

09060

DUARTE, C.A
Estudio de la Contam

2011

69060

69060

MFN:
Clasif:
T. #03



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales

**Estudio integral de la contaminación marina costera
próxima a la ciudad de Ushuaia y validación del uso de
biomarcadores.**

Tesis Doctor en Ciencias Biológicas

Lic. Claudia A. Duarte

Director: Dr. Oscar A. Amin

Co-directora: Dra C. Mabel Gualdoni

Jurado

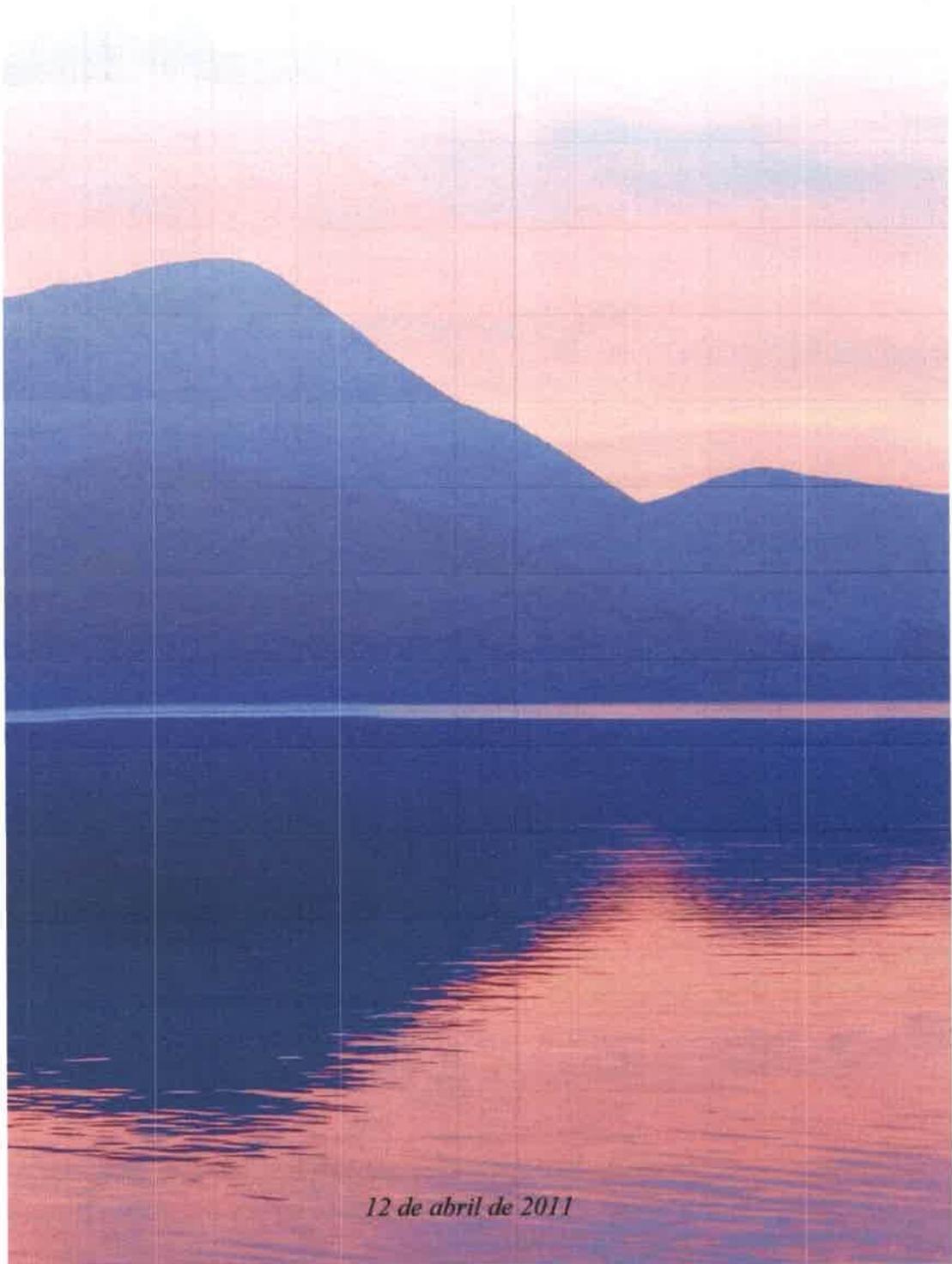
Dra. Viviana Rivarola

Dra. Mónica Gil

PA/ Dr. Jorge Marcovecchio

2011

*A Nico...mi esposo, mi cielo y sol.
A mi familia...tan lejos y tan cerca.
A Eri...incondicional siempre.*



12 de abril de 2011

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas que permitieron mi formación y al Centro Austral de Investigaciones Científicas, por permitir mi desarrollo y crecimiento dentro del Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Acuática.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto.

A mi codirectora, la Dra Mabel Gualdoni, por todo su apoyo y contención. Por estar siempre a pesar de la distancia, por sus sugerencias, por su tiempo y su confianza.

Al Dr Oscar Amin y la Dra Laura Comoglio, por darme un espacio de trabajo y disponer de su laboratorio y de su tiempo en virtud de mi tesis.

A los integrantes de la Comisión Evaluadora. Por acompañarme y guiarme en la realización de este trabajo.

A todo el personal del Área de Oceanografía Química del Instituto Argentino de Oceanografía en donde se realizaron las mediciones de nutrientes y metales pesados. Especialmente al Dr Jorge Marcovecchio que me permitió trabajar en su laboratorio, a la Lic. Nedda Chiarello, quien se ocupó de enseñarme y acompañarme durante la medición de metales, y a la Dra Sandra Botté, por sus enseñanzas y sugerencias.

A mi amiga Erica Giarratano, por su apoyo y contención en todos los momentos difíciles, por no dejarme atrás, por alentarme siempre, por su compañía y colaboración en las campañas y en el trabajo...y a la Dra Erica Giarratano, por su crítica, sus correcciones y sugerencias.

A Ricky, por su ayuda y compañía en el trabajo y por las largas horas procesando bichos.

A los personajes originales del laboratorio 67, que hicieron mis días más amenos, enriqueciendo mis recuerdos con anécdotas inolvidables, que transformaron las lágrimas de impotencia en risas reconfortantes y que ocuparon los roles de amigo, profesional, oyente, crítico...a Natalia Dellabianca y a Marcela Liljestrhon... y por supuesto, a la "mujer de hielo"... por todos estos momentos compartidos.

A mis amigos Gabi y Mariano, por las charlas, el apoyo y la incondicionalidad.

A toda mi familia, que desde lejos me apoyó y me dio energías. A mi mamá por su preocupación y llamadas alentadoras. A mis tíos, Rosita y Hector por las corridas y trámites en la universidad! ...gracias por todo el cariño y la confianza.

A Nico, el esposo, sin duda mi más importante compañía, a quien amo y admiro profundamente.

A Bruce!! Fuente de alegrías, compañero y protector.

RESUMEN

La ciudad de Ushuaia ha experimentado en los últimos años un importante y sostenido crecimiento poblacional, relacionado principalmente a su actividad económica. Su desarrollo urbanístico y demográfico sumado al aumento de la actividad turística y tráfico de embarcaciones generaron un deterioro de la calidad ambiental de las zonas costeras. Bajo condiciones ambientales como estas, los organismos que allí viven se encuentran expuestos a una mezcla compleja de sustancias. La exposición a ciertos contaminantes genera respuestas a nivel bioquímico que pueden ser utilizadas como herramienta de alarma temprana en estudios de control ambiental. Tales respuestas se conocen como biomarcadores. Dentro de ellos se identifica un grupo de enzimas y procesos, vinculados al estrés oxidativo. Esto es, cuando existe un desbalance en los tejidos vivos entre la producción y la eliminación de sustancias con especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales interactúan con macromoléculas esenciales como el ADN, proteínas y lípidos llevando a la alteración de procesos fisiológicos. Ciertos elementos o sustancias, como los metales pesados, pueden aumentar la producción de EROs y en consecuencia, activar o inhibir procesos fisiológicos y bioquímicos. El presente trabajo está dirigido a conocer la relación que existe entre los cambios producidos en la zona costera en cuanto al ingreso de nutrientes y materia orgánica y la presencia de metales pesados provenientes de efluentes urbanos, domésticos e industriales, con las alteraciones a escala bioquímica y enzimática que presenten especies residentes con características de organismos centinela. En este estudio se seleccionaron 4 sitios de muestreo caracterizados por influencia antrópica y uno con bajo impacto, todos ubicados dentro de las bahías Ushuaia y Golondrina. Se analizaron parámetros hidrográficos (temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad), nutrientes (nitrito, nitrato, fosfato, silicato y amonio), clorofila-*a* y materia orgánica particulada en muestras de agua. Al mismo tiempo se determinaron las concentraciones de metales pesados (Cd, Pb, Cu, Zn y Fe) en sedimentos superficiales costeros. Por otro lado, se analizó la actividad de tres enzimas del sistema antioxidativo (catalasa, superóxido dismutasa y Glutación S-transferasa) y niveles de lipoperoxidación en dos especies de lapas (*Nacella magellanica* y *Nacella deaurata*) y una especie de mejillón (*Mytilus edulis chilensis*) residentes del área de estudio. Se analizaron además, muestras de los organismos seleccionados con el fin de evaluar la bioacumulación de metales pesados. Los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias entre los sitios de muestreo respecto de la concentración de metales pesados en sedimentos y del aporte de nutrientes en agua. Así mismo, pudieron detectarse efectos de estas alteraciones ambientales sobre los biomarcadores seleccionados en las tres especies estudiadas. Las respuestas observadas en *N. magellanica* se mostraron principalmente asociadas a la concentración de metales pesados en tejidos, mientras que en *M. edulis chilensis* las respuestas estuvieron principalmente vinculadas a la presencia de nutrientes. Por su parte las respuestas de *N. deaurata* mostraron mayor vínculo con la temperatura, pH y salinidad, considerando que no se midieron metales en los tejidos de esta especie. Se concluye que el presente trabajo permitió la caracterización de los sitios en base a la influencia de la actividad antrópica, diferenciando los sitios más impactados, y que los efectos de dicha actividad tienen influencia sobre los biomarcadores seleccionados de forma particular en cada especie estudiada. Con esto podría implementarse en futuros estudios de monitoreo la utilización selectiva de biomarcadores y organismos teniendo en cuenta las condiciones y rangos óptimos de respuesta determinados en este trabajo.

ABSTRACT

In the past years, the city of Ushuaia has experienced an important and sustained population growth mainly related to its economic activity. Its urban development and population growth coupled with increased tourism and boat traffic generated a deterioration of the environmental quality of coastal areas. In such environmental conditions, the organisms living there, are exposed to a complex mixture of substances. The exposure to certain pollutants generated responses at the biochemical level that can be used as an early warning tool in environmental monitoring studies. Such responses are known as biomarkers. Among them, a group of enzymes and processes is linked to oxidative stress which is defined as an imbalance in living tissue between the production and elimination of substances with reactive oxygen species (ROS). These ROS interact with critical macromolecules such as DNA, proteins and lipids inducing to the alteration of physiological processes. Certain substances such as heavy metals, may increase production of ROS and thus activate or inhibit physiological and biochemical processes. The goal of this work is to study the relationship between changes in the coastal area, as the entry of nutrients and organic matter, and the presence of heavy metals from urban effluents at domestic and industrial scale, with alterations at biochemical and enzymatic level observed in resident species with sentinel organisms features. Five sampling sites were selected. Four of them were characterized by anthropogenic influences and the other one is in a low impact area. All sites are located within Ushuaia and Golondrina bays. Hydrographic parameters (temperature, dissolved oxygen, pH, salinity) and concentrations of nutrients (nitrite, nitrate, phosphate, silicate and ammonium), chlorophyll-*a* and particulate organic matter were analyzed in water samples. At the same time, the concentrations of heavy metals (Cd, Pb, Cu, Zn and Fe) in coastal surface sediments were determined. Furthermore, we analyzed the activity of three enzymes of the antioxidative system (catalase, superoxide dismutase and glutathione S-transferase) and lipoperoxidation levels in two species of limpets (*Nacella magellanica* and *Nacella deaurata*) and one species of mussel (*Mytilus edulis chilensis*) residents of the study area. Samples of organisms were also analyzed to evaluate the bioaccumulation of heavy metals. The results showed differences among sampling sites in concentration of heavy metals in sediments and nutrients in water. The effects of these environmental changes on the selected biomarkers was also detected in the three species. The responses observed in *N. magellanica* were mainly associated with the concentration of heavy metals in tissues, while in *M. edulis chilensis* responses were mainly associated with the presence of nutrients. The responses observed in *N. deaurata*, considering that bioaccumulation was not determined on this specie, showed to be mainly associated with temperature, pH and salinity. We conclude that this work allowed the characterization of sites based on the influence of anthropogenic activity, differentiating the most impacted sites, and that such activity affects selected biomarkers in different ways depending on each species studied. The selective use of biomarkers and organisms could be implemented in future monitoring assessments taking into account the conditions and optimal response range determined in this work.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.1. Contaminantes y medio acuático.....	10
I.2 Los contaminantes en los organismos y mecanismos de defensa.....	12
I.3 Biomarcadores de contaminación.....	13
I.4 Especies centinelas.....	15
I.4.a <i>Nacella (P.) magellanica</i> y <i>Nacella (P.) deaurata</i>	15
I.4.b <i>Mytilus edulis chilensis</i> (Hupé, 1854).....	16
I.5 Antecedentes.....	18
I.6. Objetivos.....	20
I.6.a Objetivo General.....	20
I.7 Hipótesis de trabajo.....	20
II. ÁREA DE ESTUDIO.....	23
II.1. Ubicación y geomorfología.....	23
II.2. Características del Canal Beagle.....	23
II.3. Clima.....	24
II.4. Hidrografía.....	25
II.5. Suelo y vegetación.....	26
II.6. La ciudad.....	26
II.7. Estaciones de muestreo.....	28
ANEXO DE FIGURAS ÁREA DE ESTUDIO.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
III.I. AMBIENTE.....	39
III.I.1. AGUA.....	39
III.I.1.a. Parámetros físico-químicos <i>in situ</i>	39
III.I.1.b Clorofila-a.....	39
III.I.1.c. Materia Orgánica Particulada (MOP).....	39
III.I.1.d. Nutrientes.....	40
III.I.2. SEDIMENTOS.....	42
III.I.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS AMBIENTALES.....	44
III.II ORGANISMOS.....	45
III.II.1 BIOMARCADORES.....	45
III.II.2 BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS.....	48
III.II.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ORGANISMOS.....	49
III.II.3.a Determinación de humedad, materia orgánica y ceniza.....	49
III.II.3.b Determinación de lípidos totales.....	49
III.II.3.c Índice de Condición (IC).....	50
III.II.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE ORGANISMOS.....	50
III.III. RESÚMEN DE TÉCNICAS Y EQUIPAMIENTOS EMPLEADOS.....	51
IV. RESULTADOS.....	53
IV.I. ANÁLISIS AMBIENTAL.....	53
IV.I.1. AGUA.....	53
IV.I.1.a. Parámetros físico-químicos <i>in situ</i>	54
IV.I.1.b. Clorofila-a.....	56
IV.I.1.c. Materia orgánica particulada.....	57
IV.I.1.d. Nutrientes.....	58
IV.I.2. SEDIMENTO.....	63
IV.I.2.a. Granulometría.....	63

IV.I.2.b. Concentración de metales pesados	64
IV.I.2.c. Índice de contaminación urbano-industrial (ICUI)	67
IV.I.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)	68
IV.II. ANÁLISIS DE LOS ORGANISMOS	70
IV.II.1. BIOMARCADORES	70
IV.II.1.a. Glutación S-transferasa (GST).....	70
IV.II.1.b. Superóxido Dismutasa (SOD).....	74
IV.II.1.c. Catalasa (CAT).....	78
IV.II.1.d. Lipoperoxidación (LPO).....	82
IV.II.2. BIOACUMULACIÓN.....	89
IV.II.3. CARÁCTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	93
IV.II.3.a. Porcentaje de humedad, materia orgánica y ceniza	93
IV.II.3.b. Contenido de lípidos totales.....	99
IV.II.3.c. Índice de Condición (IC).....	103
IV.II.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP).....	105
V. DISCUSIÓN	113
VI. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	132
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	136
ANEXO TÉCNICAS UTILIZADAS	152

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Contaminantes y medio acuático

El ambiente marino es el sistema receptor final al que llega, a través de escurrimientos, ríos y arroyos, la suma de vertidos tóxicos provenientes de la actividad antrópica desarrollada tanto en tierra como en el mismo mar. La complejidad de estas mezclas de vertidos aumenta al considerar sus productos de descomposición y degradación, superando con frecuencia la capacidad depuradora de los sistemas naturales (Salibián, 1998) produciendo efectos negativos sobre el agua, las playas y los recursos naturales.

En los ambientes acuáticos, los sedimentos han sido reconocidos como los mejores indicadores de los niveles de contaminación para numerosas sustancias, (Forstner & Wittman, 1983, Vazquez Botello *et al.*, 1997). Estos pueden tener características muy variables incluso dentro del mismo sistema acuático. Su granulometría, contenido de materia orgánica y potencial redox, entre otras características, determinan en parte la capacidad de retención de los diferentes contaminantes y la fluidez de intercambio con el agua y la comunidad asociada. El sedimento típicamente acumula contaminantes en cantidades importantes. Procesos naturales de remoción y redistribución de los mismos como son los vientos, olas y corrientes, así como la remoción mecánica por dragado, promueven la resuspensión de los sedimentos en la columna de agua y con ello, la dispersión de los tóxicos allí retenidos.

La naturaleza de los contaminantes es muy amplia. Muchas sustancias químicas están naturalmente presentes en el medio y además pueden desempeñar papeles esenciales en la biota marina; solo adquieren la categoría de contaminante en lugares o concentraciones inadecuados, lo que se traduce en efectos deletéreos para ciertos organismos y afecta al sistema (Freedman, 1989). De manera general, se denomina contaminante a todas aquellas formas de materia o energía, como es el caso de la temperatura, que exceden los niveles naturales en un momento y lugar determinado donde producen efectos adversos (Freedman, 1989).

En un sentido similar, el concepto de toxicidad se refiere a la propiedad de una sustancia de producir daño en los organismos que se encuentren en contacto con ella

(Espina & Venegas, 2005). Una vez que el tóxico es incorporado al organismo, el grado de toxicidad estará en función de los niveles que alcance en sus tejidos. Estos niveles se relacionan con la concentración de los compuestos en el medio, lo cual depende tanto del tipo de contaminante como del organismo y también del grado de exposición (Espina & Venegas, 2005). Si se trata de una exposición corta o puntual en concentraciones elevadas de un contaminante, podría implicar la muerte del organismo, en cambio, si se producen exposiciones moderadas, sostenidas en el tiempo, el organismo podría sobrevivir pero con consecuencias como la disminución en la efectividad de sus funciones.

Entre los contaminantes más importantes se encuentran los metales pesados, que son componentes naturales de la corteza terrestre, pero las concentraciones de base en los diferentes ecosistemas pueden variar por movilización natural o antropogénica. Estos compuestos que tienen amplia distribución en el ambiente, son utilizados en las industrias y están presentes en la mayoría de las aguas de desecho que se vierten al mar incluso desde fuentes domésticas. Algunos de los metales como el cromo, cobre, hierro, zinc son esenciales para los organismos, dado que participan en procesos vitales, aunque pueden ser tóxicos si las concentraciones en el medio exceden la capacidad de depuración de los mismos (Páez Osuna, 2005a). Por su parte el plomo, el cadmio y el mercurio pertenecen al grupo de metales no esenciales y son altamente tóxicos. En general todos los metales se caracterizan por su gran afinidad con el azufre, por esta razón inactivan las enzimas uniéndose a los grupos sulfidrilos, carboxilos y aminas de las proteínas, alterando actividades enzimáticas y procesos de transporte a través de membranas celulares (Espina & Venegas, 2005; Páez Osuna, 2005b).

Los niveles de contaminación por metales pesados en los ambientes acuáticos pueden referirse a diferentes compartimentos como el agua, los sedimentos y/o los organismos. Los niveles de metales pesados tales como el Cd, Cu y Zn en moluscos y otros invertebrados, son a menudo considerablemente mayores que en otros constituyentes del ambiente marino (Ansari *et al.*, 2004; Hamed & Emara, 2006). Los moluscos son considerados de alta confiabilidad para identificar contaminación de metales pesados biológicamente disponibles (Hamed & Emara, 2006).

I.2 Los contaminantes en los organismos y mecanismos de defensa.

El destino normal de la mayoría de las moléculas de oxígeno consumido por los animales es la reducción a moléculas de agua acoplada a la oxidación del alimento y la producción de energía. La reducción parcial resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), que incluyen entre los más importantes al radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las EROs afectan una variedad de biomoléculas y provocan numerosos efectos nocivos en las células, como oxidación lipídica (lipoperoxidación), inducción e inactivación de enzimas y daños en el ADN (Livingstone, 1991).

Los sistemas de defensa antioxidante que participan en la detoxificación de las EROs y productos pro-oxidantes, han sido ampliamente estudiados en los organismos acuáticos. Estos pueden dividirse en dos grupos: sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Lesser, 2006). Dentro de los primeros se encuentran enzimas antioxidantes específicas tales como superóxido dismutasa (SOD) que contribuye en la eliminación de O_2^- , catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) que participan en la eliminación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), glutatión reductasa (GR) que participa en la reducción del glutatión oxidado (GSSG) restableciendo los niveles de glutatión reducido (GSH). Este último pertenece al sistema antioxidativo no enzimático y es utilizado en reacciones de conjugación a xenobióticos catalizadas por la glutatión-S transferasa (GST) y en reacciones de degradación del H_2O_2 catalizadas por la GPx. Además de la GSH, dentro del sistema antioxidativo no enzimático se encuentran el ácido ascórbico (o vitamina C), el α -tocoferol (o vitamina E) y los carotenoides (Lesser, 2006). La capacidad de los antioxidantes no enzimáticos en interceptar EROs está asociada a su capacidad de ceder átomos de hidrógeno y permanecer estables (Montserrat *et al.*, 2008)

Se cree que existe un balance entre la producción de pro-oxidantes y las defensas antioxidantes, aunque de acuerdo a Livingstone (2003) los incrementos en la producción de EROs pueden resultar en daño oxidativo (condiciones de estrés oxidativo) si los primeros superan a las defensas antioxidantes. Esto se traduce en un incremento del daño a macromoléculas y alteraciones en procesos celulares. Adicionalmente puede existir daño oxidativo, particularmente a lípidos, proteínas y ADN.

Si bien los metales pesados se encuentran dentro de los principales agentes generadores de EROS, en forma general son los factores ambientales en su conjunto las

fuentes exógenas más importantes en la generación de las mismas. Esto significa que el daño oxidativo resulta de la sumatoria de efectos sinérgicos de múltiples factores tales como temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, nutrientes y otros elementos tales como: pesticidas, hidrocarburos aromáticos y metales. Estos agentes o bien poseen radicales libres o bien producen radicales libres mediante el metabolismo celular y los procesos de detoxificación (Livingstone, 2001).

En la actualidad, numerosos estudios se enfocan en el análisis de respuestas a nivel individual con el objeto de evaluar, monitorear y predecir el destino de las sustancias exógenas en el medio y el efecto de las mismas sobre los individuos, poblaciones y ecosistemas. Sin embargo dado que en los sistemas naturales los organismos pueden encontrarse expuestos a una variedad de tóxicos, las consecuencias de la exposición dependerán de la interacción de un gran número de variables como tiempo, frecuencia, duración, características fisicoquímicas del agente y del medio, presencia de otros tóxicos y condiciones particulares del organismo (condiciones fisiológicas, metabólicas, edad, estado nutricional, condición reproductiva).

La interferencia de los contaminantes en los procesos fisiológicos puede observarse a nivel bioquímico y/o molecular, lo cual ha sido considerado como indicador temprano del deterioro ambiental debido a la velocidad en que se manifiesta dicha respuesta.

I.3 Biomarcadores de contaminación

Los biomarcadores son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos ocasionadas por la exposición a contaminantes (US NRC, 1989). En términos prácticos, los biomarcadores son mediciones toxicológicas que registran un efecto en un organismo. Su detección y/o magnitud podrían indicar la presencia de uno o varios contaminantes por lo que pueden utilizarse tanto para evaluar el estado de salud de un organismo como para obtener una señal temprana de riesgo ambiental (Van der Oost *et al.*, 2003). El efecto que un contaminante puede producir en determinadas especies, es por lo común notoriamente acumulativo y duradero.

De acuerdo a Rodríguez (2006), para la adecuada elección de biomarcadores deben considerarse dos aspectos importantes:

La *sensibilidad*, que hace referencia a la capacidad del biomarcador a responder antes que se manifiesten efectos deletéreos en el organismo o la población; y la *especificidad*, que es la capacidad del biomarcador a responder a un contaminante en particular y por lo tanto indicar inequívocamente su presencia. Son muy pocos los biomarcadores que cumplen con esta condición por lo que se recurre a una situación intermedia, definiéndose así biomarcadores relativamente específicos. Estos, manifiestan cambios ante un grupo relativamente homogéneo de contaminantes que suelen poseer un mecanismo de acción similar. Es el caso de gran parte de los biomarcadores que se utilizan comúnmente. De acuerdo a su especificidad, los biomarcadores han sido clasificados como de “nivel I” y “nivel II” (Sanders, 1990). Los de nivel I responden específicamente a un contaminante y, por lo general, implica la inhibición de enzimas. Por su parte los biomarcadores de nivel II responden a un estrés subletal general y, frecuentemente, implica la activación o inducción de una enzima.

En general se reconocen tres clases de biomarcadores (WHO, 1993):

- 1- *Biomarcador de exposición*: es la medición de una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre un xenobiótico y algunas moléculas o células blanco dentro de un organismo.
- 2- *Biomarcador de efecto*: es la medición bioquímica, fisiológica, comportamental u otra alteración dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, puede ser reconocido y asociado con una enfermedad o alteración en la salud.
- 3- *Biomarcador de susceptibilidad*: es indicador de una capacidad adquirida o inherente de un organismo para responder a cambios de exposición a un xenobiótico específico.

Se han identificado y utilizado una variedad de métodos bioquímicos, celulares, fisiológicos e histoquímicos como herramientas en la detección temprana de cambios en el estado de los organismos expuestos a contaminantes (Livigstone *et al.* 1995; Wilhelm Filho *et al.* 2001). Específicamente, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que reportan el uso de enzimas de estrés oxidativo, como la CAT, GST y SOD como apropiadas para el análisis de contaminación en organismos costeros (Ansaldo *et al.*, 2005, Da Ros *et al.*, 2000, 2002; Geracitano *et al.* 2000, Monserrat *et al.* 1997, Nasci *et al.* 1991, 1998, 2000.).

I. INTRODUCCIÓN

I.4 Especies centinelas

Se denomina así a los organismos cuyos niveles de contaminantes en los tejidos son medibles de manera que permitan inferir la presencia de tales contaminantes en el ambiente. Estos organismos deben reunir ciertas condiciones para su uso tales como poseer una amplia distribución geográfica, fácil disponibilidad, adecuado conocimiento de sus ciclos de vida, ser nativos o representativos del ecosistema que recibe el impacto y ser sensibles a los contaminantes a estudiar (Ferrari, 2006).

Los moluscos se consideran entre los organismos más apropiados como especies centinelas y por lo tanto son ampliamente utilizados en estudios de biomonitoring y control ambiental (Ansaldo *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2004; Hamed & Emara 2006; Valavanidis *et al.*, 2006). Dentro de las características que los hacen adecuados para estos estudios se destacan la capacidad para acumular tóxicos y la tolerancia a un amplio intervalo de condiciones ambientales.

Las lapas *Nacella (P.) magellanica* y *Nacella (P.) deaurata* y el mejillón *Mytilus edulis chilensis*, son especies de moluscos presentes en las costas del Canal Beagle, incluyendo áreas cercanas a la ciudad de Ushuaia (Morriconi, 2005; Tortorelli, 1987). Por sus características, se presentan como especies adecuadas para realizar estudios de monitoreo y evaluación ambiental en el área propuesta para el presente trabajo.

I.4.a *Nacella (P.) magellanica* y *Nacella (P.) deaurata*

Nacella (Patinigera) deaurata (Gmelin, 1791) y *Nacella (Patinigera) magellanica* (Gmelin, 1791) son dos de las más conspicuas especies de lapas presentes en el Canal Beagle. Ambas son abundantes y de relativamente gran tamaño, lo que facilita su muestreo y obtención de tejido para los análisis (Figura I.1). La especie *N. magellanica* habita el intermareal medio y superior mientras que *N. deaurata* habita la zona intermareal inferior y la zona sublitoral (Morriconi & Calvo, 1993). Ambas especies se distribuyen en el litoral atlántico desde Buenos Aires (38° S) hasta Tierra del Fuego (55° S), incluyendo el estrecho de Magallanes y las islas Malvinas (Carcelles, 1950).

Ambas especies tienen sexos separados. La talla de primera madurez varía entre los 19 y los 30 mm de largo valvar para *N. magellanica* y entre 19 y 27 mm para *N.*

deaurata. Las dos especies alcanzan el período de maduración total en los meses de Julio y Octubre, con un desove parcial entre ambos meses y otro, más intenso, en Noviembre/Diciembre (primavera tardía) permaneciendo inmaduras durante el verano (Morriconi, 2005). Pueden observarse algunas variaciones como la extensión de la maduración total o modificaciones en la fecha de desove, relacionados principalmente a cambios de temperatura y a condiciones ambientales (Morriconi, 1999). Se alimentan de bacterias y macro y microalgas que ingieren al raspar las rocas sobre las que se encuentran adheridas. No hay dimorfismo sexual externo pero pueden observarse diferencias internas respecto del color de las gónadas. Los machos de ambas especies presentan gónadas de color amarillo cremoso cuando se encuentran en vías de maduración o totalmente maduros mientras que los individuos inmaduros o evacuados (fuera del período reproductivo) se tornan entre un naranja y un marrón-rojizo. Por su parte las hembras de *N. magellanica* presentan gónadas de color verde cuando están maduras mientras que las de *N. deaurata* son de color marrón. Luego del desove, las gónadas de ambas especies tornan a un color marrón oscuro (Morriconi, 2005).



Figura I.1: Especies de lapas empleadas en el presente estudio.

I.4.b Mytilus edulis chilensis (Hupé, 1854)

Esta especie habita los sustratos rocosos en la zona intermareal media e inferior, y se encuentra ampliamente distribuida en las costas de Tierra del Fuego y Sur de Chile (Tortorelli, 1987) (Figura I.2). Su ciclo reproductivo en Bahía Ushuaia presenta un

período de reposo y una prolongada época de desove la cual se produce después que las células sexuales se han cargado de lípidos con sus picos máximos en otoño y primavera. Las variaciones en la fecha de la puesta puede ser de hasta dos meses (Tortorelli, 1987). Al igual que las especies de lapas aquí estudiadas, ésta especie tiene sexos separados y no presenta dimorfismo sexual externo. Si bien durante la fase de reposo sexual las gónadas son prácticamente indiferenciables, cuando comienzan a desarrollarse ocupan casi la totalidad de la cavidad del manto y adquieren la tonalidad distintiva de cada sexo, siendo anaranjado en las hembras y amarillento pálido en los machos. La primera madurez sexual se alcanza durante el primer año de vida a una talla de aproximadamente 30 mm de largo valvar (Lasta *et al.*, 1998). Son organismos filtradores, viven esencialmente a expensas de las partículas en suspensión (fitoplancton y materia orgánica) que están en el agua. Por su modo de vida sedentario son las branquias las que van a asegurarle el abastecimiento, filtrando el agua que ellas mismas hacen circular a través del organismo.

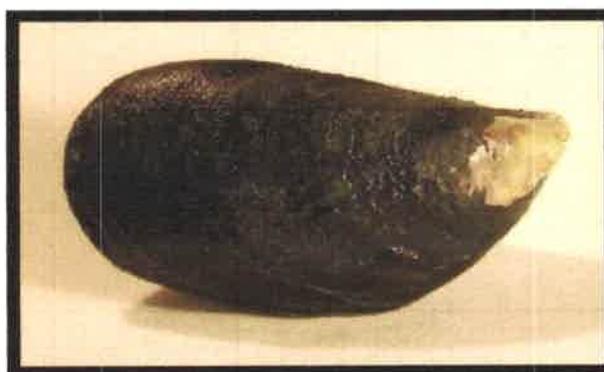


Figura 1.2: *M. edulis chilensis*, especie de mejillón empleado en el presente estudio.

I.5 Antecedentes

La región de la Patagonia Argentina presenta una extensa zona costera en la que se han desarrollado numerosos proyectos de investigación en el área de contaminación. Las ciudades costeras patagónicas han tenido crecimientos poblacionales importantes relacionados a sus actividades económicas y Ushuaia no ha sido la excepción. El explosivo desarrollo demográfico de la ciudad de Ushuaia a partir de la ley de promoción industrial promulgada en la década del '70, trajo aparejado un aumento del tráfico de embarcaciones en el puerto, ya que el mismo funciona como vía de entrada de insumos y salida de productos manufacturados. Además la actividad turística de cruceros desde y hacia la Antártida que se ha sostenido en los últimos años, ha conformando una situación dinámica de especial atención. A esto se suma la falta de plantas de tratamiento adecuado en la eliminación de efluentes domésticos e industriales, ya que estos son liberados a la costa con solo un tratamiento primario. La sumatoria de estos factores ha causado un visible deterioro de la zona costera lindante a la ciudad de Ushuaia, en la cual, con el propósito de cuantificar este daño se han llevado a cabo durante los últimos años estudios coordinados entre diversas Instituciones (el Centro Austral de Investigaciones Científicas-CADIC, el Centro Nacional Patagónico – CENPAT- el Instituto Argentino de Oceanografía –IADO y el Grupo de Investigación en Geología Ambiental de la Universidad de Texas (GERG). Estas investigaciones se han centrado en la caracterización ambiental del área y la detección de metales pesados e hidrocarburos en sedimentos, agua, y organismos costeros residentes a fin de describir los niveles de esos contaminantes y caracterizar en ese sentido la zona costera lindante a la ciudad de Ushuaia (Amin *et al.* 1996 a y b; 1997; 1999; 2003; 2010 a y b; Esteves y Amin 2004; Gil *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2009). Actualmente se están realizando estudios sobre el estado trófico de las Bahías lindantes con la ciudad dentro del proyecto "*Respuestas de especies locales a procesos de eutrofización y contaminación en la zona costera próxima a la ciudad de Ushuaia y validación de su utilización como biomarcadores*" con el propósito de incrementar el conocimiento de base de esta región, el cual prevé la actualización de la información existente y el estudio de nuevas zonas y temas de investigación no relevados hasta el presente.

La información con la que se cuenta ha permitido obtener una diagnosis importante y ha sido utilizada por los entes gubernamentales en acciones concretas de

planificación y ordenamiento costero. Además de los estudios que ya han sido realizados en la zona, es necesario remarcar la importancia de la continuidad de estas investigaciones. Entre las principales razones pueden mencionarse los constantes cambios en la ciudad devenidos tanto del sostenido incremento poblacional mencionado de los últimos años y el creciente desarrollo turístico, como por la importancia geopolítica de la región y, en particular para el caso de los mejillones, por las actividades de explotación en sistemas de cultivos que se desarrollan en la actualidad.

Con relación a los estudios sobre organismos es importante mencionar que se han llevado adelante experimentos de laboratorio realizados sobre la centolla, *Lithodes santolla*, evaluando los efectos de metales pesados sobre la toxicidad letal, el desarrollo larval y los efectos en la eclosión larval (Amin *et al.* 1998, 2003; Amin & Comoglio 1999 y 2010). Por otro lado, se realizaron estudios preliminares sobre mitílicos transplantados para evaluar bioacumulación, parámetros fisiológicos y bioquímicos (Amin *et al.* 2000; Fernandez *et al.* 2005; Giarratano *et al.*, 2010).

A pesar de la información con la que se cuenta actualmente en el área, son necesarias mayores investigaciones acerca de los efectos de los contaminantes presentes en la costa, sobre los organismos que la habitan.

El presente trabajo está dirigido a conocer con profundidad la relación que existe entre los cambios producidos en la zona costera en relación al ingreso de nutrientes y materia orgánica y la presencia de metales pesados provenientes de efluentes urbanos, domésticos e industriales, con las alteraciones a escala bioquímica y enzimática que presenten especies residentes con características de organismos centinelas.

Por lo tanto, dadas las características del área que se propone estudiar y el grado de conocimiento de la misma, el presente trabajo no sólo brindará información inédita que complementará a la existente, sino que permitirá asociar directamente los niveles de perturbación en un área sometida a las actividades antrópicas de múltiples orígenes con indicadores de efecto y daño medidos en la fauna local.

I.6. Objetivos

I.6.a Objetivo General

Estudiar y monitorear una zona costera perturbada por el ingreso de descargas de origen múltiple (municipales, portuarias, industriales y las derivadas de la creciente actividad turística), a través de los cauces de agua dulce naturales y artificiales que desembocan en las bahías lindantes a la Ciudad de Ushuaia, con base en el estudio de los compartimientos abióticos y su incidencia sobre biomarcadores de estrés oxidativo presentes en organismos centinelas.

