lo que permite que el Mn interfiera en un amplio espectro de procesos biológicos (Baden & Eriksson, 2006). Según la revisión de Baden & Eriksson (2006), las mayores concentraciones en los diferentes tejidos y órganos de los crustáceos de este metal son incorporadas a través del ambiente. Para este autor y autora, la incorporación es realizada a través de los sedimentos, aunque no se descarta la alimentación como una posible vía de ingreso, a pesar de ser poco investigada y de que muchos metales, incluido el Mn, se

unen electrostáticamente al fosfato o covalentemente al azufre y, por tanto, no están disponibles para la digestión. Así, la absorción del agua a través de las branquias parece ser la ruta más importante de Mn en los crustáceos acuáticos, especialmente en hipoxia, cuando el Mn disuelto biodisponible se encuentra en altas concentraciones.

Al respecto de la excreción de este elemento, Mohamad (2008) reportó disminuciones significativas en los niveles de Mn hasta valores basales en el hepatopáncreas del cangrejo *Liocarcinus depurator* luego de un período corto de depuración. Aunque el hepatopáncreas es el principal órgano involucrado en la detoxificación en los crustáceos, las grandes tasas de absorción exceden las tasas de excreción del Mn bajo condiciones de alta biodisponibilidad, conduciendo el proceso a una acumulación neta en este órgano (Mohamad, 2008). Por el contrario, las tasas de disminución de las concentraciones de Mn en los individuos D de *N. granulata* hasta valores <LDM pueden explicar por qué la excreción del Mn excede por demás las tasas de absorción.

Esta acción puede ser incluso más rápida en organismos menos tolerantes a este metal, como podría resultar el caso de PR y no en sitios como VM, ya que en VM, el Mn es un metal que predomina frente a los cangrejos de los otros puntos de muestreo. No hay información sobre la actividad molecular de la síntesis de MT con el Mn en crustáceos decápodos y otros invertebrados, pero es posible que los excesos de este metal puedan unirse a estas proteínas para ser detoxificadas rápidamente. La alta depuración puede vincularse a que los niveles de Mn detectados en *N. granulata*, en especial en VM, superan los niveles que fueron detectados como basales en muchos crustáceos decápodos marinos de la literatura mundial (Baden & Eriksson, 2006).

El-Gamal (2011) estudió la depuración de varios contaminantes y toxinas en la almeja blanca *Paphia undulata*. Luego de períodos cortos de depuración (24 horas), el autor observó remociones significativas de metales como Zn, Pb, Ni, Mn, Cu, Cr y Cd en los tejidos del bivalvo, con un mayor porcentaje de remoción del Mn (83%). Para este autor, los altos porcentajes de depuración de ciertos metales como el Mn indican que poseen bajas afinidades en los tejidos de ciertos invertebrados, siendo un proceso donde también podrían involucrarse las MT (Roesijadi, 1980, 1992).

La misma situación se ha observado con el **Fe**, que también presenta tasas de remoción altas en bivalvos y su depuración probablemente refleja su débil unión a los tejidos, y una explicación similar en cuanto a las tasas de depuración de metales puede atribuirse al caso de *N. granulata*. En cuanto a la **actividad bioquímica**, en el ensayo de

PR, la GST se correlacionó con el Mn, y aunque no existen muchos trabajos respecto a la actividad enzimática frente al Mn, es probable que las correlaciones entre el Mn, Ni y Fe, indiquen una posible homeostasis de estos metales esenciales luego del período de depuración.

En tres especies de bivalvos de consumo humano (*Ruditapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis* y *Scrobicularia plana*), Anacleto *et al.* (2015) observaron una detoxificación rápida de metales como el **Fe**, **Zn**, **Cu** y **Cd**. Incluso en el caso de metales tóxicos, la depuración les permitió a las especies recuperarse hasta los niveles permitidos para consumo en un período de sólo dos días con disminución en los niveles de glucógeno. No obstante, los bivalvos son más permeables al agua que los decápodos y poseen grandes áreas expuestas al intercambio con el agua, en tanto los cangrejos resultan más “impermeables” al agua, en especial a los intercambios con la fase disuelta de los metales (Rainbow & Depledge, 1990), y por lo tanto la depuración y excreción de estos elementos puede resultar más lenta.

Como se ha explicado previamente, las rutas de incorporación y excreción no han sido ampliamente estudiadas en la mayoría de los metales, a pesar de que es necesario recordar que cualquier metal tiene el potencial de causar un daño biológico y es sólo una cuestión de alcanzar una concentración lo suficientemente alta. Los metales esenciales se encuentran muy extendidos, y en especial en sistemas hipóxicos y con descargas industriales, donde se encuentran en concentraciones muy altas, en particular en los sedimentos. A su vez su biodisponibilidad aumenta como resultado del impacto antrópico, acumulándose en la biota donde tiene el potencial de causar daños en distinto orden de escala biológica (Rainbow & Depledge, 1990; Souza Machado *et al.*, 2015).

En general, en cuanto al **Cu**, una vez que los cangrejos fueron trasladados al laboratorio, las concentraciones en exceso tendieron a ser removidas, coincidiendo con el estudio de Reichmuth *et al.* (2010) para *C. sapidus*. Para este metal, Zhao *et al.* (2019) estudiaron la incorporación, eliminación y tolerancia del  $\text{Cu}^{2+}$  en el cangrejo rojo americano, *Procambarus clarkii*. Los autores y autoras detectaron que el Cu se acumulaba en mayor parte en el hepatopáncreas a diferencia de otros órganos no blanco como el músculo, glándulas antenales y tracto digestivo. Durante la exposición al  $\text{Cu}^{2+}$ , las langostas expresaron genes vinculados a la homeostasis del Cu, incluyendo la batería de genes involucrada en la síntesis de MT. A su vez, se observó un incremento de la actividad de GPx y GST y actividad genética antioxidante (*Cu/Zn-sod*, *cat*, *gpx*, *gst*) para enfrentarse al daño y estrés oxidativo inducido por el Cu, que fue acompañado por

aumentos en el contenido de MDA. Los 7 días de depuración le permitieron eliminar los excesos de Cu a *P. clarkii* por una regulación aún mayor de los mismos genes, y una recuperación del daño oxidativo al mejorar la expresión de genes de enzimas antioxidantes y consumir más GSH, lo que provocó un retorno del nivel de MDA al valor de los controles. Este estudio proporcionó nuevos conocimientos en los decápodos sobre los mecanismos reguladores del sistema de homeostasis de Cu celular y el sistema antioxidante. Considerando la alta correlación del Cu con la GST en *N. granulata* y la correlación de MT con el Cu en sitios como PR, es probable que existan mecanismos similares de regulación del Cu en la especie analizada, aunque se precisan estudios vinculados a la genética de enzimas antioxidantes y de homeostasis de los metales.

Los resultados de las correlaciones en el ensayo de PR, demuestran que las MT podrían actuar efectivamente como **quelantes de metales en la depuración del Cu** (además del Cd) en conjunto con la inducción de GR para mantener el glutatión en su forma reducida. A su vez, la correlación de la GR con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implica que una posible disminución de esta enzima se encuentra asociada a la disminución de esta especie. Sin embargo, la GR se correlacionó de manera negativa con la CAT, lo que implica que la disminución de esta enzima se encontró correlacionada con los niveles de CAT, y dicha actividad fue reportada por Wang *et al.* (2021), quienes explicaron que algunas enzimas antioxidantes necesitan mayor tiempo para reestablecer sus niveles luego de la depuración. El Cu se correlacionó de manera positiva con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que el aumento o disminución de este metal podría asociarse a un aumento o disminución de la presencia del peróxido (Zhao *et al.*, 2019). Aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no presentó diferencias significativas luego del ensayo, es probable que se necesite un más tiempo para eliminar estas ERO.

Las concentraciones de MDA evaluadas a través de **TBARS** no arrojaron diferencias significativas para ninguno de los ensayos. No obstante, en PR se observó una tendencia a la reducción de los niveles de MDA en ambos sexos. Wang *et al.* (2021) observaron una tendencia similar e incluso niveles incrementados de MDA en la depuración de *C. fluminea* luego de la depuración. Este tipo de ensayos no produjeron la reversión de la peroxidación lipídica y su consecuente daño fisiológico. Es posible que las ERO se hayan eliminado después de la primera fase de actividad de SOD y CAT, por lo cual la GR y GST - enzimas en la segunda fase de desintoxicación- no pudieron desempeñar un papel más importante y mantuvieron una actividad enzimática relativamente baja (Wang *et al.*, 2021). Otra explicación podría ser que una vez que se inició el daño lipídico, se han producido daños fisiológicos que no pueden ser revertidos

durante la depuración, o que necesitan un período más prolongado de detoxificación (Xu *et al.*, 2021). La correlación negativa de TBARS con GST y CAT implica una actividad de la CAT para reducir las ERO y el daño lipídico, y que el consumo de GSH puede disminuir la presencia de MDA en la célula luego de la depuración (Zhao *et al.*, 2019), aunque es posible que sea necesario un mayor período de depuración para reestablecer los niveles de MDA y de las enzimas implicadas en el estrés oxidativo.

En cuanto a las correlaciones del MDA con los metales depurados, para PC se observó una correlación positiva y significativa con el Cu. Ya que el Cu no presentó diferencias luego de la depuración al igual que TBARS, es posible que este metal produzca daño lipídico que no sea revertido en la depuración. La correlación entre la exposición del Cu a través de rutas como la dieta y el aumento de MDA en *N. granulata* fue observada previamente por Sabatini *et al.* (2009), por lo cual podría resultar en una posible explicación de la correlación entre este metal y el daño lipídico generado por la presencia de radicales libres y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La GR disminuyó luego del ensayo y se correlacionó con el Cu y TBARS, lo que implica una posible producción de GSH en presencia de TBARS para disminuir el MDA en la célula (Xu *et al.*, 2021). En PR, la correlación del Ni y Mn entre sí y con GST y CAT, puede significar que las disminuciones de estos metales podrían estar asociadas con disminuciones de estas enzimas.

De esta manera, aunque el Ni haya disminuido significativamente, aún podrían observarse daño lipídico producido por la presencia de este metal. Al momento no existe mucha bibliografía respecto a la relación del Ni y los biomarcadores de ERO en cangrejos estuariales. Por ejemplo, Giarratano *et al.* (2016) encontraron correlaciones fuertes entre el MDA y el Al en *N. granulata*, pero en el caso del Ni fueron negativas. En el caso de los bivalvos, existen más estudios al respecto: a modo de ejemplo, para *M. hongkongensis* en un sistema estuarial de China, se detectó que el Cu, Ni y Zn presentaron las mayores asociaciones con respuestas pro-oxidantes y de estrés oxidativo (SOD y LPO) (Chan *et al.*, 2019). Por lo cual, las respuestas bioquímicas pueden ser variables de acuerdo a la acumulación de este metal en el hábitat.

Mediante la simplificación de los resultados a través de la aplicación del **IBR**, se observó una tendencia a la acción antioxidante en los organismos depurados (D) y del daño lipídico en los ND (ND). Por ejemplo, en los ND de PC predominaron las MT y TBARS, posiblemente las MT con acción frente al daño lipídico; mientras que la CAT y GST predominaron en D, implicando que la depuración no resultó eficiente para disminuir el estrés oxidativo, aunque permitió que no predomine el MDA como daño

celular. En ND de PR, predominó la GR y el daño lipídico, mientras que, en D, la GST con predominancia de la actividad detoxificante. En tanto, en ND de VM, también predominaron las MT y en D igualmente las MT junto a TBARS, de manera que es posible que las MTs predominaran como primera línea antioxidante para prevenir el daño lipídico.

Por último y al igual que en el capítulo 3, el **ACP** permitió resumir varias variables luego de la depuración. Se observó un agrupamiento de los metales esenciales (Cu, Zn, Ni y Fe) y positiva con GR y TBARS, indicando que los resultados de la depuración de estos metales estarían ligados a la actividad de estos biomarcadores. Los altos coeficientes de correlación de los metales esenciales, podrían indicar que la Dim 1 es un indicador de la depuración de estos metales. Mientras que estas agrupaciones resultaron negativas con la mayoría de los biomarcadores (IHS, CAT, GST, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MT), exceptuando el Cd, revelando que la depuración de estos metales se encuentra vinculado con aumentos o disminuciones (según sea el caso) de estos biomarcadores en la depuración. Estos resultados permitieron observar de manera **sintética los resultados** y obtener ciertas generalizaciones, como que las respuestas de GR, TBARS y las MT son buenos biomarcadores de los procesos de depuración del Cd, tal como fue observado para el cangrejo *Sinopotamon henanense* por Xu *et al.* (2021), mientras que GR y TBARS serían buenos marcadores para la depuración del Cu y Ni.