I.6.b Objetivos específicos

- Caracterizar los sitios de muestreo seleccionados mediante el análisis físico-químico de agua y sedimento identificando las probables fuentes de contaminación en cada uno de ellos.
- Analizar la presencia de metales pesados, tanto en los sedimentos como en los organismos de los diferentes sitios de muestreo seleccionados.
- Desarrollar y aplicar los protocolos analíticos para el estudio de una serie de biomarcadores de estrés oxidativo para la identificación de los efectos producidos por la actividad antrópica, a fin de utilizarlos como posible herramienta en el monitoreo de un ambiente costero como sistemas de alarma temprana de cambios en el ambiente.
- Seleccionar tanto los organismos de características óptimas como los tejidos adecuados para la utilización de los biomarcadores seleccionados.
- Transferir la información a las entidades responsables de la regulación de la zona costera, a fin de contribuir con información significativa que permita proceder a su protección como recurso ecológico y económico y al desarrollo de prácticas sustentables de pesca, acuicultura y turismo.

I.7 Hipótesis de trabajo

A partir de los objetivos enunciados, se plantea como hipótesis de trabajo que la influencia antrópica en la zona costera genera perturbaciones en los parámetros y condiciones ambientales y produce alteraciones bioquímicas y enzimáticas en ciertas especies residentes. Tales perturbaciones se reflejarán en:

1. Aumento de las concentraciones de metales pesados, nutrientes, materia orgánica y clorofila-*a* en los sitios más afectados.
2. Cambios en el estado oxidativo de los organismos provenientes de los sitios más impactados que desencadenen un aumento en actividad de enzimas pertenecientes al sistema antioxidativo.
3. Incrementos en los niveles de LPO en los organismos que habitan los sitios más impactados como consecuencia del aumento de estresores que sobrepasen la capacidad de defensa del sistema antioxidativo.

ÁREA DE ESTUDIO

II. ÁREA DE ESTUDIO

II.1. Ubicación y geomorfología

La ciudad de Ushuaia se localiza en el extremo sur de la Isla Grande de Tierra del Fuego, entre los 54° 48' de latitud sur y 68° 18' de longitud oeste. Se sitúa al pie de los Montes Martial, pertenecientes a los Andes Patagónicos Fueguinos y a orillas de la Bahía Ushuaia, en el Canal Beagle (ver Anexo de Figuras). La cadena montañosa en este sector tiene rumbo Este-Oeste y laderas orientadas al Este-Sudeste, la altura de las cumbres no superan los 1200 m.s.n.m. (Ponce, 2006).

La ciudad se ubica en el área topográfica cordillerano-andina. En esta porción austral del territorio, el suelo cuenta con un basamento constituido por rocas metamórficas que luego fue recubierto por rocas volcánicas y sedimentarias, erosionadas posteriormente durante la última glaciación, que terminó de configurar el paisaje actual del lugar. Se trata de un paisaje de relieve montañoso, de morfología glaciaria y de ambiente peri glaciar. La formación Yaghan es la roca base que caracteriza el suelo donde se ubica la ciudad y que comprende también al área de montañas circundante: Montes Martiales, Monte Oliva, Cerro Cinco Hermanos. En la costa norte del Canal, algunos sectores carecen de verdaderas playas, presentan un declive elevado y abruptos acantilados. En otras porciones, en cambio, se desarrollan gran cantidad de bahías, como es el caso de Bahía Ushuaia en donde se encuentra emplazada la ciudad, que es una de las más amplias de la porción oeste del Canal. (Bujalesky, 1998; Ponce, 2006).

II.2. Características del Canal Beagle

El Canal Beagle se ubica entre la costa sur de la isla Grande de Tierra del Fuego y la costa norte de las islas Hoste y Navarino, pertenecientes al archipiélago fueguino. En su extremo Oeste se comunica con el Océano Pacífico mediante los brazos Noroeste y Sudoeste, rodeando la isla Gordon. Desde la punta que divide estos brazos hacia el Este, el canal tiene una extensión de 180 km. Si bien en el sector comprendido entre la ciudad de Ushuaia y la Isla Gable la profundidad media es de 50 metros, las profundidades máximas alcanzan valores de 300 metros en los brazos Noroeste y Sudoeste; el ancho medio es de 5 km y alcanza un valor mínimo de 1,8 km en la zona

de la isla Gable en el Paso Mckinlay, de solo 30 metros de profundidad (Balestrini *et al.*, 1998; Bujalesky *et al.*, 2004; Isla *et al.*, 1999).

En su paso por el canal el agua de mar es diluida por el aporte de aguas continentales originadas en el alto índice de precipitaciones y deshielos que caracterizan la región. Como consecuencia la salinidad del área presenta valores característicos de ambientes costeros marinos (32,01) solo durante el invierno, disminuyendo en el resto de los meses hasta alcanzar, en algunos sectores de la bahía Ushuaia, valores de 15,21 en primavera (Amin *et al.*, 2010a) y de 5,00 en verano (Gil *et al.* 2011)

La circulación del agua en el canal está favorecida por la preponderancia de vientos del Oeste y Sudoeste, con una velocidad anual media de 14,3 km/h. Noviembre aparece como el mes más ventoso, los porcentajes de calmas entre abril y julio son los más elevados. No obstante estos ciclos, los períodos ventosos tienen oportunidad de ocurrencia en cualquier época del año (Iturraspe & Schroeder, 1989). Esto genera corrientes permanentes, también llamadas de deriva, que se desplazan en dirección oeste a este en Bahía Golondrina y en sentido antihorario en Bahía Ushuaia. La dirección de las corrientes cambia con respecto a las mareas, que para el caso de la bahía Ushuaia son semidiurnas, lo cual implica que aproximadamente cada 24 horas tienen lugar dos pleamares y dos bajamares con una amplitud de 1,20 metros. Balestrini *et al.* (1998), mencionan que a medida que se avanza hacia la pleamar, el agua ingresa en sentido horario a la Bahía Ushuaia y en sentido Este/Oeste en la Bahía Golondrina. Cuando comienza a bajar la marea, el agua se retira en sentido antihorario de la Bahía Ushuaia y en dirección Oeste/Este de la Bahía Golondrina.

II.3. Clima

El clima es templado húmedo y está fuertemente influenciado por masas de aire antárticas y subantárticas movilizadas desde el Anticiclón del Pacífico (Ponce, 2006).

La temperatura media anual es de 5,4 °C. Los valores mínimos se registran entre junio y julio alcanzando en promedio temperaturas de -2 °C, mientras que los valores máximos se registran en un promedio de 14 °C en enero y febrero. La humedad relativa anual es de 73,6 %; las precipitaciones medias totales alcanzan los 533,5 mm anuales, de los cuales 131,9 mm corresponden a precipitaciones nivales (Tabla II.1) (Iturraspe & Schroeder, 2002).

Tabla II.1: Resumen histórico (años 1901-2002) de datos climáticos de Ushuaia (*).

Variable climática	Unid.	Períodos												Anual
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	
Temperatura media	[oC]	9,3	9	7,7	5,5	3,2	1,3	1,1	2	3,7	5,9	7,2	8,5	5,4
Temperatura media máxima	[oC]	14,1	14	12,3	9,6	6,6	4,5	4,4	5,8	7,9	10,8	12,2	13,1	9,6
Temperatura media mínima	[oC]	5,3	5,1	3,7	2,1	0	-1,8	-2	-1,3	0,4	2,2	3,3	4,7	1,8
Humedad relativa	[%]	71,3	69,7	73,2	74,6	77,1	80,4	80,3	76,9	73	68,9	68,5	69,1	73,6
Precipitación total	[mm]	50,2	47,5	53,9	49,5	44,1	43,6	39,2	40,5	37,5	37,8	42,3	47,4	533,5
Precipitación nival	[mm]	0,9	0,3	3,9	9,3	20,2	27,3	25,1	20,7	16,5	4,5	1,6	1,6	131,9
presión atmosférica	[hpc]	995,8	995,1	997,3	997,4	998,1	998,2	999,3	998,1	999,5	997,9	996,6	996,4	997,4
Velocidad media del viento	[km/h]	17	16	13,4	12	10,1	9,8	10,1	11,9	14,6	17,5	19,2	18,3	14,3
Frecuencia de calmas	%	43	48	53	54	67	64	67	59	54	44	39	40	53
Promedio vientos máximos	[km/h]	57,6	61,9	50,3	47,9	39,7	44,7	40,1	47,9	56,4	55,1	55,8	56	51,2
Dirección promedio vientos		SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW	SW
Radiación solar	Kjouis/m ²	18315	15965	11109	5662	2368	1412	1948	4645	9344	15160	17503	18641	10173
Heliofania efectiva	[hs]	5,4	5,2	4,3	3,4	2,4	1,4	1,8	2,7	4,1	5,3	6	5,4	3,9
Frecuencia de heladas	[días]	0,3	0,6	2,3	7,7	16,3	21,6	23,5	21,3	13,9	6,8	3,5	0,8	118,5

*Fuente: SMN, Base Aeronaval Ushuaia y registros propios Estación CADIC, Ushuaia. Iturraspe & Schroeder (2002).

II.4. Hidrografía

La red de drenaje en el Canal Beagle se compone de pequeños ríos y arroyos, que provienen de los valles intermontanos, presentando la mayoría de ellos aportes glaciares. El agua disponible tiene bajo contenido de sales disueltas (del orden de 100 mg/l) y un contenido de hierro elevado. Algunas alteraciones se producen por efectos de los turbales, con descensos del pH e incremento del color y la turbidez, como consecuencia de la incorporación de ácidos orgánicos. Otro nivel de escurrimiento superficial esta dado por pequeños cursos de agua, denominados localmente como "chorrillos". Estos proceden de los aportes de laderas, tanto superficiales como de vertientes subterráneas (Ponce, 2006).

Entre los cursos de agua más importantes cercanos a la ciudad de Ushuaia se encuentran los Ríos Olivia y Pipo y los Arroyos Buena Esperanza y Grande (ver Anexo mapas Figura II.1). El Río Olivia desde sus nacientes recorre aproximadamente 40 km, drenando una inmensa extensión con turbales. En su curso inferior atraviesa depósitos de origen glaciar, desembocando en el extremo oriental de la Bahía Ushuaia. El Río Pipo se extiende entre los montes Martial y el monte Susana y desemboca finalmente en la Bahía Golondrina en forma de delta. El Arroyo Grande nace en el valle de Andorra, en su curso inferior atraviesa una extensa área ocupada por turberas. Su extensión es de 25 km y desemboca en el centro de la bahía Ushuaia. El Arroyo Buena Esperanza tiene sus nacientes en los montes Martial y es canalizado aguas abajo de la planta

potabilizadora de la Dirección de Obras Sanitarias y Servicios Sanitarios. De esta manera atraviesa la ciudad y desemboca en Bahía Encerrada (Ponce, 2006).

II.5. Suelo y vegetación

El sustrato en donde se desarrollan los suelos de la zona está constituido principalmente por materiales de origen glaciario. Predominan los materiales finos limo-arcillosos. En las zonas de alta pendiente, el sustrato rocoso presenta incapacidad de retener material fino, lo cual impide un adecuado desarrollo del suelo y de la vegetación (Pascuarelli, 1987).

Los suelos turbosos son importantes debido a la extensión que ocupan en el área. Se desarrollan a partir del crecimiento de determinadas especies vegetales dentro de cubetas de origen glaciario. Estos suelos se encuentran saturados la mayor parte del año por lo que la descomposición de la vegetación es lenta. Las plantas parcialmente descompuestas se acumulan sobre un nivel de turba sin estructura, debajo del cual se encuentran los sedimentos arcillosos (Pascuarelli, 1987).

El tipo de vegetación dominante es el bosque de *Nothofagus* con las especies *N. Pumilio* (Lenga) y *N. antártica* (Ñire); en menor medida y agrupados en las laderas se encuentran ejemplares de las especies *N. betuloides* (Guindo). El denominado “bosque cordillerano” es el conocido localmente como “lengal” y se corresponde a las laderas boscosas de los valles. En las áreas deprimidas, anegadas o mal drenadas se desarrollan turbales y pastizales con arbustos y matorrales (Bondel, 1988).

II.6. La ciudad

El área urbanizada se extiende aproximadamente 14 km a lo largo de la Bahía Ushuaia y Bahía Golondrina, desde la desembocadura del río Olivia hasta la desembocadura del río Pipo (ver Anexo de Figuras: Fig.II. 1 y II.2). Este modelo lineal de desarrollo que se ensancha levemente hacia el Oeste del rectángulo fundacional, se debe a la reducida extensión del área urbanizada hacia el interior por la presencia de la zona de pendientes pronunciadas del faldeo de los Montes Martial (Plan de ordenamiento urbano, Ushuaia 2003). El área costera lindante con las bahías Golondrina y Ushuaia (Figura II.1) recibe el aporte constante de residuos cloacales, industriales y portuarios que producen el deterioro del ecosistema, afectando la calidad del agua y sedimento (Gil *et al.*, 2011).

Las descargas, ubicadas sobre la línea costera, vierten su contenido en sectores adyacentes a la ciudad, mientras que el dispersor cloacal se encuentra ubicado sobre la península occidental Ushuaia y funciona como un sumidero que colecta descargas desde una red principal que se encuentra sobre la línea costera de Bahía Ushuaia y de redes secundarias que provienen del sector sudoeste de la ciudad (Esteves & Amin, 2004). La provisión de agua potable por parte de la Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios es de 22000 m³ diarios por lo que se estima en ese orden el aporte cloacal general, aunque al ser un sistema pluvio-cloacal, el caudal efectivo que llega al mar es considerablemente mayor y varía según la época del año influenciado principalmente por las condiciones de nieve, deshielo y lluvias a las que se encuentra sometido el ambiente (Amin *et al.*, 2009). Así mismo, los cauces de ríos y arroyos que desembocan a lo largo de la zona costera y que en sus trayectos por zonas urbanas se nutren del aporte de descargas pluvio-cloacales son otra fuente más de ingreso de contaminantes al sistema (ver Anexo de Figuras: Fig.II.1 y 2).

Otros aspectos a considerar son el aumento constante de la población por inmigración interna y la marcada estacionalidad turística, que podrían incidir en la demanda de servicios sanitarios y en la producción de desechos líquidos y residuos sólidos (Amin *et al.*, 2009). A esto puede agregarse que el puerto de Ushuaia es el único en la isla, por lo que ha cobrado un desarrollo significativo y sostenido en los últimos años. A él arriban cruceros de turismo, buques pesqueros y de carga y en menor número, buques científicos (Tabla II.2).

Respecto a las actividades que se desarrollan en el área costera, dentro del proceso expansivo de la ciudad y específicamente en el sector industrial, se realizaron alteraciones con rellenos de grandes áreas de basura y escombros. Estas superficies ganadas al mar son utilizadas por emprendimientos industriales particulares, conformando un paisaje costero en el que se destacan playas utilizadas como depósito de contenedores navales de importantes empresas nacionales e internacionales y extensas superficies destinadas para depósito de basura y desechos de industrias y comercios. Todas estas ocupaciones y usos irregulares resultan no solo en una contaminación visual sino que además aportan a la contaminación del agua y sedimentos y destruyen hábitats naturales con la consecuente disminución de la diversidad de especies.

Tabla II.2: Número de buques que arribaron al puerto de Ushuaia desde el año 1995 hasta el 2009 (*).

Año	Tipo de embarcación								TOTAL
	pasajeros	pesca	carga	militar	científico	apoyo	tanque	otros	
1995	133	106	91	3	5	26	0	32	396
1996	138	100	77	13	2	3	0	36	369
1997	132	73	87	16	5	6	2	37	358
1998	153	58	96	17	6	4	6	38	378
1999	152	64	75	5	6	0	9	36	347
2000	186	70	86	19	8	0	14	43	426
2001	173	52	94	9	6	1	9	28	363
2002	164	85	84	12	14	1	1	17	378
2003	202	76	84	15	8	6	0	14	405
2004	253	95	101	17	8	4	14	36	528
2005	276	63	101	19	8	5	24	34	530
2006	338	68	108	18	6	1	26	31	596
2007	355	66	88	26	7	0	25	28	595
2008	374	68	75	25	6	0	25	25	598
2009	337	69	62	18	9	0	20	24	539

*Datos obtenidos de la página oficial de la Dirección Provincial de Puertos de Tierra del Fuego (www.puertoushuaia.gov.ar).

II.7. Estaciones de muestreo

Para el presente estudio se seleccionaron 5 sitios de muestreo, 3 de ellos próximos a la ciudad, distribuidos sobre la costa de Bahía Ushuaia, 1 en la Península Occidental Ushuaia y el restante sobre la costa de Bahía Golondrina (ver Anexo de Figuras: Fig.II.3 y 4). La selección de estos sitios se realizó en base a conocimientos previos sobre el área de estudio. La descripción de cada uno de ellos se detalla en la Tabla II.3.

Tabla II.3: Descripción de los sitios de estudio.

Estación	Localización	Descripción
Bahía Golondrina (BG)	54° 50.415'S 68° 21.423'O	Bajo impacto, zona alejada al emplazamiento principal de la ciudad.
Península (PU)	54° 50.837'S 68° 19.725'O	Extremo occidental de la Península Ushuaia, donde se encuentra el dispersor cloacal.
Club de actividades náuticas (AF)	54° 48.800'S 68° 18.628'O	Sector Este del muelle perteneciente al club de deportes y actividades náuticas.
Planta Orión (PO)	54° 48.391'S 68° 17.391'O	Muelle de operaciones de carga y descargas de combustible.
Zona Industrial (ZI)	54° 47.889'S 68° 16.00'O	Sector de la ciudad donde se emplazan fábricas e industrias.

ANEXO DE FIGURAS ÁREA DE ESTUDIO

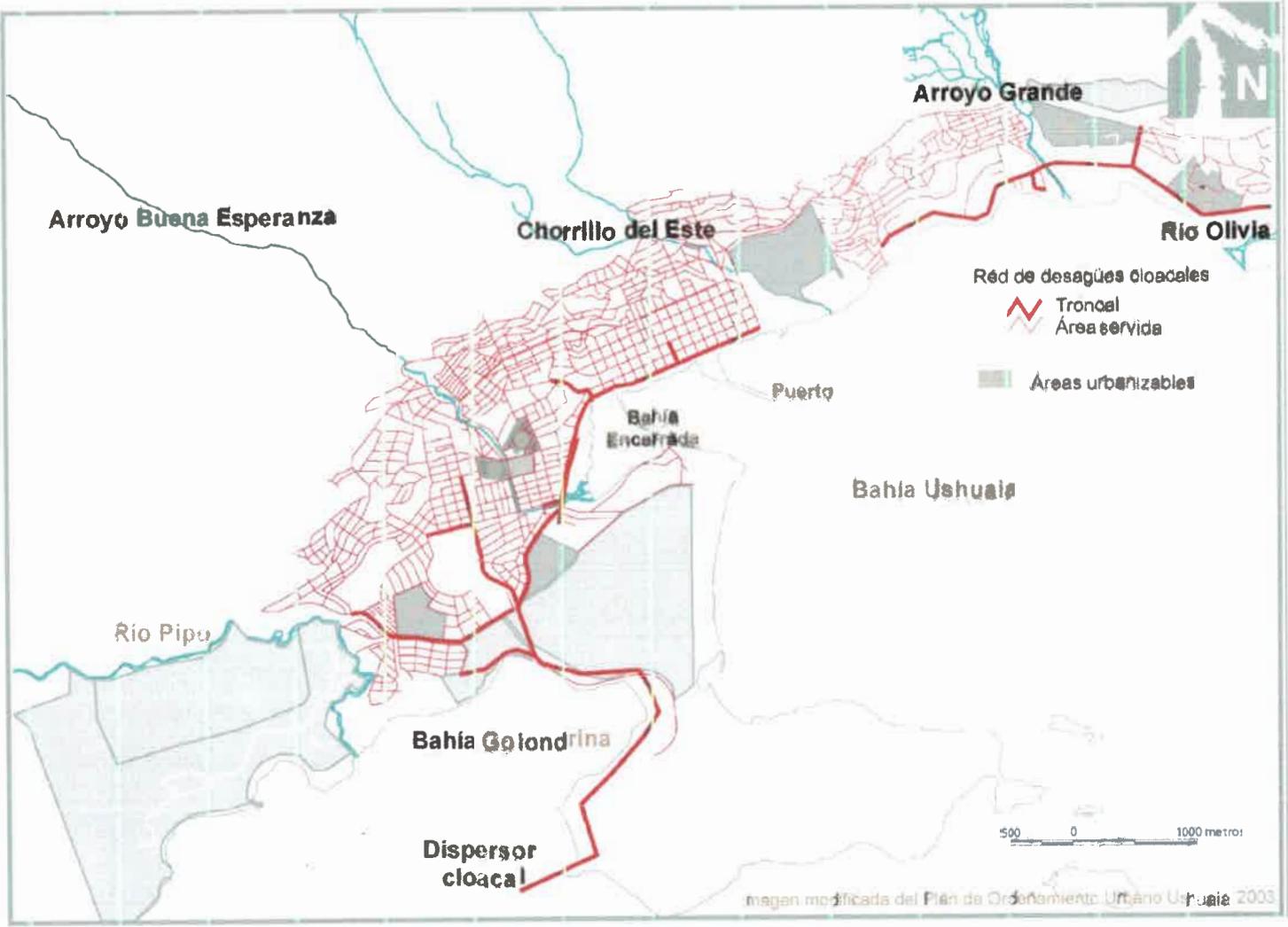


Figura 11.1: Red cloacal y principales cursos de agua que desembocan en las bahías (fuente: Plan de Ordenamiento Urbano, Ushuaia 2003).

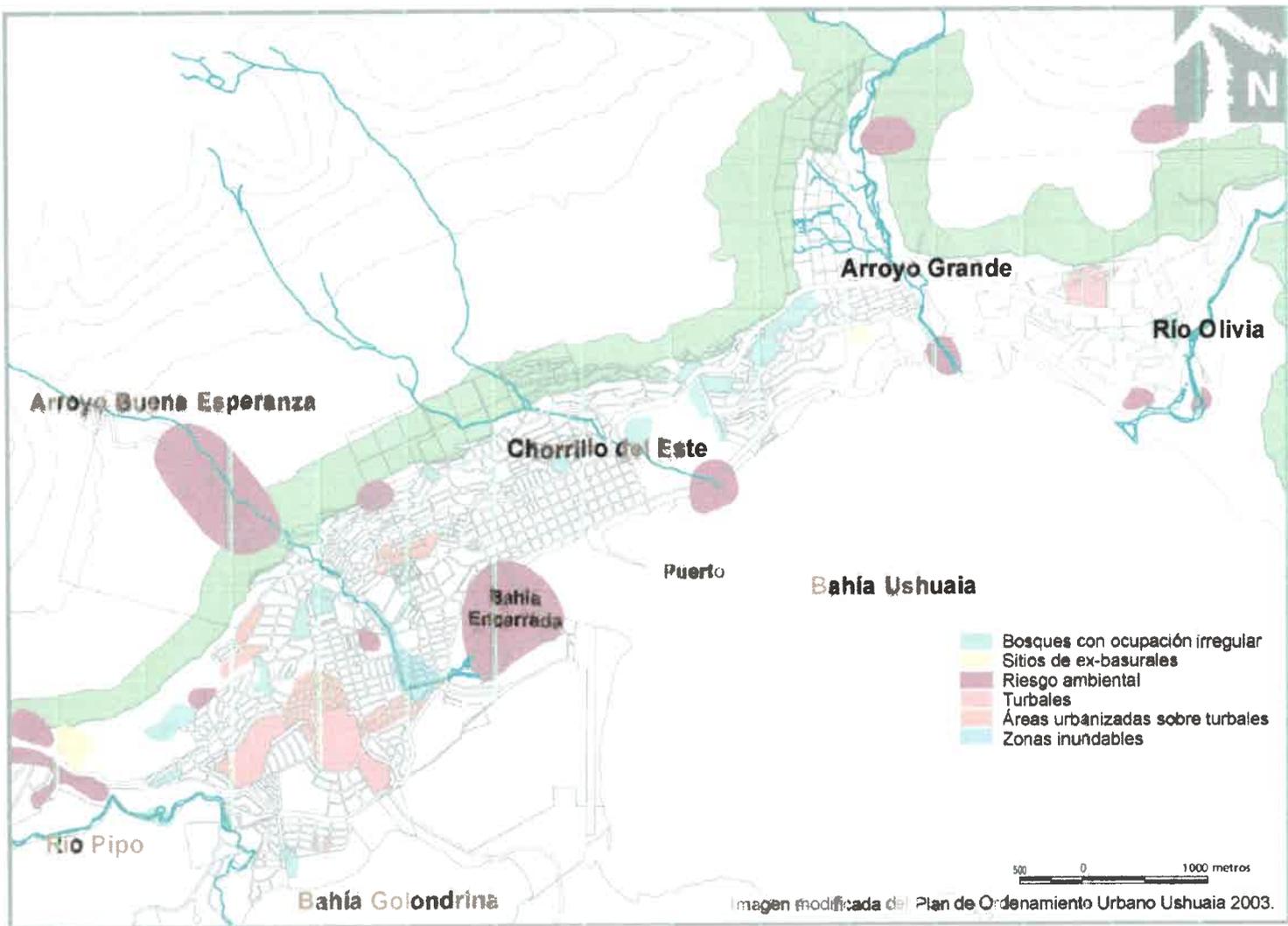


Figura II.2: Características del área urbanizada (fuente: Plan de Ordenamiento Urbano, Ushuaia 2003).



Figura II.3: Área de estudio indicando los sitios de muestreo. BG: Bahía Golondrina, PU: Península Occidental Ushuaia, AF: Club de actividades náuticas, PO: Planta Orión y ZI: Zona Industrial.

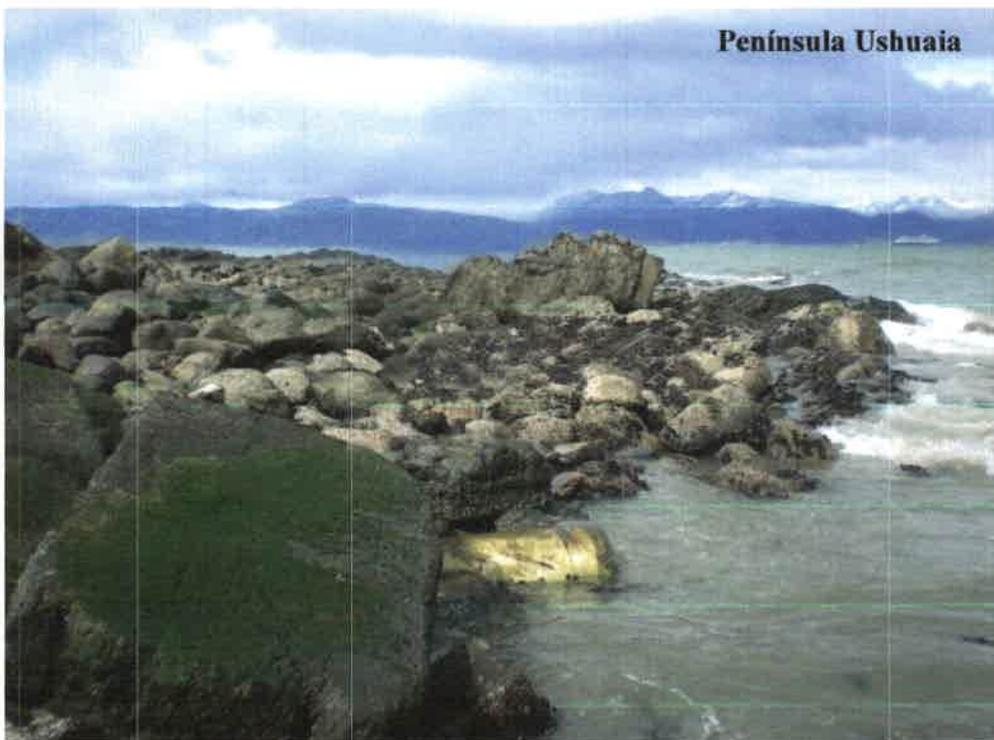
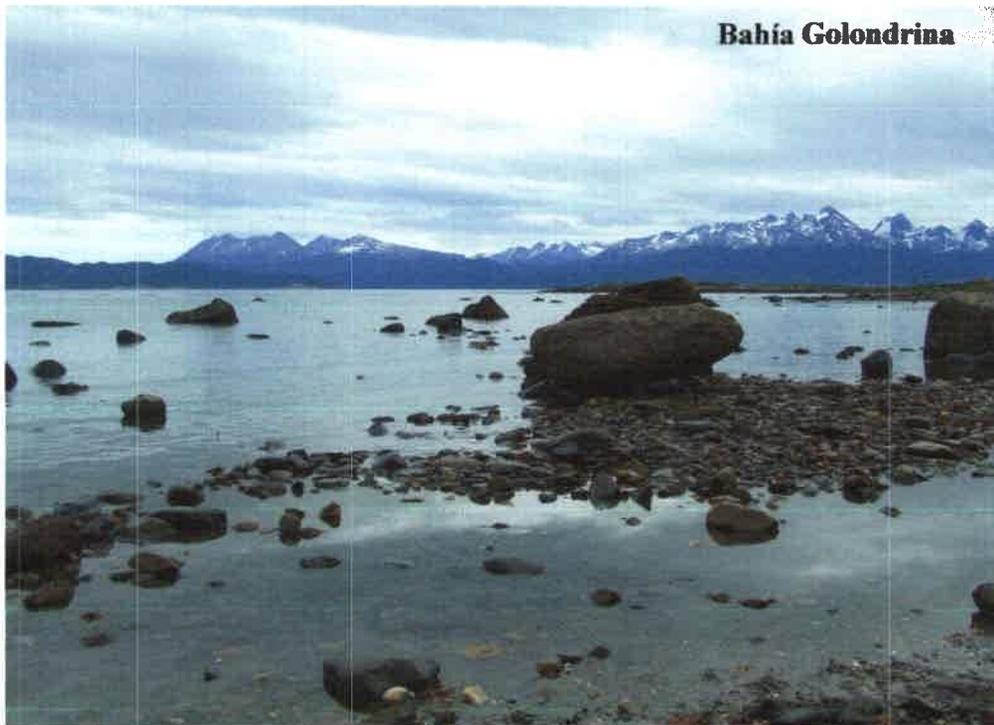
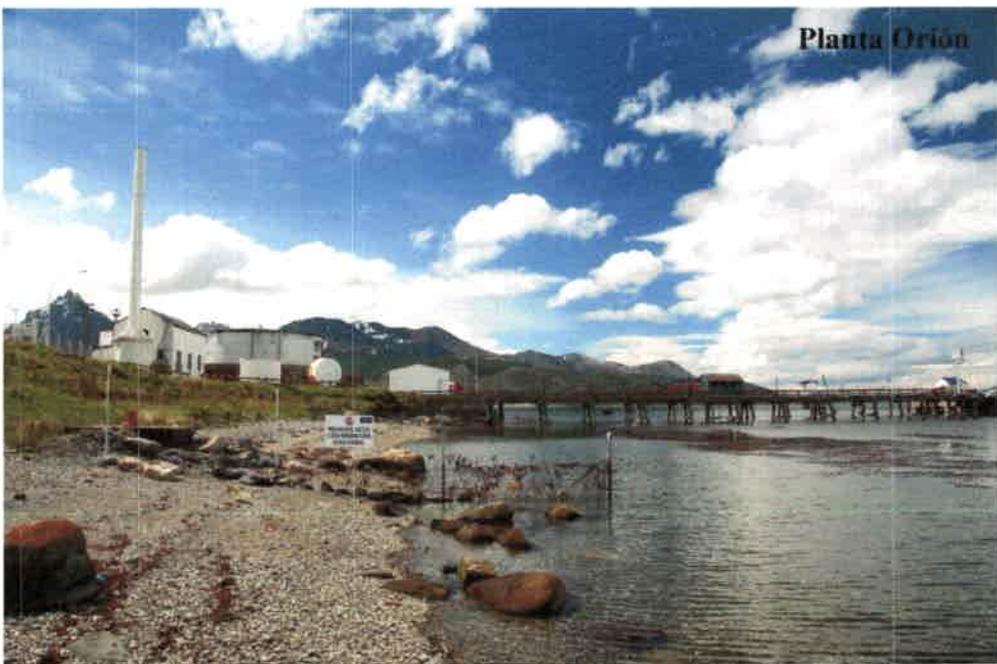
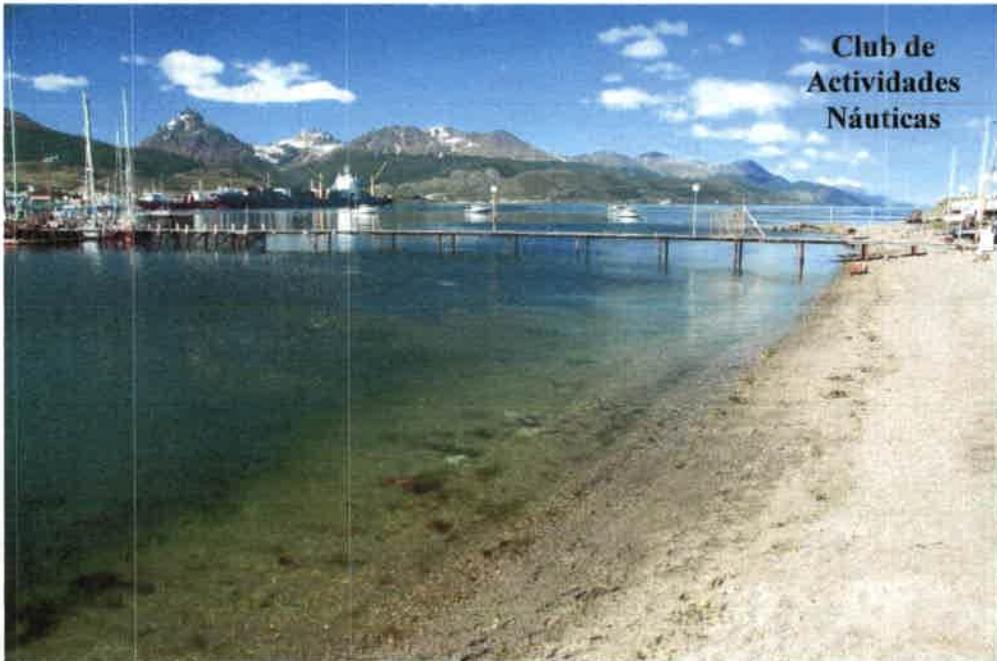


Figura II.4.: Imágenes de las estaciones de muestreo

Continuación Figura II.4.



Continuación Figura II.4.



MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En cada sitio seleccionado se llevaron a cabo un total de 8 campañas de muestreo realizadas entre Julio de 2006 y Junio de 2008. La Tabla III.1 detalla las campañas y los parámetros determinados en cada una de ellas.

Tabla III.1: Muestréos y determinaciones realizadas en el presente estudio.

Muestréos			Determinaciones																		
Nº	Fecha	Estación	Muestras colectadas	In.S	Nut	Clor-a	MOP	M.P	Gr	CAT	GST	SOD	LPO	Lip	IC	%H	%MO	%C			
1	Jul 2006	invierno-I	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X					X	X						
			<i>N. magellanica</i>					X	X					X	X						
			<i>N. deaurata</i>																		
2	Nov 2006	primavera-I	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>																		
3	Feb 2007	verano-I	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	Mayo 2007	otoño-I	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	Ago 2007	invierno-II	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	Nov 2007	primavera-II	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	Feb 2008	verano-II	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	Jun 2008	otoño-II	agua	X	X	X	X														
			sedimento					X	X												
			<i>M. edulis chilensis</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. magellanica</i>					X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
			<i>N. deaurata</i>									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Abreviaciones: **In.S-** parámetros fisicoquímicos tomados in situ: temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad. **Nut-** nutrientes: amonio, nitrito, nitrato, fosfato y silicato. **Clor-a-** clorofila-a. **MOP-** materia orgánica particulada. **M.P-** metales pesados: Cd, Pb, Cu, Zn y Fe. **Gr-** granulometría. **CAT-** catalasa. **GST-** Glutación S-transferasa. **SOD-** superóxido dismutasa. **LPO-** lipoperoxidación. **Lip-** lípidos. **IC-** índice de condición. **%H-** porcentaje de humedad. **%MO-** porcentaje de materia orgánica. **%C-** porcentaje de cenizas.

III.I. AMBIENTE

III.I.1. AGUA

En la línea de costa de cada sitio de estudio y en los 15 y 7 días previos al muestreo de organismos se registraron parámetros físico-químicos *in situ* y, paralelamente, se tomaron muestras de agua en botellas plásticas, previamente acondicionadas, las cuales fueron mantenidas en frío durante el transporte hasta el laboratorio. Una vez allí, se filtraron con filtros GF/C para determinar posteriormente las concentraciones de nutrientes, clorofila-*a* y materia orgánica particulada. En la sección III.III se presenta un resumen de las técnicas y equipamientos empleados en cada caso.

III.I.1.a. Parámetros físico-químicos *in situ*

Con un sensor multiparamétrico Horiba U-10 se registraron los siguientes parámetros *in situ*: temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad..

III.I.1.b Clorofila-*a*

En laboratorio, las muestras se filtraron inmediatamente con filtros GF/C, utilizando un volumen de 1 - 1,250 litros. Posteriormente los filtros se enrollaron y se guardaron en tubos de vidrio con tapa esmerilada y se conservaron en oscuridad y en freezer (-20°C) hasta su análisis.