#### 4.4.2.5 Gránulos ricos en metales (GRM)

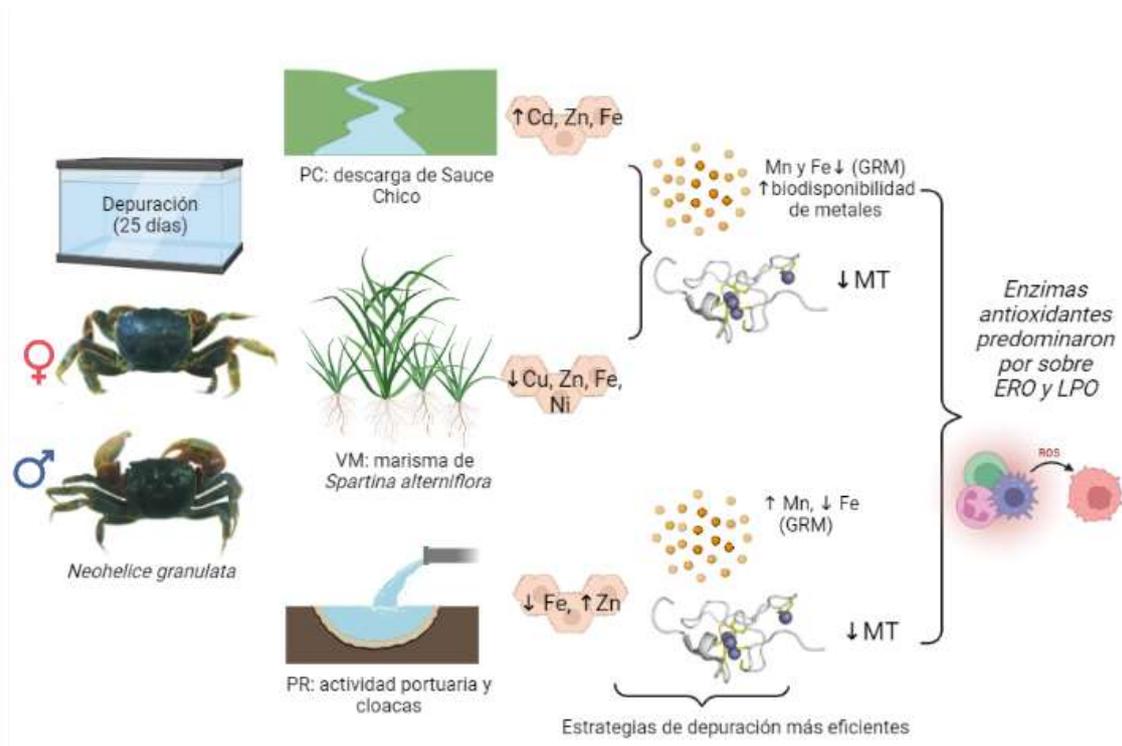
En el caso de los **GRM**, para el **Cd**, se han registrado valores <LDM previo a la depuración y luego del ensayo en todos los casos. De esta manera, es posible que en *N. granulata*, el Cd no sea biológicamente detoxificado en su forma inactiva de gránulos y se encuentren **tróficamente disponibles** para los depredadores. Esto resulta novedoso ya que en otros crustáceos se halló este metal en forma granular e incluso resultó ser el principal mecanismo de incorporación y depuración (Chiodi Boudet *et al.*, 2019; De Almeida Duarte *et al.*, 2019), ya que esta manera no necesita de energía como la producción de proteínas y es más ventajosa que la síntesis de MT. La forma de GRM como ruta de detoxificación no ha sido ampliamente estudiada en la bibliografía, salvo el Cd y Zn (Wallace *et al.*, 2003).

Esto refuerza la idea de que los mecanismos de depuración resultan **especie-específicos** e incluso dependientes del sexo y del metal, y que no necesariamente la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos signifique que los organismos

no pueden recuperarse de la exposición previa a los metales (Wallace *et al.*, 2003), sino que probablemente necesiten un período más prolongado de depuración. Mientras que otros metales esenciales, como el Fe y el Mn presentaron diferencias significativas y disminuyeron luego de la depuración, el Cu tendió a disminuir en ambos sexos, pero no de manera significativa. De esta manera, es probable que los metales esenciales en forma de gránulos puedan ser una estrategia de depuración rápida.

Al respecto de las disminuciones significativas de los GRM luego de los períodos de depuración, Chiodi Boudet *et al.* (2013) explicaron que, en los decápodos, la forma de gránulos se encuentra en las células R- senescentes en la región proximal de los túbulos del hepatopáncreas (Vogt, 2002). Estas células no presentan secreción apócrina, por lo que los contaminantes deben permanecer dentro de la célula hasta la muerte celular. Algunos autores y autoras han informado que los gránulos se eliminan durante la renovación epitelial al final de cada ciclo digestivo y luego se excretan por las heces, lo que resulta en una posible explicación de la disminución de algunos metales. En este proceso, las células senescentes y las concreciones minerales se liberan mientras el nuevo epitelio se construye por debajo. Por otro lado, parte del epitelio del hepatopáncreas se renueva en cada ciclo de **muda**, pudiendo también ser otra forma de eliminación de los gránulos (Chiodi Boudet *et al.*, 2013) que deberían estudiarse como otras vías de depuración (Ramos *et al.*, 2021).

De esta manera, se propone que el proceso de depuración de metales es especie-específico, dependientes de los rasgos ecológicos, del hábitat y del tipo de metal, ya que, en el caso de los esenciales, la excreción puede resultar más rápida que los no esenciales debido a que los mecanismos celulares son más eficientes para metabolizar aquellos elementos vitales para el normal desarrollo de los organismos (Figura 74). Esta explicación, sumada a la tolerancia de los organismos según el hábitat y la afinidad de los tejidos al metal, son las más plausibles para elucidar por qué algunos metales son depurados en un período relativamente prolongado para un invertebrado (25 días) y por qué otros no. Adicionalmente, la efectividad del proceso de depuración también depende del número de variables que se presenten, como el estado de salud general del organismo, los parámetros ambientales, el tipo de metal y el nivel de contaminación a los que estuvo expuesto previamente. A medida que se comprenda más sobre los mecanismos de los metales que subyacen en la ecofisiología de los animales y se aclaren más los detalles del impacto humano en el ambiente, es probable que se preste más atención a metales que han sido históricamente ignorados en estudios de toxicidad.



**Figura 74:** Esquema de los principales resultados del proceso de depuración de *N. granulata* en esta tesis. Se observaron mecanismos fisiológicos similares en PC y VM, a pesar de los aumentos de los metales en PC. En PR, se registraron aumentos y disminuciones de algunos metales y las estrategias de depuración resultaron más eficientes. El estrés oxidativo denotó una predominancia de las enzimas antioxidantes por sobre las especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica.

# Capítulo 5. Consideraciones finales

## 5.1 Conclusiones

- A partir del empleo de una batería de **índices geoquímicos** se pudo determinar que los sedimentos de los sitios estudiados poseen una baja a moderada contaminación por metales, con un potencial riesgo ecotoxicológico para la biota estuarial. También se observó un enriquecimiento de los sedimentos por **Cu**, en especial en **PR**, por lo tanto, las descargas cloacales, basurales y las actividades portuarias contribuyen a una gran fuente de este metal en el ambiente. A su vez, los valores de este metal están por encima de los recomendados en la normativa internacional e incluso presentan **valores superiores** a los de otros sistemas costeros mundiales. Sin embargo, se considera que el EBB se encuentra dentro de los límites de **contaminación baja a moderada** respecto a las normativas y comparaciones con otros estudios internacionales.
- Se observó una tendencia de algunos metales en los sedimentos (Cu, Pb, Zn y Cr) a aumentar en las **estaciones cálidas**, que probablemente se encuentre influenciada por la actividad microbiana y bioturbadora de organismos bentónicos, donde *N. granulata* juega un papel clave.
- En **PC** se detectaron altos niveles de Cr respecto a los otros sitios que posiblemente estén asociados a la erosión de los sedimentos de la zona interna y a actividades humanas, como la cercanía de la descarga cloacal “Tercera Cuenca” y al aporte fluvial de arroyos que fluyen a través de campos agrícolas donde se vierten otros xenobióticos, como herbicidas, pesticidas, biocidas y fármacos veterinarios. En tanto, el aumento de metales como el Cu, Pb, Zn y Fe en **PR** puede encontrarse asociada a la actividad portuaria y a la descarga cloacal. Mientras que en **VM**, -un sitio que aparentemente no posee actividades antrópicas marcadas- el aumento de algunos metales en sedimentos, como el Mn, Ni y Fe, puede deberse a que es una marisma amplia con gran deposición de sedimentos que no se generan por resuspensión local.
- **Parámetros hidrológicos** como el pH, la salinidad y temperatura de la columna de agua se correlacionaron con los metales en sedimentos, indicando una posible **interacción** de estos parámetros sobre los metales, que influyen sobre procesos geoquímicos de partición, adsorción, desorción y biotransformación.

- En relación a *N. granulata* como organismo biomonitor, el análisis de las **medidas morfológicas** indicó el **IHS** resultó ser un mejor indicador biométrico del estado de salud de los organismos que la relación peso-talla del FC, ya que los cambios ambientales se detectan primero a nivel órgano.
- *N. granulata* demostró ser un buen **biomonitor** ya que se detectaron todos los metales presentes en los sedimentos, a excepción del Cr y Pb, y del Cd que sólo se detectó en los cangrejos. De esta manera, la **bioacumulación** puede interpretarse como un primer biomarcador de exposición ambiental a metales.
- En cuanto a los **patrones de acumulación espaciales**, en general se registraron mayores valores de Mn y Ni en los cangrejos de VM; Cd en los ejemplares de PC y VM; y Zn, Cu y Fe en PR y VM. Aunque VM es un sitio que no presenta impactos antrópicos aparentes, la acumulación de los metales puede estar asociada a la presencia de grandes extensiones de *S. alterniflora* como principal ítem trófico de *N. granulata*, y otra posibilidad es la deposición sedimentaria aloctona que es bioacumulada por los cangrejos. En PR, la acumulación superior de metales puede deberse a la exposición de los cangrejos a sedimentos con metales provenientes de las descargas cloacales, mientras que, en PC, la presencia de metales como el Cd puede deberse a la incorporación de la fase particulada de origen fluvial, o a partir de la interacción con metales como el Zn que facilitan el incremento del Cd en tejidos y órganos.
- El **FABS** por sitio indicó mayor bioacumulación del Cu en hembras de PC y VM, lo que también coincide con las correlaciones positivas significativas entre el Cu\_S/Cu\_C. Mientras que estacionalmente, se observó un mayor valor del índice en hembras de otoño. De esta manera, la acumulación también responde a los períodos reproductivos donde se da una mayor reserva de metales en otoño para prepararse para el período reproductivo.
- Se observaron mayores **correlaciones** entre los metales en sedimentos y cangrejos en estaciones cálidas, lo que indicaría que un mayor número de metales son incorporados del ambiente, posiblemente por el aumento de la actividad de organismos bioturbadores.
- El **IBR** resultó una herramienta útil para resumir resultados de biomarcadores bioquímicos con amplia variabilidad entre sexos, estaciones y sitios con diferente grado de impacto antrópico, e indicó una probable presión toxicológica selectiva,

ya que en VM predominó la peroxidación lipídica (TBARS), mientras que, en PC y PR, las defensas antioxidantes.

- Los **análisis multivariados** como las correlaciones y el ACP resultaron ser buenos análisis estadísticos para resumir estudios con variables complejas. Las **correlaciones** indicaron mayores interacciones entre los metales y los biomarcadores en las estaciones cálidas, que posiblemente se asocie a la incorporación de metales del ambiente para la etapa reproductiva, donde los organismos son más sensibles a presiones antrópicas. Mientras que el **ACP** señaló correlaciones positivas entre la mayoría de los metales en sedimentos y en cangrejos, y el IHS, GR y TBARS, que podrían resultar ser buenos biomarcadores de los metales.
- En esta tesis, las **MT** no resultaron buenos biomarcadores de metales, a pesar de que son quelantes de estos elementos, por lo que posiblemente actúen como primera línea de defensa antioxidante junto a la CAT.
- En líneas generales, se observó una **reversibilidad** de los metales en cangrejos y las MT luego del ensayo de depuración, en especial en PR y VM.
- A través del **IBR** se observó una predominancia del daño lipídico en los organismos ND, mientras que luego del ensayo predominaron las actividades antioxidantes para proteger al organismo del daño celular. Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas en cuanto a los niveles de MDA luego del ensayo, implica que la depuración no resulta eficiente para que los organismos se recuperen del daño lipídico causado por el estrés oxidativo.
- La ausencia del **Cd** como forma **GRM** en la mayoría de los ensayos posiblemente indique que este metal se encuentra disponible para ser biomagnificado en las redes tróficas. Ya que *N. granulata* es una especie clave en el ecosistema del estuario, se deben continuar con estudios de la incorporación y depuración de este metal.
- Se propone que el proceso de depuración de metales en *N. granulata* es especie-específico, dependiente de los rasgos ecológicos, del hábitat y del tipo de metal, ya que, en el caso de los **esenciales**, la excreción puede resultar más rápida que los no esenciales debido a que los mecanismos celulares son más eficientes para metabolizar aquellos elementos vitales para el desarrollo de los organismos.
- También se concluye que la depuración depende de la **tolerancia** de los organismos según el hábitat y la afinidad de los tejidos al metal, lo que permite

explicar por qué en la misma especie y en distintos sitios, algunos metales son depurados en un período relativamente prolongado para un invertebrado (25 días) y por qué otros no, en especial en los casos de metales como el Cd y Cu.