Los contenidos de clorofila-*a* se determinaron de acuerdo al método fluorimétrico de Holm-Hansen *et al.* (1965), el cual consiste en la extracción de los pigmentos con metanol. Posteriormente se realizaron las lecturas de absorbancia de los extractos en fluorómetro antes y después del agregado de HCL 0,1 N.

III.I.1.c. Materia Orgánica Particulada (MOP)

En el laboratorio las muestras de agua se filtraron a la brevedad posible, con filtros GF/C previamente muflados a 450-500 °C durante 30 minutos en sobres de aluminio. El volumen filtrado fue de 1-1,250 L. Para conservar la muestra, se le adicionó al filtro 4 ml de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) 0,32 M. Posteriormente los

filtros se plegaron y colocaron en los sobres de aluminio y se almacenaron en freezer (-20°C) hasta su análisis.

El contenido de MOP se determinó siguiendo el método descrito por Strickland & Parsons (1972), el cual consiste en una oxidación húmeda de la materia orgánica mediante dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio ácido. El principio de este método es medir la disminución en la absorbancia del color amarillo del dicromato (Cr^{+6}) luego de su reducción a Cr^{+3} por la materia orgánica presente. Las lecturas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro con celda de 1 cm de paso óptico a 440 nm.

III.I.1.d. Nutrientes

El material utilizado para la toma y procesamiento de muestras de nutrientes fue lavado con detergente neutro y agua de red, seguido por un enjuague con agua destilada y posteriormente sumergido en HCl al 5 % durante 24 hs. Luego fue nuevamente enjuagado con agua de red y finalmente con agua destilada.

Con excepción del amonio, las determinaciones de nutrientes fueron realizadas por personal del Área de Oceanografía Química (AOQ) del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO – CONICET)

Amonio

De la muestra original de agua (1-1,250 l) las submuestras (25 ml) para determinar amonio se colocaron en frascos de vidrio color ámbar, conservadas con fenol (1 ml fenol 1:10 p/v) en heladera. La determinación de amonio se realizó a través del método de azul de indofenol (Strickland & Parsons, 1972). El principio de este método consiste en que, en un medio alcalino y en presencia de nitroprusiato que actúa como catalizador, los iones de amonio presentes reaccionan con el fenol y el hipoclorito de sodio formando el azul de indofenol, el cual puede evaluarse espectrofotométricamente a 640 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de amonio presente. El límite de detección fue de 0,1 $\mu\text{g-at/L}$.

Para la determinación del resto de los nutrientes inorgánicos disueltos, las submuestras de 25 ml de agua, provenientes del filtrado de la muestra original, fueron

conservadas en freezer (-20°C) en envases plásticos hasta su análisis, el cual se realizó en el AOQ (IADO – CONICET).

Nitrito

La determinación colorimétrica de la concentración de nitrito en agua de mar se realizó haciendo uso de la reacción de diazotación entre el nitrito y la sulfanilamida en medio ácido. El compuesto obtenido reacciona con la amina aromática, N-(1naftil) etilendiamina, a través de una reacción de copulación para formar un compuesto azoico color rojo que presenta un máximo de absorción a 540 nm, según el método de Benschneider & Robinson (1952). La automatización del método se hizo siguiendo el procedimiento descrito por Grasshoff *et al*, (1983).

Nitrato

Para determinar la concentración de nitrato se hizo pasar la muestra por una columna de reducción compuesta de Cd metálico recubierto por Cu (cadmio cuperizado), en donde el nitrato es reducido a nitrito con rendimientos estables y elevados (Treguer & Le Corre, 1975a). El nitrito allí formado fue determinado colorimétricamente según el método de Benschneider & Robinson (1952) citado anteriormente.

Fosfato

La determinación de la concentración de fosfato se realizó siguiendo el método de Eberlein & Kattner (1987) basado en el método original de azul de molibdeno de Murphy & Riley (1962). En este caso, los iones ortofosfatos reaccionan con el molibdato de amonio para formar un complejo color amarillo, el fosfomolibdato de amonio, que luego de la reducción da una coloración azul. Como agente reductor se utiliza ácido ascórbico pues se obtienen resultados reproducibles y brinda la ventaja de poder utilizar un único reactivo formado por ácido sulfúrico, molibdato de amonio hidratado, ácido ascórbico y tartrato de antimonio y potasio. Al circuito analítico, además, se le agrega un agente de lavado que contiene 2,5 ml de aerosol 22 (Technicon GMBH, Bad Vilbel,FRG) en 1 litro de agua bidestilada.

Silicato

El procedimiento automático para la determinación de silicatos solubles en agua de mar se basa en la reducción del silicomolibdato en solución ácida a azul de molibdeno por medio de ácido ascórbico (Technicon®, 1973). Ácido oxálico es introducido a la muestra antes del agregado del ácido ascórbico para eliminar la interferencia producida por los fosfatos.

III.1.2. SEDIMENTOS

Se obtuvieron muestras de sedimentos superficiales (aproximadamente a 5 cm de profundidad) en la zona intermareal de los 5 sitios seleccionados. Se recolectaron manualmente usando cucharas plásticas e inmediatamente se colocaron en doble bolsa de polietileno.

En el laboratorio las muestras (aproximadamente 1 kg de sedimento por sitio) fueron colocadas en bandejas sobre papel manteca; en forma manual se quitaron bioclastos y material orgánico visualmente distinguible (vegetal o animal) presentes. Seguidamente se secaron en estufa a $50 \pm 5^\circ \text{C}$, hasta peso constante. Luego se conservaron en doble bolsa de polietileno, mantenidas en espacios cerrados libres de humedad hasta su posterior análisis. El material utilizado en la técnica para determinación de metales pesados fue previamente acondicionado, sometido a un lavado con solución de detergente neutro y enjuagado con agua de red y agua destilada. Posteriormente fue sumergido en solución de ácido nítrico 0,7 % durante 24-48 horas, terminando con un enjuague de agua destilada.

Para la determinación de metales totales se procedió a desagregar y homogeneizar las muestras en mortero de porcelana. Posteriormente se tamizaron para la determinación de las diferentes fracciones granulométricas: $>1000 \mu$; $250 - 1000 \mu$; $62 - 250 \mu$ y $<62 \mu$ (Commendatore *et al.*, 1996). De la fracción menor a $62 \mu\text{m}$ se tomaron fracciones de $0,5 \pm 0,05 \text{ g}$. La selección de esta fracción elimina la influencia del tamaño del grano y es considerada la más adecuada para la determinación de metales en sedimentos (Förstner & Salomons, 1980; Klamer *et al.*, 1990). Sobre esta alícuota se realizó la extracción de los metales totales (Cd, Pb, Cu, Zn y Fe), utilizando el método

propuesto por Marcovecchio & Ferrer (2005) reemplazando el peróxido de hidrógeno utilizado originalmente por ácido perclórico, para mejorar la oxidación de las muestras. La metodología se basa en la destrucción del grueso de la materia orgánica presente en las muestras por “mineralización húmeda” con una mezcla de ácidos ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1)). Se trabaja a temperatura controlada, en baño de glicerina ($110 \pm 10^\circ\text{C}$) con reducción del volumen hasta aproximadamente 1 ml y luego dilución con ácido nítrico al 0,7 %. La cuantificación se realizó luego de la lectura de los extractos en espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire acetileno, presente en el AOQ (IADO – CONICET). En todos los casos las muestras fueron analizadas por duplicado y el resultado expresado en microgramos del metal por gramo de sedimento seco ($\mu\text{g/g}$ peso seco) con excepción del Fe en sedimento que fue expresado como miligramo del metal por gramo de sedimento seco (mg/g peso seco).

La calidad analítica de la determinación de cada metal se controló con materiales de referencia (*pond sediments*, R.M. N°2) provistos por el National Institute for Environmental Studies (NIES) de Tsukuba (Japón). Los porcentajes de recuperación en los análisis de cada metal en el material de referencia se muestran en la Tabla III.2 El límite de detección del método (LDM), por debajo del cual los resultados son expresados como “no detectables” (nd) se presentan en la Tabla III.3 En la sección III.III se presenta un resumen de las técnicas y equipamientos empleados en cada caso.

Tabla III.2: Porcentajes de recuperación (rangos) en los análisis del material de referencia (NIES) para determinación de la calidad analítica de los datos.

Metal analizado	sedimento
Cd	91,4 - 99,3 %
Pb	94,7 - 98,8%
Cu	95,5 - 99,4%
Zn	97,4 - 101,5%
Fe	97,4 - 101,3%

Tabla III.3: Límite de detección del método (LDM), de acuerdo a cada una de las matrices analizadas.

matriz	unidad	Cd	Pb	Cu	Zn	Fe
sedimento	µg/ml	0,01	0,11	0,04	0,04	0,14
	µg/g	0,27	2,15	0,77	0,88	2,73

III.1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS AMBIENTALES

Los datos ambientales fueron analizados con diversos métodos estadísticos y/o descriptivos, de acuerdo a los objetivos propuestos. Así, con el fin de detectar diferencias entre los sitios respecto de las variables medidas en agua (temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad, concentración de clorofila-*a*, materia orgánica particulada, nutrientes) y de los niveles de metales pesados en sedimento, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido por el test de Tukey para determinaciones posteriores. Previamente se comprobaron sobre los datos las condiciones de normalidad (Shapiro-Wilks) y de igualdad de varianza (test de Bartlett). En el caso de que los datos no cumplieran con estas condiciones se aplicaron transformaciones logarítmicas (log10). Si aún así no se cumplían estas condiciones, se utilizó un análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) y el test de Dunn para comparaciones múltiples (Daniel, 1978). Para el análisis estadístico de los datos de metales con valores no detectables, el valor utilizado en cada caso fue de la mitad del valor correspondiente al LDM empleado (Botté, 2005). El nivel de significancia en todos los casos fue de $p < 0,05$ (Sokal & Rohlf, 1981). Se calculó el Índice de Contaminación Urbano-Industrial (ICUI) ($ICUI = \sum [Cu] + [Zn] + [Pb]$) el cual describe el comportamiento del Cu, Zn y Pb, considerando su origen antropogénico (Amat Infante *et al.*, 2006). Finalmente, para lograr una descripción global de los sitios de estudio se utilizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando una matriz de correlación y empleando la totalidad de los datos ambientales medidos en los dos años de muestreo. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa de estadística STATISTICA versión 7.0.

III.II ORGANISMOS

Entre los meses de Julio de 2006 y Junio de 2008 (Tabla III.1) en cada sitio de muestreo se obtuvieron ejemplares adultos (50 ± 5 mm) de las especies locales del mejillón *Mytilus edulis chilensis*, y de la lapa *Nacella (Patinigera) magellanica*. A partir de Febrero de 2007, se incluyó una segunda especie de lapa, *Nacella (Patinigera) deaurata*, debido a la dificultad de encontrar en AF organismos de la especie originalmente propuesta adecuados en número y talla. Se decidió entonces tomar muestras de esta otra especie tanto en AF como en BG y ZI, ya que son los sitios en los que se encuentra con facilidad. Esta incorporación resultó de especial interés dada la posibilidad de comparar las respuestas biológicas de ambas especies de lapas y analizar la viabilidad o no de su utilización de manera indistinta.

En todos los casos, los organismos se recolectaron manualmente de la zona intermareal, preferentemente durante las horas de bajamar y fueron transportados hasta el laboratorio en recipientes plásticos con agua del sitio correspondiente, en conservadoras refrigeradas manteniéndose allí hasta el momento de su procesamiento. De igual forma que para los datos ambientales, en la sección III.III se presenta un resumen de las técnicas y equipamientos empleados en cada caso.

III.II.1 BIOMARCADORES

Se determinaron las actividades de tres enzimas pertenecientes al sistema antioxidante (Catalasa –CAT, Glutación S-transferasa –GST y Superóxido Dismutasa –SOD) y se cuantificaron los niveles de lipoperoxidación (LPO) como respuesta no enzimática. Se diseccionaron 5 individuos por especie y por sitio de muestreo, de los cuales se extrajeron glándula digestiva (gd), branquia (br) y manto (ma) para el caso del mejillón y glándula digestiva y gónada (go) en el caso de lapas (Figura III.1). Una vez diseccionados, los órganos se mantuvieron almacenados en freezer hasta su utilización. Esta selección de tejidos se realizó en base a pruebas preliminares que permitieron seleccionar los órganos más adecuados para cada especie. Con esos resultados, se definió estudiar las respuestas enzimáticas en branquia y glándula digestiva de *M. edulis* y en glándula digestiva de *N. magellanica* y *N. deaurata*, por ser estos los órganos en

que se obtuvieron respuestas satisfactorias luego de verificar que en manto de mejillón y en gónadas de lapas la actividad resultó muy inestable. Por su parte, la LPO se midió sobre la totalidad de los órganos submustrados en cada especie en estudio.

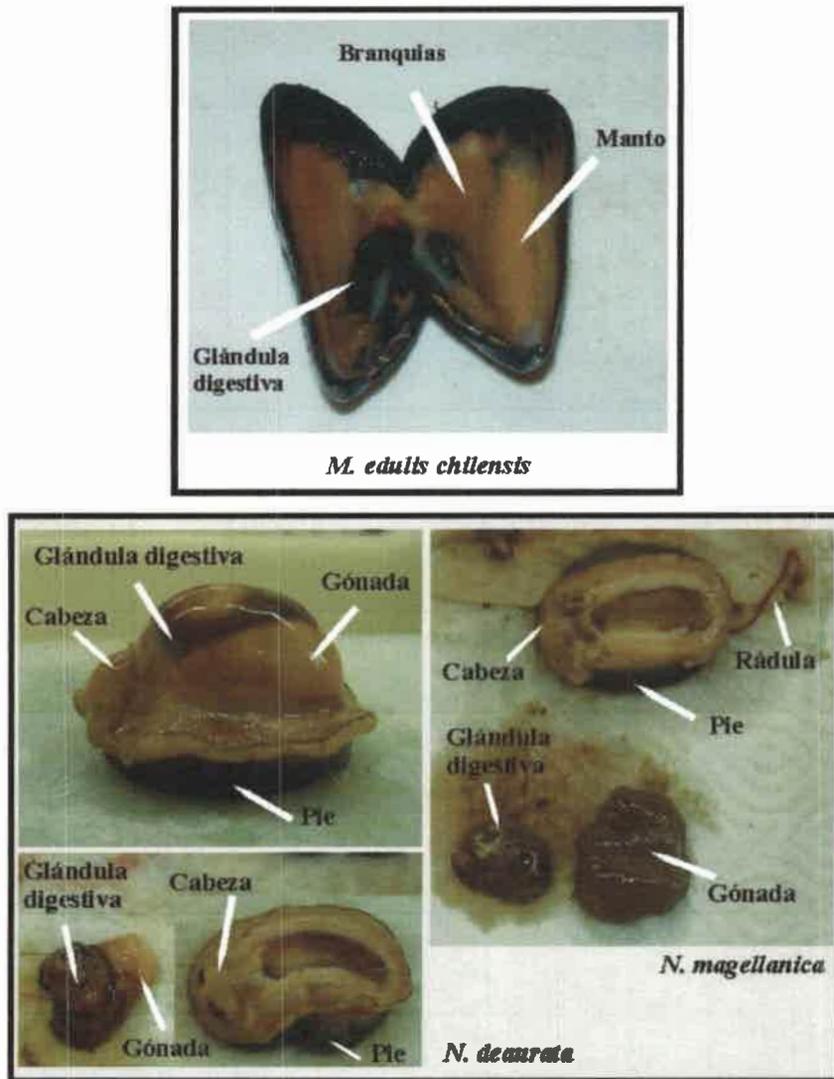


Figura III. 1: Disección de las especies estudiadas indicando sus partes y órganos utilizados.

Ante la posibilidad de mantener la calidad de las muestras reemplazando el sistema de conservación en freezer por una conservación de muestras liofilizadas, se realizaron pruebas que validaron este cambio. En el caso de los órganos congelados, estos fueron descongelados y homogenizados en frío en una relación 1:3 (p/v), ó 1:4 en el caso de los tejidos liofilizados, en buffer pH 7,6 (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM

DTT, 500 mM sacarosa, 150 mM KCl and 0.1 mM PMSF). Posteriormente, los homogenatos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 30 minutos en centrífuga con refrigeración. Para la determinación de LPO, se utilizó un buffer de homogenización de pH 7,8 (0.1 M Tris) en relación 1:3 (p/v) (1:4 en el caso de que se usaran tejidos liofilizados) y los homogenatos fueron centrifugados 10 minutos a 9000 rpm en centrífuga con refrigeración.

Finalmente los sobrenadantes para la determinación de enzimas y LPO se conservaron en freezer hasta su análisis (el tiempo máximo transcurrido hasta el análisis no superó las dos semanas). Las mediciones se realizaron por duplicado y en algunos casos, cuando fue necesario, por triplicado, cuantificándose y expresándose todas las determinaciones en relación a la concentración de proteínas solubles determinadas según el método de Markwell *et al.*, (1978). Todas las mediciones se realizaron por espectrofotometría y la temperatura de las muestras se mantuvo en baño termostático de agua de acuerdo a los requerimientos de las técnicas correspondientes.

La actividad de CAT se midió a 30°C siguiendo la tasa de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 240 nm (Beutler, 1982). La actividad fue expresada como U CAT = cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol (μmol) de H_2O_2 por minuto por miligramo de proteína.

La actividad de SOD fue medida a 30°C a través de la auto-oxidación de epinefrina a 480 nm de acuerdo a Misra & Fridovich, (1972). Se expresó como U SOD/mg prot = cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de oxidación de la epinefrina por miligramo de proteína.

La actividad de GST se determinó a 25°C de acuerdo al método descrito por Habig & Jakoby, (1981). La reacción mide la conjugación de 1-cloro, 2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con Glutatió reducida (GSH) a través del incremento en la absorbancia a 340 nm. La actividad fue expresada como U GST = cantidad de enzima que conjuga 1 micromol (μmol) de CDNB por minuto, por miligramo de proteína.

La LPO fue determinada a 532 nm a través de la generación de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico y cuantificada en términos de equivalentes de malondihaldehido (MDA) según Buege & Aust, (1972). Se expresó como nanomoles de MDA formados por miligramo de proteína (nmol MDA/mg prot).

III.II.2 BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS

En cada sitio y fecha de muestreo se recolectaron individuos de las tres especies seleccionadas. Se separó la totalidad del tejido blando de las valvas y se colocaron grupos de 5 organismos, de cada especie, en bolsas plásticas para su liofilización. Una vez secos, los tejidos fueron homogenizados en mortero de porcelana el cual fue recubierto con papel manteca evitando así el contacto de los sedimentos con la superficie porosa. De esta manera, se obtuvieron las muestras (harinas) sobre las que se determinaron las concentraciones de Cadmio (Cd), Plomo (Pb), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Hierro (Fe). Se colocaron alícuotas de $0,5 \pm 0,05$ g en tubos de ensayo y se procedió de acuerdo con el método descrito por Marcovecchio & Ferrer (2005), el cual fue detallado previamente en la sección III.II.2. En este caso el material de referencia usado fue harina de mejillón (*mussel tissue flour*, R.M. N°6), provisto por el National Institute for Environmental Studies (NIES, Tsukuba, Japón). Los porcentajes de recuperación del material de referencia para determinar la calidad analítica del análisis de cada metal se muestran en la Tabla III.4. Los límites de detección del método empleado para cada metal analizado se muestran en la Tabla III.5.

Tabla III.4: Porcentajes de recuperación (rangos) en los análisis del material de referencia (NIES) para determinación de la calidad analítica de los datos.

Metal analizado	organismo
Cd	92,4 - 98,7%
Pb	95,3 - 99,8%
Cu	93,1 - 97,7%
Zn	96,5 - 102,3%
Fe	95,6 - 101,7%

Tabla III.5: Límite de detección del método (LDM), de acuerdo a cada una de las matrices analizadas.

matriz	unidad	Cd	Pb	Cu	Zn	Fe
organismo	µg/ml	0,01	0,11	0,04	0,04	0,14
	µg/g	0,27	2,15	0,77	0,88	2,73

III.II.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ORGANISMOS

Con el objeto de describir el estado o condición de los organismos seleccionados en cada uno de los sitios de estudio y complementar la información biológica, se llevaron a cabo las mediciones que se detallan a continuación para cada una de las especies estudiadas.

III.II.3.a Determinación de humedad, materia orgánica y ceniza

Para obtener el contenido de humedad de las especies en estudio se obtuvieron, entre primavera-I y otoño-II, los pesos frescos de tejidos blandos de 5 organismos por especie, luego se liofilizaron hasta la obtención del peso seco constante y se calculó por diferencia el contenido de humedad. Posteriormente los tejidos secos se calcinaron en mufla a 500° C (durante 5 horas) hasta la obtención de ceniza blanca. La materia orgánica presente se determinó por diferencia entre peso seco y peso de ceniza. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso fresco para contenido de humedad (%H), de materia orgánica (%MO) y de cenizas (%C).

III.II.3.b Determinación de lípidos totales

Con el objeto de obtener información general de base para cada estación del año, se realizó una determinación de lípidos totales sobre los organismos obtenidos en los 4 muestreos del año 2007 para obtener información general de base para cada estación del año. Se analizó el contenido en glándula digestiva y gónada de las dos especies de lapas (n=3) y en glándula digestiva y manto de mejillón (n=3), habiéndose determinado previamente la baja o nula presencia de lípidos en branquias. Se empleó la técnica gravimétrica descrita por Bligh & Dyer (1959), por la cual se obtienen los lípidos totales a partir de una mezcla extractora de cloroformo-metanol (1:1). Al extracto obtenido se le agrega una solución salina de NaCl 1,8 %, se deja reposar hasta que se formen dos fases: la superior con agua, metanol e impurezas no lipídicas y la inferior con cloroformo y la fracción lipídica. A continuación se colecta la fase lipídica en un vial y se deja evaporar en estufa a 40 ± 5 °C hasta peso constante, previo agregado de una solución de cloroformo-acetona (1:1). La estimación final de lípidos totales se realiza por diferencia entre el peso inicial del recipiente colector vacío, y el peso final

conteniendo el extracto. Los resultados se expresan como miligramos de lípidos por gramo de tejido seco.

III.II.3.c Índice de Condición (IC)

Para calcular el Índice de Condición (IC) de las especies en estudio en cada período de muestreo, se separaron los tejidos blandos de las valvas. Los tejidos fueron liofilizados hasta peso seco constante y las valvas secadas a temperatura ambiente. Se calculó el IC de acuerdo a Couillard *et al.*, (1995) como:

$$\text{IC} = \text{peso seco de los tejidos} / \text{peso seco de las valvas.}$$

III.II.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE ORGANISMOS

Con el fin de detectar diferencias significativas entre sitios y/o entre fechas, para cada especie u órgano según correspondiera, en las variables analizadas (actividad enzimática, LPO, concentración de lípidos, Índice de Condición y bioacumulación de metales pesados) se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido por el test de Tukey para determinaciones múltiples. Previamente se comprobaron sobre los datos las condiciones de normalidad (Shapiro-Wilks) y de igualdad de varianza (test de Bartlett). En el caso de que los datos no cumplieran con estas condiciones se aplicaron transformaciones logarítmicas (\log_{10}). Si aún así no se cumplían estas condiciones, se utilizó un análisis de la varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) y el test de Dunn para determinaciones múltiples (Daniel, 1978). Finalmente, para lograr una integración de los datos ambientales y los biológicos, se realizó un análisis de componentes principales incluyendo las fechas en las que se observaron diferencias significativas entre los sitios respecto a los biomarcadores que mostraron una mejor respuesta. El nivel de significancia en todos los casos fue de $p < 0,05$ (Sokal & Rohlf 1981). Todos los análisis se realizaron utilizando el programa de estadística STATISTICA versión 7.0.

III.III. RESÚMEN DE TÉCNICAS Y EQUIPAMIENTOS EMPLEADOS

En la Tabla III.6 se resumen las metodologías y equipamientos utilizados en los distintos muestreos y análisis de datos. En el **Anexo I** se presentan en detalle cada una de las técnicas empleadas en este estudio.

Tabla III.6: resumen de técnicas y equipamientos.

Determinaciones	Técnica y/o análisis de datos	Equipamiento
Parámetros in situ: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, salinidad, , pH	Directo	Analizador multiparamétrico portátil HORIBA U-10
nitrito, nitrato, fosfato y silicato.	Strickland & Parson (1972)	Autoanalizador Technicon II
Clorofila- <i>a</i>	Holm-Hansen, (1965)	Fluorómetro Sequoia Turner
Amonio	Técnica de indofenol. Strickland & Parson (1972)	Espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis. Lamda25- (640 nm)
Metales pesados totales en sedimentos y organismos.	Marcovecchio & Ferrer (2005)	Espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire acetileno. Perkin Elmer
Materia Orgánica Particulada	Strickland & Parsons (1972)	Espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis. Lamda25- (640 nm)
Caracterización de sedimentos	Commendatore <i>et al.</i> (1996)	Tamizador y balanza granataria (error de $\pm 0,0001$)
Homogenización de tejidos		Homogenizador Ultraturrax T25
Separación de fases de los homogenatos de tejidos		Microcentrífuga GELEC modelo G.130-D
Actividad de CAT	Beutler, (1982)	Espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis. Lamda25- (240 nm)
Actividad de SOD	Misra & Fridovich, (1972).	Espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis. Lamda25- (480 nm)
Actividad de GST	Habig & Jakoby, (1981)	Espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis. Lamda25- 340 nm)
Actividad enzimática		Baño Termostático Vicking Masson Digital
Niveles de LPO	Buege & Aust, (1972)	Espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis. Lamda25- (532 nm)
Lípidos Totales	Bligh & Dyer (1959)	Balanza de precisión y Estufa
% humedad, materia orgánica y cenizas en tejidos.		Estufa. Horno mufla O.R.L-VI/P

IV. RESULTADOS

IV.I. ANÁLISIS AMBIENTAL

IV.I.1. AGUA

A continuación se presenta la Tabla IV.I.1 detallando los datos correspondientes a los parámetros analizados en agua por cada sitio de muestreo.

Tabla IV. I.1: Resumen de los parámetros fisicoquímicos analizados en agua (media y desvío estándar-DS, n=8). Para cada parámetro, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p<0,05$).

Parámetros		Sitios				
		BG	ZI	PO	AF	PU
Temp. (°C)	media	6,17 a	7,08 a	6,94 a	7,34 a	6,81 a
	DS	2,09	2,40	2,34	2,01	1,85
pH	media	7,92 a	7,98 a	7,89 a	8,00 a	7,97 a
	DS	0,16	0,24	0,23	0,21	0,27
OD (mg/L)	media	10,19 a	10,39 a	9,93 a	10,55 a	10,54 a
	DS	0,71	1,77	0,91	1,91	1,63
Salinidad	media	24,26 a	22,58 a	24,06 a	24,96 a	23,27 a
	DS	2,57	5,42	3,29	2,58	3,37
Clor-a (µg/L)	media	0,20 a	0,20 a	0,28 a	0,59 a	0,25 a
	DS	0,18	0,15	0,28	0,65	0,24
MOP (mg C/L)	media	0,93 a	0,72 a	1,12 a	1,12 a	1,31 a
	DS	0,54	0,52	0,70	0,97	0,94
Amonio (µmol/L)	media	0,97 a	12,09 bc	1,47 ab	2,76 ab	48,71 bc
	DS	0,57	10,30	0,86	4,51	53,87
Nitrito (µmol/L)	media	0,18 a	0,38 ab	0,34 ab	0,28 a	0,68 b
	DS	0,19	0,20	0,31	0,16	0,41
Nitrato (µmol/L)	media	5,44 a	7,96 a	6,90 a	5,91 a	8,13 a
	DS	3,99	5,10	5,32	4,37	4,35
Fosfato (µmol/L)	media	1,18 a	2,05 a	1,18 a	1,30 a	5,43 a
	DS	0,41	1,24	0,30	0,39	5,28
Silicato (µmol/L)	media	5,32 a	13,89 b	5,95 ab	4,82 a	9,89 ab
	DS	2,57	8,96	2,38	1,67	6,91

IV.I.1.a. Parámetros físico-químicos *in situ*

Los resultados del análisis de los parámetros físico-químicos para todas las épocas estudiadas no mostraron diferencias significativas entre los sitios en los registros de temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad (ANOVA $p=0,856$; $p=0,871$; $p=0,904$ y $p=0,720$ respectivamente).

Respecto a las variaciones estacionales de cada parámetro, se observaron tendencias a lo largo de los dos años de estudio que se detallan a continuación.

La temperatura se registró en un rango de 2,65 a 11,60 °C. Los valores más altos se registraron en los muestreos de verano (entre 8,05 y 11,60 °C) y los más bajos en invierno (entre 2,65 y 5,85 °C) de los dos años para todos los sitios (Fig IV.I.1).

El pH se registró en un rango de 7,60 a 8,35. Se observaron aumentos en primavera de los dos años (entre 7,91 y 8,35) y disminuciones en invierno-I (entre 7,69 y 7,89) y otoño de los dos años (7,60 a 8,13) (Fig IV.I.1).

Los valores de oxígeno disuelto se registraron en un rango de 8,31-14,43 mg/L durante los dos años de muestreo. Se observaron los mayores registros en primavera-I en ZI, AF y PU (entre 10,99 y 14,43 ml/L) y los más bajos en invierno-I y otoño-II en ZI, PO y AF (Fig IV.I.1).

La salinidad se registró en un rango de 10,80 a 30,50. Los valores fueron mayores en invierno-I ($30,30 \pm 0,20$). Durante el segundo año los valores fueron más bajos y con poca variación ($22,20 \pm 2,90$) en todos los sitios y épocas de muestreo excepto en el verano-II donde se registraron las mínimas salinidades en ZI (10,80) y en PO (18,50) (Fig IV.I.1).

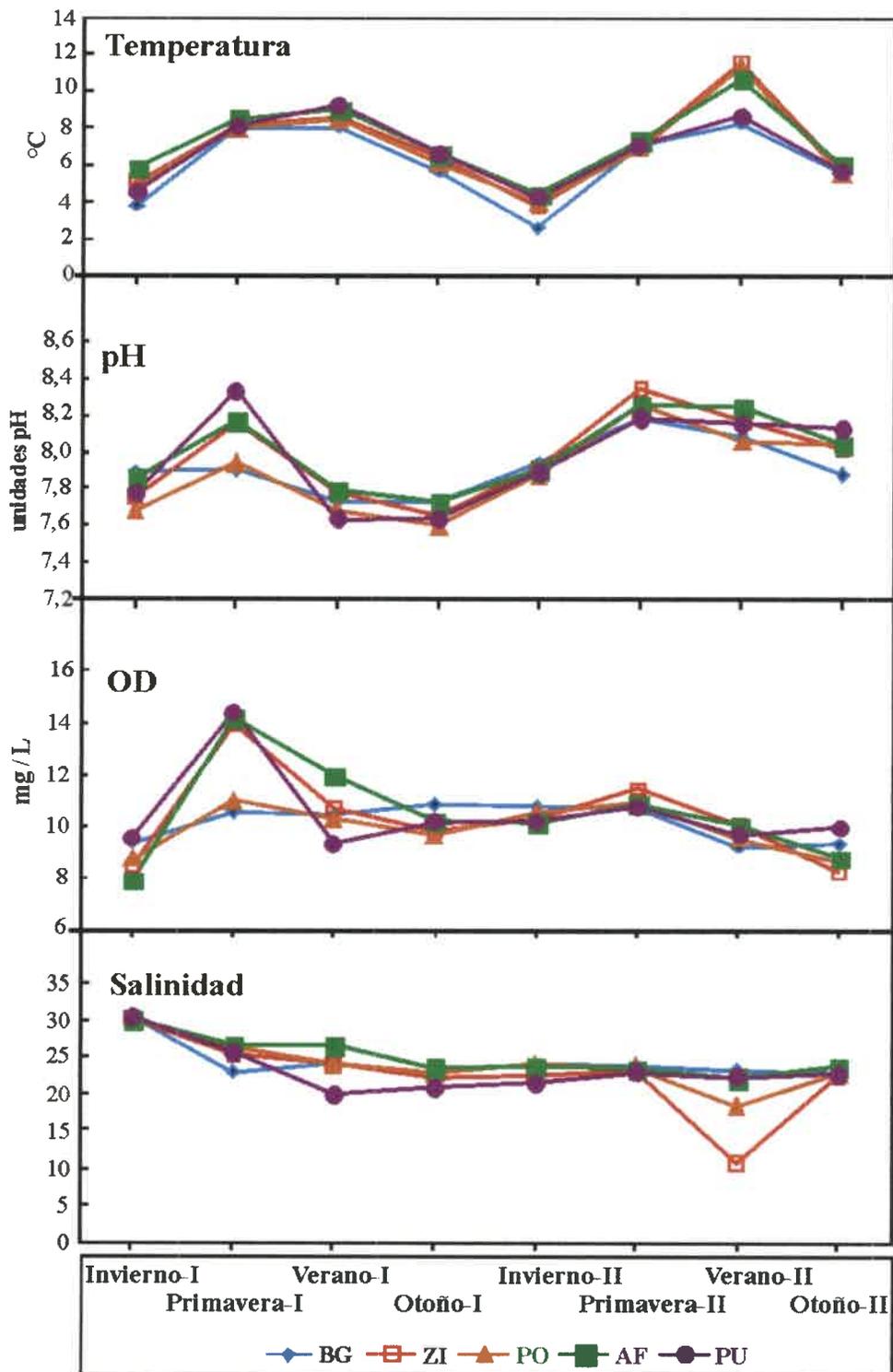


Figura IV.I.1: Variación estacional de los registros de temperatura, pH, oxígeno disuelto-(OD) y salinidad determinados como el valor promedio de las dos mediciones realizadas por sitio en cada muestreo.

IV.I.1.b. Clorofila-a

La concentración de clorofila-*a* se registró en un rango de 0,02 a 2,11 $\mu\text{g/L}$, con valores promedio que fueron mayores en primavera ($0,58 \pm 0,54 \mu\text{g/L}$) y menores en invierno ($0,11 \pm 0,12 \mu\text{g/L}$) en ambos años de muestreo. En primavera-I se registró un pico máximo en AF, (2,11 $\mu\text{g/L}$). Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los sitios (ANOVA $p=0,179$), en general, los valores en AF (entre 0,04 y 2,11 $\mu\text{g/L}$) se encontraron siempre entre los más altos con relación a los otros sitios estudiados, mientras que los registros de BG se encontraron entre los más bajos (Fig. IV.I.2).

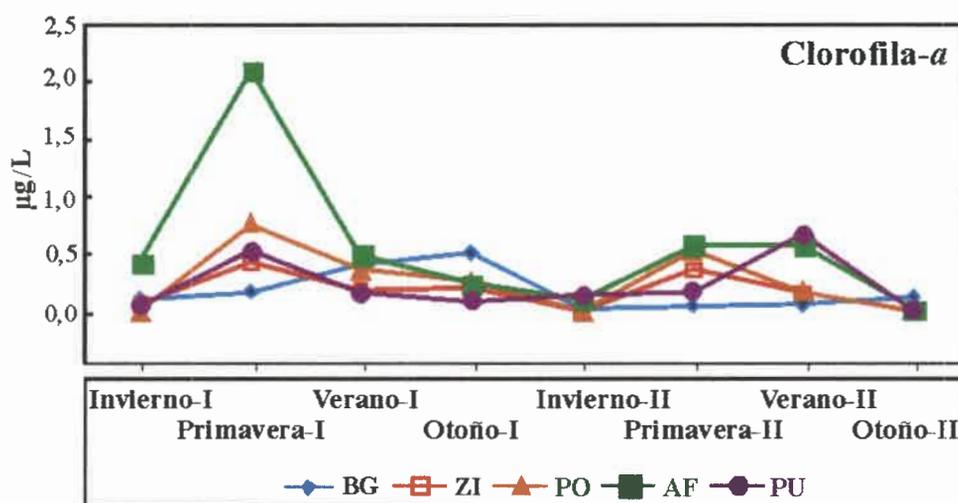


Figura IV.I.2: Variación estacional de la concentración de clorofila-*a* determinada como el valor promedio de las dos mediciones realizadas por sitio en cada muestreo.

IV.I.1.c. Materia orgánica particulada

La concentración de materia orgánica particulada osciló entre 0,17 y 3,41 mg C/L para todos los muestreos con promedios menores en invierno-I ($0,38 \pm 0,20$ mg C/L) y otoño-II ($0,45 \pm 0,16$ mg C/L), mientras que, en general, las concentraciones más altas se registraron en ambos veranos ($1,53 \pm 0,52$ C/L). No se encontraron diferencias significativas entre sitios (ANOVA $p=0,610$) pero se observaron picos máximos en primavera-I en AF (3,41 mg C/L) y en otoño-I en PU (3,06 mg C/L) (Fig. IV.I.3).

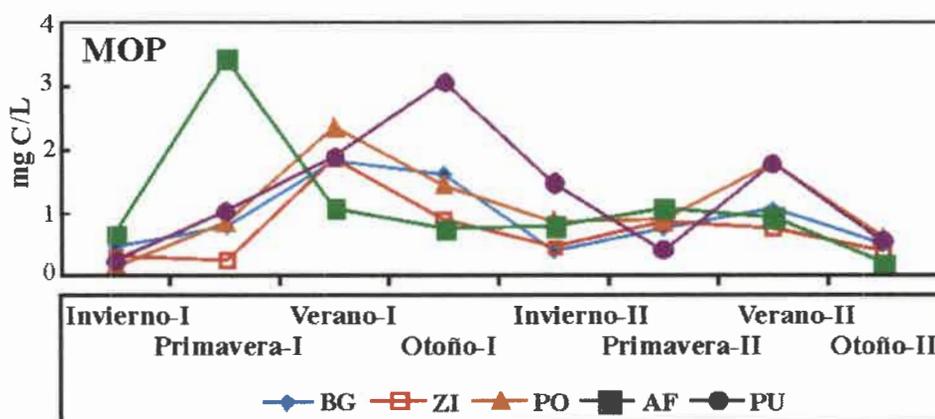


Figura IV.I.3: Variación estacional de la concentración de materia orgánica particulada-MOP, determinada como el valor promedio de las dos mediciones realizadas por sitio en cada muestreo.

IV.I.1.d. Nutrientes

Amonio

La concentración de amonio (Fig.IV.I.4) se registró en un rango que osciló desde valores no detectables en BG hasta máximas de 141,34 $\mu\text{mol/L}$ en PU. Las diferencias entre sitios (Kruskal-Wallis $H(4; 40)=20,400$; $p= 0,0004$) mostraron a PU y ZI con valores más elevados que en BG. En PU se observaron valores de hasta dos órdenes de magnitud superiores a los demás sitios de muestreo, con un pico de 141,34 $\mu\text{mol/L}$ en verano-I. En los muestreos sucesivos en este sitio, la concentración de amonio fue disminuyendo hasta la última fecha donde alcanzó valores menores a los registrados en ZI y AF. ZI fue el segundo sitio con alta concentración de amonio. Allí los valores fueron de hasta un orden de magnitud superior a los demás sitios, con picos en primavera-I (19,62 $\mu\text{mol/L}$) y verano-II (32,51 $\mu\text{mol/L}$). En BG la concentración de amonio fue, en promedio entre todos los muestreos, la más baja con valores que oscilaron entre no detectables y un máximo de 1,74 $\mu\text{mol/L}$ en primavera-I.

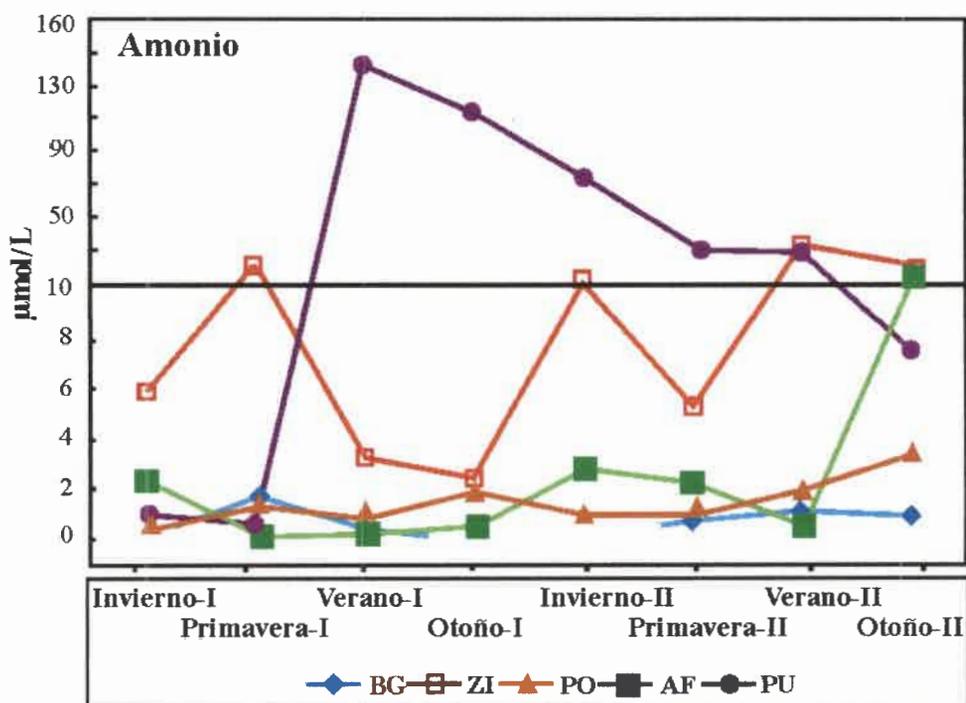


Figura IV.I.4: Variación estacional de la concentración de amonio en agua determinada como el promedio de los dos valores registrados por sitio en cada muestreo. En ambos inviernos y en otoño-I las concentraciones en BG fueron no detectables.

Nitrito

La concentración de nitritos registró valores entre 0,05 y 1,26 $\mu\text{mol/L}$ (Fig IV.I.5). Se encontraron diferencias significativas entre sitios (ANOVA $p=0,01$). PU presentó concentraciones mayores a las de BG y AF y sus mayores registros se observaron entre verano-I (1,26 $\mu\text{mol/L}$) y primavera-II (1,09 $\mu\text{mol/L}$). El resto de los sitios se mantuvieron a lo largo de los dos años de muestreo en un rango similar que osciló entre 0,02 y 0,66 $\mu\text{mol/L}$ excepto por un pico de 1,07 observado en PO en primavera-I.

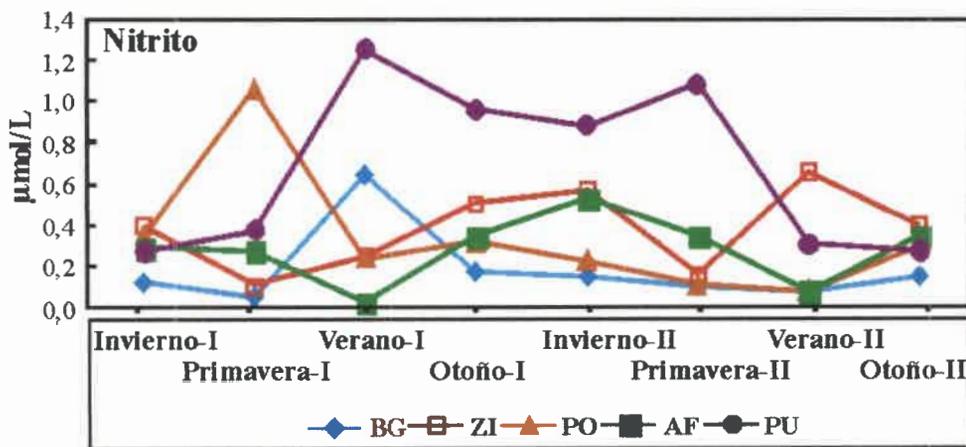


Figura IV.I.5: Variación estacional de la concentración de nitrito en agua, determinada como el promedio de los dos valores registrados por sitio en cada muestreo.

Nitrato

La concentración de nitratos se registró en un rango de 0,31 a 72,17 $\mu\text{mol/L}$ (Fig IV.I.6). Aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre sitios (Kruskal-Wallis $H(4; 40)=4,479$; $p=0,345$) se observó una tendencia de valores más elevados en PU entre verano-I y primavera-II, registrándose en esta última fecha un pico de un orden de magnitud superior a los demás sitios y fechas (72,17 $\mu\text{mol/L}$). No se cuenta con los datos de verano-II para AF y PU.

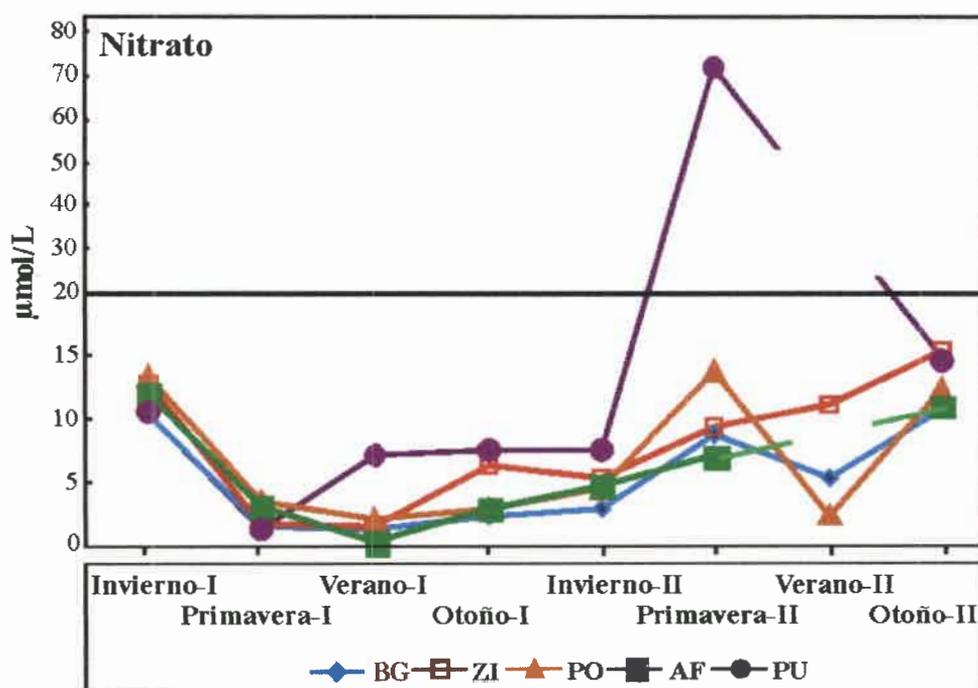


Figura IV.I.6: Variación estacional de la concentración de nitrato en agua, determinada como el promedio de los dos valores registrados por sitio en cada muestreo.

Fosfato

La concentración de fosfatos se registró en un rango variable entre 0,49 y 14,40 $\mu\text{mol/L}$ (Fig IV.I.7). No se registraron diferencias significativas entre sitios (Kruskal-Wallis $H(4; 40)=5,319$; $p=0,256$), pero se observaron valores de hasta dos órdenes mayores en PU respecto de los demás sitios entre verano-I (14,40 $\mu\text{mol/L}$) y primavera-II (4,43 $\mu\text{mol/L}$). Por otro lado, se observó una tendencia de disminución, sin dejar de ser mayor que en los demás sitios, en la concentración de fosfato de PU desde el verano-I hasta la última fecha de muestreo. En los demás sitios los valores se mantuvieron en un promedio de $1,31 \pm 0,50 \mu\text{mol/L}$ a lo largo de los dos años de estudio excepto por un pico de 4,56 $\mu\text{mol/L}$ observado en ZI en invierno-I.

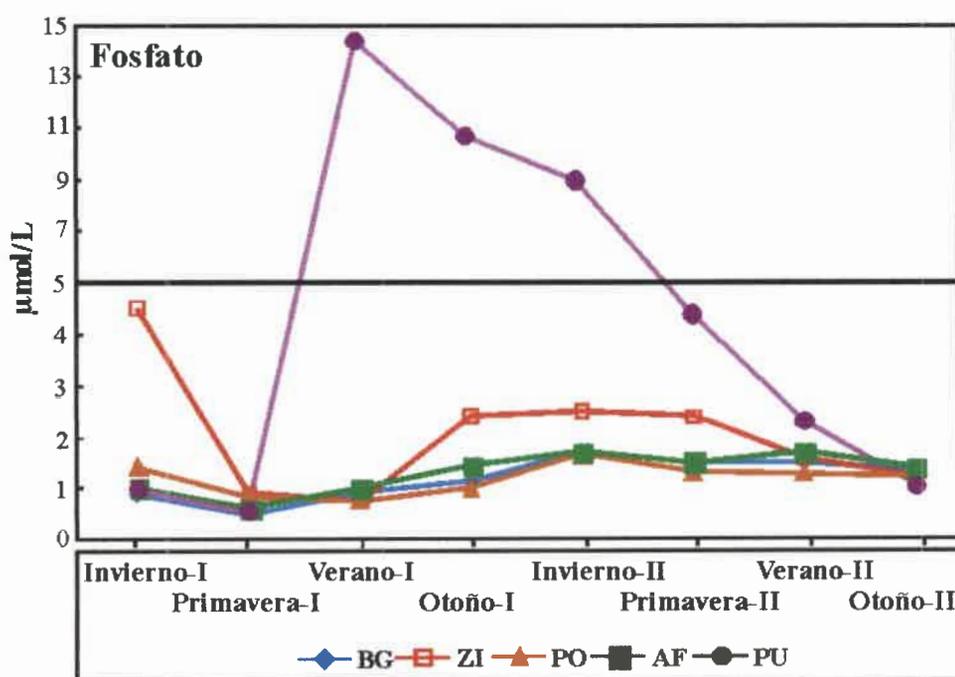


Figura IV.I.7: Variación estacional de la concentración de fosfato en agua, determinada como el promedio de los dos valores registrados por sitio en cada muestreo.

Silicato

La concentración de silicatos se registró en un rango de 1,98 a 25,28 $\mu\text{mol/L}$ (Fig IV.I.8). Las diferencias entre sitios indicaron valores más altos en ZI respecto de BG y AF (ANOVA $p=0,012$). En general, en todos los muestreos, ZI mostró los valores más altos con un promedio de $13,89 \pm 8,96 \mu\text{mol/L}$, seguido por PU con un promedio de $9,89 \pm 6,91 \mu\text{mol/L}$. En este último sitio el máximo valor se registró en verano-I (20,90 $\mu\text{mol/L}$) y se observó una tendencia de disminución en los registros sucesivos. Las concentraciones en los demás sitios se mantuvieron en un promedio de $5,36 \pm 2,19 \mu\text{mol/L}$ durante los dos años de estudio.

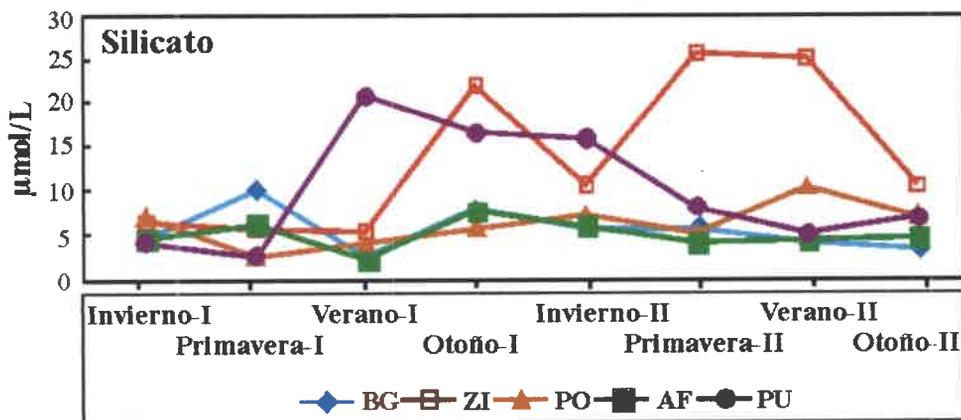


Figura IV.I.8: Variación estacional de la concentración de silicato en agua, determinada como el promedio de los dos valores registrados por sitio en cada muestreo.

IV.I.2. SEDIMENTO

IV.I.2.a. Granulometría

Los resultados obtenidos del análisis granulométrico de los sedimentos se presentan en la Tabla IV.I.2.

BG fue el sitio que tuvo en promedio el mayor porcentaje de sedimento fino <62 μm (8,94 %) y el menor porcentaje de sedimento grueso >1000 μm (45,69 %). En PU se registró en promedio, el menor porcentaje de sedimento fino <62 μm (1,26 %) y el mayor de sedimento grueso >1000 μm (83,29 %).

Tabla IV.I.2: Porcentaje de las distintas fracciones granulométricas del sedimento (mínima-Min; máxima-Max; Media y desvío estándar-DS) determinadas en los sitios de estudio y gráfica de los promedios correspondientes.

		% Fracciones											
		>1000 μm	250-1000 μm	62-250 μm	<62 μm	>1000 μm 250-1000 μm 62-250 μm <62 μm							
BG	Min	16	3	2	1								
	Max	75	47	52	27								
	Media	45,69	20,07	25,30	8,94								
	DS	23,89	15,22	17,46	8,93								
ZI	Min	49	21	3	1								
	Max	73	41	15	6								
	Media	53,29	34,81	8,86	3,05								
	DS	9,43	6,52	3,98	1,68								
PO	Min	55	3	2	1								
	Max	93	25	12	5								
	Media	74,88	14,43	8,00	2,69								
	DS	12,05	7,81	3,29	1,45								
AF	Min	48	8	4	1								
	Max	82	16	32	9								
	Media	65,23	11,20	17,76	5,82								
	DS	12,68	2,65	10,46	3,23								
PU	Min	58	5	0,5	0,6								
	Max	93	37	2	2								
	Media	83,29	13,75	1,71	1,26								
	DS	10,64	9,83	0,92	0,58								
						0	10	25	40	55	70	85	100

IV.I.2.b. Concentración de metales pesados

La concentración de metales pesados se registró en un rango de nd a 2,99 $\mu\text{g/g}$ para Cd; 4,64 a 181,05 $\mu\text{g/g}$ para Pb; 7,63 a 121,89 $\mu\text{g/g}$ para Cu; 46,43 a 209,97 $\mu\text{g/g}$ para Zn y 11,99 a 52,11 mg/g para Fe (Tabla IV.I.2). La variación estacional de la concentración de cada metal en cada uno de los sitios de estudio se muestra en la Figura IV.I.9.

Se encontraron diferencias significativas entre los sitios para los 5 metales analizados. La concentración promedio de cada uno de ellos en todas las fechas estudiadas fue: para el Cd, mayor en PU ($1,79 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$) respecto de BG y AF ($0,68 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$) (ANOVA $p=0,008$); para el Pb, la concentración promedio resultó mayor en ZI ($49,52 \pm 25,23 \mu\text{g/g}$) y en PO ($49,78 \pm 15,77 \mu\text{g/g}$) respecto de BG ($8,48 \pm 2,96 \mu\text{g/g}$) (Kruskal-Wallis $H(4;40)=22,922$; $p=0,0001$). En AF se registró un pico en la concentración de Pb en verano-II, el cual fue tres órdenes de magnitud superior a los demás registros. Para el caso del Cu, la concentración promedio fue mayor en ZI ($43,76 \pm 30,30 \mu\text{g/g}$) y PU ($61,34 \pm 34,10 \mu\text{g/g}$) que en BG ($12,32 \pm 4,19 \mu\text{g/g}$) (ANOVA $p=0,00004$). En PU se registró el valor más alto de Cu en otoño-II, y en ZI, en verano-II. En cuanto al Zn, las concentraciones promedio determinadas en ZI ($160,79 \pm 42,22 \mu\text{g/g}$), PU ($146,02 \pm 42,76 \mu\text{g/g}$) y PO ($125,67 \pm 32,08 \mu\text{g/g}$) fueron mayores a las registradas en BG ($67,39 \pm 16,36 \mu\text{g/g}$) y AF ($61,97 \pm 14,10 \mu\text{g/g}$) (ANOVA $p=0,0000$). Finalmente, el Fe fue el metal de mayor concentración absoluta de todos los estudiados. Las concentraciones promedio fueron mayores en PU ($30,60 \pm 10,08 \text{ mg/g}$), ZI ($25,90 \pm 4,79 \text{ mg/g}$) y PO ($23,90 \pm 4,23 \text{ mg/g}$) que aquellas registradas en AF ($17,16 \pm 4,06 \text{ mg/g}$) (ANOVA $p=0,00001$). En primavera-II se registró en PU el mayor pico de Fe ($52,11 \text{ mg/g}$).

La observación cualitativa de los sedimentos en general mostró que los correspondientes a PU presentaron características típicas de sedimentos anóxicos, identificándolos por el color oscuro y olor desagradable. En AF se observaron características similares pero en menor intensidad. Por su parte, los sedimentos pertenecientes a BG se destacaron por su color claro, de apariencia limpia y oxigenada.

Tabla IV.I.2: Concentraciones de metales pesados registradas en sedimentos. Rango, media y desvío estándar (DS) (n=8) de los valores determinados por sitio de todos los muestreos.

Sitio		Metales				
		($\mu\text{g/g}$) Cd	($\mu\text{g/g}$) Pb	($\mu\text{g/g}$) Cu	($\mu\text{g/g}$) Zn	(mg/g) Fe
BG	Min	nd	4,64	7,63	50,83	19,01
	Max	2,06	12,66	19,80	97,26	27,15
	Media	0,68 a	8,48 a	12,32 b	67,39 b	22,45 ab
	DS	0,63	2,96	4,19	16,36	2,72
ZI	Min	0,33	21,29	14,44	80,86	20,33
	Max	2,53	90,13	109,86	209,97	33,17
	Media	1,27 ab	49,52 b	43,76 a	160,79 a	25,90 a
	DS	0,74	25,23	30,30	42,22	4,79
PO	Min	0,42	28,33	14,82	95,63	18,50
	Max	1,60	79,88	67,36	182,84	32,99
	Media	1,04 ab	49,78 b	32,30 ac	125,67 ac	23,90 a
	DS	0,38	15,77	15,56	32,08	4,23
AF	Min	nd	7,67	6,44	46,43	11,99
	Max	1,16	181,05	86,90	86,63	24,57
	Media	0,68 a	43,05 ab	22,30 bc	61,97 bc	17,16 b
	DS	0,45	56,83	26,42	14,10	4,06
PU	Min	nd	21,75	19,59	90,13	20,80
	Max	2,99	40,42	121,89	196,81	52,11
	Media	1,79 b	32,25 ab	61,34 a	146,02 a	30,60 a
	DS	0,90	6,67	34,05	42,76	10,08

Las letras diferentes para cada metal indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sitios.

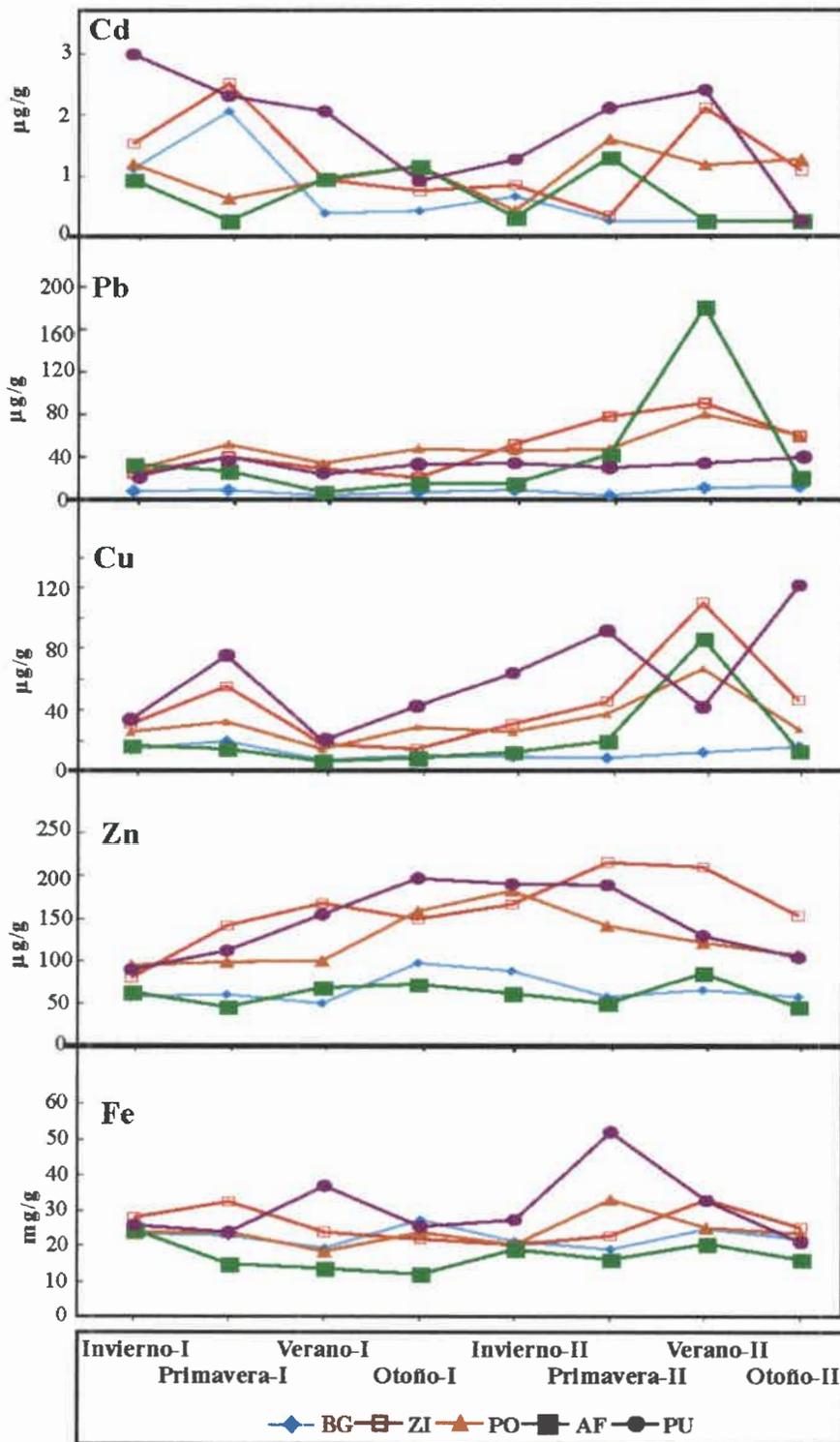


Figura IV.I.9: Variación estacional de la concentración de metales pesados en sedimentos (expresada en µg/g de peso seco excepto Fe en mg/g peso seco) de todos los sitios en cada uno de los muestreos realizados.

IV.I.2.c. Índice de contaminación urbano-industrial (ICUI)

El cálculo del ICUI determinó que PU, ZI y PO son los sitios con mayor concentración de metales de origen urbano-industrial (Pb, Cu y Zn), respecto a lo observado en BG y AF.

Los valores se registraron en un rango de 72,30 a 114,30 en BG; de 136,63 a 409,96 en ZI; de 149,50 a 268,85 en PO; de 80,21 a 113,56 con un pico de 354,58 en AF y de 145,13 a 311,16 en PU (Fig.IV.I.10).

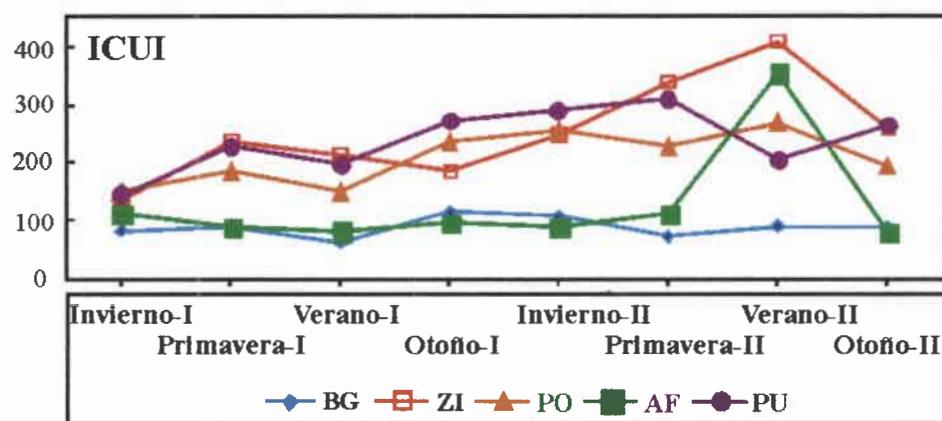


Figura IV.I.10: Valores del índice de contaminación urbano-industrial (ICUI) correspondientes a los cálculos determinados por sitio en cada muestreo.

IV.I.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

El análisis de componentes principales realizado a partir de todas las variables ambientales en estudio reveló que un 71,15 % de la varianza total está explicada por los primeros tres componentes principales (CP). El CP 1, el cual explica el 28,32 % de la variabilidad, está asociado de forma negativa con los nutrientes, excepto el nitrato, y con las concentraciones de Cu, Zn y Fe y de forma positiva con la salinidad. El CP 2, explica el 17,94% de la variabilidad, y está asociado al pH, OD, temperatura, Clor-*a* y Pb en su eje positivo. El CP 3 explica el 15,58 % de la variabilidad y está asociado positivamente con nitratos y negativamente con MOP. Por último, el CP 4 (9,31 %) indica un aumento de la concentración de Cd hacia el eje positivo (Tabla IV.I. 3).

Esto permitió diferenciar un grupo formado principalmente por BG, AF, PO con bajas concentraciones de nutrientes y metales en general, y con una mayor salinidad, separado de PU con mayores valores de nutrientes, metales y MOP. ZI se ubicó en posición intermedia entre los dos grupos (Fig.IV.I.11).

Tabla IV.I.3: Extracción de componentes principales (CP) basados en las correlaciones entre las variables ambientales analizadas.

Variables	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
pH	-0,03	0,65	0,52	0,11
OD	0,11	0,68	-0,31	0,38
Temperatura	-0,27	0,71	-0,14	-0,07
Salinidad	0,62	-0,33	0,01	0,47
Clorofila-a	0,20	0,66	-0,41	0,28
Amonio	-0,81	-0,23	-0,39	0,08
Nitrito	-0,69	-0,24	-0,30	0,17
Nitrato	-0,27	-0,33	0,62	0,07
Fosfato	-0,75	-0,34	-0,40	0,05
Silicato	-0,74	-0,02	-0,07	-0,34
MOP	-0,18	0,36	-0,78	-0,07
Cd	-0,39	0,02	0,21	0,69
Pb	-0,33	0,53	0,40	-0,36
Cu	-0,57	0,42	0,52	0,03
Zn	-0,79	0,06	0,10	-0,09
Fe	-0,68	-0,05	0,27	0,49
% Var. Acumulada	28,32	46,26	61,85	71,15

Los coeficientes de correlación significativos (>0,50) se indican en negrita.
Porcentaje de variación acumulada (% Var. Acum).

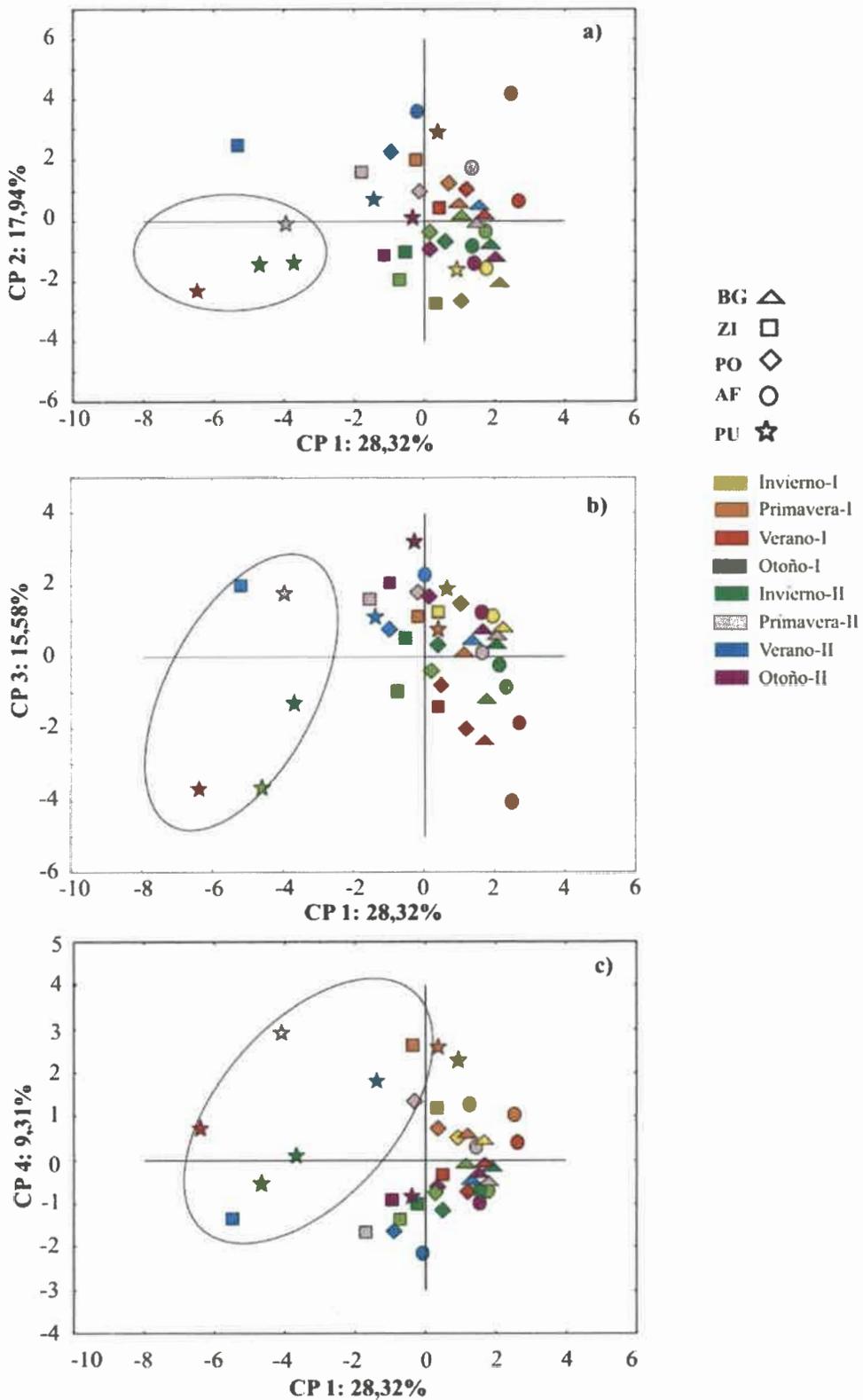


Figura IV.I.11: Proyección de los sitios de estudio en un plano representando la posición de cada uno de ellos respecto del grado de asociación de las variables ambientales analizadas con los componentes principales a) CP 1 y 2 b) CP 1 y 3 c) CP 1 y 4.

IV.II. ANÁLISIS DE LOS ORGANISMOS

IV.II.1. BIOMARCADORES

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en las determinaciones de la actividad enzimática de Glutación S-transferasa (GST), Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) y los niveles de oxidación lipídica (LPO) registrados en las tres especies estudiadas.

IV.II.1.a. Glutación S-transferasa (GST)

M. edulis chilensis

La actividad de GST en branquia se registró en un rango de 0,03 a 0,25 U GST, y en glándula digestiva en un rango de 0,02 a 0,21 U GST (Figura IV.II.1).

Se encontraron diferencias significativas entre las fechas analizadas en el conjunto de los sitios tanto para branquia (K-W, $H_0=37,36$; $p=0,000$) como para glándula digestiva (K-W, $H_0=67,47$, $p=0,000$). La actividad determinada a lo largo de los dos años de estudio en branquia fue variable en rangos de 0,03 a 0,22 U GST en BG; de 0,04 a 0,25 U GST en ZI; de 0,07 a 0,25 U GST en PO; de 0,06 a 0,26 U GST en AF y de 0,08 a 0,27 U GST en PU. Mientras que en glándula digestiva la variación fue de 0,02 a 0,13 U GST en BG; de 0,05 a 0,18 U GST en ZI; de 0,04 a 0,18 U GST en PO; de 0,02 a 0,16 U GST en AF y de 0,04 a 0,21 U GST en PU.

Por su parte, las diferencias entre sitios en cada fecha fueron significativas en los dos órganos analizados, excepto para branquia en otoño-I (K-W, $H_0=10,18$; $p=0,37$) (Figura IV.II.1) y para glándula digestiva en primavera-II (ANOVA, $p=0,123$).

Los resultados en branquia indicaron que en primavera-I la actividad fue mayor en PU respecto a los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I fue mayor en ZI respecto de BG y AF (ANOVA, $p=0,001$); en invierno-II fue mayor en PU, AF y PO respecto a ZI y BG (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II fue menor en ZI respecto de los demás sitios (ANOVA, $p=0,002$); en verano-II fue mayor en PO respecto de ZI y AF (K-W, $H_0=19,45$, $p=0,001$) y en otoño-II fue mayor en PO y AF respecto de BG (ANOVA, $p=0,002$).

Los resultados en glándula digestiva indicaron que en primavera-I la actividad fue menor en BG que en el resto de los sitios (K-W, $H_0=17,30$; $p=0,002$); en verano-I

fue mayor en ZI y PU que en PO (ANOVA, $p=0,001$); en otoño-I fue mayor en ZI y AF que en el resto (ANOVA, $p=0,001$); en invierno-II fue mayor en AF, PO y PU que en ZI (ANOVA, $p=0,002$); en verano-II fue significativamente mayor en ZI (ANOVA, $p=0,000$) y en otoño-II fue mayor en ZI y PO que en el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,004$).