- Concluimos que la **hipotesis de trabajo** propuesta inicialmente ha sido corroborada en parte, ya que los organismos sintetizan IAT en respuesta a la presión antrópica, lo que permite identificar de manera anticipada efectos delétereos de los contaminantes en los sistemas biológicos a mayor escala. Sin embargo, es necesario conocer la historia natural de la especie y la de los distintos sitios en los que habitan, ya que, por ejemplo, sitios con mayor historia de contaminación podrían estar involucrados en generar una mayor tolerancia biológica a los metales, lo que afecta la síntesis de IAT. A su vez, los parámetros físico-químicos de la columna de agua también juegan un rol clave en la inducción de los IAT, así como la posible sinergia con otros contaminantes y xenobióticos. De esta manera, la utilización de IAT resultó útil para complementar los análisis químicos tradicionales para abordar esta problemática de manera integral en futuras líneas de monitoreo ambiental.

## 5.2 Futuras líneas de investigación

- Continuar con el monitoreo integrado de metales utilizando biomarcadores bioquímicos en **otras especies bentónicas** residentes del EBB, como el mejillín *Brachidontes rodriguezii* y otros decápodos (*Cyrtograpsus* spp.)
- Determinar la **biodisponibilidad** de los metales en sedimentos en los sitios de muestreo.
- Incorporar otras **mediciones** que afectan la biodisponibilidad de metales en sedimentos como la medición de MO, granulometría y potencial redox.
- Realizar ensayos toxicológicos de **interacción de metales**, como el caso del Zn, en sedimentos y agua enriquecidos con este metal para conocer si este elemento facilita el incremento de metales como el Cu y Cd en los tejidos de *N. granulata* y otros organismos bentónicos.
- Emplear **otros biomarcadores** como la morfología del caparazón, que no dependen de factores estacionales, sumado a posibles aberraciones a nivel histológico y genético.
- Realizar **ensayos jaula crónicos** con organismos en exposición a las descargas cloacales y a las actividades portuarias intensas en sitios como PR o en otros como

Canal la Vieja (cerca de la descarga “Primera Cuenca”) que permitan un manejo integrado de los impactos generados por estas actividades.

- Realizar estudios toxicológicos letales y subletales con **mezclas de contaminantes** que reflejen de manera más fiel lo que ocurre en el EBB donde se han registrado diversos tipos de contaminantes.
- Continuar estudiando la **tolerancia** como un mecanismo involucrado en la depuración en las posibles subpoblaciones de cangrejos presentes en el estuario.
- Estudiar la **cinética** de incorporación y depuración de metales en *N. granulata* en condiciones de laboratorio tanto para metales esenciales (Zn y Cu) y no esenciales (Cd) por separado y en mezclas en distintos períodos.
- Analizar los biomarcadores bioquímicos vinculados al estrés oxidativo e histológicos en los estudios de cinética para evaluar la posible reversibilidad de estos marcadores.
- Evaluar la **muda** como otro mecanismo de depuración de metales *N. granulata*.

## Abreviaciones

- Me: Metal
- Cd: Cadmio
- Cu: Cobre
- Pb: Plomo
- Zn: Zinc
- Mn: Manganeseo
- Ni: Níquel
- Cr: Cromo
- Fe: Hierro
- BSAF/FABS: Factor de acumulación biota-sedimento
- MT: Metalotioneínas
- MTLP: Proteínas similares a las metalotioneínas
- IAT: Indicador de alerta temprano
- CAT: Catalasa
- GSH: Glutación reducido
- GST: Glutación-s-transferasa
- GR: Glutación reductasa
- LPO: Peroxidación lipídica
- TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
- MDA: Malondialdehído
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno
- GRM: Gránulos ricos en metales
- EBB: Estuario de Bahía Blanca
- OD: Oxígeno disuelto
- PC: Puerto Cuatros
- VM: Villa del Mar
- PR: Puerto Rosales
- D: Depurados
- ND: No depurados
- H: Hembra
- M: Macho

- AC: Ancho de caparazón
- HNO<sub>3</sub>: Ácido nítrico
- HClO<sub>4</sub>: Ácido perclórico
- LDM: Límite de detección del método
- IBR: Índice de respuesta integrada de biomarcadores
- ERO: Especies reactivas de oxígeno
- Me\_S: Metal en sedimento
- Me\_C: Metal en tejido de cangrejo
- ACP: Análisis de componentes principales
- I<sub>geo</sub>: Índice de geoacumulación
- FE: Factor de enriquecimiento
- PLI: Pollution load index/ Índice de carga metálica
- RE: Riesgo ecológico
- mERM-Q: Índice de la media del cociente de la mediana de los rangos de efectos
- FC: Factor de condición
- IHS: Índice hepatosomático
- O: Otoño,
- I: Invierno
- P: Primavera
- V: Verano
- MO: Materia orgánica
- MPS: Material particulado en suspensión
- TEL-Q: Threshold Effect Level quotients (Cociente del nivel de umbral de efecto).
- PEL-Q: Probable Effect Level quotients (Cociente del nivel de efecto probable)
- SQGs: Sediments Quality Guidelines, (Guía de Calidad de Sedimentos)
- ps: Peso seco
- ph: Peso húmedo

## Referencias

Abdennour, C. (1997). Copper, zinc and haemocyanin concentrations in four caridean decapods (Crustacea): Size relationships. *Hydrobiologia*, 346, 1–9.

Adams S.M., (2002). Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, USA, p. 647.

Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., (2004). Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 174(6).

Albornoz, C. B., Larsen, K., Landa, R., Quiroga, M. A., Najle, R., Marcovecchio, J., (2016). Lead and zinc determinations in *Festuca arundinacea* and *Cynodon dactylon* collected from contaminated soils in Tandil (Buenos Aires Province, Argentina). *Environmental Earth Sciences*, 75(9).

Ale, A., Liberatori, G., Vannuccini, M. L., Bergami, E., Ancora, S., Mariotti, G., Bianchi, N., Galdopóra, J.M., De Simone, M.F., Cazenave, J., Corsi, I., (2019). Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 211, 46-56.

Ali, M. M., Islam, Md. S., Islam, A. R. Md. T., Bhuyan, Md. S., Ahmed, A. S. S., Rahman, Md. Z., Rahman, Md. M., (2022). Toxic metal pollution and ecological risk assessment in water and sediment at ship breaking sites in the Bay of Bengal Coast, Bangladesh. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113274. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2021.113274>

Aljahdali, M.O., Alhassan, A.B., (2020). Ecological risk assessment of heavy metal contamination in mangrove habitats, using biochemical markers and pollution indices: A case study of *Avicennia marina L.* in the Rabigh lagoon, Red Sea. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 1174–1184

Allison, E.H., Perry, A.L. Badjeck, M.-C., Neil Adger, W., Brown, K., Conway, K., D. Halls, A.S., Pilling, G.M., Reynolds, J.D., Andrew, N.L., Dulvy, N.K., (2009). Vulnerability of national economies to the impacts of climate change on fisheries. *Fish and Fisheries*, 10(2), 173–196.

Alsop, D., & Wood, C. M., (2011). Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 385–393.

Álvaro, N. V., Neto, A. I., Couto, R. P., Azevedo, J. M. N., Rodrigues, A. S., (2016). Crabs tell the difference – Relating trace metal content with land use and landscape attributes. *Chemosphere*, 144, 1377–1383.

Amaral, C.R.M., de Freitas Rebelo, M., Paulo Machado Torres, J., Pfeiffer, C.W., (2005). Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) transplanted to and from a contaminated tropical coastal lagoon. *Marine Environmental Research* 59(4), 277–285.

Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P., (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 160–202.

Anacleto, P., Maulvault, A.L., Nunes, M.L., Carvalho, M.L., Rosa, R., Marques, A., (2015). Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs. *Food Control*, 47, 493–501.

Andrade, S., Pucci, A.E., Marcovecchio, J.E., (2000). Cadmium concentrations in the Bahía Blanca estuary (Argentina). Potential effects of dissolved cadmium on the diatom *Thalassiosira curviseriata*. *Oceanologia*, 43, 505-520.

Andrade, V.S., Wiegand, C., Pannard, A., Gagneten, A.M., Pédrot, M., Bouhnik Le Coz, M., Piscart, C., (2019). How can interspecific interactions in freshwater benthic macroinvertebrates modify trace element availability from sediment? *Chemosphere*, 125594, 125594.

Angeletti, S., (2017). Efecto bioturbador del cangrejo *Neohelice granulata* sobre la distribución y transporte de sedimento en ambientes intermareales próximos al límite sur de su distribución geográfica: Un estudio poblacional comparado. Tesis Doctoral, UNS, Bahía Blanca, p. 180.

Angeletti, S., Cervellini, P.M., Lescano, L., (2018a). Burrowing activity of the *Neohelice granulata* crab (Brachyura, Varunidae) in southwest Atlantic intertidal areas. *Ciencias Marinas*, 44(3), 155–167.

Angeletti, S., Pierini, J.O., Cervellini, P.M., (2018b). Suspended sediment contribution resulting from bioturbation in intertidal sites of a SW Atlantic mesotidal estuary: data analysis and numerical modelling. *Scientia Marina*, 82(4), 245-256.

APHA (1998). En: Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D., (Eds.). Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington (USA).

Arias, A.H., Vázquez-Botello, A., Díaz, G., Marcovecchio, J.E., (2013). Accumulation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Navigation Channels, Harbors and Industrial Areas of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *International Journal of Environmental Research*, 7(4), 925-936.

Arini, A., Daffe, G., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., Baudrimont, M., (2014) Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): A one-year depuration experiment. *Environmental Pollution*, 192, 74–82.

Anot, J. A., & Gobas, F. A., (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 14(4), 257–297.

Arya S., Trivedi J.N., Vachhrajani K.D., (2014). Brachyuran Crabs as a Biomonitoring tool: A Conceptual Framework for Chemical Pollution Assessment. *International Research Journal of Environment Sciences*, 3(1), 49-57

Atkinson, M.J. & Bingman, C., (1997). Elemental composition of commercial seasalts. *Journal of Aquarium and Aquatic Science*, 8(2), 39-43.

Atkinson, C.A., Jolley, D.F., Simpson, S.L., (2007). Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments. *Chemosphere*, 69(9), 1428-1437 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.068>

ATSDR, (1994). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. E.E.U.U. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/es>

Baden, S.P., Eriksson, S.P., Weeks, J.M., (1995). Uptake, accumulation and regulation of manganese during experimental hypoxia and normoxia by the decapod *Nephrops norvegicus* (L.). *Marine Pollution Bulletin*, 31, 93-102.

Baden, S.P., & Eriksson, S.P., (2006). Role, Routes and Effects of Manganese in Crustaceans. En: Gibson, R.N., Atkinson, R.J.A., Gordon, J.D.M., (Eds.). *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Taylor & Fancis, 44, 61-83.

Barakat, A., El Baghdadi, M., Rais, J., Nadem, S., (2012). Assessment of heavy metal in surface sediments of day river at Beni-Mellal Region, Morocco. *Research Journal Environmental Earth Sciences*, 4(8), 797–806

Barboza, N. R., Guerra-Sá, R., Leão, V. A., (2016). Mechanisms of manganese bioremediation by microbes: an overview. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(11), 2733–2739. doi:10.1002/jctb.4997

Barletta, M., Lima, A. R. A., Costa, M. F., (2019). Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Science of The Total Environment*, 651, 1199–1218.

Barutot, R.A., D'Incao, F., Fonseca, D.R., (2011). Natural diet of *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Crustacea, Varunidae) in two salt marshes of the estuarine region of the Lagoa dos Patos lagoon. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1), 91-98

Bas, C., Nuñez, J., Spivak, E., Luppi, T., (2019). Inter-population differences in feeding ecology under nitrogen-limited diets: Field growth and the role of cannibalism in limiting/improving reserve accumulation. *Marine Ecology*, e12547.

Bastami, A.A., Khoei, J.K., Esmailian, M., (2012). Bioaccumulation of Heavy Metals in Sediment and Crab, *Portunus pelagicus* from Persian Gulf, Iran. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 12 (6), 886-892.

Beliaeff, B. & Burgeot, T., (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316–1322.

Bellincampi, D., Dipierro, N., Salvi, G., Cervone, F., De Lorenzo, G., (2000). Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 122, 1379–1385

Beltrame, M. O., De Marco, S. G., Marcovecchio, J. E., (2008). Cadmium and Zinc in Mar Chiquita Coastal Lagoon (Argentina): Salinity Effects on Lethal Toxicity in Juveniles of the Burrowing Crab *Chasmagnathus granulatus*. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 55(1), 78–85.

Beltrame, M. O., De Marco, S. G., Marcovecchio, J. E., (2009). Influences of Sex, Habitat, and Seasonality on Heavy-Metal Concentrations in the Burrowing Crab

(*Neohelice granulata*) From a Coastal Lagoon in Argentina. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 58(3), 746–756.

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(3), 531–536.

Beltrame, M. O., De Marco, S. G., Marcovecchio, J. E. (2011). The burrowing crab *Neohelice granulata* as potential bioindicator of heavy metals in estuarine systems of the Atlantic coast of Argentina. Environmental Monitoring and Assessment, 172(1-4), 379–389.

Ben-Khedher, S., Jebali, J., Houas, Z., Nawéli, H., Jrad, A., Banni, M., Boussetta, H., (2013). Metals bioaccumulation and histopathological biomarkers in *Carcinus maenas* crab from Bizerta lagoon, Tunisia. Environmental Science and Pollution Research, 21(6), 4343–4357.

Berasategui, A.A., Biancalana, F., Fricke, A., Fernández Severini, M.D., Uibrig, R., Dutto, M.S., Marcovecchio, J. E., Calliari, D.L., Hoffmeyer M.S., (2018). The impact of sewage effluents on the fecundity and survival of *Eurytemora americana* in a eutrophic estuary of Argentina. Estuarine and Coastal Shelf Science, 211, 208 – 216.

Bertrand, L., Monferrán, M.V., Métais, I., Mouneyrac, C., Amé, M.V., (2015). Subcellular distribution of zinc and associated metallothioneins induction in a freshwater decapod crustacean of South America, *Palaemonetes argentinus*. Ecological Indicators, 48, 533-541.

Bertrand, L., Monferrán, M.V., Mouneyrac, C., Bonansea, R.I., Asis, R., Amé, M.V., (2016). Sensitive biomarker responses of the shrimp *Palaemonetes argentinus* exposed to chlorpyrifos at environmental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins. Aquatic Toxicology, 179, 72-81

Blasina, G. E., Barbini, S. A., Díaz de Astarloa, J. M., (2010). Trophic ecology of the black drum, *Pogonias cromis* (Sciaenidae), in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina). Journal of Applied Ichthyology, 26(4), 528–534.

Blasina, G. E., Ronda, A. C., Botté, S. E., Molina, J. M., Labudía, A. C., Marcovecchio, J. E., Lopez-Cazorla, A., (2020). Metabolic and physiological responses of a coastal fish in highly and lightly impacted habitats. Journal of Marine Systems, 103423.

Blewett, T. A., Glover, C. N., Fehsenfeld, S., Lawrence, M. J., Niyogi, S., Goss, G. G., Wood, C. M., (2015). Making sense of nickel accumulation and sub-lethal toxic effects in saline waters: Fate and effects of nickel in the green crab, *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology*, 164, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.010>

Blewett, T. A., Leonard, E. M., (2017). Mechanisms of nickel toxicity to fish and invertebrates in marine and estuarine waters. *Environmental Pollution*, 223, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.028>

Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254

Broeg, K., Lehtonen, K., (2006) Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multibiomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 508–522.

Brooks, M. L., Fleishman, E., Brown, L. R., Lehman, P. W., Werner, I., Scholz, N., Mitchelmore, C., Lovvorn, J.R., Johnson, M.L., Schlenk, D., van Drunick, S., Drever, J., Stoms, D.M., Parker, A.E., Dugdale, R., (2011). Life Histories, Salinity Zones, and Sublethal Contributions of Contaminants to Pelagic Fish Declines Illustrated with a Case Study of San Francisco Estuary, California, USA. *Estuaries and Coasts*, 35(2), 603–621.

Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* 66(3), 267–278.

Bryan, G. W., (1980). Recent trends in research on heavy-metal contamination in the sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 33(1-4), 6–25.

Bryan, G. W., & Langston, W. J., (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental Pollution*, 76(2), 89–131.

Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F., (2008). Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, 89(4), 257–266.

Borja, Á., Dauer, D. M., Elliott, M., Simenstad, C. A., (2010). Medium- and Long-term Recovery of Estuarine and Coastal Ecosystems: Patterns, Rates and Restoration Effectiveness. *Estuaries and Coasts*, 33(6), 1249–1260.

Bortolus, A., Carlton, J. T., Schwindt, E., (2015). Reimagining South American coasts: unveiling the hidden invasion history of an iconic ecological engineer. *Diversity and Distributions*, 21, 1267–1283.

Botté, S.E., (2005). El rol de la vegetación en el ciclo biogeoquímico de metales pesados, en humedales del estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral, UNS, Bahía Blanca, p. 290.

Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., Fernández Severini, M.D., Negrin, V.L., Panebianco, M.V., Simonetti, P., Buzzi, N., Delucchi F., (2013). Ciclo de metales pesados. En: Marcovecchio, J.E. & Freije, H. (Eds.). *Procesos Químicos en Estuarios, Bahía Blanca*, 227-258.

Botto, F., Valiela, I., Iribarne, O., Martinetto, P., Alberti, P., (2005). Impact of burrowing crabs on C and N sources, control, and transformations in sediments and food webs of SW Atlantic estuaries. *Marine Ecology Progress Series*, 293, 155-164.

Botto, F., Gaitán, E., Mianzan, H., Acha, M., Giberto, D., Schiariti, A., Iribarne, O., (2011). Origin of resources and trophic pathways in a large SW Atlantic estuary: An evaluation using stable isotopes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(1), 70–77.

Buccolieri, A., Buccolieri, G., Cardellicchio, N., Dell'Atti, A., Leo, A., Maci, A., (2006). Heavy metals in marine sediments of Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy). *Marine Chemistry*, 99, 227–235

Buchman, M.F., (1999). NOAA Screening Quick Reference Tables, NOAA. HAZMAT. Report 99-1, Seattle WA. Coastal Protection and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, p. 12

Burdige, D.J., (2011). Estuarine and Coastal Sediments – Coupled Biogeochemical Cycling. En: Leane, R., & Middelburg, J.J. (Eds.). *Treatise on Estuarine and Coastal Science vol. 5, Biogeochemistry*. Academic Press, pp. 279-316.

Buzzi, N.S., Marcovecchio, J.E., (2016). A baseline study of the metallothioneins induction and its reversibility in *Neohelice granulata* from the Bahía Blanca estuary (Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 112(1–2), 452–458

Buzzi, N.S., Oliva, A.L., Arias, A.H., Marcovecchio, J.E., (2017). Assessment of trace metal accumulation in native mussels (*Brachidontes rodriguezii*) from a South American temperate estuary. *Environmental Science and Pollution Research* 24(18), 15781–15793.

Buzzi, N.S., Marcovecchio, J.E., (2018). Heavy metal concentrations in sediments and in mussels from Argentinean coastal environments, South America. *Environmental Earth Science*, 77, 1–13.

Buzzi, N.S., Fernández, E.M., Fernández Severini, M.D., Truchet, D.M., Gilabert, A.S., Villagran, D.M., Spetter, C.V., (2021). Environmental quality assessment by multiple biogeochemical indicators of an intertidal flat under anthropogenic influence from the southwest of Buenos Aires (Argentina). *Environmental Earth Science*, 80, 256.

Cairo, S., Costa, M. H., Ramos, T. B., Fernandes, F., Silveira, N., Coimbra, A., Medeiros, G., Painho, M., (2005). Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecological Indicators*, 5(2), 151–169.

Cairo, S., Costa, M. H., DelValls, A., Repolho, T., Gonçalves, M., Mosca, A., Coimbra, A.P., Ramos, T.B., Painho, M., (2009). Ecological risk assessment of sediment management areas: application to Sado Estuary, Portugal. *Ecotoxicology*, 18(8), 1165–1175.

Capparelli, M.V., Abessa, D.M., McNamara, J.C., (2016). Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 185–186, 102–111

Capparelli, M.V., Bordon, I.C., Araujo, G., Gusso-Choueri, P.K., Sousa Abessa, D.M., Campbell McNamara, J., (2019a) Combined effects of temperature and copper on oxygen consumption and antioxidant responses in the mudflat fiddler crab *Minuca rapax* (Brachyura, Ocypodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 223, 35–41.

Capparelli, M. V., Gusso-Choueri, P. K., de Souza Abessa, D. M., McNamara, J.C., (2019b). Seasonal environmental parameters influence biochemical responses of the fiddler crab *Minuca rapax* to contamination in situ. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*.

Capparelli, M.V., McNamara, J.C., Grosell, M.G., (2020). Tissue Accumulation and the Effects of Long-Term Dietary Copper Contamination on Osmoregulation in the

Mudflat Fiddler Crab *Minuca rapax* (Crustacea, Ocypodidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.

Carriquiriborde, P., (2021). Biodisponibilidad, biotransformación, bioacumulación y biomagnificación. En: Carriquiriborde, P. (Ed). Principios de Ecotoxicología. EDULP, La Plata, pp. 62-93.

Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. Ecological Indicators, 38, 104–112.

Cazenave, J., Amé, M.V., Menone, M.L., (2021). Biomarcadores de Contaminación. En: Carriquiriborde, P. (Ed). Principios de Ecotoxicología. EDULP, La Plata, pp. 291-308.

Cenov, A., Perić, L., Glad, M., Žurga, P., Lušić, D.V., Traven, L., Bihari, N., (2018). A baseline study of the metallothioneins content in digestive gland of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* from Northern Adriatic Sea: Body size, season, gender and metal specific variability. Marine Pollution Bulletin, 131, 95–105. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.03.002

Chan, C. Y., Wang, W.-X., (2019). Biomarker responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* in relation to metal contamination patterns in the Pearl River Estuary, southern China. Environmental Pollution, 251, 264-276.

Chelomin, V.P., Zakhartsev, M.V., Kurilenko, A.V., Belcheva, N.N., (2005). An in vitro study of the effect of reactive oxygen species on subcellular distribution of deposited cadmium in digestive gland of mussel *Crenomytilus grayanus*. Aquatic Toxicology, 7, 181-189.

Chen, M.-H., Chen, C.-Y., Chou, H.-Y., Wen, T.-C., (2005). Gender and size effects of metal bioaccumulation on the rock crab, *Thalamita crenata*, in Dapeng Bay, southwestern Taiwan. Marine Pollution Bulletin, 50(4), 463–469.

Chen, C.-F., Chen, C.-W., Ju, Y.-R., Kao, C.-M., Dong, C.-D., (2018). Impact of disposal of dredged material on sediment quality in the Kaohsiung Ocean Dredged Material Disposal Site, Taiwan. Chemosphere, 191, 555–565.

Cheng, L., Zhou, J. L., Cheng, J., (2018). Bioaccumulation, tissue distribution and joint toxicity of erythromycin and cadmium in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Chemosphere, 210, 267–278.

Chiaramonte, G. E., & Pettovello, A. D., (2000). The biology of *Mustelus schmitti* in southern Patagonia, Argentina. *Journal of Fish Biology*, 57(4), 930–942.

Chiodi Boudet, L., Polizzi, P., Romero, M. B., Robles, A., Gerpe, M., (2013). Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 52–58.

Chiodi Boudet, L.N., Polizzi, P., Romero, M.B., Robles, A., Marcovecchio, J.E., Gerpe, M.S., (2015). Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium in white shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 231–240.

Chiodi Boudet, L., Mendieta, J., Romero, M. B., Dolagaratz Carricavur, A., Polizzi, P., Marcovecchio, J. E., Gerpe, M., (2019). Strategies for cadmium detoxification in the white shrimp *Palaemon argentinus* from clean and polluted field locations. *Chemosphere*, 236, 124224.

Claiborne, A., (1985). Catalase activity. En: Greenwald, R.A., (Ed.). *Book of methods in oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284

Comoglio, L., Amin, O., Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., (2011). Use of biomarkers in resident organisms as a tool for environmental monitoring in a cold coastal system, Tierra del Fuego Island. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 382–393.

Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Serafim, A., Almeida, C., Rocha, T., Lopes, B., Company, R., Medeiros, A., Norberto, R., Pereira, R., Araújo, O., Bebianno, M. J. (2012). A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal. *Marine Environmental Research*, 75, 23–34.

Cresswell, T., Mazumder, D., Callaghan, P. D., Nguyen, A., Corry, M., Simpson, S. L., (2017). Metal Transfer among Organs Following Short- and Long-Term Exposures Using Autoradiography: Cadmium Bioaccumulation by the Freshwater Prawn *Macrobrachium australiense*. *Environmental Science & Technology*, 51(7), 4054–4060.

Cuadrado, D.G., Ginsberg, S.S., Gómez, E., (2004). Geomorfología. En: Piccolo M.C., & Hoffmeyer M.S., (Eds.). *Ecosistema del estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía (IADO-CONICET), Bahía Blanca, Argentina, pp. 29-38

Das, A. P., Ghosh, S., Mohanty, S., Sukla, L. B., (2015). Advances in Manganese Pollution and Its Bioremediation. En: Sukla, L., Pradhan, N., Panda, S., Mishra, B. (Eds.) Environmental Microbial Biotechnology, pp. 313–328. doi:10.1007/978-3-319-19018-1\_16

De Almeida Duarte, L.F., Moreno, J. B., Catharino, M. G. M., Moreira, E. G., Trombini, C., Pereira, C. D. S., (2019). Mangrove metal pollution induces biological tolerance to Cd on a crab sentinel species subpopulation. Science of The Total Environment, 687, 768–779.

De Melo Gurgel, P., Navoni, J. A., de Morais Ferreira, D., do Amaral, V. S., (2016). Ecotoxicological water assessment of an estuarine river from the Brazilian Northeast, potentially affected by industrial wastewater discharge. Science of The Total Environment, 572, 324–332.

Delgado, A. L., Guinder, V. A., Dogliotti, A. I., Zapperi, G., Pratolongo, P. D., (2019). Validation of MODIS-Aqua bio-optical algorithms for phytoplankton absorption coefficient measurement in optically complex waters of El Rincón (Argentina). Continental Shelf Research, 173, 73–86.

Depledge, M. H., Forbes, T. L., Forbes, V. E., (1993). Evaluation of cadmium, copper, zinc, and iron concentrations and tissue distributions in the benthic crab, *Dorippe granulata* (De Haan, 1841) from Tolo Harbour, Hong Kong. Environmental Pollution, 81(1), 15–19.

Di Salvatore, P., Calcagno, J.A., Ortíz, N., Ríos de Molina, M. del C., Sabatini, S.E., (2013). Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. Marine Environmental Research, 92, 244–252.