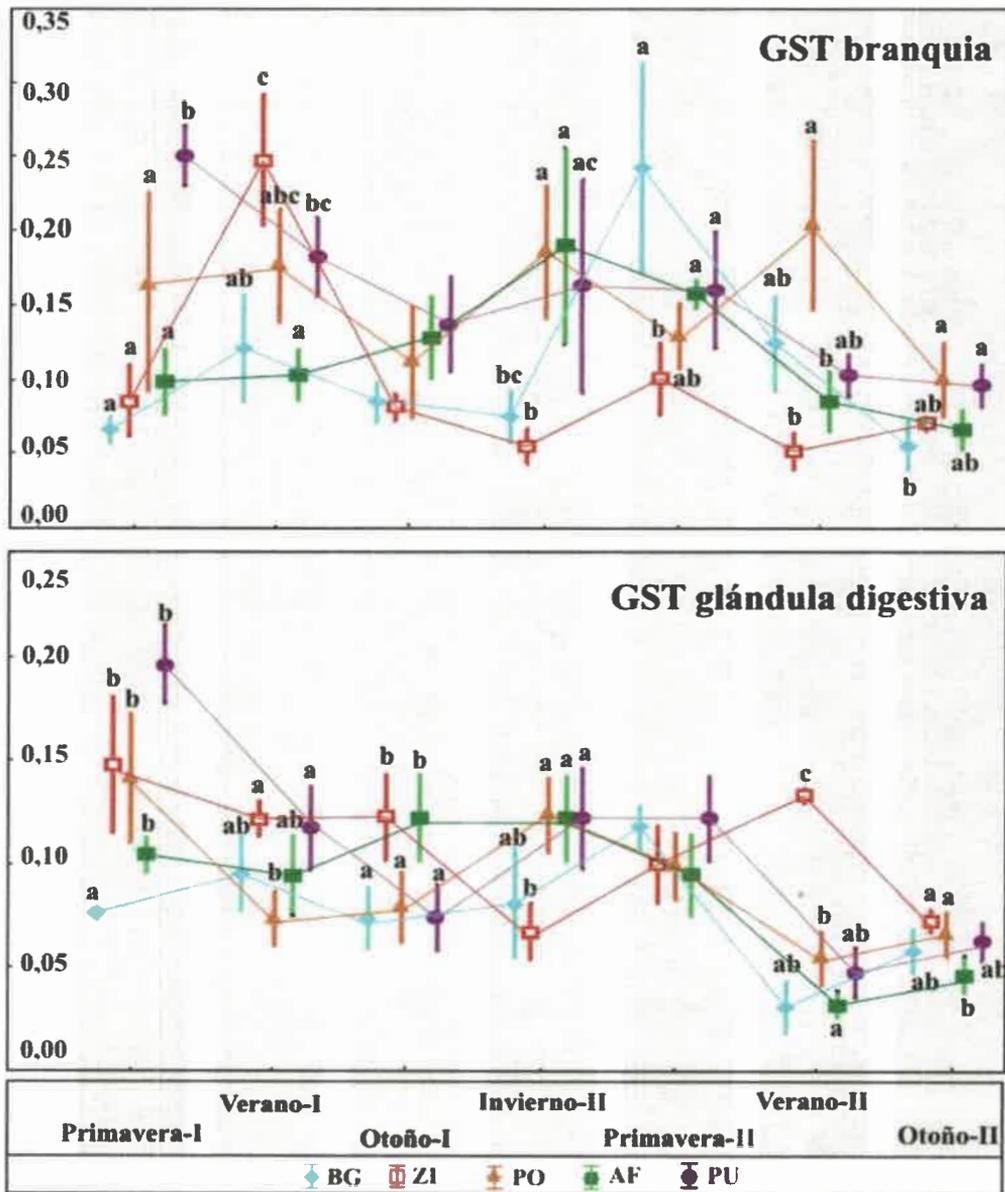


Fig. IV.II.1: Actividad de GST en *M. edulis chilensis* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p < 0,05$).

N. magellanica

La actividad de GST en glándula digestiva se registró en un rango de 1,83 a 24,85 U GST y mostró una variación estacional significativa (K-W, $H_0=36,23$; $p=0,000$). En BG se registraron valores entre 1,83 y 9,93 U GST; entre 3,30 y 24,85 U GST en ZI; entre 3,01 y 11,04 U GST en PO y entre 3,17 y 16,82 U GST en PU.

Se detectaron además diferencias significativas entre sitios en cada fecha de estudio excepto en primavera-II (ANOVA, $p=0,511$) y otoño-II (ANOVA, $p=0,480$). En primavera-I la mayor actividad se registró en ZI y la menor en BG respecto de los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I PU y ZI presentaron actividades más altas que BG y PO (ANOVA, $p=0,000$); en otoño-I la actividad fue mayor en ZI y PO respecto de BG (ANOVA, $p=0,017$); en invierno-II fue mayor en PU que en BG (ANOVA, $p=0,005$) y en verano-II ZI y PO registraron actividades más altas que en BG (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.2).

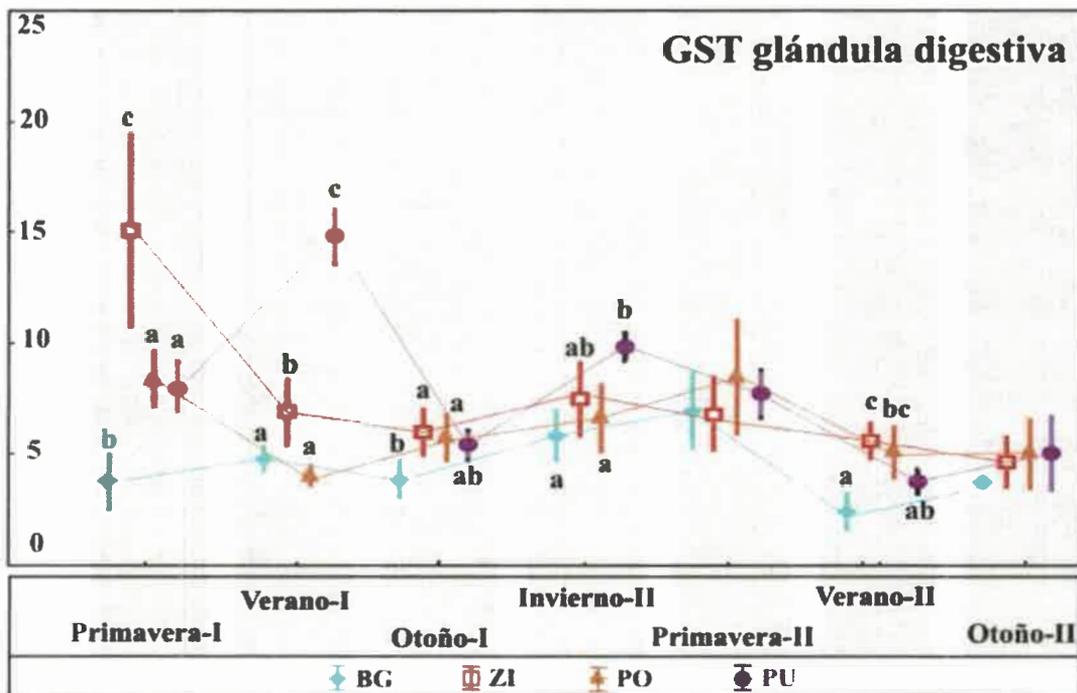


Fig IV.II.2: Actividad de GST en *N. magellanica* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p<0,05$).

N. deaurata

La actividad de GST en glándula digestiva se registró en un rango de 1,09 a 7,90 y mostró una variación estacional significativa (K-W, $H_0=22,22$; $p=0,000$). En BG se registraron valores entre 1,41 y 6,02 U GST; entre 2,37 y 6,29 U GST en ZI y entre 1,09 y 7,90 U GST en AF.

Por su parte, las diferencias entre sitios en cada fecha de estudio fueron significativas en verano-I, donde la actividad en AF fue mayor que en los demás sitios (ANOVA, $p=0,001$) y en verano-II y otoño-II donde la mayor actividad se registró en ZI (ANOVA, $p=0,001$). En otoño-I, invierno-I y primavera-I no se detectaron diferencias significativas entre los sitios (ANOVA, $p=0,726$, $0,153$ y $0,146$ respectivamente). (Figura IV.II.3).

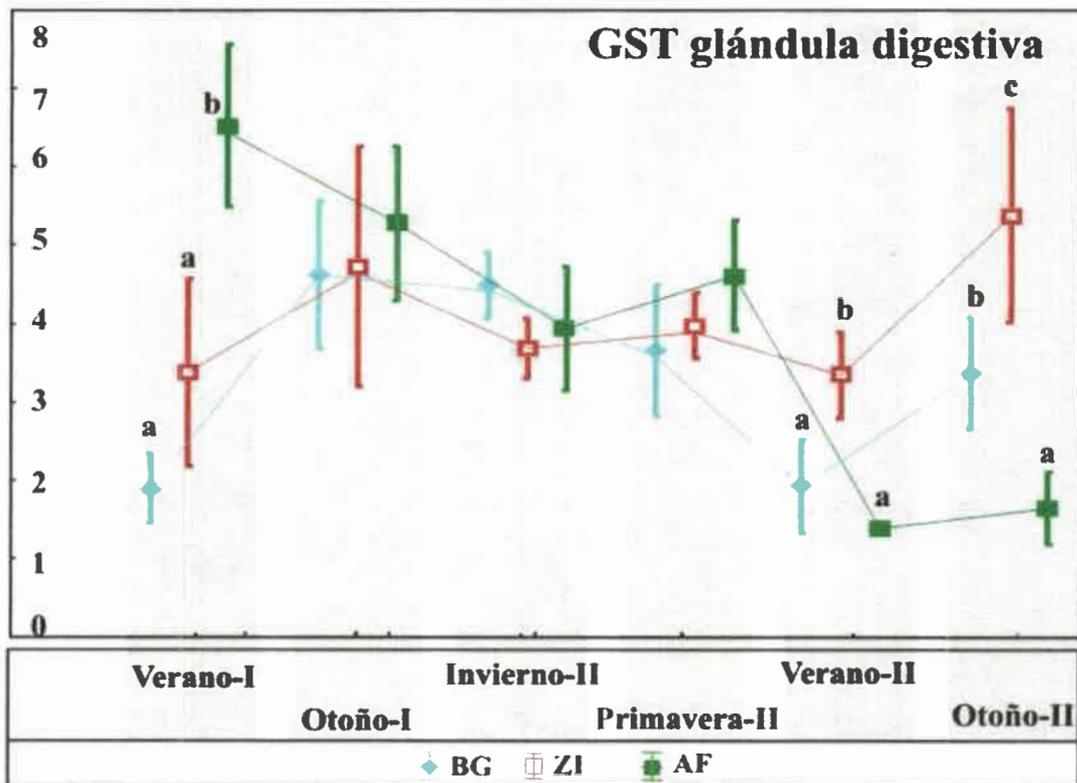


Fig IV.II.3: Actividad de GST en *N. deaurata* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p<0,05$).

IV. RESULTADOS

IV.II.1.b. Superóxido Dismutasa (SOD)

M. edulis chilensis

La actividad de SOD en branquia se registró en un rango de 0,91 a 54,28 U SOD y en glándula digestiva en un rango de 1,03 a 37,71 U SOD.

Se encontraron diferencias significativas entre las fechas analizadas en el conjunto de sitios tanto para branquia (K-W, $H_0=38,41$; $p=0,000$) como para glándula digestiva (K-W, $H_0=66,90$; $p=0,000$). La actividad determinada a lo largo de los dos años de estudio en branquia fue variable en rangos de 1,89 a 42,15 U SOD en BG; de 0,93 a 30,63 U SOD en ZI; de 1,75 a 12,28 U SOD en PO; de 0,91 a 15,59 U SOD en AF y de 1,33 a 54,28 U SOD en PU. Mientras que en glándula digestiva la variación fue de 1,03 a 32,86 U SOD en BG; de 1,69 a 37,71 U SOD en ZI; de 1,05 a 19,74 U SOD en PO; de 1,51 a 18,60 U SOD en AF y de 1,74 a 17,26 U SOD en PU. En invierno-I solo se registró actividad en BG y AF.

Se encontraron diferencias significativas entre sitios en cada fecha para los dos órganos estudiados, excepto en verano-I y otoño-II (ANOVA, $p>0,05$) (Figura IV.II.4).

Los resultados en branquia indicaron que en invierno-I la actividad fue mayor en ZI respecto de AF (ANOVA, $p=0,016$); en primavera-I la actividad en ZI fue mayor que en los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en otoño-I la actividad en PU fue menor a las registradas en BG, ZI y PO (ANOVA, $p=0,000$); en invierno-II la actividad fue mayor en PO respecto de la registrada en ZI (K-W, $H_0=10,16$; $p=0,038$); en primavera-II la actividad en PO y ZI fue menor a la registrada en BG (K-W, $H_0=18,32$; $p=0,001$), finalmente en verano-II no se registró actividad de SOD en AF, pero en los restantes sitios fue más alta en PU respecto de GB, ZI y PO (ANOVA, $p=0,000$).

Por su parte, en glándula digestiva no se registró actividad en invierno-I excepto en AF y BG, siendo mayor la actividad en este último sitio; en primavera-I la mayor actividad se observó en ZI respecto a todos los demás sitios, y en AF respecto de PO y PU (ANOVA, $p=0,000$); en otoño-I en PO se registró la mayor actividad y en AF y PU la menor (ANOVA, $p=0,000$); en invierno-II BG y PO tuvieron actividades más altas que los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II ZI y PU mostraron actividades mayores a las registradas en PO (K-W, $p=0,010$); en verano-II se registraron actividades mayores en ZI, PO y PU respecto de BG (ANOVA, $p=0,000$).

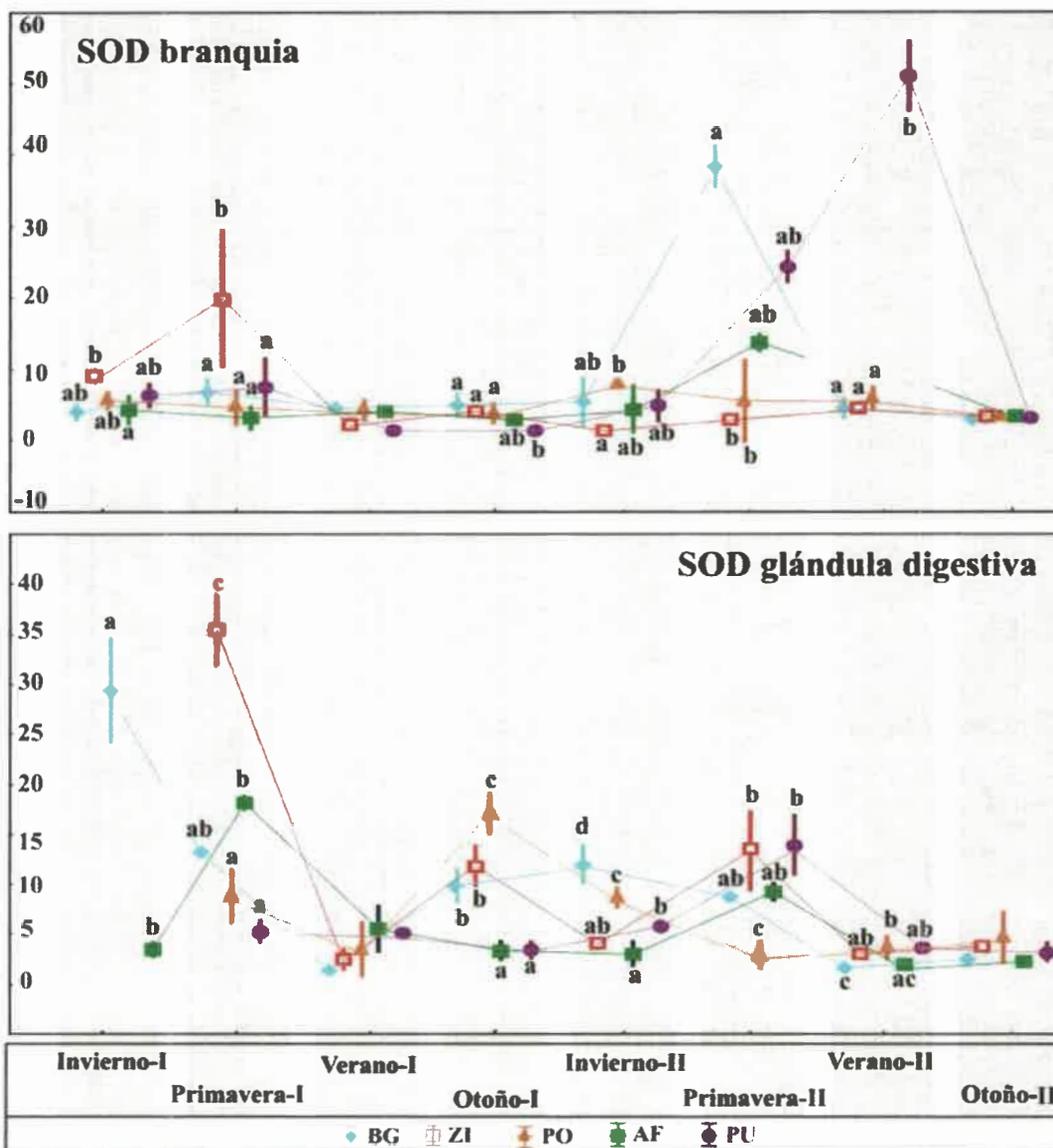


Fig. IV.II.4: Actividad de SOD en *M. edulis chilensis* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media ± el desvío estándar (n=5). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios (p<0,05).

N. magellanica

Los resultados para la actividad de SOD en glándula digestiva de *N. magellanica* se registraron en un rango de 0,22 a 75,85 U SOD e indicaron variación estacional significativa (K-W, $H_0=66,90$; $p=0,000$). En BG se registraron valores entre 0,22 y 75,85 U SOD; entre 2,31 y 46,36 U SOD en ZI; entre 3,72 y 49,79 U SOD en PO y entre 1,00 y 49,67 U SOD en PU. En general se observó una mayor actividad en invierno-I y verano-II y valores más bajos en invierno-II y primavera-II. No se encontró actividad en los muestreos correspondientes a verano-I y otoño-I.

Se encontraron además diferencias significativas entre sitios en cada fecha de estudio excepto en primavera-I (ANOVA, $p=0,052$) y primavera-II (ANOVA, $p=0,513$). En invierno-I la mayor actividad se registró en BG y ZI respecto de PU (ANOVA, $p=0,011$); en invierno-II en PU se registró la actividad más alta y en BG la más baja respecto a los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en verano-II la mayor actividad se registró en PO y PU respecto de BG (ANOVA, $p=0,002$) y finalmente en otoño-II en PU se registró la actividad más baja respecto a los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.5).

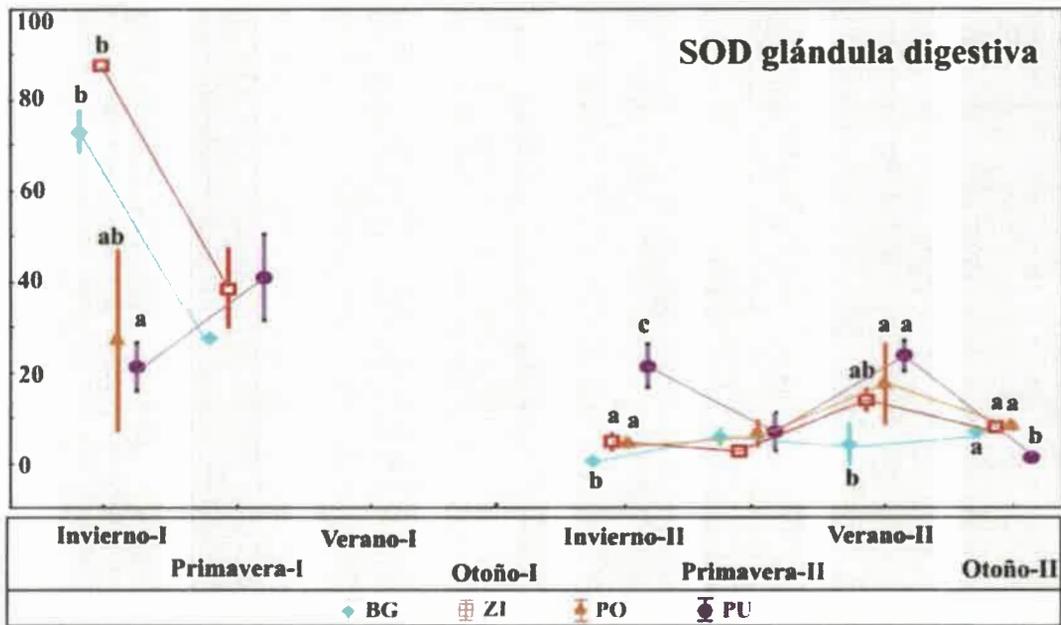


Fig IV.II.5: Actividad de SOD en *N. magellanica* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p<0,05$).

N. deaurata

Los resultados de la actividad de SOD en glándula digestiva de *N. deaurata* se registraron en un rango de 0,42 a 21,48 y mostraron variación estacional significativa (K-W, $H_0=3,04$, $p=0,000$). En BG los registros fueron variables entre 0,45 y 12,88 U SOD; entre 1,74 y 16,72 U SOD en ZI y entre 9,46 y 21,48 U SOD en AF. Al igual que en *N. magellanica*, no se encontró actividad en las glándulas de los muestreos correspondientes a verano-I y otoño-I. En las fechas restantes, se encontraron diferencias significativas entre los sitios. En invierno-II la mayor actividad se registró en AF y la menor en BG (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II (ANOVA, $p=0,001$) y verano-II (ANOVA, $p=0,000$) AF y ZI registraron actividades mayores a las de BG y finalmente en invierno-II no se encontró actividad en las glándulas digestivas correspondientes a AF pero se registraron valores más altos en BG respecto de ZI (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.6).

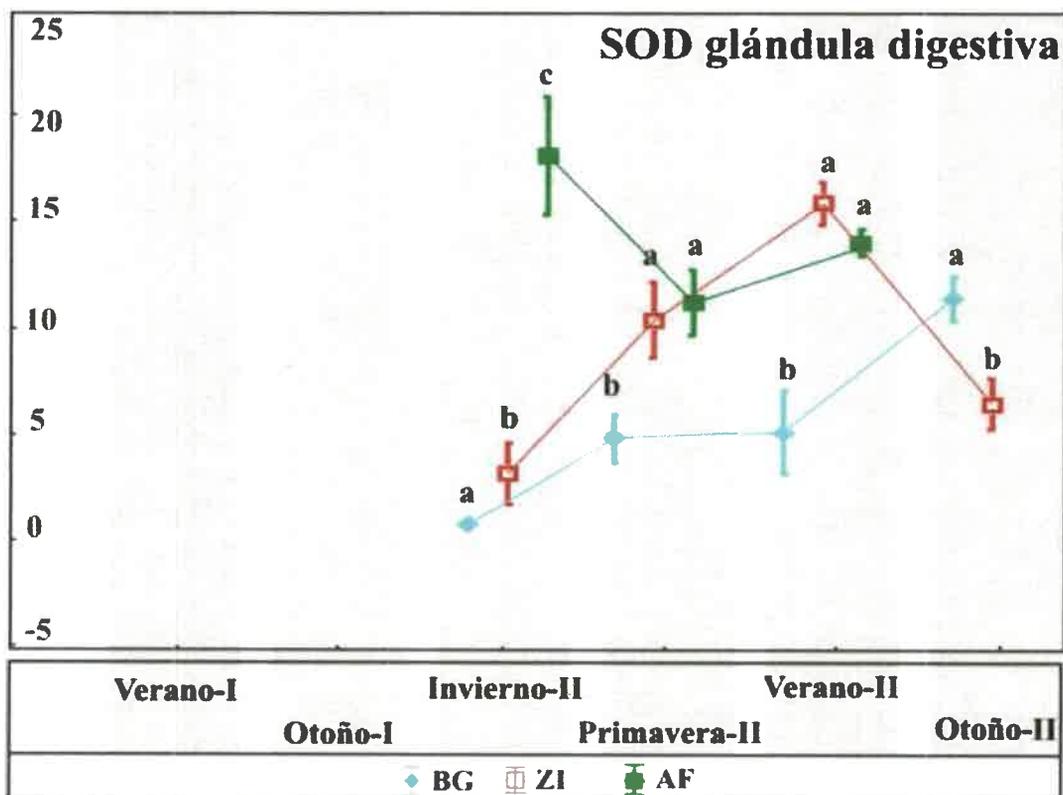


Fig IV.II.6: Actividad de SOD en *N. deaurata* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p<0,05$).

IV.II.1.c. Catalasa (CAT)***M. edulis chilensis***

La actividad de CAT en branquia se registró en un rango de 0,09 a 11,25 U CAT, y en glándula en un rango de 0,34 a 24,79 U CAT.

Se encontraron diferencias significativas entre las fechas de estudio para la actividad de CAT en branquia en el conjunto de sitios (K-W, $H_0=122,86$, $p=0,000$) y en glándula digestiva (K-W, $H_0=124,74$, $p=0,000$). Se observaron aumentos de la actividad en primavera de los dos años y en invierno-I en branquias. La actividad se registró en un rango de 0,20 a 5,46 U CAT en BG; de 0,17 a 8,45 U CAT en ZI; de 0,31 a 6,80 U CAT en PO; de 0,43 a 5,46 U CAT en AF y de 0,09 a 11,12 U CAT en PU. En glándula digestiva se observaron aumentos en primavera-I y II y disminuciones en verano e invierno de los dos años. La actividad observada registró valores que oscilan entre 0,58 y 24,79 U CAT en BG; 0,34 y 23,97 U CAT en ZI; 0,83 y 16,10 U CAT en PO; 0,71 y 13,08 U CAT en AF y entre 0,73 y 17,51 U CAT en PU.

Las diferencias entre sitios fueron significativas para branquia excepto en otoño-I (ANOVA, $p=0,088$), primavera-II (ANOVA, $p=0,144$) y verano-II (ANOVA, $p=0,058$). En invierno-I la actividad fue mayor en PU que en los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-I fue mayor en PU, ZI y PO respecto de BG (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I fue mayor en ZI respecto de PO (K-W, $p=0,005$); en invierno-II fue mayor en BG, PO y AF respecto de PU y ZI (ANOVA, $p=0,000$) y en otoño-II fue mayor en PO y AF respecto de BG (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.7).

En glándula digestiva también se registraron diferencias significativas entre sitios excepto en los muestreos correspondientes a otoño-I (ANOVA, $p=0,267$) y otoño-II (ANOVA, $p=0,479$). La actividad de CAT en invierno-I fue mayor en BG que en el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-I fue mayor en ZI respecto de GB, PO y AF (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I fue menor en PU respecto de AF (K-W, $H_0=11,80$; $p=0,019$); en invierno-II fue mayor en BG, PO y PU respecto de ZI (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II fue mayor en BG que en el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,002$) y en verano-II fue mayor en ZI, PO y PU respecto de BG (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.7).

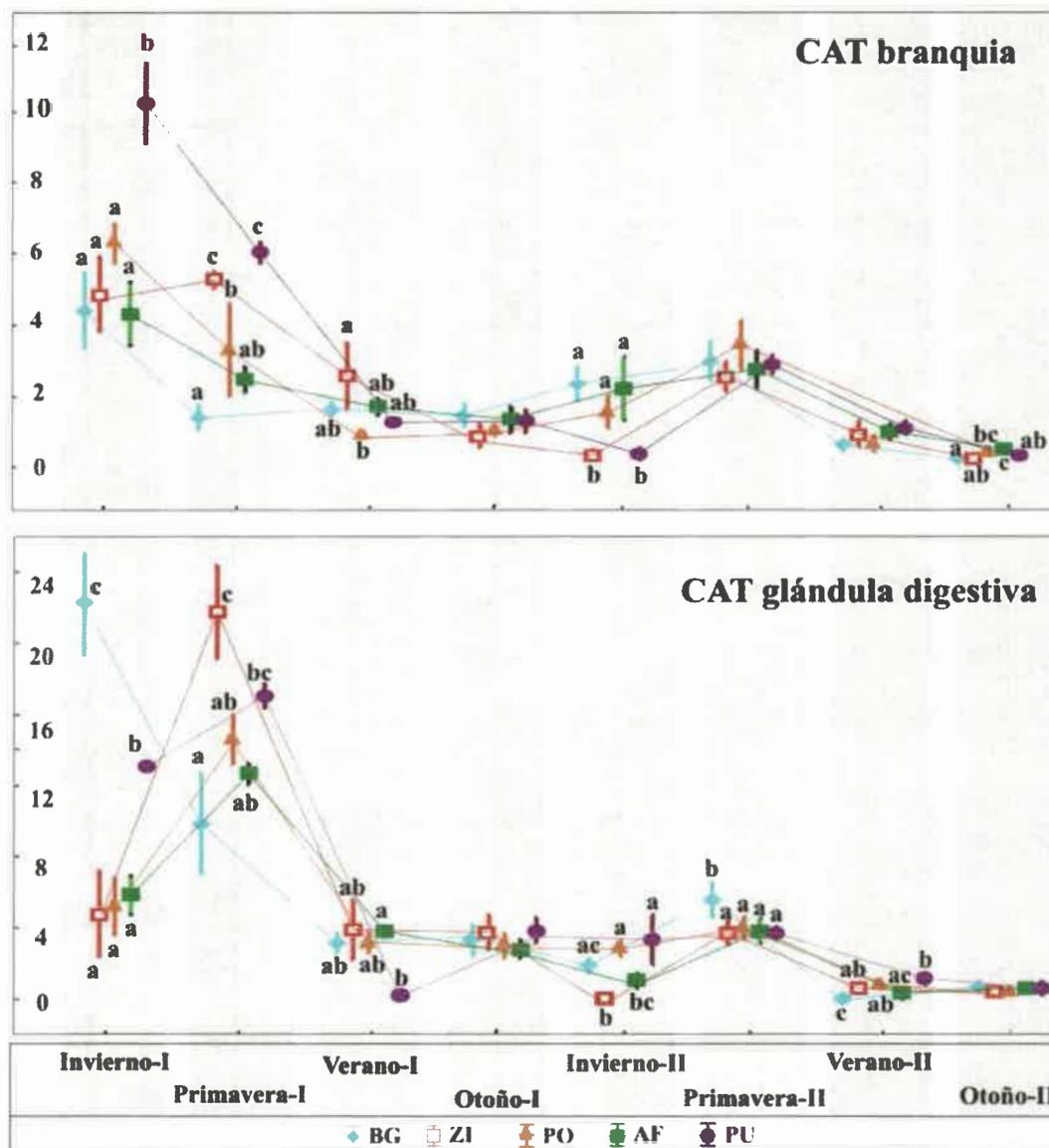


Fig. IV.II.7: Actividad de CAT en *M. edulis chilensis* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media ± el desvío estándar (n=5). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios (p<0,05).

N. magellanica

La actividad de CAT en glándula digestiva se registró en un rango de 1,22 a 108,37 U CAT e indicó diferencias significativas entre las fechas estudiadas (K-W, $H_0=122,05$; $p=0,000$). Se observaron disminuciones en otoño-II y verano de los dos años y aumentos en invierno-I, primavera-I y otoño-I. Las actividades se registraron en un rango de 1,44 a 86,69 U CAT en BG; de 1,32 a 108,37 U CAT en ZI; de 1,22 a 106,31 U CAT en PO y de 1.23 a 90,04 U CAT en PU.

Por su parte, se encontraron además diferencias significativas entre sitios para cada fecha excepto en invierno-I (ANOVA, $p=0,263$) y verano-II (ANOVA, $p=0,646$). La actividad de CAT en primavera-I fue mayor en ZI respecto de BG (ANOVA, $p=0,0001$); en verano-I fue mayor en ZI y PU respecto de PO (ANOVA, $p=0,000$); en otoño-I fue mayor en ZI respecto de PO y PU (ANOVA, $p=0,005$); en invierno-II fue menor en BG que en el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II fue menor en ZI respecto de los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$) y en otoño-II fue mayor en BG y PO respecto de ZI (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.8).

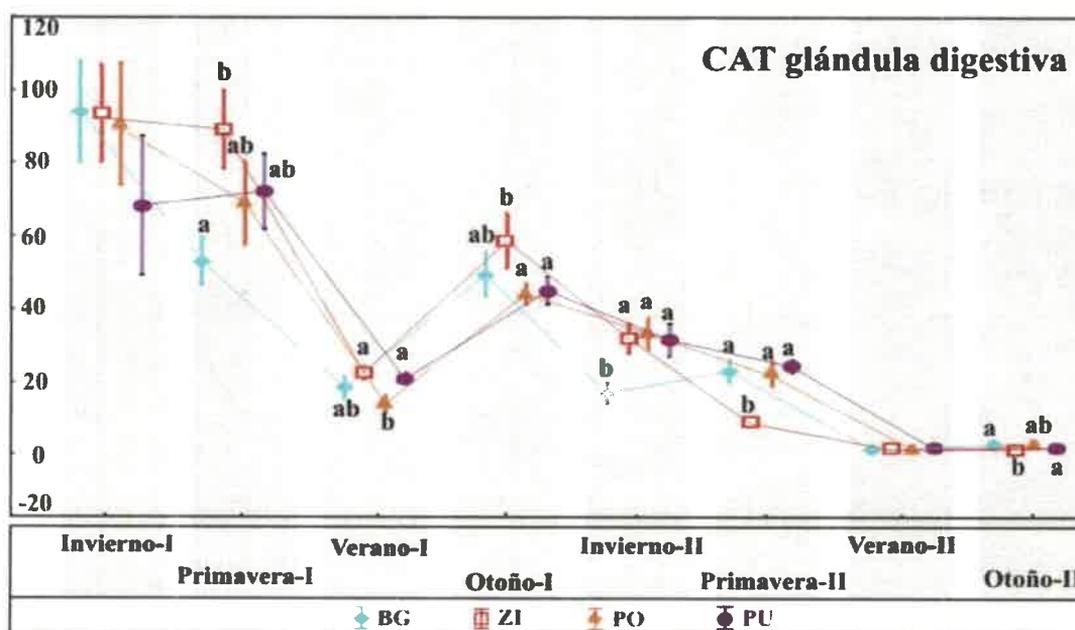


Fig IV.II.8: Actividad de CAT en *N. magellanica* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p < 0,05$).

N. deaurata

La actividad de CAT en glándula digestiva de *N. deaurata* se registró en un rango de 0,90 a 56,32 U CAT e indicó diferencias significativas entre las fechas analizadas (ANOVA, $p=0,000$). En términos generales se observaron los valores más altos en otoño-I y los más bajos en verano-II y otoño-II. La actividad se registró en un rango de 1,04 50,81 U CAT en BG; de 0,92 a 45,28 U CAT en ZI y de 0,90 a 56,32 U CAT en AF.

No se observaron diferencias significativas entre sitios en otoño-I (ANOVA $p=0,692$), mientras que en verano-I la actividad fue mayor en AF respecto de BG (ANOVA, $p=0,012$); en invierno-II fue mayor en AF que en el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,001$); en primavera-II fue mayor en BG y AF respecto de ZI (ANOVA, $p=0,000$); en verano-II fue mayor en ZI respecto de AF (K-W, $H_0=6,38$; $p=0,041$) y en otoño-II fue mayor en AF que en el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,000$) (Figura IV.II.9).

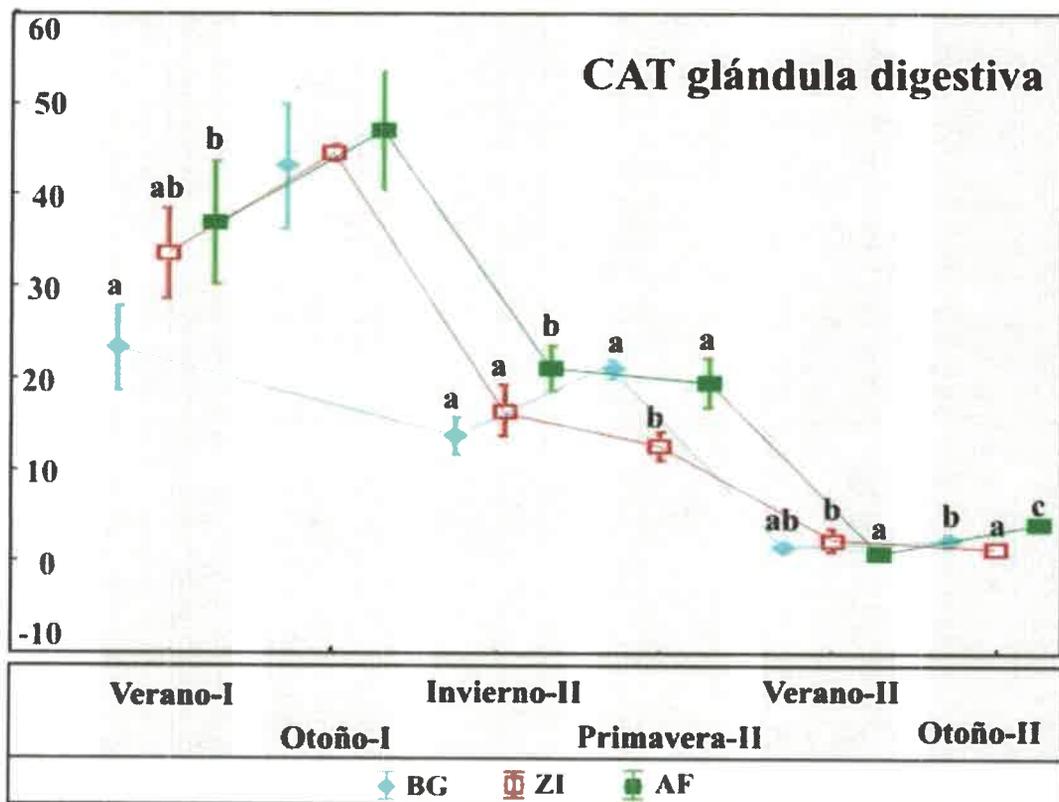


Fig IV.II.9: Actividad de CAT en *N. deaurata* registrada en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar ($n=5$). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p<0,05$).