Ding, Z., Chen, X., Kong, Y., Shao, X., Zhang, Y., Ye, J., (2020) Dietary manganese requirement and its effects on antioxidant enzyme activities, intestinal morphology and microbiota in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan). Aquaculture 516, 734622.

Diodato, S., Comoglio, L., Camilion, C., Amin, O., Marcovecchio, J.E., (2021). Integrated biomarker response in *Mytilus chilensis* exposed to untreated urban discharges along the coast of Ushuaia Bay (Beagle Channel, Argentina). Environmental Science and Pollution Research

Dolagaratz Carricavur, A., Chiodi Boudet, L., Romero, M. B., Polizzi, P., Marcovecchio, J. E., Gerpe, M., (2018). Toxicological responses of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute, subchronic and chronic exposure to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 217–224. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.11.048

Duarte, C.A., Giarratano, E., Amin, O.A., Comoglio, L.I., (2011). Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1895–1904.

Duodu, G. O., Goonetilleke, A., Ayoko, G. A., (2017). Potential bioavailability assessment, source apportionment and ecological risk of heavy metals in the sediment of Brisbane River estuary, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1-2), 523–531.

Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.-C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., (2007). Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*, 148(2), 445–458.

Eça, G. F., Pedreira, R.M.A., Hatje, V., (2013). Trace and major elements distribution and transfer within a benthic system: Polychaete *Chaetopterus variopedatus*, commensal crab *Polyonyx gibbesi*, worm tube, and sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 32–41.

El-Gamal, M.M., (2011). The effect of depuration on heavy metals, petroleum hydrocarbons, and microbial contamination levels in *Paphia undulata* (Bivalvia: Veneridae). *Czech Journal of Animal Science*, 56 (8),345–354.

Engel, D.W., Brouwer, M., (1984). Trace-metal binding proteins in marine mollusks and crustaceans. *Marine Environmental Research*, 13, 177-194.

EPA, Environmental Protection Agency's., (2016). Definition and procedure for the determination of the method detection limit, 40 CFR136 Appendix B; Revision 2, EPA Office of Water, EPA 821-R-16-006

Espósito, G., (1986). Etrude geomorphologique de la zona El Rincón (Argentina). Docteur 3 Cycle Thesis Université Paris-Sud.

Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S., (2000). Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology*, 49, 243–250

Federal Register., (1984). Definition and procedure for determination of the method detection limit. EPA, 40 CFR Part 136, Appendix B, Revision 1.11 1 (11), pp. 198–199

Fernández, E. M., Spetter, C. V., Martinez, A. M., Cuadrado, D. G., Avena, M. J., Marcovecchio, J.E., (2016). Carbohydrate production by microbial mats communities in tidal flat from Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Environmental Earth Science*, 75(8).

Fernández Severini, M.D., Botté, S.E., Hoffmeyer, M.S., Marcovecchio, J.E., (2009). Spatial and temporal distribution of cadmium and copper in water and zooplankton in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85, 57–66.

Fernández Severini, M.D., Botté, S.E., Hoffmeyer, M.S., Marcovecchio, J.E., (2011). Lead concentrations in zooplankton, water, and particulate matter of a southwestern Atlantic temperate estuary (Argentina). *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 61(2), 243-260.

Fernández Severini, M. D., Hoffmeyer, M. S., Marcovecchio, J. E., (2013). Heavy metals concentrations in zooplankton and suspended particulate matter in a southwestern Atlantic temperate estuary (Argentina). *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(2), 1495–1513.

Fernández Severini, M.D., Villagran, D.M., Biancalana, F., Berasategui, A.A., Spetter, C.V., Tartara, M.N., Menéndez, M.C., Guinder, V.A., Marcovecchio, J.E., (2017). Heavy Metal Concentrations Found in Seston and Microplankton from an Impacted Temperate Shallow Estuary along the Southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Coastal Research*, 33, 1196-1209.

Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M. A., (2006). The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. *Marine Environmental Research*, 61(3), 326–338.

Ferreira, C.P., Piazza, T.B., Souza, P., Lima, D., Mattos, J.J., Saldaña-Serrano, M., Piazza, R.S., Jorge, M.B., Bianchini, A., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Montone, R.C.,

Bícego, M.C., Bainy, A.C.D., Lüchman, K.H., (2021). Integrated biomarker responses in oysters *Crassostrea gasar* as an approach for assessing aquatic pollution of a Brazilian estuary. *Marine Environmental Research*, 165, 105252

Ferrer, L. D., Santiago Andrade, J., Contardi, E. T., Asteasuain, R. O., Marcovecchio, J. E., (2003). Copper and zinc concentrations in Bahía Blanca Estuary (Argentina), and their acute lethal effects on larvae of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 15(1), 7–14.

Ferrer, L., Andrade, S., Asteasuain, R., & Marcovecchio, J. (2006). Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 209–217.

Ferreya, H., Romano, M., Beldomenico, P., Caselli, A., Correa, A., Uhart, M., (2014). Lead gunshot pellet ingestion and tissue lead levels in wild ducks from Argentine hunting hotspots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 103, 74–81.

Ferreya, H., Beldomenico, P. M., Marchese, K., Romano, M., Caselli, A., Correa, A. I., Uhart, M., (2015). Lead exposure affects health indices in free-ranging ducks in Argentina. *Ecotoxicology*, 24(4), 735–745.

Ferronato, C., Guinder, V.A., Chidichimo, M.P., López Abbate, M.C., Amodeo, M., (2021). Zonation of protistan plankton in a productive area of the Patagonian shelf: Potential implications for the anchovy distribution. *Food Webs*, 29, e00211 doi: 10.1016/j.fooweb.2021.e00211.

Figueira, E., Cardoso, P., Freitas, R., (2012). *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium: Toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 80–86.

Filiciotto, F., Sal Moyano, M. P., de Vincenzi, G., Hidalgo, F., Sciacca, V., Bazterrica, M. C., Corrias, V., Lorusso, M., Mazzola, S., Buscaino, G., Gavio, M. A., (2018). Are semi-terrestrial crabs threatened by human noise? Assessment of behavioural and biochemical responses of *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) in tank. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 24–34.

Foguelman, D., & Brailovsky, A.E., (2009). Memoria Verde: Historia Ecológica de la Argentina. Editorial Sudamericana, Buenos Aires, p. 352.

Forero López, A.D., Truchet, D.M., Rimondino, G.N., Maisano, L., Spetter, C.V., Buzzi, N.S., Nazzarro, M.S., Malanca, F.E., Furlong, O., Fernández Severini, M.D., (2021a). Microplastics and suspended particles in a strongly impacted coastal environment: Composition, abundance, surface texture, and interaction with metal ions. *Science of the Total Environment*

Forero López, A.D., Rimondino, G.N., Truchet, D.M., Colombo, C.V., Buzzi, N.S., Malanca, F.E., Spetter, C.V., Fernández Severini, M.D., (2021b). Occurrence, distribution, and characterization of suspended microplastics in a highly impacted estuarine wetland in Argentina. *Science of the Total Environment*.

Förstner, U. & Wittmann, G.T.W., (1979). *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, p. 486.

Förstner, U., Ahlf, W., Calmano, W., Kersten, M., Salomons, W., (1986). Mobility of Heavy Metals in Dredged Harbor Sediments. En: Sly, P.G. (Ed.) *Sediments and Water Interactions*. Springer, New York, pp. 371–380.

Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10(5), 360–375.

Freije, H., & Marcovecchio, J.E., (2004). *Oceanografía Química*. En: Piccolo, M.C., & Hoffmeyer, M., (Eds.). *Ecosistema del estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía (IADO-CONICET), Bahía Blanca, Argentina, pp. 69-68.

Freije, H., Spetter, C.V., Marcovecchio, J.E., Popovich, C., Botté, S.E., Negrin, V.L., Arias, A.H., Delucchi, F., Astasuain, R., (2008). Water chemistry and nutrients of the Bahía Blanca Estuary. En: Neves, R., Barreta, J., Mateus, M. (Eds.). *Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America*. IST Press, Lisboa, pp. 243-256.

Frías-Espericueta, M. G., Bautista-Covarrubias, J. C., Osuna-Martínez, C. C., Delgado-Alvarez, C., Bojórquez, C., Aguilar-Juárez, M., Roos-Muñoz, S., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F. (2022). Metals and oxidative stress in aquatic decapod crustaceans: A review with special reference to shrimp and crabs. *Aquatic Toxicology*, 242.

Gagné, F., André, C., Blaise, C., (2008). The Dual Nature of Metallothioneins in the Metabolism of Heavy Metals and Reactive Oxygen Species in Aquatic Organisms: Implications of Use as a Biomarker of Heavy-Metal Effects in Field Investigations. *Biochemical Insights*, 1.

Gagneten, A. M., Gervasio, S., Paggi, J. C., (2007). Heavy Metal Pollution and Eutrophication in the Lower Salado River Basin (Argentina). *Water, Air, and Soil Pollution*, 178(1-4), 335–349.

Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., (2011). Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 62(6), 1337–1344.

Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., (2013). Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 111–119.

Giarratano E., Gil M.N., Marinho, C.H., Malanga, G., (2016). Metals from mine waste as potential cause of oxidative stress in burrowing crab *Neohelice granulata* from San Antonio bay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 68–76.

Gil, M.N., Torres, A., Harvey, M., Esteves, J.L., (2006). Heavy metals in marine organisms from the coastal zone of Continental Argentine Patagonia. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 41(2), 167-176.

Girones, L., Arias, A. H., Oliva, A. L., Recabarren-Villalon, T., Marcovecchio, J. E., (2019). Occurrence and spatial distribution of organochlorine pesticides in the southwest Buenos Aires using the freshwater snail *Chilina parchappii* as environmental biomonitor. *Regional Studies in Marine Science*.

Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F., (2008). An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 65(1), 34–49.

Grecco, L.E., Marcos, A.O., Gómez, E.A., Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., (2006). Natural and Anthropogenic Input of Heavy Metals in Sediments from Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Journal of Coastal Research*, 39, 1021 – 1025.

Grecco, L.E., Gómez, E.A., Botté, S.E., Marcos, A.O., Marcovecchio, J.E., Cuadrado, D.G., (2010). Natural and anthropogenic heavy metals in estuarine cohesive sediments: geochemistry and bioavailability. *Ocean Dynamics*, 61, 285–29.

Gu, Y. G., Li, Q. S., Fang, J. H., He, B. Y., Fu, H. B., Tong, Z. J., (2014). Identification of heavy metal sources in the reclaimed farmland soils of the pearl river

estuary in China using a multivariate geostatistical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105, 7–12.

Guo, W., Liu, W., Liu, Z., Li, G., (2010). Pollution and potential ecological risk evaluation of heavy metals in the sediments around Dongjiang harbor, Tianjin. *Procedia Environmental Sciences*, 2, 729–736.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., (1974). Glutathione S transferases. The first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139

Häder, D.-P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., Helbling, E. W., 2020. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of the Total Environment*, 136586.

Hakanson, L., (1980). An ecological risk index for aquatic pollution control: A sedimentological approach. *Water Research*, 14, 975–1001

He, Y., Men, B., Yang, X., Li, Y., Xu, H., Wang, D., (2018). Relationship between heavy metals and dissolved organic matter released from sediment by bioturbation/bioirrigation. *Journal of Environmental Sciences*, 75, 216 – 223.

Hedge, L.H., Knott, N.A., Johnston, E.L., (2009). Dredging related metal bioaccumulation in oysters. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 832–840

Hempel, M., Botté, S. E., Negrin, V. L., Chiarello, M. N., Marcovecchio, J. E., (2008). The role of the smooth cordgrass *Spartina alterniflora* and associated sediments in the heavy metal biogeochemical cycle within Bahía Blanca estuary salt marshes. *Journal of Soils Sediments*, 8(5), 289–297.

Heredia Chaz, E. (2014). De la responsabilidad a la contaminación social empresaria: la ingeniería social del Polo Petroquímico de Bahía Blanca (Tesina para optar por el título de Licenciada en Historia). Recuperado de <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/2961/1/Heredia%20Chaz,%20Emilce.%20Tesina.pdf>

Hobbie, J.E., (Ed.). 2000. *Estuarine science: A synthetic approach to research and practice*. Island Press, 539 p.

Hu, W., Wang, H., Dong, L., Huang, B., Borggaard, O. K., Bruun Hansen, H. C., He, H., Holm, P. E., (2018). Source identification of heavy metals in peri-urban

agricultural soils of southeast China: An integrated approach. *Environmental Pollution*, 237, 650–661

Huang, S. S., Liao, Q. L., Hua, M., Wu, X. M., Bi, K. S., Yan, C. Y., Chen, X. Y., Zhang, X. Y., (2007). Survey of heavy metal pollution and assessment of agricultural soil in Yangzhong district, Jiangsu Province, China. *Chemosphere*, 67(11), 2148–2155.

Ibrahim, M.I.A., Mohamed, L.A., Mahmoud, M.G., Shaban, K.S., Fahmy, M.A., Ebeid, M. H., (2020). Potential ecological hazards assessment and prediction of sediment heavy metals pollution along the Gulf of Suez, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*.

Idaszkin, Y. L., Márquez, F., Mateos-Naranjo, E., Pollicelli, M. de la P., Saraví Cisneros, H., (2019). Multidimensional approach to evaluate *Limonium brasiliense* as source of early biomarkers for lead pollution monitoring under different saline conditions. *Ecological Indicators*, 104, 567–575.