IV.II.1.d. Lipoperoxidación (LPO)

M. edulis chilensis

Los niveles de LPO (nmol MDA/mg prot) se registraron dentro de un rango de 0,57 a 7,28 en branquia; de 0,48 a 6,15 en manto y de 0,82 a 8,47 en glándula digestiva de *M. edulis chilensis*.

Se encontraron diferencias significativas entre las fechas de estudio en los tres órganos analizados (K-W, $p=0,000$). En términos generales, se observaron en branquia aumentos en primavera-II y disminuciones en verano-II y otoño-II; en manto se observaron aumentos en verano-I y primavera-II y disminuciones en verano-II y otoño de ambos años; en glándula digestiva, los aumentos se observaron en primavera de los dos años y las disminuciones en invierno-I y en otoño de los dos años.

En branquia, los niveles de LPO registraron valores entre 0,81 y 6,41 en BG; 1,33 y 4,61 en ZI; 1,22 y 5,19 en PO; 0,57 y 7,28 en AF y entre 0,85 y 5,40 en PU. Por su parte, en manto, los niveles de LPO se registraron en un rango de 0,62 a 2,56 en BG; 0,62 a 3,98 en ZI; 0,82 y 4,06 en PO; 0,48 y 3,16 en AF y 0,66 y 6,15 en PU. Finalmente, en glándula digestiva los registros oscilaron entre 0,90 y 6,77 en BG; 0,90 y 6,64 en ZI; 1,30 y 8,47 en PO; 0,82 y 7,63 en AF y 1,26 y 7,69 en PU.

En branquia se encontraron diferencias significativas entre sitios excepto en invierno-I (ANOVA, $p=0,253$) e invierno-II (ANOVA, $p=0,170$) (Figura IV.II.10). En primavera-I, los niveles de LPO fueron mayores en PU y PO y menores en BG y ZI respecto a los demás sitios (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I en ZI se registraron niveles más altos que en BG, PO y PU (ANOVA, $p=0,000$); en otoño-I los niveles fueron mayores en PO respecto a BG, ZI y PU (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II se registraron niveles más altos en AF respecto de ZI, PO y PU (ANOVA, $p=0,000$); en verano-II, se registraron en ZI, PO y PU niveles mayores a los correspondientes a BG y AF (ANOVA, $p=0,000$), finalmente, en otoño-II los niveles más altos se registraron en BG y ZI respecto de PU (ANOVA, $p=0,017$).

En manto no se encontraron diferencias significativas entre sitios en invierno-I (ANOVA, $p=0,079$) (Figura IV.II.10). En primavera-I los niveles más altos se registraron en PU y PO (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I los mayores niveles se encontraron en ZI y PU respecto de BG y PO (ANOVA, $p=0,001$); en otoño-I AF mostró niveles mayores a los de ZI (ANOVA, $p=0,017$); en invierno-II en ZI y PO se

registraron niveles más altos que en BG y AF (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II, se registraron mayores niveles de LPO en PO, AF y PU respecto de ZI (ANOVA, $p=0,003$); en verano-II, ZI, PO y PU mostraron los niveles más altos (ANOVA, $p=0,000$) y finalmente en otoño-II AF registró niveles más altos que en BG y ZI (ANOVA, $p=0,002$).

Por último, los niveles de LPO en glándula digestiva mostraron diferencias significativas entre sitios excepto, al igual que en los otros dos órganos estudiados, en invierno-I (ANOVA, $p=0,122$) (Figura IV.II.10). En primavera-I, PO y PU registraron los niveles más altos mientras que BG y ZI los más bajos (ANOVA, $p=0,000$); en verano-I, ZI mostró los valores más altos y AF los más bajos (ANOVA, $p=0,001$); en otoño-I los niveles más altos se observaron en BG (ANOVA, $p=0,000$); en invierno-II los niveles más altos se encontraron en ZI, PO y AF (ANOVA, $p=0,000$); en primavera-II los valores más bajos se registraron en PU (ANOVA, $p=0,000$); en verano-II, en ZI los registros fueron mayores respecto a los correspondientes a BG, AF y PU (ANOVA, $p=0,000$) y en otoño-II, PO y AF registraron niveles mayores a los encontrados en BG (ANOVA, $p=0,001$).

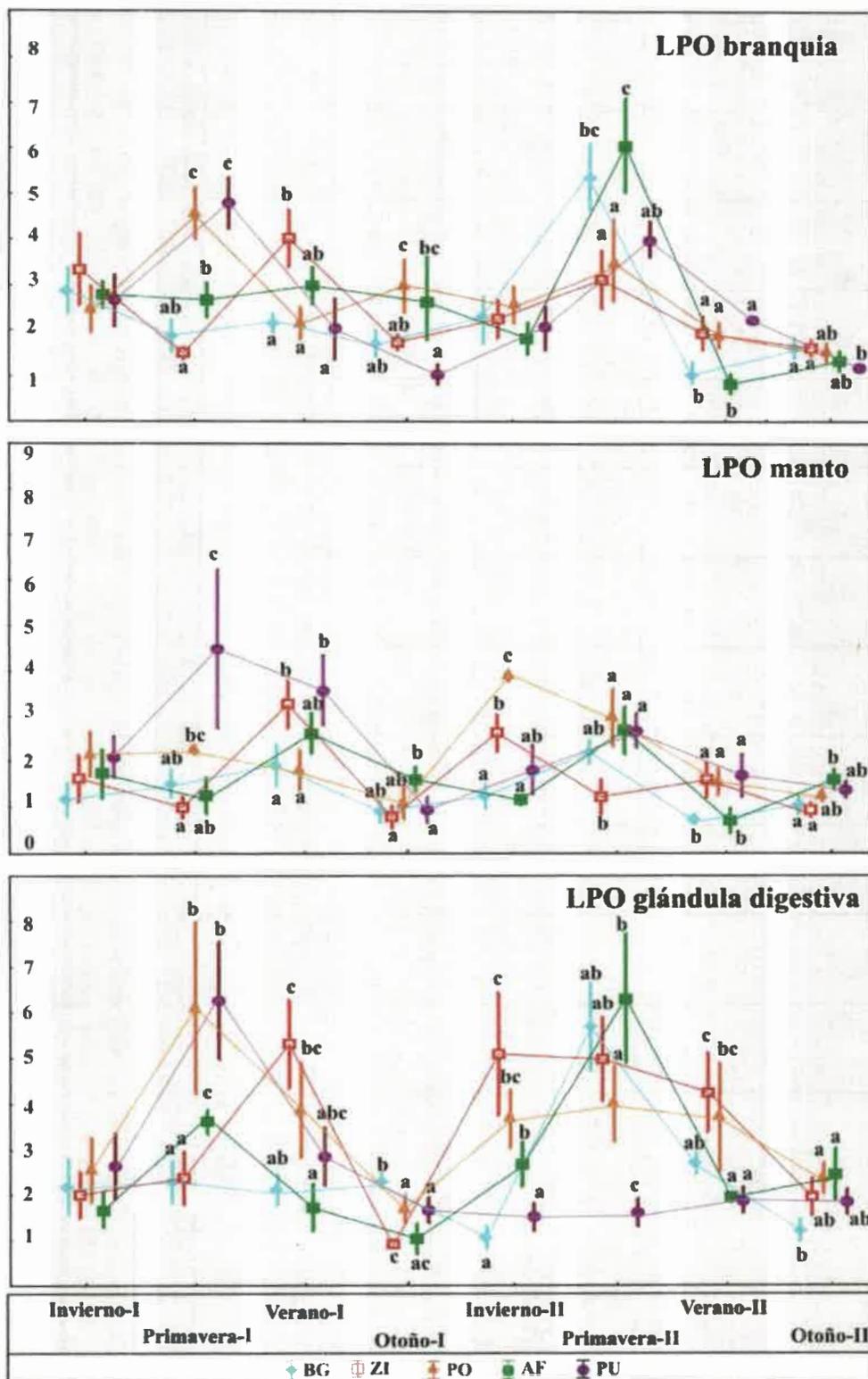


Fig IV.II.10: Niveles de LPO en *M. edulis chilensis* registrados en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar (n=5) Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p < 0,05$).

N. magellanica

Los niveles de LPO (nmol MDA/mg prot) se registraron en un rango de 0,36 a 3,36 en glándula digestiva y de 0,14 a 5,65 en gónada de *N. magellanica*.

Se registraron diferencias significativas en los niveles de LPO entre fechas en los dos órganos analizados (K-W, $p=0,000$). La tendencia general indicó aumentos en invierno-I y verano-II en glándula digestiva y en invierno I y II, primavera-I y verano-II en gónada. Los niveles de LPO en glándula digestiva registrados a lo largo de los dos años estudiados variaron en rangos de 0,40 a 2,09 en BG; de 0,45 a 2,60 en ZI; de 0,36 a 1,97 en PO y de 0,81 a 3,63 en PU, mientras que en gónada, las variaciones entre fechas fueron de 0,14 a 2,15 en BG; de 0,48 a 4,04 en ZI; de 0,20 a 3,56 en PO y de 0,16 a 5,64 en PU.

Entre sitios las diferencias fueron significativas excepto en otoño-II en ambos órganos (ANOVA, $p=0,176$ y $0,656$ en glándula digestiva y gónada respectivamente) y en primavera-II en glándula digestiva (ANOVA, $p=0,250$) (Figura IV.II.11).

En glándula digestiva, la LPO en invierno-I y primavera-I mostró los valores más altos en PU (ANOVA, $p=0,001$ y $p=0,000$ respectivamente); en verano-I en PU se registraron niveles más altos que en PO (ANOVA, $p=0,013$); en otoño-I, PU registró mayores niveles respecto de BG y ZI (ANOVA, $p=0,000$); en invierno-II y en verano-II, ZI, PO y PU mostraron niveles de LPO mayores a los de BG (ANOVA, $p=0,001$ y $p=0,000$ respectivamente).

Por su parte, en gónada, los niveles de LPO más altos se registraron en PO en invierno-I (ANOVA, $p=0,000$), en PU en primavera-I (ANOVA, $p=0,000$) y en ZI en verano-I (ANOVA, $p=0,000$). En otoño-I la LPO fue mayor en PO respecto de BG (ANOVA, $p=0,022$) mientras que en invierno-II los valores más altos se registraron en PU, seguidos de PO y ZI (ANOVA, $p=0,000$). En primavera-II la LPO fue mayor en PU respecto de PO (ANOVA, $p=0,009$) mientras que en verano-II los niveles más altos se registraron en ZI (ANOVA, $p=0,000$).

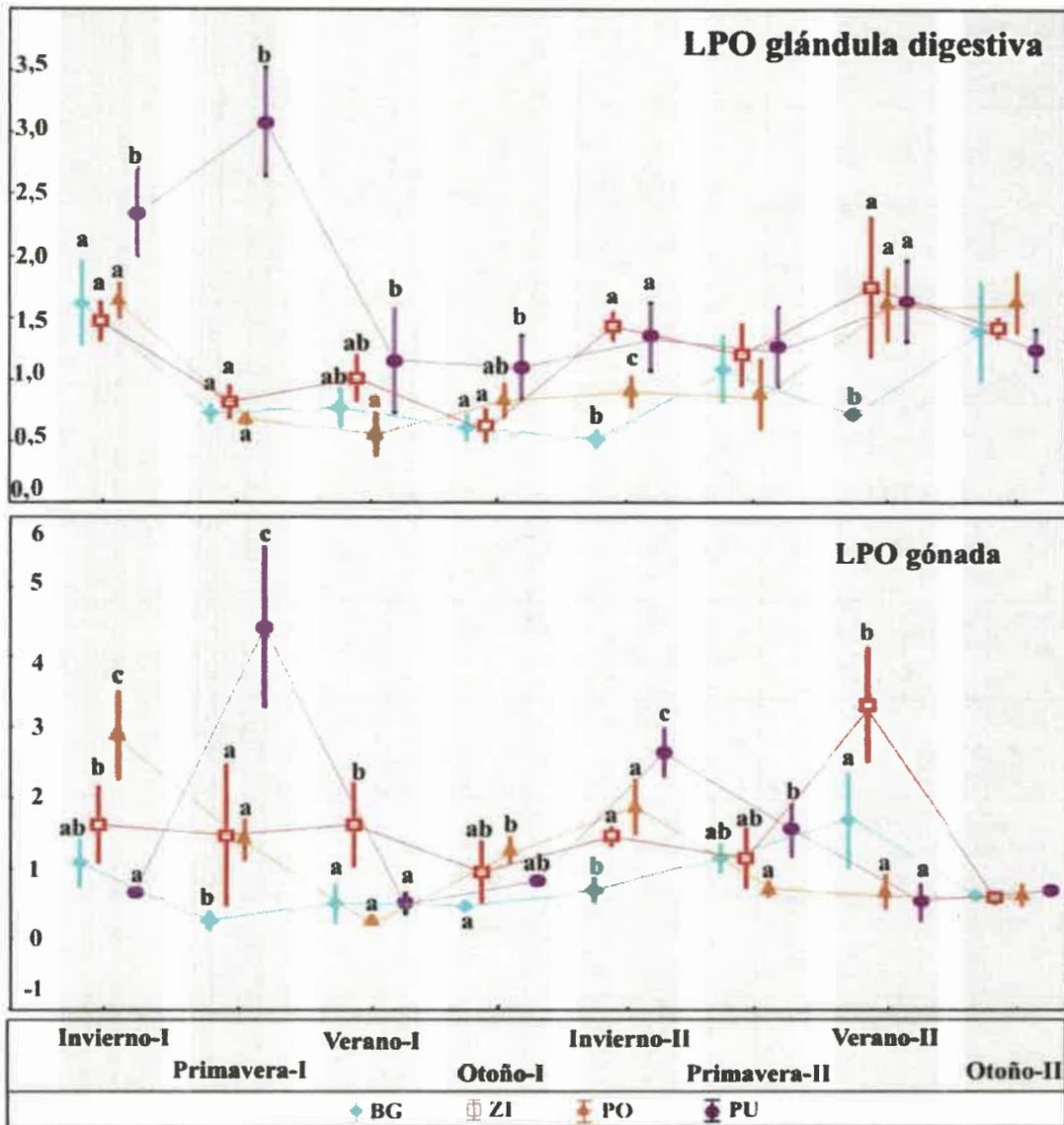


Fig IV.II.11: Niveles de LPO en *N. magellanica* registrados en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media \pm el desvío estándar (n=5). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p < 0,05$).

N. deaurata

Los niveles de LPO (nmol MDA/mg prot) en *N. deaurata* se registraron en un rango de 0,49 a 2,60 en glándula digestiva y de 0,13 a 5,25 en gónada.

Se registraron diferencias significativas en los niveles de LPO entre fechas tanto para los registros de glándula digestiva (ANOVA, $p=0,000$) como para los de gónada (K-W, $H_0=27,51$; $p=0,000$). En glándula digestiva los aumentos se observaron en general, entre primavera-II y otoño-II y los niveles más bajos en otoño-I, mientras que en gónada se observaron aumentos en primavera-II y otoño-II en AF y ZI y en verano-II en BG. Los niveles más bajos en este órgano se registraron en otoño-I.

A lo largo de los dos años de estudio, la LPO se registró en rangos de 0,49 a 2,60 en glándula digestiva y de 0,22 a 2,27 en gónada en BG; de 0,72 a 2,45 en glándula digestiva y de 0,21 a 5,25 en gónada en ZI y de 0,88 a 2,43 en glándula digestiva y de 0,13 a 4,73 en gónada en AF.

Se encontraron diferencias significativas en los niveles de LPO entre sitios en ambos órganos, excepto en verano-II (ANOVA, $p=0,131$ en glándula digestiva y $p=0,333$ en gónada), en verano-I en glándula digestiva (K-W, $p=0,05$) y en otoño-I en gónada (ANOVA, $p=0,723$) (Figura IV.II.12).

La LPO en glándula digestiva registró los valores más altos en AF en otoño-I (ANOVA, $p=0,000$) y otoño-II (ANOVA, $p=0,011$); en invierno-II fue mayor en ZI respecto a los demás sitios (ANOVA, $p=0,006$) y en primavera-II fue mayor en AF que en ZI (ANOVA, $p=0,010$).

En gónada, los niveles de LPO fueron mayores en AF respecto de BG en verano-I (ANOVA, $p=0,022$) mientras que en invierno-II (ANOVA, $p=0,006$), primavera-II (ANOVA, $p=0,000$) y otoño-II (ANOVA, $p=0,030$) fueron más elevados en ZI y AF respecto de BG.

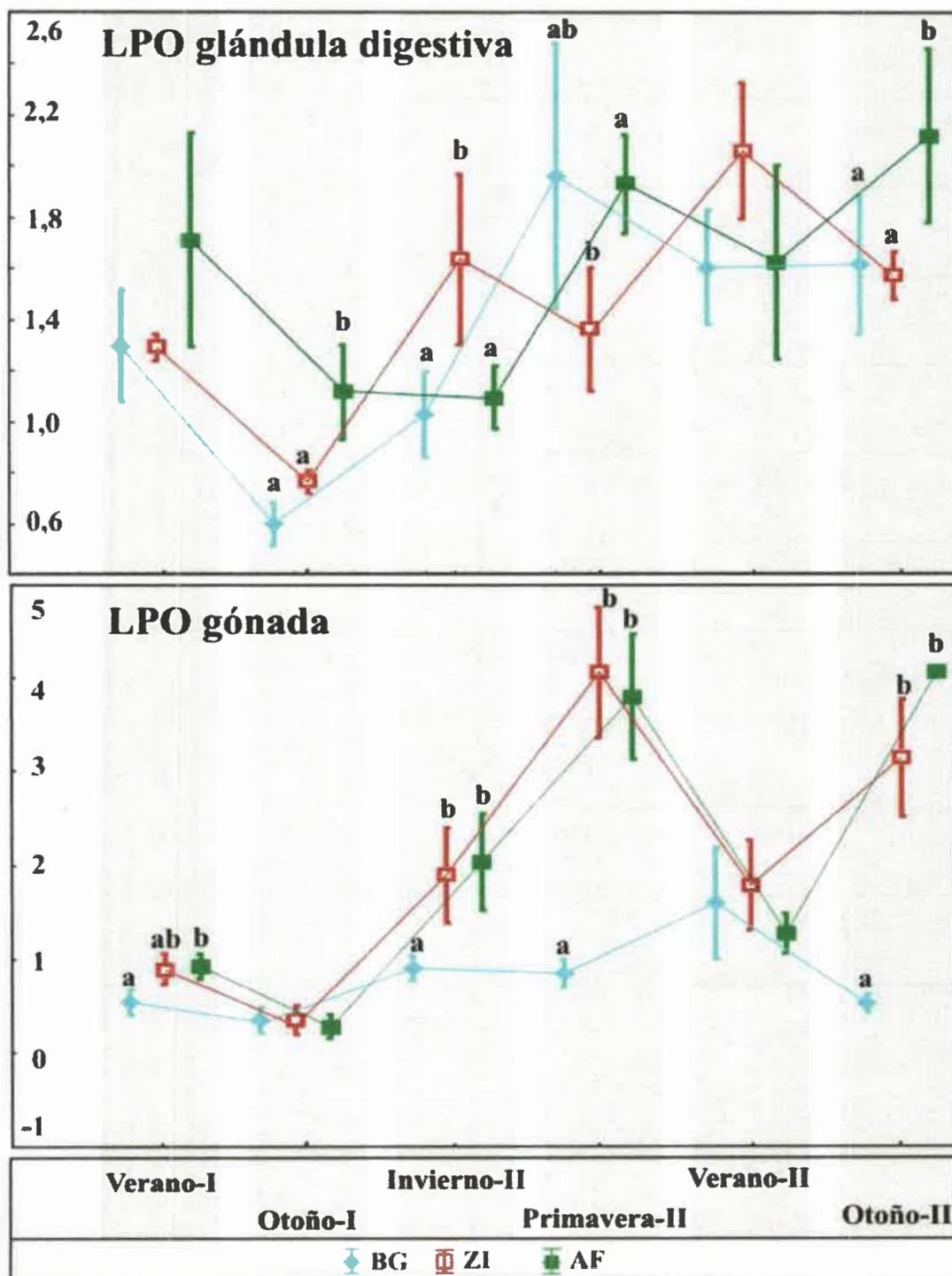


Fig IV.II.12: Niveles de LPO en *N. deaurata* registrados en los sitios y fechas de estudio correspondientes. Los valores representan la media ± el desvío estándar (n=5). Para cada fecha, las letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($p < 0,05$).

IV.II.2. BIOACUMULACIÓN

M. edulis chilensis

La concentración de metales pesados en *M. edulis chilensis* se registró en rangos de *nd* a 3,22 µg/g para Cd; de *nd* a 8,73 µg/g para Pb; de 1,89 a 15,24 µg/g para Cu; de 55,09 a 908,91 µg/g para Zn y de 108,06 a 547,87 µg/g para Fe.

El promedio de la concentración de Fe de todas las fechas estudiadas resultó significativamente mayor en BG respecto de ZI, AF y PU (ANOVA, $p=0,002$). Para el resto de los metales no se encontraron diferencias significativas entre sitios ($p>0,05$) (Tabla IV.II.1).

Respecto al Pb, la mayoría de las mediciones resultaron por debajo del nivel de detección (2,37 µg/g) excepto en primavera-I en AF, PO y PU; en ambos veranos y en otoño-II en BG; en otoño-I en PU; en invierno-II en ZI y en primavera-II en PU. Para la concentración de Cd, valores por debajo del nivel de detección (0,26 µg/g) fueron registradas en PO en otoño-I y en BG en otoño-II.

Se observaron fluctuaciones a lo largo de los muestreos en las concentraciones de todos los metales. En BG se observaron picos máximo de Fe en primavera y verano I y de Cd en primavera-I; incrementos de Cu en PO en invierno-I y primavera-II, finalmente, en primavera-I se registraron picos máximos de Pb en PO y PU y un pico máximo de Zn en PU (Figura IV.II.13).

Tabla IV.II.1: Concentración de metales pesados (media \pm desvío estándar, $n=8$) determinada en *M. edulis chilensis* para cada sitio durante las fechas de estudio.

sítios		Cd	Pb	Cu	Zn	Fe
BG	media	1,58 a	1,88 a	5,58 a	118,77 a	359,24 b
	DS	0,96	0,97	1,60	37,67	127,10
ZI	media	1,04 a	1,43 a	5,41 a	113,65 a	204,91 a
	DS	0,54	0,69	2,32	45,47	66,95
PO	media	1,20 a	2,37 a	7,72 a	211,60 a	234,60 ab
	DS	0,73	2,66	4,04	79,91	119,52
AF	media	1,11 a	1,75 a	5,78 a	119,63 a	159,96 a
	DS	0,40	1,59	1,39	45,14	43,43
PU	media	1,44 a	2,26 a	5,94 a	110,28 a	202,68 a
	DS	0,46	1,66	2,12	55,48	0,36

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre sitios.
Las concentraciones se expresan en µg/g de tejido seco.

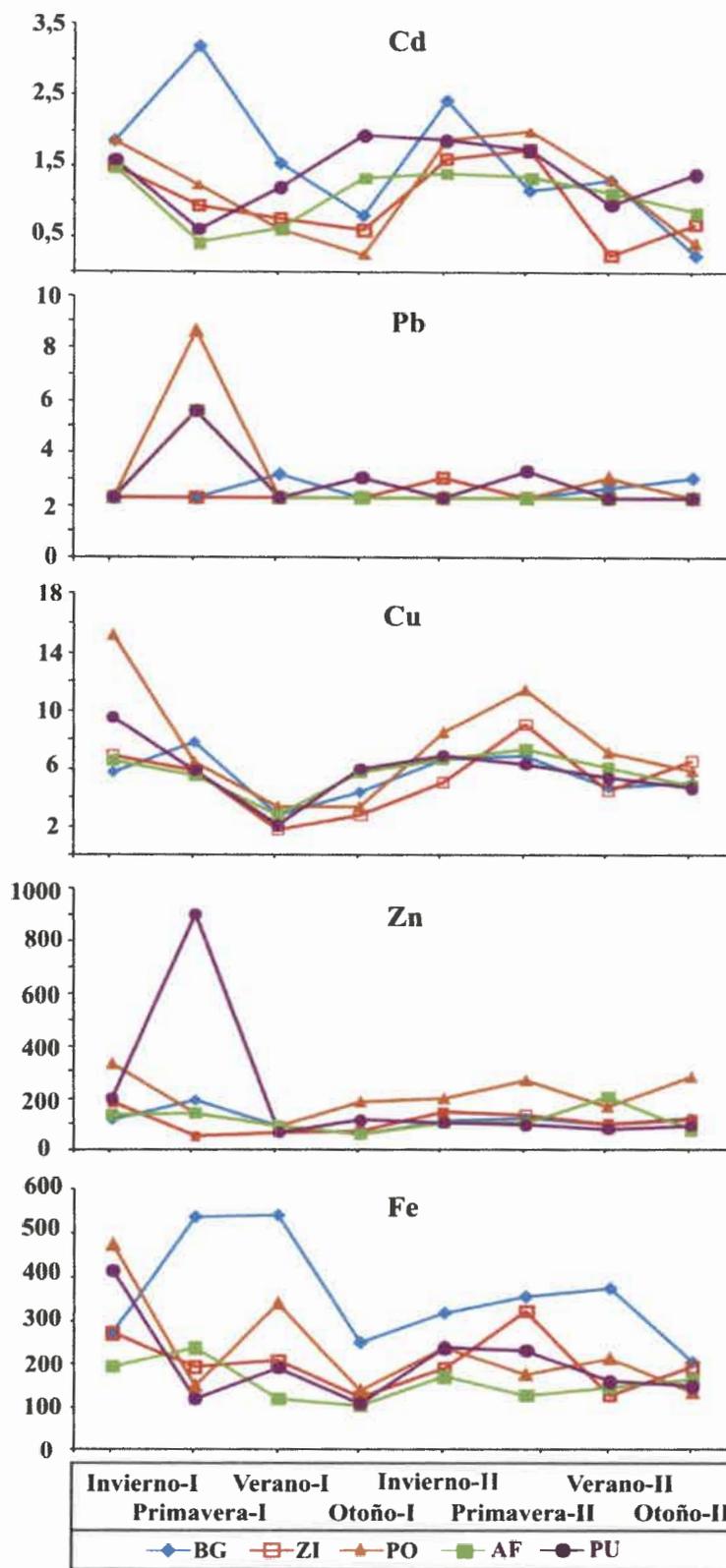


Fig IV.II.13: Variación estacional de la concentración de metales pesados (µg/g tejido seco) en *M. edulis chilensis* para cada sitio de estudio.

N. magellanica

La concentración de metales pesados en *N. magellanica* se registró en rangos de *nd* a 5,44 µg/g para Cd; de *nd* a 9,76 µg/g para Pb; de 6,65 a 19,33 µg/g para Cu; de 45,53 a 95,36 µg/g para Zn y de 1,07 a 8,77 mg/g para Fe.

El promedio de la concentración de Cd de todas las fechas estudiadas resultó mayor en organismos de BG respecto de PO (ANOVA, $p=0,016$). De manera similar, el Fe mostró una acumulación significativamente mayor en los organismos de BG comparado con el resto de los sitios (ANOVA, $p=0,002$). Para el resto de los metales no se encontraron diferencias significativas entre sitios ($p>0,05$) (Tabla IV.II.2).

Concentraciones de Pb por debajo del nivel de detección (2,37 µg/g) fueron registradas en PU en verano-I y en ZI en invierno-II, mientras que concentraciones de Cd por debajo del nivel de detección (0,26 µg/g) se registraron en PO en primavera-II.

Se observaron algunas tendencias en cuanto a la variación estacional de los metales. El Cd mostró picos máximos en BG y PU en verano-II. La concentración de Pb mostró incrementos en PO en primavera-I y verano-II y en ZI en otoño-II. Durante la primavera-I se observaron incrementos de Cu en ZI y PO; picos de Zn se registraron en PO en primavera-I, en PU en primavera-II y en BG en verano-II. Finalmente la concentración de Fe mostró incrementos en BG en ambas primaveras y en verano-II (Figura IV.II.14).

Tabla IV.II.2: Concentración de metales pesados (media \pm desvío estándar, $n=8$) determinada en *N. magellanica* para cada sitio durante las fechas de estudio.

sitios		Cd	Pb	Cu	Zn	Fe
BG	media	2,95 b	5,25 a	11,34 a	60,11 a	5,75 b
	DS	1,31	1,17	2,49	10,46	2,34
ZI	media	2,59 ab	5,07 a	12,11 a	56,35 a	2,93 a
	DS	0,76	2,42	2,31	8,10	0,90
PO	media	1,38 a	5,42 a	11,00 a	59,34 a	2,68 a
	DS	0,74	2,36	3,68	11,47	1,08
PU	media	1,72 ab	3,81 a	11,41 a	58,93 a	3,00 a
	DS	1,17	1,37	2,11	7,72	1,73

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre sitios. Las concentraciones se expresan en µg/g de tejido seco.

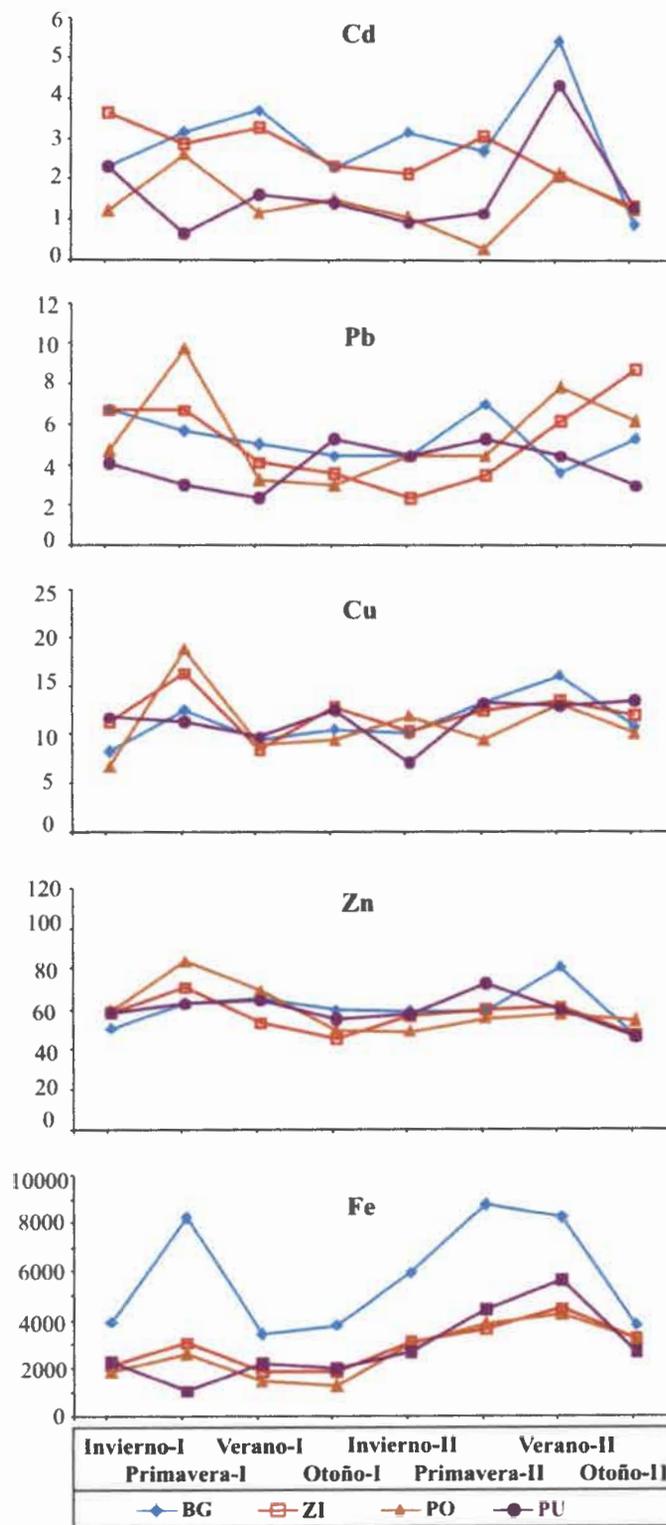


Fig IV.II.14: Variación estacional de la concentración de metales pesados ($\mu\text{g/g}$ tejido seco) en *N. magellanica* para cada sitio de estudio.

IV.II.3. CARÁCTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

IV.II.3.a. Porcentaje de humedad, materia orgánica y ceniza

Se presenta un análisis descriptivo de los porcentajes de humedad (%H), cenizas (%C) y materia orgánica (%MO) obtenidos entre primavera-I y otoño-II en las tres especies estudiadas.

M. edulis chilensis

Las variaciones entre sitios del %H promedio no superaron el 3%. Los registros más altos se encontraron en los organismos correspondientes a BG (entre 75,57 y 82,18 %) y los más bajos en los organismos de AF (entre 73,74 y 78,17 %). La variación estacional no resultó muy marcada, indicando, en términos generales, disminuciones en los muestreos de verano-I ($75,69 \pm 4,50$ %) y verano-II ($75,18 \pm 3,11$ %) respecto de las demás fechas (Figura IV.II.15).

El %C indicó leves diferencias entre sitios. Los registros variaron entre 1,99 y 7,39 % en BG; 1,99 y 6,25 % en ZI; 2,08 y 6,66 % en PO; 1,81 y 6,95 % en AF y 1,90 y 6,35 % en PU. En general se observó un aumento en todos los sitios en otoño-I ($6,69 \pm 1,24$ %) respecto a las demás fechas en las que los valores se mantuvieron entre $2,08 \pm 0,43$ en verano-II y $3,98 \pm 2,27$ % en verano-I (Figura IV.II.15).

El %MO resultó también con mínimas variaciones entre sitios y fechas. Los valores obtenidos se ubican en rangos de 14,51 a 23,87 % en BG; de 17,02 a 22,35 % en ZI; de 13,49 a 21,32 % PO; de 18,42 a 24,24 % en AF y de 11,77 a 24,28 % en PU. El promedio general para cada fecha indicó valores más altos en verano-II ($22,74 \pm 3,25$ %) y más bajos en otoño-I ($15,06 \pm 2,99$ %) respecto de los demás muestreos (Figura IV.II.15).

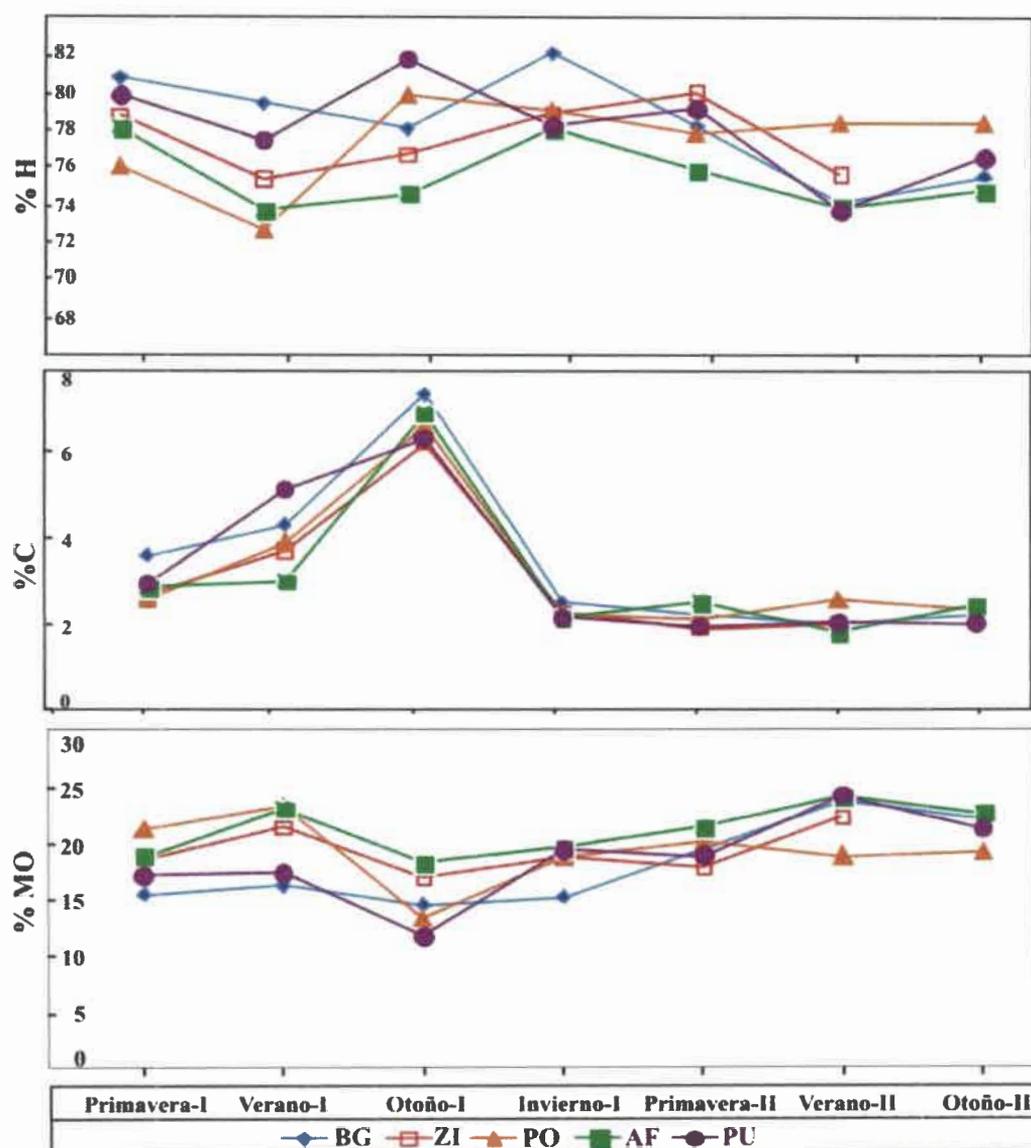


Fig. IV.II.15: Valores promedio (n=5) para cada fecha y sitio de los porcentajes de humedad (%H), cenizas (%C) y materia orgánica (%MO) registrado en *M. edulis chilensis*.