Islam, M.S., Hossain, M.B., Matin, A., Islam Sarker, M.S., (2018). Assessment of heavy metal pollution, distribution and source apportionment in the sediment from Feni River estuary, Bangladesh. *Chemosphere*.

Jesus, W.B., de Sousa Oliveira Mota Andrade, T., Soares, S.H., Pinheiro-Sousa, D.B., de Oliveira, S.R.S., Torres, H.S., dos Santos Protazio, G., da Silva, D.S., Silva Santos, D.M., Carvalho Neta, A.V., Anjos Benjamin, L.C., Carvalho Neta, R.N.F., (2021). Biomarkers and occurrences of heavy metals in sediment and the bioaccumulation of metals in crabs (*Ucides cordatus*) in impacted mangroves on the Amazon coast, Brazil. *Chemosphere*, 271, 129444,

Jerome, F. C., Hassan, A., Omoniyi-Esan, G. O., Odujoko, O. O., Chukwuka, A. V., (2017). Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of *Callinectes amnicola* exposed to industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 179–193. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.032>

Kalman, J., Buffet, P. E., Amiard, J. C., Denis, F., Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C. (2010). Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Biomarkers*, 15(5), 461–469.

Khan, F.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., (2012). Copper and zinc detoxification in *Gammarus pulex* (L.). *Journal of Experimental Biology* 215(5), 822–832.

Kopprio, G. A., Biancalana, F., Fricke, A., Garzón Cardona, J. E., Martínez, A., Lara, R. J., (2015). Global change effects on biogeochemical processes of Argentinian estuaries: An overview of vulnerabilities and ecohydrological adaptive outlooks. *Marine Pollution Bulletin*, 91(2), 554–562.

La Colla, N. S., Negrin, V. L., Marcovecchio, J. E., Botté, S. E., (2015). Dissolved and particulate metals dynamics in a human impacted estuary from the SW Atlantic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 166, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.05.009>

La Colla, N.S., Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., (2017). Tracing Cr, Pb, Fe and Mn occurrence in the Bahía Blanca estuary through commercial fish species, *Chemosphere*

La Colla, N. S., Botté, S. E., Negrin, V. L., Serra, A. V., Marcovecchio, J. E. (2018a). Influence of human-induced pressures on dissolved and particulate metal concentrations in a South American estuary. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(9), 532.

La Colla, N. S., Botté, S. E., Fiori, S. M., Dos Santos, E. P., Labudía, A. C., (2018b). First records of metal concentrations in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from a Southwest Atlantic estuary. *Environmental Geochemistry and Health*.

La Colla, N. S., Botté, S. E., Marcovecchio, J. E., (2018c). Metals in coastal zones impacted with urban and industrial wastes: Insights on the metal accumulation pattern in fish species. *Journal of Marine Systems*, 181, 53–62.

La Colla, N. S., Botté, S. E., Marcovecchio, J. E., (2019). Mercury cycling and bioaccumulation in a changing coastal system: From water to aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 40–50.

La Sala, L. F., Petracci, P. F., Smits, J. E., Botté, S., Furness, R. W., (2010). Mercury levels and health parameters in the threatened Olrog's Gull (*Larus atlanticus*) from Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 181(1-4), 1–11.

Lafabrie, C., Pergent. G., Kantin, R., Pergent-Martini, C-, González, J.L., (2007). Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species--validation of the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere*, 68

Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S., Simoniello, M. F., Colussi, C. L., Cuzziol Boccioni, A.P., Sigrist, M., (2019). First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10), e02601.

Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Lener, G., Cuzziol Boccioni, A. P., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C. S., Demonte, L. D., Repetti, M. R., (2022). Glyphosate and glufosinate ammonium, herbicides commonly used on genetically modified crops, and their interaction with microplastics: Ecotoxicity in anuran tadpoles. *Science of the Total Environment*, 804.

Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S., (2000). Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246(2), 259–279.

Li, X., Liu, L., Wang, Y., Luo, G., Chen, X., Yang, X., Gao, B., He, X., (2012). Integrated Assessment of Heavy Metal Contamination in Sediments from a Coastal Industrial Basin, NE China. *PLoS ONE*, 7(6), e39690.

Limbozzi, F., Leitao, T.E., (2008). Characterization of Bahia Blanca main existing pressures and their effects on the state indicators for surface and groundwater quality. En: Neves, R., Baretta, J.W., Mateus, M. (Eds). *Perspectives on integrated coastal zone management in South America*. IST Press, Lisboa.

Lin, Y., Huang, J., Dahms, H.-U., Zhen, J., Ying, X., (2017). Cell damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* induced by cadmium. *Aquatic Toxicology*, 190, 190–198.

Liu, F., & Wang, W.-X., (2013). Facilitated Bioaccumulation of Cadmium and Copper in the Oyster *Crassostrea hongkongensis* Solely Exposed to Zinc. *Environmental Science & Technology*, 1670-1677.

Lompré, J., Malanga, G., Gil, M. N., Giarratano, E., (2019). Multiple-Biomarker Approach in a Commercial Marine Scallop from San Jose gulf (Patagonia, Argentina) for Health Status Assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 78(3), 451–462.

Long, E.R., Field, L.J., MacDonald, D.D., (1998). Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17,714–727

Long, E.R., (2000). Degraded Sediment Quality in U.S. Estuaries: A review of magnitude and ecological implications. *Ecological Applications*, 10 (2), 338–349

López Carnelo, L.G, de Miguez, S. R., Marbán, L. (1997). Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of The Total Environment*, 204(3), 245–250.

López Greco, L.S., & Rodríguez, E.M., (1999) Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine*, 40, 155–164.

López Greco, L.S., Sánchez, V., Nicoloso, G.L., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., (2001). Toxicity of cadmium and copper on larval and juvenile stages of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 41, 333–338.

Luppi, T., Spivak, E., Klaus, A., (2001). Experimental studies of predation and cannibalism in recruits of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29-48.

Luppi, T. A., Spivak, E. D., Bas, C. C., Anger, K., (2004). Molt and growth of an estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae), in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(5), 333–344. doi:10.1111/j.1439-0426.2004.00575.x

Luppi, T., Bas, C., Méndez Casariego, A. Albano, M., Lancia, J., Kittlein, M., Rosenthal, A., Farías, N., Spivak, E., Iribarne, O., (2013). The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus granulata*). *Helgoland Marine Research*, 67, 1–15.

Luo, J., Zhu, T., Wang, X., Cheng, X., Yuan, Y., Jin, M., Betancor, M.B., Tocher, D.R., Zhou, Q., (2021). Toxicological mechanism of excessive copper supplementation: Effects on coloration, copper bioaccumulation and oxidation resistance in mud crab *Scylla paramamosain*. *Journal of Hazardous Materials*, 395, 122600.

Lv, J., Hu, R., Wang, N., Zhu, L., Zhang, X., Yuan, X., Liu, B., (2021). Distribution and movement of heavy metals in sediments around the coastal areas under

the influence of multiple factors: A case study from the junction of the Bohai Sea and the Yellow Sea. *Chemosphere*, 278, 130352.

Marcovecchio, J.E., Obenat, S.M., Pérez, A., Moreno, V.J., (1986). Total mercury and lead contents in the biota at Mar Chiquita coastal lagoon, Province of Buenos Aires, Argentine Republic. *Journal of Shoreline Management*, 2, 207-222.

Marcovecchio, J.E., Moreno, V., Pérez, A., (1988a). Determination of heavy metal concentrations in biota of Bahía Blanca, Argentina. *Science of the Total Environment*, 75, 181-190

Marcovecchio, J.E., Moreno, V., Pérez, A. (1988b). Total mercury levels in marine organisms of the Bahía Blanca estuarine trophic web. En: Seelinger, U., de Lacerda, L.D., Patchineelam, S.R., (Eds.). *Metals in Coastal Environments of Latin America*. Springer Verlag, Heidelberg, pp.122-129

Marcovecchio, J.E., Moreno, V., Pérez, A. (1988c). The sole, *Paralichtys* sp., as an indicator species for heavy metal pollution in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Science of the Total Environment*, 75, 191-199.

Marcovecchio, J. E., Moreno, V. J., Bastida, R. O., Gerpe, M. S., Rodríguez, D. H. (1990). Tissue distribution of heavy metals in small cetaceans from the Southwestern Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 21(6), 299–304.

Marcovecchio, J.E., Moreno, V., Pérez, A. (1991). Heavy metals accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Marine Environmental Research* 31 (4), 263-274.

Marcovecchio, J.E., (1994). Trace metal residues in tissues of two crustacean species from the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 29, 65-73.

Marcovecchio, J.E., & Moreno, V., (1993). Evaluación del contenido de metales pesados en peces de la Bahía Samborombón. *Frente Marítimo*, 12, 139 – 146.

Marcovecchio, J.E., (2000). Land-based sources and activities affecting the marine environment at the Upper Southwestern Atlantic Ocean: an overview. *UNEP Regional Seas Reports & Studies* 170, p. 67.

Marcovecchio, J.E., (2004). The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as biological indicators of heavy metals pollution in La Plata River estuary (Argentina). *The Science of the Total Environment* 323 (1-3), 219-226.

Marcovecchio, J.E., Ferrer, L., (2005). Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Journal of Coastal Research*, 21, 826–834.

Marcovecchio, J., Botté, S., Fernández Severini, M. D., Delucchi, F., (2010). Geochemical Control of Heavy Metal Concentrations and Distribution Within Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Aquatic Geochemistry*, 16(2), 251–266.

Marcovecchio, J.E., Freije, R.H., Vázquez Botello, A., (2013). Estuarios: ¿ambientes adecuados para realizar estudios de contaminación? En: Marcovecchio, J.E., Freije R.H. (Eds). *Procesos Químicos en Estuarios*. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional (edUTecNe), Bahía Blanca, pp. 220-227.

Marcovecchio, J. E., Botté, S. E., Fernández Severini, M.D., (2016). Distribution and behavior of zinc in estuarine environments: an overview on Bahía Blanca estuary (Argentina). *Environmental Earth Science*, 75(16).

Marcovecchio J.E. Oliva, A.L., La Colla, N.S., Arias, A.H., Botté, S.E., Simonetti, P., Serra, A.V., Negrin, V.L., Ronda, A.C. Domini, C., (2021) Bahía Blanca Estuary: A Chemical Oceanographic Approach. In: Fiori S.M., Pratolongo, P.D. (Eds.) *The Bahía Blanca Estuary*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_4)

Marinho, C. H., Gil, M. N., Esteves, J. L., (2013). Distribution and origin of trace metals in sediments of a marine park (Northern San Jorge Gulf) from Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 72(1), 260–263.

Marinho, C. H., Giarratano, E., Gil, M. N., (2018). Metal biomonitoring in a Patagonian salt marsh. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(10).

Markert, B., Wünschmann, S., Marcovecchio, J.E., De Marco, S.G., (2013). Bioindicadores y biomonitores: definiciones, estrategias y aplicaciones. En: Marcovecchio, J.E., Freije R.H. (Eds). *Procesos Químicos en Estuarios*. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional (edUTecNe), Bahía Blanca, pp. 315-340.

Márquez, F., & Idaszkin, Y.L., (2021). Crab carapace shape as a biomarker of salt marsh metals pollution. *Chemosphere*, 276, 130195.

Martin, J.M., & Maybeck, M., (1979). Elemental mass-balance of material carried by major world rivers. *Marine Chemistry*, 7, 173–206.

Martín-Díaz, M. L., Blasco, J., Sales, D., Del Valls, T. A., (2008). Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environmental Pollution*, 151(3), 631–640.

Martinetto, P., Alemany, D., Botto, F., Mastrángelo, M., Falabella, V., Acha, E.M., Antón, G., Bianchi, A., Campagna, C., Cañete, G., Filippo, P., Iribarne, O., Laterra, P., Martínez, P., Negri, R., Piola, A.R., Romero, S.I., Santos, D., Saraceno, M., 2019. Linking the scientific knowledge on marine frontal systems with ecosystem services. *Ambio*.

Mayer, F. L., Versteeg, D. J., McKee, M. J., Folmar, L. C., Franey, R. L., McCume, D. C. and Rattner, B. A. (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. En: Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M., Bergman, H.L., (Eds). *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, Florida, pp. 5–86.

McDonald, S., Cresswell, T., Hassell, K., (2020). Bioaccumulation kinetics of cadmium and zinc in the freshwater decapod crustacean *Paratya australiensis* following multiple pulse exposures. *Science of The Total Environment*, 720, 137609.

Medesani, D.A., Greco, L.S.L., Rodríguez, E.M., (2004). Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Aquatic Toxicology*, 69(2), 165–174.

Melo, W.D., (2004). Origen del estuario de Bahía Blanca. En: Piccolo, M.C., & Hoffmeyer, M.S., (Eds). *El Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía (IADO-CONICET), Bahía Blanca, Argentina, pp. 21-27.

Mendez Casariego, A., Luppi, T., Iribarne, O., Daleo, P., (2011). Increase of organic matter transport between marshes and tidal flats by the burrowing crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* Dana in SW Atlantic salt marshes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 401(1-2), 110–117.