N. magellanica

El %H determinado en *N. magellanica* presentó mínimas variaciones entre sitios. Los valores determinados varían entre 75,27 y 82,66 % en BG; 73,97 y 79,40 % en ZI; 73,37 y 79,84 % en PO y entre 74,82 y 79,92 % en PU. Respecto a las variaciones estacionales se observó un mayor %H en primavera-I en todos los sitios ($80,46 \pm 3,08$ %) y disminuciones en verano-I ($74,94 \pm 7,79\%$) y en otoño-II ($75,10 \pm 1,44\%$).

Dentro del comportamiento homogéneo de los valores obtenidos para el contenido de cenizas (cuyos valores oscilan entre 2-3-% de variación), en BG se registraron a lo largo del año, valores mayores (entre 3,29 y 5,53 %), mientras que en el resto las variaciones estuvieron en un rango de 2,29 a 5,11 % en ZI; 2,62 a 7,28 % en PO y entre 2,20 y 4,35 % en PU. Se observó un aumento en el %C en todos los sitios en verano-I ($5,29 \pm 2,09$ %).

El contenido de materia orgánica fue homogéneo entre sitios y a lo largo de todos los muestreos (con variaciones que llegan como máximo a 5 %). Se registraron valores entre 14,04 y 20,49 % en BG; 17,19 y 23,63 % en ZI; 17,08 y 22,49 % en PO y 16,89 y 22,28 % en PU. Se observaron valores más bajos en la primavera-I ($16,30 \pm 2,89$ %) respecto al resto de las fechas en donde los valores oscilaron entre 19,71 y 22,09 %. Los datos se presentan en la Figura. IV.II.16.

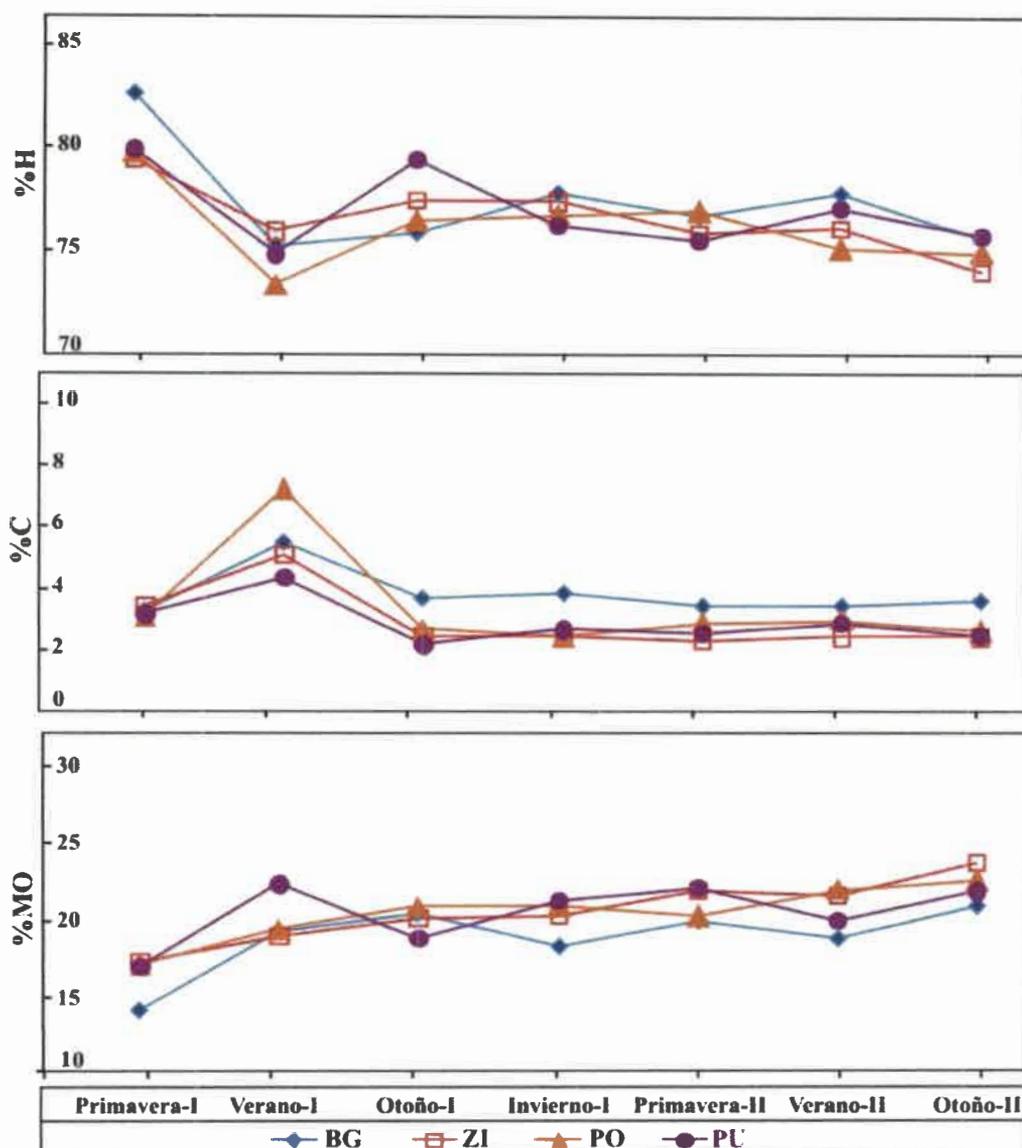


Fig. IV.II.16: Valores promedio (n=5) para cada fecha y sitio de los porcentajes de humedad (%H), cenizas (%C) y materia orgánica (%MO) registrado en *N. magellanica*.

N. deaurata

Los datos obtenidos para *N. deaurata* se presentan en la Fig. IV.II.15. El porcentaje de humedad se mantuvo con poca variación entre sitios y fechas. En general fue menor en los organismos de BG (entre 71,72 y 75, 11%) comparado con ZI (entre 75,55 y 77, 55 %) y AF (entre 73,60 y 77,67 %). Se observaron disminuciones en verano-I ($74,96 \pm 1,06$ %) y otoño-II ($74, 01 \pm 1,81$ %) y una notable disminución en BG en primavera-II ($71,72 \pm 0,62$ %) respecto de los demás sitios que oscilaron entre 76 y 78 %.

El contenido de cenizas fue mayor en BG (entre 4,62 y 9,50 %) respecto de ZI (entre 2,19 y 7,83 %) y AF (entre 2,91 y 3,34 %). Se registró poca variación entre fechas en ZI y AF, excepto por un pico en otoño-I en ZI, mientras que en BG se detectaron aumentos en primavera-II y disminuciones en verano-II y otoño-II.

Con respecto al contenido de materia orgánica, los valores obtenidos resultaron muy homogéneos entre sitios y a lo largo de todos los muestreos, con valores registrados entre 17,04 y 21,69 % en BG; 14,66 y 22,23 % en ZI y entre 19,15 y 24,54 % en AF. Los datos se presentan en la Figura IV.II.17.

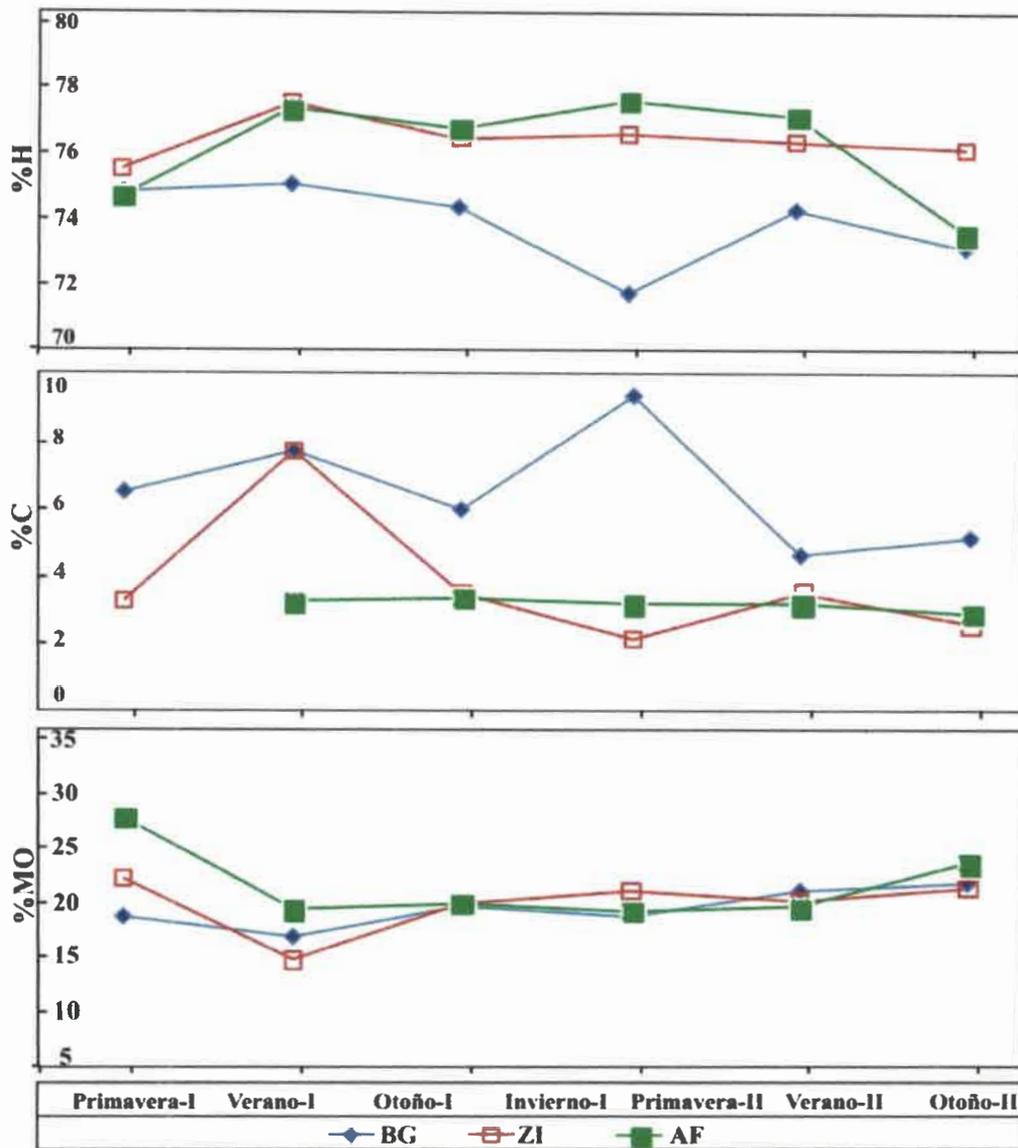


Fig. IV.II.17: Valores promedio (n=5) para cada fecha y sitio de los porcentajes de humedad (%H), cenizas (%C) y materia orgánica (%MO) registrado en *N. deaurata*.

IV.II.3.b. Contenido de lípidos totales

M. edulis chilensis

El contenido de lípidos (mg/g tejido seco) se registró en un rango de 66,19 a 196,39 en glándula digestiva y de 65,59 a 150,59 en manto de *M. edulis chilensis*.

Se encontraron diferencias significativas entre las fechas de muestreo en la concentración de lípidos en ambos órganos (K-W, $H_0=16,20$ y $p=0,001$ y $H_0=12,18$; $p=0,007$ para glándula digestiva y manto respectivamente). En términos generales, en glándula digestiva se observaron valores más bajos en invierno-II en todos los sitios, con un promedio de $102,02 \pm 30,12$, respecto a las demás fechas, donde los valores oscilaron entre 134 y 153. Por su parte en manto, se observó en general para todos los sitios, un aumento de la concentración de lípidos en invierno-II, con un valor promedio de $124,44 \pm 24,08$ con respecto a las demás fechas que variaron entre 92 y 87.

Las diferencias entre sitios solo fueron significativas en glándula digestiva en otoño-I (K-W, $H_0=10,26$; $p=0,036$), donde AF y ZI registraron concentraciones menores a los demás sitios y en manto en primavera-II (K-W, $H_0=11,13$ $p=0,035$), donde se observaron valores más altos en BG (Figura IV.II.18).

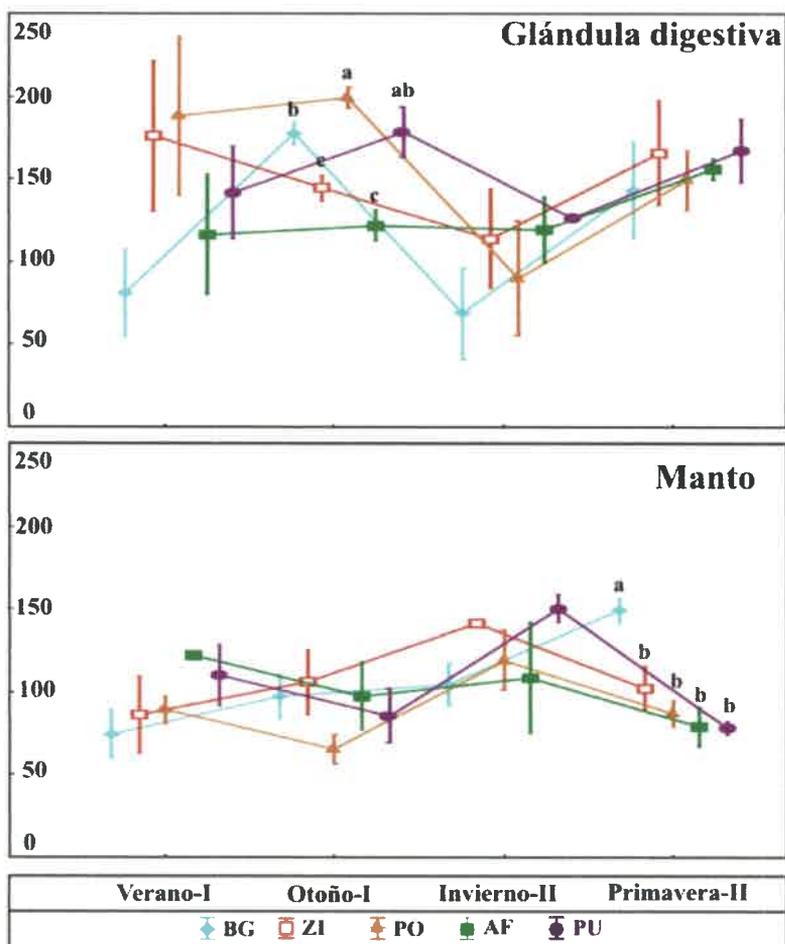


Figura IV.II.18: Contenido de lípidos (mg/g tejido seco) en *M. edulis chilensis*. Valores expresados como media \pm desvío estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sitios.

N. magellanica

El contenido de lípidos (mg/g tejido seco) en *N. magellanica* se registró en un rango de 92,48 a 287,81 en glándula digestiva y de 90,66 a 182,82 en gónada.

No se encontraron diferencias significativas entre las distintas épocas en ninguno de los dos órganos estudiados (K-W, $H_0=4,67$ y $p=0,192$ y $H_0=8,16$ y $p=0,050$ para glándula digestiva y gónada respectivamente). En glándula digestiva se encontraron diferencias significativas entre los sitios en verano-I (K-W, $H_0=8,00$; $p=0,039$) donde los valores fueron mayores en ZI y PU respecto a los demás sitios y en invierno-II (K-W, $H_0=6,57$; $p=0,041$) donde ZI y PO mostraron un contenido menor de lípidos

respecto a BG y PU. En gónada, solo se encontraron diferencias significativas entre sitios en primavera-II (K-W, $p=0,037$) donde se registró un mayor contenido de lípidos en ZI respecto de los demás sitios (Figura IV.II.19).

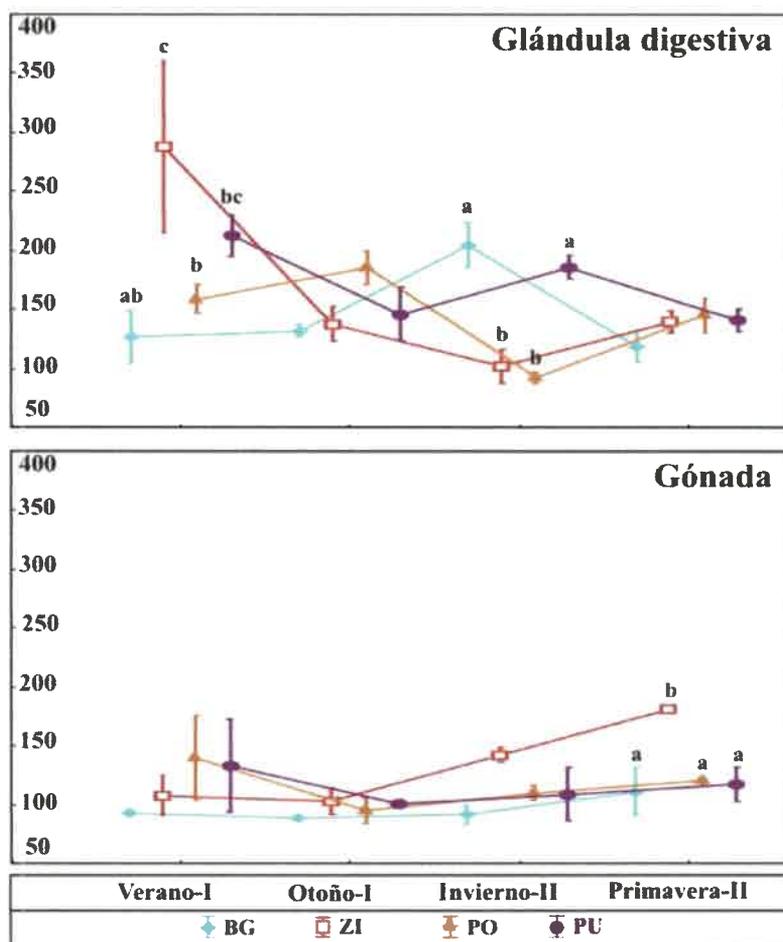


Figura IV.II.19: Contenido de lípidos (mg/g tejido seco) en *N. magellanica*. Valores expresados como media \pm desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre sitios.

N. deaurata

El contenido de lípidos (mg/g tejido seco) en *N. deaurata* se registró en un rango de 64,50 a 193,80 en glándula digestiva y de 75,26 a 229,63 en gónada.

Se encontraron variaciones significativas en el contenido de lípidos en glándula digestiva en las distintas épocas (K-W, $H_0=22,77$; $p=0,000$), indicando en promedio, valores menores en todos los sitios en invierno-II ($77,93 \pm 15,37$) y primavera-II

(106,35 ± 9,22) respecto a los observados en verano-I (149,41 ± 25,40) y otoño-I (183,16 ± 31,90). Las diferencias entre los sitios en este órgano no fueron significativas (K-W, $p > 0,05$).

En gónada la variación del contenido de lípidos entre las épocas no fue significativa (K-W, $H_0 = 2,54$; $p = 0,467$) aunque en AF se observaron valores más altos en invierno-II y primavera-II respecto de las demás fechas. Por otro lado, en estos mismos períodos, se encontraron diferencias significativas entre sitios (K-W, $p < 0,05$), con valores mayores en AF respecto de BG y ZI (Figura IV.II.20)

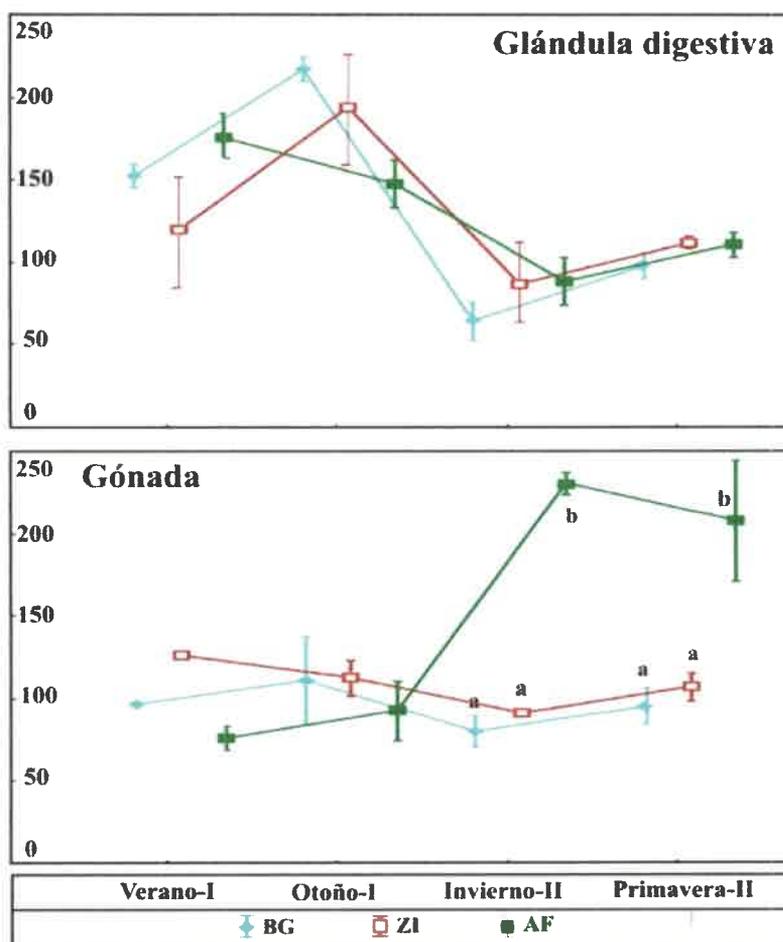


Figura IV.II.20: Contenido de lípidos (mg/g tejido seco) en *N. deaurata*. Valores expresados como media ± desvío estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sitios.

IV.II.3.c. Índice de Condición (IC)

M. edulis chilensis

Se encontraron diferencias significativas entre los sitios en todas las fechas estudiadas. En primavera-I, BG mostró el menor IC respecto a los demás sitios (ANOVA, $p < 0,05$). En el resto de las fechas, AF presentó un IC mayor al resto de los sitios (ANOVA, $p < 0,05$), con un promedio general de $(0,18 \pm 0,04)$ mientras que el IC promedio de los demás sitios se mantuvo entre 0,09 y 0,11. Se encontró variación estacional significativa en todos los sitios (ANOVA, $p < 0,05$). En BG y PO se registraron aumentos en verano-II; en ZI se observó una disminución en otoño-II y en AF en primavera-I respecto a las demás fechas, finalmente en PU, se registró un aumento del IC en otoño-II (Figura IV.II.21).

N. magellanica

Se encontraron diferencias significativas entre los sitios en el IC de todos los períodos (ANOVA, $p < 0,05$). En general, los valores promedio más altos correspondieron a ZI $(0,19 \pm 0,03)$ y PU $(0,20 \pm 0,03)$ y los más bajos a BG $(0,14 \pm 0,03)$ y PO $(0,15 \pm 0,04)$.

La variación estacional del IC fue significativa en todos los sitios (ANOVA, $p < 0,05$). En BG y PO se registraron aumentos en otoño-I, mientras que en ZI se observó un aumento del IC en invierno-II y en PU se registraron valores más bajos en primavera-I y mayores en verano-II (Figura IV.II.21).

N. deaurata

El IC en *N. deaurata* mostró diferencias significativas entre sitios en verano-I (ANOVA, $p = 0,000$) y otoño-I (ANOVA, $p = 0,003$) donde se observaron valores más altos en AF respecto de los demás sitios y en primavera-II (ANOVA, $p = 0,031$), donde el IC de AF fue mayor que en BG.

La variación estacional indicó valores más altos en ZI en otoño-II y primavera-II respecto de los observados en verano-II (ANOVA, $p = 0,000$) y en AF, donde el IC fue mayor en verano-I respecto del invierno-II, verano-II y otoño-II (ANOVA, $p = 0,004$). En BG el IC se mantuvo con mínimas variaciones entre fechas (Figura IV.II.21).

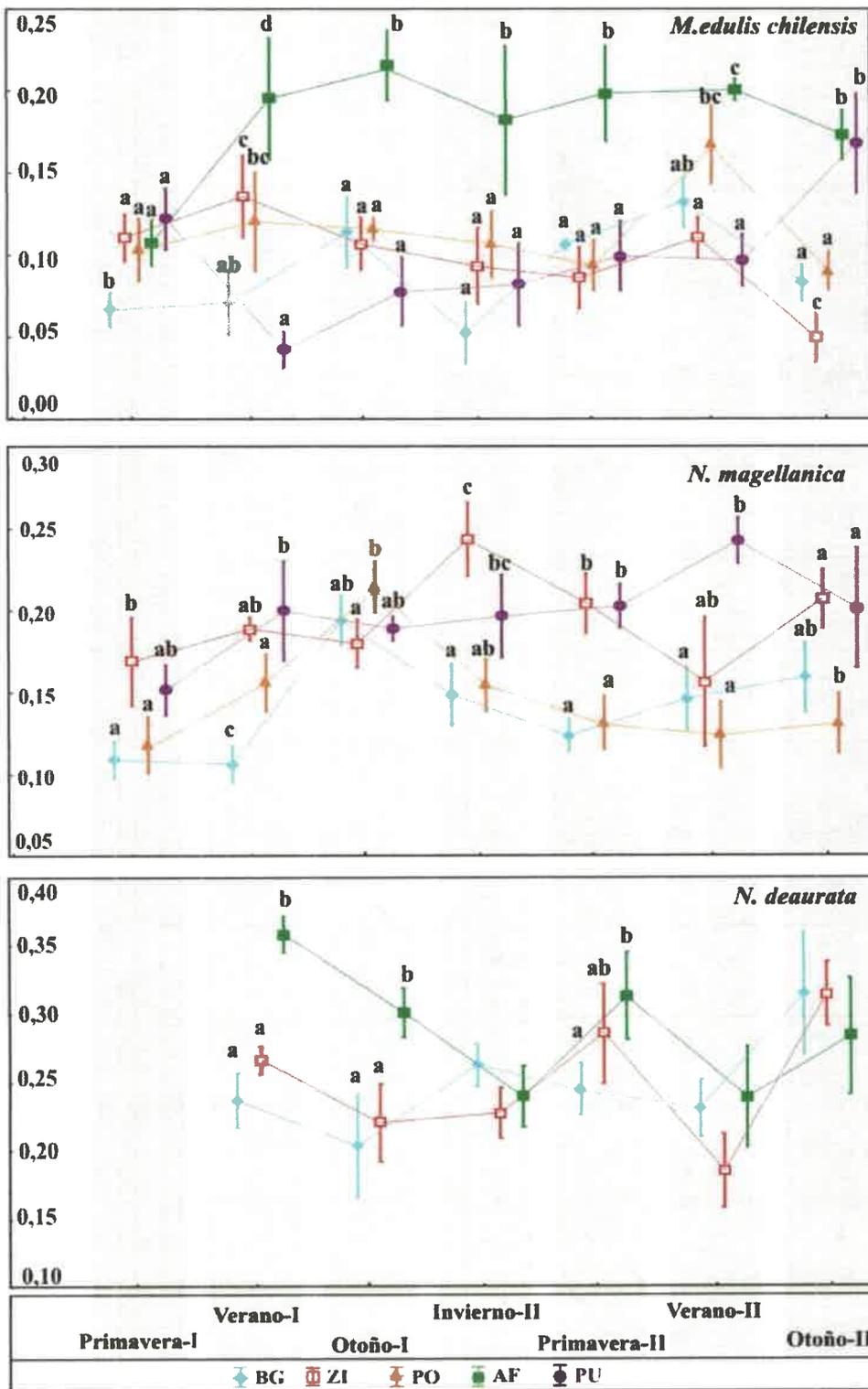


Figura IV.II.21: Índice de Condición (IC) calculado para las tres especies estudiadas, en los sitios y fechas correspondientes. Los valores se expresan como media \pm desvío estándar (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05) entre sitios para cada fecha.

IV.II.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

Se realizaron ACP para cada una de las especies en estudio incluyendo los resultados de biomarcadores y acumulación de metales en tejidos (*para M. edulis chilensis* y la especie de lapa *N. magellanica*) junto con los parámetros fisicoquímicos medidos en agua. Sólo se incluyeron las fechas de muestreo en las que se detectó actividad en todas las enzimas. Para el análisis de las lapas se omitieron los datos de SOD ya que su registro estaba incompleto, con valores no detectados en varias fechas y/o sitios.

M. edulis chilensis

El ACP realizado a partir de la integración de variables ambientales y biológicas en mejillones reveló que un 60,43 % de la varianza total está explicada por los primeros tres componentes principales (CP) (Tabla IV.II.3). El CP 1 (22,22%) está integrado por la asociación en el eje positivo de OD con la actividad de CAT, GST, SOD y LPO en branquias y CAT y LPO en glándula digestiva y LPO en manto. El CP 2 (16,20%) está compuesto por la asociación en el eje negativo de nutrientes, excepto el nitrato y la actividad de GST en glándula digestiva. El CP 3 (12,01%) indicó la asociación en el eje negativo de nitratos, pH y Cu en tejidos mientras que en el eje positivo aparecen asociadas la clorofila-*a* y MOP. Finalmente, el PC 4 (10,0 %) mostró una asociación en el eje positivo de la salinidad con el Cd en tejidos, en oposición a la temperatura. La Figura IV.II.22 muestra la disposición de los sitios en base a las asociaciones descriptas. Se observan grupos diferenciados principalmente por las fechas y se distingue una mayor dispersión de los datos correspondientes a PU.

Tabla IV.II.3: Factores extraídos del ACP basados en la correlación entre las variables analizadas para *M. edulis chilensis*.

Variab les	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
pH	0,42	0,26	-0,66	-0,31
OD	0,73	-0,17	0,24	0,11
Temperatura	0,02	-0,35	0,30	-0,64
Salinidad	0,35	0,44	0,31	0,62
Clorofila-a	0,46	-0,07	0,51	-0,14
Amonio	-0,35	-0,84	-0,14	0,18
Nitrito	-0,27	-0,81	-0,26	0,21
Nitrato	0,19	-0,19	-0,61	0,14
Fosfato	-0,26	-0,83	-0,15	0,31
Silicato	-0,24	-0,60	-0,31	-0,33
MOP	-0,08	-0,54	0,62	0,13
CAT br	0,88	-0,18	-0,01	0,08
CAT gl	0,75	-0,23	0,31	0,16
GST br	0,52	-0,35	0,22	0,06
GST gl	0,35	-0,56	-0,15	-0,38
SOD br	0,67	-0,08	-0,26	0,02
SOD gl	0,39	-0,07	-0,16	0,14
LPO br	0,89	-0,11	0,02	-0,14
LPO ma	0,50	-0,37	0,01	-0,01
LPO gl	0,56	-0,07	0,00	-0,46
Cd-tejido	0,34	-0,18	-0,34	0,61
Pb-tejido	-0,19	-0,07	-0,11	0,33
Cu-tejido	0,44	0,20	-0,62	0,09
Zn-tejido	0,16	0,33	-0,38	-0,05
Fe-tejido	0,23	0,11	0,19	0,31
% Var. Acumulada	22,2	38,42	50,43	60,43

Los coeficientes de correlación son significantes cuando son > 0,50 (en negrita).
Variación Acumulada (Var. Acumulada).

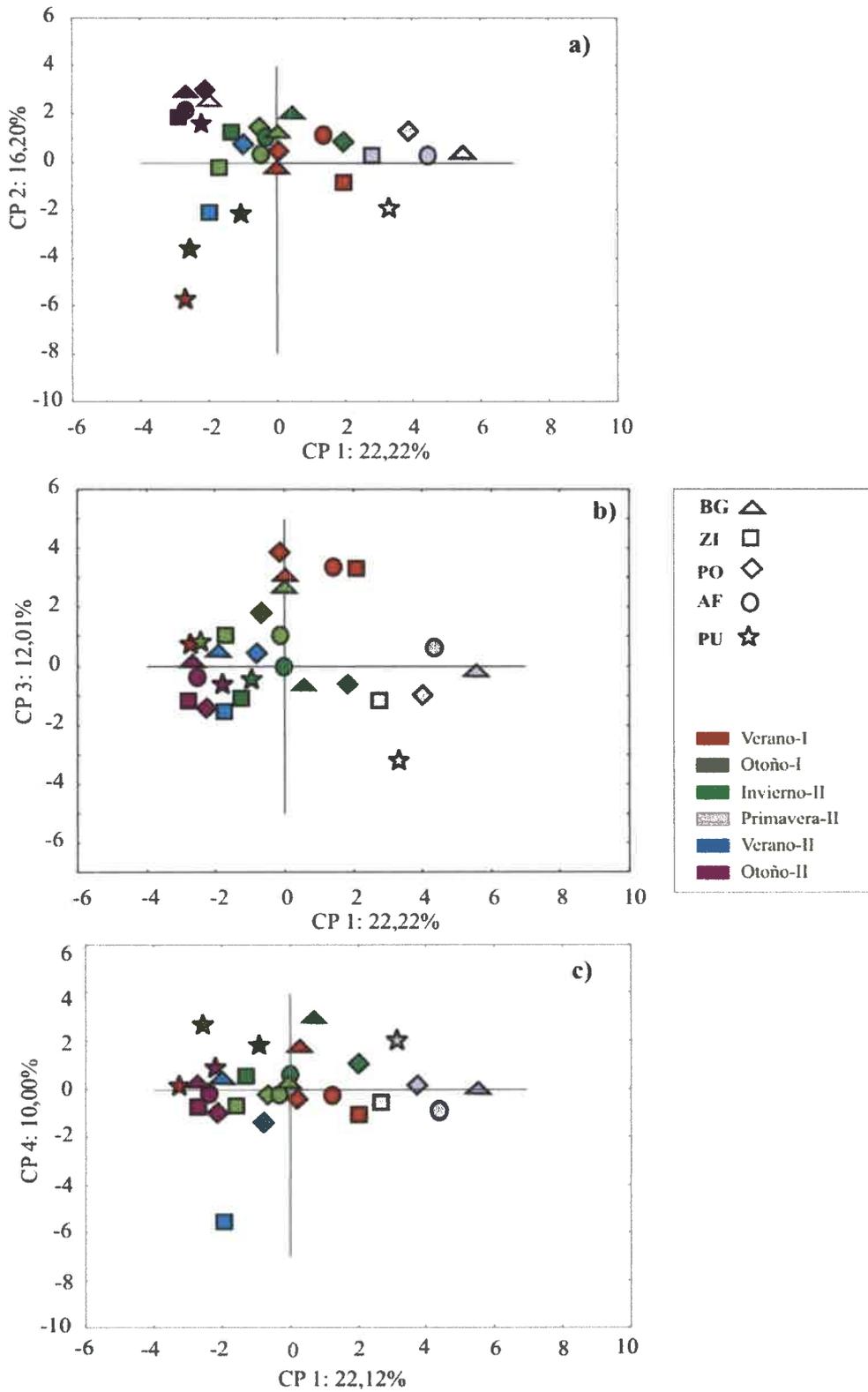


Figura IV.II.22: Proyección de los casos en un plano indicando la posición de los sitios de estudio de acuerdo a la asociación entre las variables analizadas con a) CP 1 y 2 y b) CP 1 y 3 c) CP 1 y 4 para *M. edulis chilensis*.

N. magellanica

El ACP realizado a partir de la integración de variables ambientales y biológicas en lapas de la especie *N. magellanica* reveló que un 54,95 % de la varianza total está explicada por los primeros tres componentes principales (CP) (Tabla IV.II.4). El CP 1 (23,98%) está integrado por la asociación en el eje positivo de los nutrientes, excepto el nitrato con la actividad de GST en glándula digestiva en oposición a la asociación en el eje negativo de la concentración de Fe en tejidos. El CP 2 (18,65%) esta compuesto por la asociación en el eje negativo de pH, Cu en tejido y LPO en glándula digestiva en oposición a la asociación en el eje positivo de la salinidad y CAT en glándula digestiva. Finalmente el CP 3 (12,32%) indicó la asociación en el eje negativo la temperatura, clorofila-*a*, MOP y concentración de Cd y Zn en tejidos. Al igual que lo observado en mejillón, el gráfico en dos dimensiones muestra una diferenciación de grupos por fechas y una separación de PU del resto de los sitios (Figura.IV.II.23).

Tabla IV.II.4: Factores extraídos del ACP basados en la correlación entre las variables analizadas para *N. magellanica*.