Menone, M. L., Miglioranza, K. S. B., Botto, F., Iribarne, O., Aizpún de Moreno, J. E., Moreno, V. J., (2006). Field accumulative behavior of organochlorine pesticides. The role of crabs and sediment characteristics in coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1717–1724.

Mohamad, F., (2008). Uptake of manganese into the exoskeleton of the swimming crab *Liocarcinus depurator* (L.) in relation to biomonitoring and biosorption. Doctoral Thesis. pp 250.

Monserat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 221–234.

Monserat, J.M., (2021). Capítulo 5: Estrés Oxidativo. En: Carriquiriborde, P. (Ed). *Principios de Ecotoxicología*. EDULP, La Plata, p. 116-125.

Montesarchio, L.A, Lizasoain, W.O., (1981). Dinámica sedimentaria de la denominada ría de Bahía Blanca. *Contribución Científica* 58. Instituto Argentino de Oceanografía, p. 208.

Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J., Rainbow, P., (2001). Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 129(3), 193–209.

Muniz, P., Marrero, A., Brugnoli, E., Kandratavicius, N., Rodríguez, M., Bueno, C., Venturini, N., Figueira, R.C.L., (2019). Heavy metals and As in surface sediments of the north coast of the Río de la Plata estuary: Spatial variations in pollution status and adverse biological risk. *Regional Studies in Marine Science*, 28, 100625

Müller, G., (1981). The heavy metal content of the sediments of the Neckar and its tributaries: An Inventory. *Chemical Zeitung*, 105,157–164

Negrin, V. L., Botté, S. E., Pratolongo, P. D., González Trilla, G., Marcovecchio, J. E., (2015). Ecological processes and biogeochemical cycling in salt marshes: synthesis of studies in the Bahía Blanca estuary (Argentina). *Hydrobiologia*, 774(1), 217–235.

Negrin, V. L., Teixeira, B., Godinho, R. M., Mendes, R., Vale, C., (2017). Phytochelatin and monothiols in salt marsh plants and their relation with metal tolerance. *Marine Pollution Bulletin*, 121(1-2), 78–84.

Negrin, V.L., Botté, S.E., La Colla, N.S., Marcovecchio, J.E., (2019). Uptake and accumulation of metals in *Spartina alterniflora* salt marshes from a South American estuary. *Science of The Total Environment*, 649, 808–820.

Negrin, V.L., Idaszkin, Y.L., Domini, C., Simonetti, P., Botté, S.E., (2021). Soil metal pollution assessment in *Sarcocornia* salt marshes in a South American estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 166, 112224

Negro, C.L., Collins, P., (2017). Histopathological effects of chlorpyrifos on the gills, hepatopancreas and gonads of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis*. Persistent effects after exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 116–122.

Negro, C. L., Iturburu, F. G., Mendieta, J., Menone, M. L., Collins, P., (2019). Are Oxidative Stress Biomarkers Sensitive to Environmental Concentrations of Chlorpyrifos Exposed to the Freshwater Crab, *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae)? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.

Neto, J. A. B., Gingele, F. X., Leipe, T., Brehme, I., (2006). Spatial distribution of heavy metals in surficial sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Geology*, 49(7), 1051–1063.

Newman, M.C., (2014). *Fundamentals of Ecotoxicology. The Science of Pollution*. Taylor & Francis, New York, 4<sup>th</sup> Edition, p. 664.

Noceti, M. B., (2017). ¿Reserva, puerto o ría? Conflicto socioambiental en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Etnografías Contemporáneas*, 3(4), 64-91.

Noceti, M.B., Truchet, D.M., Jaramillo Cuellar, S., (2021). Cuenta La Marea. Arte, saberes y prácticas de la pesca artesanal como reservorio de patrimonio cultural en zonas portuarias del estuario de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires Argentina. En: Chaliar, G., Noceti, M.B., Rohou, B. (Eds). *La Bahía de Todos los Puertos*. EdiUNS, Bahía Blanca, p. 134 – 153.

Núñez, J. D., Ribeiro, P. D., Ocampo, E. H., Luppi, T. A., (2018). *Neohelice granulata* burrow fidelity behaviour related to landscape heterogeneity. *Helgoland Marine Research*, 72(1). <https://doi.org/10.1186/s10152-018-0518-2>

Oliva, A. L., Quintas, P. Y., La Colla, N. S., Arias, A. H., Marcovecchio, J. E., (2015). Distribution, Sources, and Potential Ecotoxicological Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 69(2), 163–172.

Oliva, M., José Vicente, J., Gravato, C., Guilhermino, L., Dolores Galindo-Riaño, M., (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the

impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75, 151–162.

Parodi, E.R., (2004). Marismas y algas bentónicas. En: Piccolo, M.C., Hoffmeyer, M.S. (Eds.), *Ecosistemas del Estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía (IADO, CONICET-UNS), Bahía Blanca, pp. 101–107

Pan, J., Bournod, C.N., Pizani, N.V., Cuadrado, D.G., Carmona, N.V., (2013). Characterization of microbial mats from a siliciclastic tidal flat (Bahía Blanca Estuary, Argentina). *Geomicrobiological Journal*, 30, 665–674

Panebianco, M. V., Botté, S.E., Negri, M. F., Marcovecchio, J. E., Cappozzo, H. L., (2011). Heavy Metals in Liver of the Franciscana Dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from the Southern Coast of Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 7(1), 33-41.

Panebianco, M. V., Negri, M. F., Botte, S. E., Marcovecchio, J. E., Cappozzo, H. L., (2013). Essential and non-essential heavy metals in skin and muscle tissues of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) from the southern Argentina coast. *Chemistry and Ecology*, 29(6), 511–518

Pedersen, S.N., Lundebye, A.-K. (1996) Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal estuary (UK). *Marine Environmental Research* 42(1-4), 241–246.

Pedersen, S. N., Lundebye, A.-K., Depledge, M. H., (1997). Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology*, 37(2-3), 183–200.

Pereira, P., de Pablo, H., Dulce Subida, M., Vale, C., Pacheco, M., (2009). Biochemical responses of the shore crab (*Carcinus maenas*) in a eutrophic and metal-contaminated coastal system (Óbidos lagoon, Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1471–1480.

Pereira, P., Pablo, H. de, Subida, M. D., Vale, C., Pacheco, M., (2010). Bioaccumulation and biochemical markers in feral crab (*Carcinus maenas*) exposed to moderate environmental contamination-The impact of non-contamination-related variables. *Environmental Toxicology*, 26(5), 524–540.

Pereira, T. de S., Moreira, Í. T. A., de Oliveira, O. M. C., Rios, M. C., Filho, W. A. C. S., de Almeida, M., de Carvalho, G. C., (2015). Distribution and ecotoxicology of

bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1-2), 166–177.

Pereira Righi, B.D., Abujamara, L.D., Barcarolli, I.F., Jorge, M.B., Zebral, Y.D., Costa, P.G., Reis Martínez, C.B., Bianchini, A., (2021). Response of biomarkers to metals, hydrocarbons and organochlorine pesticides contamination in crabs (*Callinectes ornatus* and *C. bocourti*) from two tropical estuaries (São José and São Marcos bays) of the Maranhão State (northeastern Brazil). *Chemosphere*, 132649.

Perillo, G.M.E., (1995). Definition and geomorphology classifications of estuaries. En: Perillo, G.M.E., (Ed.). *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries. Developments in Sedimentology*. Elsevier Science BV, Amsterdam, 53, 14-47.

Perillo, G.M.E., (2004). ¿Por qué Bahía Blanca es un estuario? En: Piccolo, M.C., & Hoffmeyer, M.S., (Eds). *El Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía (IADO-CONICET), Bahía Blanca, Argentina, pp. 11 - 19

Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., Melo, W.D., (2008). The Bahía Blanca Estuary: An integrated overview of its geomorphology and dynamics. En: Neves, R., Barreta, J., Mateus, M. (Eds.). *Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America*. IST Press, Lisboa, pp. 221-231.

Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., (2021) Physical Oceanography of the Bahía Blanca Estuary. En: Fiori, S.M., Pratolongo, P.D. (Eds) *The Bahía Blanca Estuary*. Springer, Cham, pp. 31-49. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_3)

Phillips, D. J. H., Rainbow, P. S., (1989). Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research*, 28(1-4), 207–210.

Pinheiro, M.A.A., Silva, P.P.G., Duarte, L. F. de A., Almeida, A.A., Zanotto, F.P., (2012). Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 114–121.

Polizzi, P.S., Romero, M.B., Chiodi Boudet, L.N., Das, K., Denuncio, P.E., Rodríguez, D.H., Gerpe, M.S., (2014). Metallothioneins pattern during ontogeny of coastal dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 80(1-2), 275–281.

Pollicelli, M. de la P., Idaszkin, Y. L., Gonzalez-José, R., Márquez, F., (2018). Leaf shape variation as a potential biomarker of soil pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 69–74.

Popovich, C., Spetter, C., Marcovecchio, J., Freije, R., (2008). Dissolved Nutrient Availability during Winter Diatom Bloom in a Turbid and Shallow Estuary (Bahía Blanca, Argentina). *Journal of Coastal Research*, 24(1), 95-102.

Pratolongo, P. D., Perillo, G. M. E., Piccolo, M. C., (2010). Combined effects of waves and plants on a mud deposition event at a mudflat-saltmarsh edge in the Bahía Blanca estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87(2), 207–212.

Pratolongo, P., Mazzon, C., Zapperi, G., Piovan, M. J., Brinson, M. M., (2013). Land cover changes in tidal salt marshes of the Bahía Blanca estuary (Argentina) during the past 40 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 133, 23–31.

Pratolongo, P.D., Funk, F., Piovan, M.J., Celleri, C., Negrín, V.L., (2021) Coastal Wetlands of the Bahía Blanca Estuary: Landscape Structure and Plant Associations. En: Fiori, S.M., Pratolongo, P.D. (Eds) *The Bahía Blanca Estuary*. Springer, Cham, pp. 435-468 [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_16)

Pytharopoulou, S., Sazakli, E., Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D.L., (2008). Translational responses of *Mytilus galloprovincialis* to environmental pollution: Integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index. *Aquatic Toxicology*, 89(1), 18–27

Quintas, P. Y., Oliva, A.L., Arias, A., Domini, C.E., Alvarez, M.B., Garrido, M., Marcovecchio, J.E., (2016). Seasonal changes in organotin compounds in sediments from the Bahía Blanca Estuary. *Environmental Earth Science*, 75(8).

R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Raftopoulou, E. K., Dimitriadis, V. K., (2011). Comparative study of the accumulation and detoxification of Cu (essential metal) and Hg (nonessential metal) in the digestive gland and gills of mussels *Mytilus galloprovincialis*, using analytical and histochemical techniques. *Chemosphere*, 83(8), 1155–1165.

Rahmanpour, S., Ashtiyani, S. M. L., Ghorghani, N.F., (2014). Biomonitoring of heavy metals using bottom fish and crab as bioindicator species, the Arvand River. *Toxicology and Industrial Health*, 32(7), 1208–1214.

Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., Depledge, M.H., (1990). The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Marine Pollution Bulletin*, 21 (7), 321-324.

Rainbow, P. S., & Phillips, D. J. H., (1993). Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, 26(11), 593–601

Rainbow, P. S. (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12), 183–192.

Rainbow, P.S., (1998) Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. En: Langston, W.J. & Bebianno M.J. (Eds.) *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Springer, Boston, MA, pp 285-319

Rainbow, P.S., (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, 120, 497–507

Rainbow, P.S., Blackmore, G., Wang, W.-X., (2007). Effects of previous field-exposure history on the uptake of trace metals from water and food by the barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Ecology Progress Series*, 259, 201–213.

Rainbow, P. S., Smith, B. D., (2010). Trophic transfer of trace metals: Subcellular compartmentalisation in bivalve prey and comparative assimilation efficiencies of two invertebrate predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 390(2), 143–148.

Rainbow, P. S., Luoma, S. N., (2011). Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 455–465.

Ramos, R. J., Tadokoro, C. E., de Carvalho Gomes, L., Leite, G. R., (2021). Efficiency in heavy metal purge in crustaceans during the ecdysis. *Environment, Development and Sustainability*, 23(10), 14878–14907. doi:10.1007/s10668-021-01277-4

Regaldo, L., Gutierrez, M. F., Reno, U., Fernández, V., Gervasio, S., Repetti, M. R., Gagneten, A. M., (2017). Water and sediment quality assessment in the Colastiné-

Corralito stream system (Santa Fe, Argentina): impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6951–6968.

Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G. W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S., (2002). Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 912–922.

Reichmuth, J.M., Weis, P., Weis, J.S., (2010). Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) from a contaminated and clean estuary. *Environmental Pollution*, 158(2), 361-368.

Rodrigues, S.K., Abessa, D.M.S., Machado, E.C., (2013). Geochemical and Ecotoxicological Assessment for Estuarine Surface Sediments from Southern Brazil. *Marine Environmental Research*, 91, 68-79

Rodríguez, E.M., Monserrat, J.M., Amín, O.A., (1992). Chronic toxicity of ethyl parathion and isobutoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to estuarine juvenile and adult crabs. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 22, 140–145.

Rodríguez, E.M., López Greco, L.S., Fingerman, M., (2000). Inhibition of ovarian growth by cadmium, in the fiddler crab *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 202–206.

Romano, M., Ferreyra, H., Ferreyroa, G., Molina, F. V., Caselli, A., Barberis, I., Beldomenico, P., Uhart, M., (2016). Lead pollution from waterfowl hunting in wetlands and rice fields in Argentina. *Science of The Total Environment*, 545-546, 104–113.

Roesijadi, G., (1980). The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates: Current status. *Marine Environmental Research*, 4(3), 167–179.

Roesijadi, G.I., (1992). Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 22(2), 81–113.

Sabatini, S. E., Chaufan, G., Juárez, Á. B., Coalova, I., Bianchi, L., Eppis, M. R., Ríos de Molina, M. del C., (2009). Dietary copper effects in the estuarine crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, maintained at two different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(4), 521–527.

Saher, N. U., Siddiqui, A.S., (2019). Occurrence of Heavy Metals in Sediment and their Bioaccumulation in Sentinel Crab (*Macrophthalmus depressus*) from Highly Impacted Coastal Zone. *Chemosphere*.

Sal Moyano, M.P., Gavio, A., Luppi, T., (2020). Reproductive biology of *Neohelice granulata*. En: Luppi, T. & Rodriguez, E., (Eds). *Neohelice granulata: a model species for the study of decapod crustaceans*. Vol 1 Life History and Ecology, pp. 159-182.

Sardiña, P., & Lopez Cazorla, A. C., (2005a). Feeding habits of the juvenile striped weakfish, *Cynoscion guatucupa* Cuvier 1830, in Bahía Blanca estuary (Argentina): seasonal and ontogenetic changes. *Hydrobiology*, 532(1-3), 23–38.

Sardiña, P., & López Cazorla, A. C., (2005b). Trophic ecology of the whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri* (Pisces: Sciaenidae), in south-western Atlantic waters. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 85(2), 405–413.

Schvezov, N., Amin, O. (2011). Biochemical response of amphipods (*Gammarid: Paramorea*) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 394–402.

Serra-Batiste, M., Cols, N., Alcaraz, L.A., Donaire, A., González-Duarte, P., Vašák, M., (2010). The metal-binding properties of the blue crab copper specific CuMT-2: a crustacean metallothionein with two cysteine triplets. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(5), 759–776.

Simonetti, P. (2012). El ostrero pardo, *Haematopus palliatus*, en el Estuario de Bahía Blanca: Estudio de la biología reproductiva, uso del hábitat y el potencial condicionamiento ambiental como consecuencia del impacto antrópico. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur, p. 142.

Simonetti, P., Botté, S.E., Fiori, S.M., Marcovecchio, J.E., (2012). Heavy-metal concentrations in soft tissues of the burrowing crab *Neohelice granulata* in Bahía Blanca estuary, Argentina. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 62, 243–253.

Simonetti, P., Botté, S.E., Fiori, S.M., Marcovecchio, J.E., (2013). Burrowing crab (*Neohelice granulata*) as a potential bioindicator of heavy metals in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 64, 110–118.

Simonetti, P., Botté, S. E., Marcovecchio, J. E., (2015). Exceptionally high Cd levels and other trace elements in eggshells of American oystercatcher (*Haematopus palliatus*) from the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 495–500.

Simonetti, P., Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., (2017). Occurrence and spatial distribution of metals in intertidal sediments of a temperate estuarine system (Bahía Blanca, Argentina). *Environmental Earth Science*, 76, 636.

Simonetti, P., Botte, S.E., Marcovecchio, J.E., (2018). Heavy metal bioconcentration factors in the burrowing crab *Neohelice granulata* of a temperate ecosystem in South America: Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34), 34652-34660

Simonetti, P., Truchet, D. M., Buzzi, N. S., Marcovecchio, J. E., (2020). First approaches to the depuration process of trace metals in the burrowing crab *Neohelice granulata* from a temperate wetland in South America: Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*.

Soto-Jiménez, M.F., (2011). Transferencia de elementos traza en tramas tróficas acuáticas. *Hidrobiológica*, 21, 239-248

Souza Machado, A. A., Spencer, K., Kloas, W., Toffolon, M., Zarfl, C., (2015). Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. *Science of The Total Environment*, 541, 268–281.

Souza Machado, A. A., Spencer, K. L., Zarfl, C., O’Shea, F. T., (2018). Unravelling metal mobility under complex contaminant signatures. *Science of The Total Environment*, 622-623, 373–384.

Spetter, C.V., Buzzi, N.S., Fernández, E.M., Cuadrado, D.G., Marcovecchio, J.E., (2015a). Assessment of the physicochemical conditions sediments in a polluted tidal flat colonized by microbial mats in Bahía Blanca estuary (Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 9, 491–505.

Spetter, C.V., Popovich, C., Arias, A., Asteasuain, R., Freije, H., Marcovecchio, J.E., (201b). Role of nutrients in the phytoplankton development during a winter diatom bloom in an eutrophic South American Estuary (Bahía Blanca, Argentina). *Journal of Coastal Research*, 31, 7-87.

Speake, M.A., Carbone, M.E., Spetter, C.V., (2020). Análisis del sistema socio-ecológico del estuario Bahía Blanca (Argentina) y su impacto en los servicios ecosistémicos y el bienestar humano. *Investigaciones Geográficas*.

Spivak, E. and Sánchez, N., (1992) Prey selection by *Larus belcheri atlanticus* in Mar Chiquita lagoon, Buenos Aires, Argentina: a possible explanation for its discontinuous distribution. *Revista Chilena de Historia Natural*, 67, 209–220

Spivak, E. D., (2010). The crab *Neohelice (=Chasmagnathus) granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, 64(3), 149–154.

STAN IADO (Servicio Tecnológico de Alto Nivel IADO), (2017). Programa de Monitoreo de la Calidad Ambiental de la Zona interior del estuario de Bahía Blanca (2017-2018). Municipalidad de Bahía Blanca, Bahía Blanca, Buenos Aires.

Sun, Z., Mou, X., Tong, C., Wang, C., Xie, Z., Song, H., Sun, W., Lv, Y., (2015). Spatial variations and bioaccumulation of heavy metals in intertidal zone of the Yellow River estuary, China. *Catena*, 126, 43–52.

Svampa, M., (2012). Consenso de los Commodities, Giro Ecoterritorial y Pensamiento crítico en América Latina. *Revista del Observatorio Social de América Latina*, 13(32), 15-38.

Szefer, P., Kusak, A., Szefer, K., Glasby, G.P., Jankowska, H., Wolowicz, M., Ali, A.A., (1998). Evaluation of the anthropogenic influx of metallic pollutants into Puck Bay, southern Baltic. *Applied Geochemistry*, 13, 293–304

Tanaka, K., Sano, T., Ishizuba, K., Kitta, K., Kawamura, Y., (1994). Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Physiologia Plantarum*, 91, 353–358

Tankoua, O. F., Buffet, P.-E., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac, C., Berthet, B. (2011). Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(8), 1253–1263.

Tomlinson, D.L., Wilson, J.G., Hariis, C.R., Jeffrey, D.W., (1980). Problems in the assessment of heavy metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgoland Wiss. Meeresunters*, 33, 566–575

Toniolo, M.A., Seitz, C., Perillo, G.M.E., (2021). Origin and evolution of tidal depressions in a tidal flat and their role in carbon sequestration in the Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Marine Geology*, 436, 106467.

Truchet, D.M., (2018). De espaldas al mar: conflictividad socio-ecológica en el Estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina). La pesquería artesanal frente a las políticas neoextractivistas. *Papeles del Centro FCJS*, 8, 9 – 26.

Truchet, D.M., Buzzi, N.S., Carcedo, M.C., Marcovecchio, J.E., (2019a). First record of the fiddler crab *Leptuca* (= *Uca*) *uruguayensis* in the Bahía Blanca Estuary (Buenos Aires, Argentina) with comments on this species in South America. *Regional Studies in Marine Science*, 27.

Truchet, D.M., Noceti, M.B., Villagrán, D.M., Orazi, M.M., Medrano, M.C., Buzzi, N.S., (2019b). Fishers' ecological knowledge about marine pollution: What can FEK contribute to ecological and conservation studies of a Southwestern Atlantic estuary? *Journal of Ethnobiology*, 39(4), 584-606

Truchet, D.M., Noceti, M.B., (2021) Small-Scale Artisanal Fishers and Socio-environmental Conflicts in Estuarine and Coastal Wetlands. En: Fiori, S.M., Pratolongo, P.D. (Eds.) *The Bahía Blanca Estuary*. Springer, Cham, pp. 493-519. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_18)

Truchet, D. M., Buzzi, N. S., Negrin, V. L., Botté, S. E., Marcovecchio, J. E., (2022). First long-term assessment of metals and associated ecological risk in subtidal sediments of a human-impacted SW Atlantic estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 174, 113235. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113235>

Urban, S. R., Corrêa, A. X. R., Schettini, C. A. F., Schwingel, P. R., Sperb, R. M., Radetski, C. M., (2010). Physicochemical and ecotoxicological evaluation of estuarine water quality during a dredging operation. *Journal of Soils and Sediments*, 10(1), 65-76.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149.

Viarengo, A., Palmero, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R., Orunesu, M., (1985). Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Marine Environmental Research*, 16, 23–26

Viarengo, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Reviews in Aquatic Science*, 1, 295-317.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1), 69–84.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular & Molecular Biology*, 46, 407–417

Villagran, D. M., Severini, M. F. D., Biancalana, F., Spetter, C. V., Fernández, E. M., Marcovecchio, J. E. (2019). Bioaccumulation of heavy metals in mesozooplankton from a human-impacted south western Atlantic estuary (Argentina). *Journal of Marine Research*, 77(1), 217–241.

Villagran, D. M., Truchet, D. M., Buzzi, N. S., Forero Lopez, A. D., & Fernández Severini, M. D., (2020). A baseline study of microplastics in the burrowing crab (*Neohelice granulata*) from a temperate southwestern Atlantic estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 110686.

Vogt, G., (2002). Functional anatomy. En: Holdich, D.M. (Ed.). *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell, Oxford, pp. 53-151.

Wallace, W.G., Luoma, S.N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*, 257: 125–137,

Wallace, W.G., Lee, B.-G., Luoma, S.N., (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*, 249, 183–197.

Wang, L., Yan, B., Liu, N., Li, Y., Wang, Q., (2008) Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*, 74(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.025>

Wang, W.-C., Mao, H., Ma, D.-D., Yang, W.-X., (2014). Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. *Frontiers in Marine Science*, 1.

Wang, Z., Kong, F., Fu, L., Li, Y., Yu, Z., (2021). Responses of Asian clams (*Corbicula fluminea*) to low concentration cadmium stress: Whether the depuration phase restores physiological characteristics. *Environmental Pollution*, 284, 117182.

Wiech M., Vik, E., Duinker, A., Frantzen, S., Bakke, S., Maage, A., (2017). Effects of cooking and freezing practices on the distribution of cadmium in different tissues of the brown crab (*Cancer pagurus*). *Food Control* 75, 14–20.

Wiech, M., Frantzen, S., Duinker, A., Rasinger, J. D., Maage, A., (2020). Cadmium in brown crab *Cancer pagurus*. Effects of location, season, cooking and multiple physiological factors and consequences for food safety. *Science of the Total Environment*, 703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134922>

Weinstein, J., West, T., Bray, J., (1992). Shell disease and metal content of blue crabs, *Callinectes sapidus*, from the Albemarle-Pamlico Estuarine System, North Carolina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23(3), 355–362.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Steinberg, C., (2000). Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology*, 85(4), 413–422

Williams, J. A., Antoine, J., (2020). Evaluation of the elemental pollution status of Jamaican surface sediments using enrichment factor, geoaccumulation index, ecological risk and potential ecological risk index. *Marine Pollution Bulletin*, 157, 111288.

Won, E.-J., Raisuddin, S., Shin, K.-H., (2008). Evaluation of induction of metallothionein-like proteins (MTLPs) in the polychaetes for biomonitoring of heavy metal pollution in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 57(6-12), 544–551.

Wu, J.-P., Chen, H.-C., Huang, D.-J., (2008). Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 73(7), 1019–1026.

Xia, L., Chen, S., Dahms, H.-U., Ying, X., Peng, X., (2016). Cadmium induced oxidative damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Meretrix meretrix*. *Ecotoxicology*, 25(5), 959–969.

Xu, Z., Liu, J., Wang, E., Zhao, C., Hu, X., Chu, K. H., Wang, L., (2021). Detoxification and recovery after cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(41), 58050–58067.

Yang, J., Chen, L., Liu, L.-Z., Shi, W.-L., Meng, X.-Z. (2014). Comprehensive risk assessment of heavy metals in lake sediment from public parks in Shanghai. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 129–135.

Yeh, H.-C., Chen, I.-M., Chen, P., Wang, W.-H., (2008). Heavy metal concentrations of the soldier crab (*Mictyris brevidactylus*) along the inshore area of Changhua, Taiwan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 153(1-4), 103–109.

Zapperi, G., (2015). Estructura y funciones ecológicas de las comunidades bentónicas en planicies de marea de la zona interna del estuario de Bahía Blanca. Tesis de Doctora en Biología, Universidad Nacional del Sur, 141 p.

Zhao, D., Zhang, X., Liu, D., Ru, S., (2019). Cu accumulation, detoxification and tolerance in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 201–207.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 135–150.

Zoffoli, H. J. O., do Amaral-Sobrinho, N. M. B., Zonta, E., Luisi, M. V., Marcon, G., Tolón-Becerra, A., (2013). Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's Southern Region. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3), 2423–2437.