Variables	CP 1	CP 2	CP 3
pH	-0,55	-0,59	0,10
OD	0,03	0,27	-0,26
Temperatura	0,00	-0,52	-0,58
Salinidad	-0,26	0,73	0,06
Clorofila- <i>a</i>	-0,04	0,23	-0,57
Amonio	0,85	-0,31	-0,14
Nitrito	0,83	-0,31	-0,03
Nitrato	-0,01	-0,42	0,16
Fosfato	0,87	-0,22	-0,12
Silicato	0,55	-0,47	0,01
MOP	0,46	0,22	-0,63
CAT gl	0,50	0,53	0,00
GST gl	0,76	-0,14	0,12
LPO gl	0,03	-0,75	0,33
LPO gon	0,16	-0,48	0,10
Cd-tejido	-0,40	-0,07	-0,67
Pb-tejido	-0,42	-0,38	0,21
Cu-tejido	-0,43	-0,56	-0,18
Zn-tejido	-0,05	-0,26	-0,73
Fe-tejido	-0,61	-0,37	-0,28
% Var. Acumulada	23,98	42,63	54,95

Los coeficientes de correlación son significantes cuando son > 0,50 (en negrita).

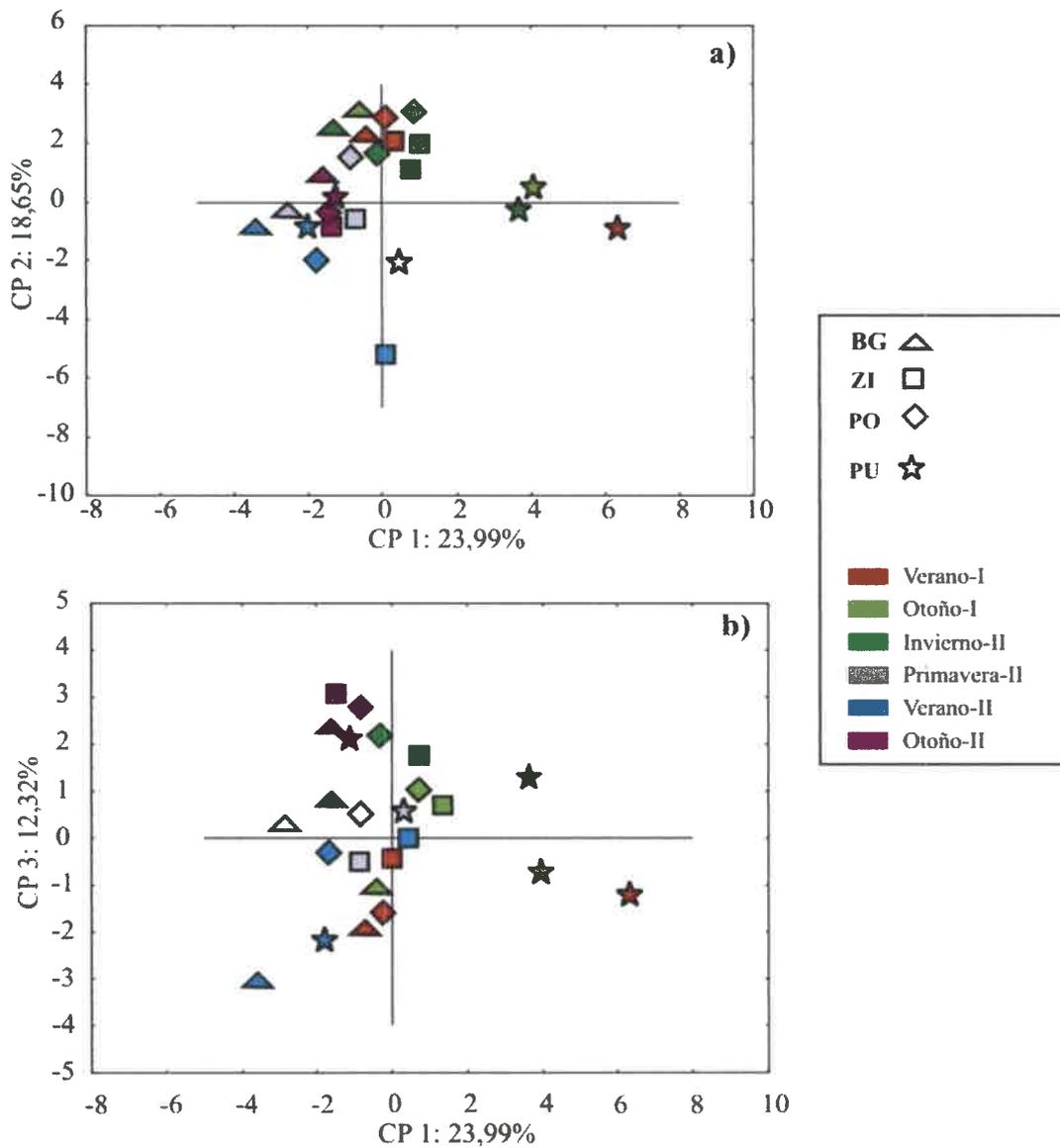


Figura IV.II.23: Proyección de los casos en un plano indicando la posición de los sitios de estudio de acuerdo a la asociación entre las variables analizadas con a) CP 1 y 2 y b) CP 1 y 3 para *N. magellanica*.

N. deaurata

El ACP realizado a partir de la integración de variables ambientales y biológicas en lapas de la especie *N. deaurata* reveló que un 68,60 % de la varianza total está explicada por los primeros tres componentes principales (CP) (Tabla IV.II.5). El CP 1 (28,07%) está integrado por la asociación en el eje negativo de pH, temperatura, silicato

y SOD y LPO en glándula digestiva en oposición a la asociación de la salinidad en el eje positivo. El CP 2 (21,65%) está compuesto por la asociación en el eje negativo de amonio, nitrito y nitrato en oposición a la asociación sobre en el eje positivo de OD, clorofila-*a* y MOP. Finalmente el CP 3 (18,88%) indicó la asociación en el eje positivo de fosfatos con CAT y GST en glándula digestiva y LPO en gónada. Esto permitió diferenciar entre los tres sitios con presencia de *N. deaurata* una mayor dispersión de los datos correspondientes a ZI en comparación al comportamiento observado en el resto de los sitios. (Figura IV.II.24).

Tabla IV.II.5: Factores extraídos del ACP basados en la correlación entre las variables analizadas para *N. deaurata*.

Variables	CP 1	CP 2	CP 3
pH	-0,68	0,58	0,07
OD	-0,03	0,64	0,61
Temperatura	-0,88	0,16	-0,40
Salinidad	0,76	0,47	-0,04
Clorofila- <i>a</i>	-0,51	0,71	-0,03
Amonio	-0,63	-0,68	0,26
Nitrito	-0,31	-0,56	0,53
Nitrato	-0,46	-0,54	-0,10
Fosfato	0,06	0,23	0,68
Silicato	-0,62	-0,26	0,54
MOP	-0,51	0,72	-0,17
CAT gl	0,36	0,38	0,67
GST gl	0,22	-0,21	0,75
SOD gl	-0,58	0,04	0,04
LPO gl	-0,62	0,15	-0,12
LPO gon	-0,41	0,20	0,55
% Var. Acumulada	28,07	49,72	68,6

Los coeficientes de correlación son significantes cuando son > 0,50 (en negrita).

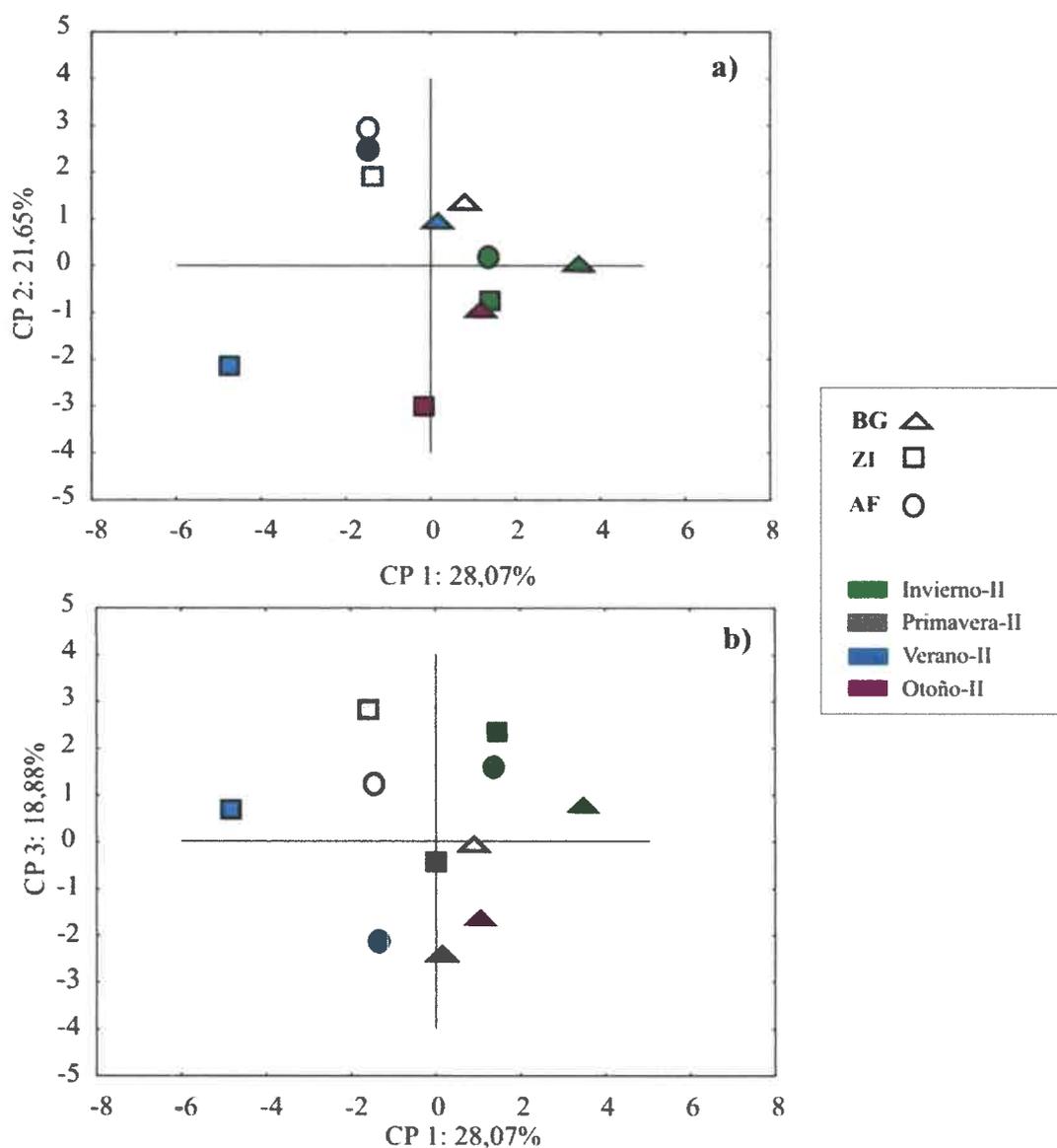


Figura IV.II.24: Proyección de los casos en un plano indicando la posición de los sitios de estudio de acuerdo a la asociación entre las variables analizadas con a) CP 1 y 2 y b) CP 1 y 3 para *N. deaurata*.

V. DISCUSIÓN

Ambiente

Las diferencias registradas en los parámetros físico-químicos medidos *in situ* en el agua, están relacionadas principalmente a cambios estacionales, reflejadas en la mayoría de los casos para todos los sitios de muestreo. Los valores de salinidad, que en todos los casos se observaron por debajo del valor característico de ambientes marinos costeros (32,01) y en especial en las estaciones PU y ZI, estarían relacionados a la cercanía de estos sitios de muestreo al ingreso de efluentes pluviales, industriales y domésticos y de descargas naturales para el caso de ZI. Estos registros coinciden con lo reportado por Amin *et al.* (2010a) que atribuyen la disminución de la salinidad también, a los grandes volúmenes de agua dulce provenientes de los procesos de deshielo que ocurren en otoño y primavera.

En general, a lo largo de los dos años de estudio, los valores de oxígeno disuelto indicaron un buen nivel de oxigenación en el sistema con porcentajes de saturación superiores al 78 %. Los valores más altos registrados en la primavera-I, pueden asociarse en parte a que esa es la época de mayores vientos en la zona (Estación meteorológica CADIC), y la frecuencia e intensidad del viento dentro del área estudiada produce una importante mezcla en la columna de agua incorporando altos niveles de oxígeno (Amin *et al.*, 2010a) como ocurre en otros ambientes del mundo (Dickson & Orchardo 2001). Por otro lado, en el caso particular de AF, los valores más altos de oxígeno disuelto coincidieron con el mayor pico de clorofila-*a*, lo que estaría indicando además, un aporte de oxígeno al agua como resultado de procesos fotosintéticos. Una asociación similar fue registrada por Beltrame *et al.* (2008) en el estuario de Mar Chiquita. Particularmente la estación AF se encuentra cercana a dos fuentes de ingreso de agua dulce con elevados aportes de MO proveniente de Bahía Encerrada (Torres *et al.*, 2009) y de descargas pluvio-cloacales ya identificadas (Amin *et al.*, 2009 y 2010a, Gil *et al.*, 2011). Esto produce proliferación de algas verdes en toda la zona costera que favorecen el fenómeno descrito precedentemente.

El pH se mostró homogéneo a lo largo de los dos años, en un rango cuya amplitud fue menor a una unidad (7,60 a 8,35) y se encontró dentro de los valores esperables para ambientes marinos costeros.

Respecto a los nutrientes en general, PU se caracterizó como el sitio con mayor concentración, excepto por el silicato que fue mayor en ZI. Según lo establecido por Hager & Schemel (1996) y Owens (1986), el agua de ambientes dulceacuícolas y marino-costeros puede estar enriquecida con nutrientes como el fosfato y componentes nitrogenados provenientes de descargas urbanas, desechos industriales y escurrimientos y reciben además, aportes de silicato desde ríos y arroyos vía intemperismo de rocas y percolación de suelo.

En el presente trabajo los valores determinados para nitrato y fosfato, se registraron en un orden promedio de $7\mu\text{M}$ y $1,7\mu\text{M}$ respectivamente. Excepto por los valores correspondientes a PU que alcanzaron los $72\mu\text{M}$ para nitratos y los $14,40\mu\text{M}$ para fosfatos, la concentración en el resto de los sitios se ubicó dentro del rango encontrado en otras áreas costeras patagónicas. Respecto a las concentraciones de nitrito y silicato, los valores registrados se observaron también dentro de los rangos indicados por otros autores en diversos ambientes (Braga et al., 2008; Popovich & Marcovecchio 2008). Por su parte, las concentraciones de amonio resultaron mayores en PU y en ZI, donde se registraron valores de hasta $140\mu\text{M}$, característicos de zonas cercanas a efluentes cloacales. Resultados similares fueron observados en estudios realizados por Gil *et al.* (2001) en ambientes costeros sometidos a presión antrópica en costas patagónicas. Los valores promedio de nutrientes registrados previamente en esta zona por Amin *et al.* (2010a) para nitrito ($0,30\mu\text{M}$), fosfato ($1,02\mu\text{M}$) y silicato ($7,76\mu\text{M}$), fueron similares a los obtenidos en general en el presente trabajo, mientras que los correspondientes a nitrato ($43,37\mu\text{M}$) se asemejaron solo a los altos valores registrados en PU. Al respecto, estos autores indicaron que estas altas concentraciones, mucho mayor a las reconocidas para ambientes marinos, estarían relacionadas principalmente con la cantidad de agua dulce que es incorporada al sistema costero luego de atravesar densos bosques y grandes extensiones de turberas, ambientes típicos del Archipiélago de Tierra de Fuego (Roig, 2004). Debido a los restos de vegetación que presentan los suelos de dichos ambientes, sumado a su alto contenido de humedad que aumenta la degradación de materia orgánica, se produce una importante liberación de nutrientes inorgánicos que llega a la costa transportadas en el agua.

Las diferencias entre sitios registradas a través del análisis de los metales en sedimento, estarían relacionadas principalmente al grado de impacto antrópico,

especialmente las concentraciones observadas en ZI, PO y PU. En el caso de ZI, su proximidad a descargas con potenciales compuestos provenientes de desechos industriales y el escurrimiento de metales provenientes de desechos sólidos presentes en el área, podría ser la causa de los registros hallados. Similares resultados han sido hallados en otras regiones en los sitios cercanos a zonas industriales (Guzmán Amaya *et al.*, 2005). En el caso de PO, vinculado al muelle y depósitos de combustible, las concentraciones de Pb encontradas en los sedimentos de este sitio podrían estar en parte relacionadas con depósitos residentes de otras épocas, ya que en la actualidad la mayoría de los combustibles no contienen este metal. Prueba de esto son los altos valores reportados previamente en este sitio por Amin *et al.* (1996a). Así mismo, otro factor importante relacionado tanto a las concentraciones de Pb detectadas allí, como a los valores de Cd, Cu, Zn y Fe podrían ser resultado de la intensa actividad portuaria (tráfico, la corrosión propia de los barcos y las actividades de mantenimiento y reparación) tal como se ha observado en trabajos realizados en otras regiones con similar actividad (González-Lozano *et al.*, 2006; Hamed & Emara, 2006). Finalmente, PU recibe metales principalmente de efluentes domésticos y pluviales que son descargados en este sitio a través del dispensor cloacal (Amin & Estéves, 2004). Estos efluentes que llegan a PU consisten en aguas no tratadas o tratadas solo mecánicamente que son descargadas sobre la línea de costa. De manera general, se considera que las aguas de desecho domestico constituyen una importante fuente de metales en sistemas acuáticos (Forstner & Wittmann 1983, Amat Infante *et al.*, 2006).

Los niveles de metales pesados registrados en este estudio fueron comparados con los observados en trabajos anteriores en esta misma zona. Amin *et al.*, (1996b y 1997) encontraron las mayores concentraciones de Zn, Fe, Cr, Pb, Mn y Fe en PO y ZI. Por otro lado, trabajos recientes (Giarratano *et al.*, 2010) indicaron altas concentraciones de Pb en sedimentos costeros bentónicos sub-superficiales de ZI y PO, mientras que en PU se encontraron las mayores concentraciones de Cd. Por otro lado, respecto a lo informado por Amin *et al.* (1996b y 1997), el presente estudio mostró que ZI y PO registraron concentraciones entre 2 y 4 veces menores para el Pb y entre 3 y 9 veces menores para el Cu. Esto podría asociarse a la reducción de la actividad industrial observada desde entonces al presente, con la consecuente disminución del aporte de

metales. Además, como se mencionó anteriormente, el hecho de la reducción del Pb en los combustibles actuales. Contrario a esto, la tendencia en PU ha sido de aumento para las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Fe, lo cual es coincidente con el aumento poblacional, la cantidad de viviendas conectadas a la red y el consecuente incremento en los volúmenes eliminados al mar, siempre sin tratamiento.

Por otro lado, se encontró que las concentraciones de Cd, Pb, Cu y Zn, especialmente en los sitios de mayor impacto, resultaron muy cercanos o, en la mayoría de los casos, por encima de la concentración que señalan Long *et al.* (1995) como un “valor que en sedimentos produce efectos biológicos” (V.S.E.B.). Así mismo, dichos metales medidos en este trabajos sobrepasaron también los señalados por Bryan & Langston (1992) como “sedimentos no contaminados” y se encuentran (con excepciones en BG) entre los rangos indicados para costas de España, Chile y México correspondientes a zonas impactadas (Tabla V.1).

Tabla V.1: Comparación de la concentración de metales pesados en sedimentos del presente trabajo con otros estudios.

Autor	Referencia		Metales							
			Cd	Pb	Cu	Zn	Fe	Cr	Ni	Co
<i>Presente estudio</i>	BG	media	0,68	8,48	12,32	67,39	22400	s/d	s/d	s/d
		DS	0,63	2,96	4,19	16,36	2,72			
<i>Presente estudio</i>	ZI	media	1,27	49,52	43,76	160,79	25800	s/d	s/d	s/d
		DS	0,74	25,23	30,30	42,22	4,79			
<i>Presente estudio</i>	PO	media	1,04	49,78	32,30	125,67	23800	s/d	s/d	s/d
		DS	0,38	15,77	15,56	32,08	4,23			
<i>Presente estudio</i>	AF	media	0,68	43,05	22,30	61,97	17100	s/d	s/d	s/d
		DS	0,45	56,83	26,42	14,10	4,06			
<i>Presente estudio</i>	PU	media	1,79	32,05	61,34	146,02	30600	s/d	s/d	s/d
		DS	0,90	6,67	34,05	42,76	10,08			
<i>Long et al., 1995</i>	<i>V.S.E.B</i>		1,20	46,70	34	150	s/d	81	20,90	x
<i>Bryan y Langston 1992</i>	Sedimentos	min	0,01	5	5	20	s/d	30	10	6
	No contaminados	max	0,03	25	25	100			20	10
<i>Guzmán Amaya et al., 2005</i>	Alvarado (Golfo de México)	media	< LD	27,49	17,49	55,81	s/d	13,75	71,80	s/d
		DS		13,65	4,09	20,70		9,04	7,19	
<i>Guzmán Amaya et al., 2005</i>	Mandinga (Golfo de México)	media	0,89	29,56	15,77	56,14	s/d	14,75	72,26	s/d
		DS	0,46	5,40	6,88	149,54		9,76	4,09	
<i>Guzmán Amaya et al., 2005</i>	Tamiahua (Golfo de México)	media	6,21	17,35	10,52	39,98	s/d	26,40	59,18	s/d
		DS	1,86	15,85	11,48	24,66		49,04	20,37	
<i>Usero et al., 2005</i>	Área contaminada (Costa atlántica, Sur de España)	min	0,35	16	42	289	s/d	s/d	s/d	s/d
		max	0,72	31	92	338				
<i>Ahumada 2006</i>	Canales y fiordos australes (Chile)	min	0,27	20,80	18,00	93,60	s/d	50,10	22,40	12,00
		max	0,36	22,60	24,50	112,40		60,40	29,70	14,00

Valores expresados en $\mu\text{g/g}$ de sedimento seco (fracción menor a $62 \mu\text{m}$). s/d: sin datos.

Como fue señalado en estudios previos, el Fe resultó el metal más abundante en los sedimentos del ambiente estudiado y ha sido propuesto como elemento de referencia para estudios que detectan aportes antrópicos (Amin *et al.*, 1996b; 1997).

En el presente estudio se encontraron las más bajas concentraciones de metales en los sedimentos del sitio BG, por lo que dichos valores podrían proponerse como línea de base para concentraciones de metales, coincidiendo con las características de sitio de bajo impacto, al momento de los muestreos. En respaldo a esta caracterización, los resultados de BG fueron comparados con datos de sitios de bajo impacto obtenidos en estudios similares realizados en esta región (Amin *et al.*, 1996b, 1997, 2007, Giarratano *et al.*, 2010, Schvezov & Amin, 2009) y se encontraron en rangos similares o aún menores para la mayoría de los metales analizados.

Los sedimentos correspondientes a AF también registraron bajas concentraciones de metales en sedimento. A pesar de que este sitio se encuentra muy cercano a la ciudad, las concentraciones se registraron en un rango similar a las de BG. Esto podría atribuirse a que el punto de muestreo se encuentra relativamente alejado de la entrada de efluentes, comparado con los demás sitios, por lo que es posible que los mecanismos de transporte de metales y su llegada a este sitio se encuentren restringidos o minimizados, con lo cual la depositación en los sedimentos se daría más cerca de los sitios de emisión.

ACP en factores ambientales

El ACP realizado permitió la integración y la síntesis de los resultados ambientales obtenidos. El CP 1 diferenció los sitios en cuanto a las concentraciones de nutrientes y metales en general, excepto el Pb. En este aspecto, se observó que PU registró los valores más altos durante los muestreos de 2007, reflejando variaciones en la descarga del difusor cloacal ya que la diferencia con los muestreos de 2006 y 2008 es notable. Al respecto se consultó en el Área de Servicios Públicos de la Municipalidad, sobre el funcionamiento del difusor. Allí se indicó que en ocasiones (especialmente en 2006) en las que el difusor cloacal se encuentra fuera de funcionamiento o en reparación, las descargas son desviadas hacia un colector alternativo ubicado en el sector Este de la

Bahía Golondrina, lo que podría explicar la amplitud en las variaciones observadas en PU.

El aumento en el aporte de nutrientes y metales en PU está acompañado por valores de salinidad más bajos que en la mayoría de los sitios y fechas. En este mismo eje se ubicó además ZI, correspondiente al verano-II. Aquí se observó el registro de salinidad más bajo respecto a la totalidad de los muestreos. Esto estaría respondiendo, como fuera indicado por Amin *et al.* (2010a), a los deshielos producto de las altas temperaturas (el mayor pico) observadas en esta fecha, ya que durante los 10 días previos al muestreo del verano-II, se registraron temperaturas de entre 18 y 28 °C, (Servicio de Información Ambiental y Geográfica-SIAG del CADIC) lo que sería la causa principal del aumento del volumen de agua dulce que ingresó a la costa a través de los principales afluentes, provocando la disminución en la salinidad registrada. En la misma fecha se registró también en ZI un aumento notable en la concentración de nutrientes en especial de silicato, además de un enriquecimiento de metales pesados en general. Esto podría asociarse a un aumento en el caudal de los afluentes que llegan a ZI y principalmente del arroyo Grande, muy próximo a ZI, como consecuencia de los procesos de deshielos mencionados. Al respecto, otros autores (Braga *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 1978), indican que la concentración de silicatos en ríos y/o arroyos tributarios puede ser el factor dominante que afecte la concentración de este elemento en los estuarios.

Por otro lado, el CP 2 permitió la clasificación de los sitios de acuerdo a la concentración de clorofila-*a* en agua y de Pb en sedimento. De acuerdo a esto, ZI, PO y AF son los sitios con mayor dispersión a lo largo de este eje indicando variación estacional respecto a estos dos parámetros. En los muestreos de primavera y verano se observan las mayores concentraciones de clorofila-*a* y OD, en especial en AF durante la primavera-I y el verano-II. Por su parte, las mayores concentraciones de Pb se observaron durante el verano-II en AF, seguida de ZI y PO. Para el caso de ZI y PO, las concentraciones de Pb fueron las más altas durante los dos años de muestreos, a excepción de esta única fecha en donde los valores de Pb fueron excepcionalmente altos en AF, más aún teniendo en cuenta que en el resto de los muestreos las concentraciones de Pb en estos sitios estuvieron junto con BG, entre las más bajas. Una posible explicación a esto podría estar vinculada al aumento de la actividad náutica y portuaria

observada tanto en PO como en AF durante el verano. De acuerdo a Esteves & Amin 2004 los metales de origen antrópico como el Pb podrían ser producto no solo de la actividad industrial sino también de la creciente actividad portuaria, tanto turística como pesquera, que se desarrolla en la ciudad.

Finalmente el CP 3 brindó información acerca de los sitios enriquecidos en MOP y NO₃. En este sentido PU y AF se caracterizaron por mostrar variación estacional y las mayores concentraciones de estos parámetros. Para el caso de PU, sería directamente atribuible a las descargas cloacales mientras que para AF la concentración de MOP podría vincularse a los desechos producidos en los barcos que llegan al muelle ubicado en este sitio. Además, dependiendo de la intensidad de las mareas y corrientes podrían estar llegando hasta este sitio parte de los desechos de origen urbano-cloacal que desembocan en los efluente correspondientes al Club Náutico y a la Bahía Encerrada, que se encuentran en cercanías del sector (Esteves & Amin 2004; Torres *et al.*, 2009)

Respecto a BG, el ACP mostró que fue el sitio más homogéneo, con valores muy similares a lo largo de los dos años de muestreo y respecto de los 3 componentes principales. Fue el sitio con menor concentración de nutrientes, metales, clorofila-*a* y MOP lo cual sugiere ausencia de impacto antrópico u otro tipo de interacción con aportes terrestres. Este hecho es de gran importancia ya que avala la condición de sitio de referencia, mostrando una alta estabilidad en las condiciones ambientales.

Biomarcadores

En lo que respecta a las variaciones estacionales observadas, de los biomarcadores seleccionados, CAT fue la que mostró un comportamiento más homogéneo en todas las especies y órganos analizados. Si bien hubo diferencias significativas entre los sitios en la mayoría de las fechas analizadas, el comportamiento estacional de esta enzima fue muy similar en todos ellos mostrándose más evidente en comparación con los demás biomarcadores. Resultados similares fueron reportados por Leiniö & Lehtonen (2005) en estudios realizados en los bivalvos *M. edulis* y *M. balthica* y por Malanga *et al.* (2007) sobre la especie de lapas *N. magellanica*. Estos autores determinaron un marcado patrón estacional en el comportamiento de la CAT atribuyéndolo a la fuerte influencia de la temperatura sobre la actividad de esta enzima.

Por otro lado, las diferencias encontradas entre los biomarcadores presentes en branquia y glándula digestiva de mejillón, coinciden con las indicadas por otros autores. Manduzio *et al.* (2004) encontraron mayor actividad de SOD en branquias que en glándula digestiva de *M. edulis* mientras que Almeida *et al.* (2005) registraron mayor actividad de GST en branquias y mayor actividad de CAT en glándulas del mejillón *P. perna*.

Comparando los datos registrados entre el verano-I y el otoño-II, en ambas especies de lapas se registraron variaciones estacionales de los biomarcadores en un rango similar. Al respecto, Malanga *et al.* (2004) encontraron que la LPO resultó un 2% mayor en *N. deaurata* que en *N. magellanica* mientras que CAT y SOD un 35 y un 128 % respectivamente mayor en *N. magellanica* que en *N. deaurata*. Estos autores atribuyen estos resultados a que *N. magellanica* vive bajo extremas condiciones de estrés ambiental causadas, en relación a la posición que ocupa en la zona intermareal, por el prolongado tiempo de exposición al aire, desecación y cambios en la temperatura debido al tiempo que pasa descubierta al bajar la marea. Estas condiciones habrían determinado mecanismos adaptativos en su sistema antioxidante que le permite sobrevivir. En el presente trabajo, si bien pueden apreciarse variaciones en los rangos observados para cada biomarcador, estas no reflejaron las magnitudes, aunque sí las tendencias, indicadas por los mencionados autores.

En mejillones, los principales aumentos en la actividad de CAT, GST y SOD y en los niveles de LPO se observaron en primavera y las disminuciones se registraron entre verano y otoño para las enzimas y en invierno y otoño para LPO. Esto coincide en parte, con lo registrado por Romeo *et al.* (2003) y Cancio *et al.* (1999) quienes informaron para *M. galloprovincialis* aumentos en la actividad de GST y CAT en primavera y otoño y con lo reportado por Wilhem Filho *et al.* (2001) para *Perna perna*. Estos autores atribuyen el aumento de las defensas antioxidantes a la intensa actividad reproductiva que ocurre en esos períodos y a los incrementos en la tasa metabólica, relacionado a su vez con los incrementos de temperatura. Según Cancio *et al.* (1999) el aumento en la tasa de incorporación de alimentos es también un factor clave. A esto, Sheehan & Power (1999) agregan que en estudios relacionados con la defensa antioxidante en mejillones, es necesario considerar la estrecha relación funcional entre

la glándula digestiva y el desarrollo gonadal. Este metabolismo particular de los estadios reproductivos resalta la importancia de conocer la estacionalidad del estado antioxidante en relación a la interpretación de los datos de biomonitorio (Viarengo *et al.*, 1991, Solé *et al.*, 1995, Cancio *et al.*, 1999; Sheehan & Power 1999).

Para Wilhem Filho *et al.* (2000, 2001), los patrones estacionales encontrados en la defensa antioxidante estarían muy relacionados con la variación de la temperatura y el ciclo reproductivo y sugieren que en organismos expuestos a cambios estacionales de temperatura, el consumo de oxígeno determina la generación de EROs y el estado antioxidante. El aumento de la temperatura y alta disponibilidad de alimento están seguidas de un incremento en el consumo de oxígeno y consecuentemente en un incremento de la generación celular de EROs lo cual puede ser compensado por el incremento de las defensas antioxidantes. Por lo tanto, la disminución de la actividad de la defensa antioxidante que ocurre en invierno/otoño en los mejillones analizados en el presente trabajo, podría ser directamente responsable de un incremento en la susceptibilidad de los mejillones al estrés oxidativo, pudiendo registrarse en consecuencia mayores niveles de LPO.

En algunos sitios, tanto para branquia de mejillones como para glándula digestiva de lapas, se observaron aumentos de la actividad de GST coincidentes con disminuciones en la actividad de CAT y SOD. Varios autores (Power & Sheehan, 1996; Sheehan & Power, 1999; Manduzio *et al.*, 2004) proponen que los incrementos observados en la actividad de GST en branquias de *M. edulis* podrían ocurrir en respuesta al estrés oxidativo generado cuando la actividad de otras enzimas antioxidantes disminuye.

Como se mencionó previamente, los niveles de LPO, al igual que la actividad enzimática, varían estacionalmente debido a aumentos en la temperatura y a cambios en el ciclo reproductivo. La especie *M. edulis chilensis* en el canal Beagle, muestra un máximo desove en la primavera (Tortorelli, 1987), el cual coincide con los picos máximos de LPO y actividad enzimática obtenidos en este trabajo. Algunos autores (Santini y Chelazzi, 1995; Simpson; 1982) han mencionado que la acumulación de sustancias de reserva (como glicógeno y lípidos) en la glándula digestiva está específicamente relacionada a los eventos reproductivos siendo transferidas estas sustancias hacia las gónadas. De esta manera los eventos de alta actividad de las

enzimas en el período reproductivo están directamente relacionados a la actividad de movilización de reservas en esta época. Resultados similares a los aquí obtenidos fueron observados por Wilhem Filho *et al.* (2001) en mediciones realizadas sobre el mejillón *P. perna*, el cual mostró los máximos niveles de LPO durante el período de desove. Estos autores además, reportaron los mayores niveles de LPO coincidentes con los períodos de mayor acumulación de lípidos. En el presente estudio se registró la mayor acumulación de lípidos en glándula digestiva de mejillón en primavera, lo cual coincide con los máximos niveles de LPO observados. Mientras que en manto la mayor acumulación de lípidos se observó en invierno, coincidiendo solo parcialmente con los niveles de LPO observados en mejillones de ZI y PO. En relación a los niveles de LPO y su vinculación al contenido de lípidos observados en lapas, no se encontraron diferencias marcadas como en los mejillones. Solo se encontró variación estacional en el contenido de lípidos en glándula digestiva de *N.deaurata*, indicando aumentos en verano y otoño y disminuciones en invierno. Estos resultados coinciden parcialmente con los niveles de LPO observados en los dos veranos y en el otoño-II.

Respecto a la influencia del ciclo reproductivo en lapas, Morriconi (2005) informó la ocurrencia de dos desoves, uno parcial entre agosto y septiembre y uno de mayor intensidad a finales de la primavera. En este sentido y a diferencia de lo registrado en mejillones, en el presente estudio no se observó una tendencia clara en el comportamiento estacional de los biomarcadores en relación al ciclo reproductivo de las lapas. Por un lado se observó en ambas especies y en todos los sitios el mayor aumento de CAT durante el otoño-I, que no fue acompañado por los demás biomarcadores. Mientras que por otro lado, se observaron incrementos aislados solo en algunos sitios como PU o IZ. Esto podría estar indicando respuestas del sistema antioxidativo vinculadas específicamente a las condiciones de cada sitio particular. De acuerdo a lo informado por Livingstone (2001), la generación de EROs puede producirse tanto por subproductos del metabolismo celular como por exposición de los organismos a contaminantes. Además, la variación en la temperatura del agua, fluctuaciones en el oxígeno y la salinidad relacionadas a oscilaciones en la marea y desecación durante la exposición al aire en mareas bajas, pueden ser factores influyentes (Almeida *et al.*, 2007). Por su parte, Viarengo *et al.*, (1991) sugieren que la variación de las enzimas

antioxidantes no actúa en la misma medida por la concentración de metales que por otros factores biológicos como desove y gametogénesis.

Bioacumulación

El empleo de organismos centinelas como indicadores biológicos de la contaminación por metales pesados en el medio ambiente marino, tiene una gran importancia en programas de monitoreo. La concentración de metal acumulado en determinados organismos tiene el potencial de proveer información de aplicación relevante en términos de la variación geográfica y temporal en la biodisponibilidad de metales tóxicos en sistemas acuáticos (Rainbow, 2002).

En el presente estudio, se analizó la concentración de metales pesados en tejidos blandos completos del mejillón *M. edulis chilensis* y la lapa *N. magellanica* presentes en las costas cercanas al ciudad de Ushuaia. A excepción del Zn, el resto de los metales mostraron mayor bioacumulación en los tejidos de *N. magellanica* comparado con *M. edulis chilensis*. Si bien se observaron tendencias de alta o baja acumulación en cada uno de los sitios para todos los metales, solo se obtuvieron diferencias significativas para el Fe y el Cd.

La acumulación de Fe observada tanto en lapas como en mejillones de BG, indican una mayor biodisponibilidad allí respecto de los demás sitios, más aún considerando los valores indicados en sedimentos. Esto podría responder a una diferencia en las condiciones de biodisponibilidad para el Fe en este sitio respecto de los otros.

Las lapas mostraron concentraciones de Fe en un orden de magnitud mayor que la registrada en mejillones, y de dos órdenes de magnitud por encima de la registrada para los demás metales. Este hecho fue también observado por In-Young *et al.* (2002) en lapas de la especie *Nacella concinna*, y por Hamed & Emara (2006) en *Patella caerulea* donde las concentraciones de Fe superaban en hasta dos órdenes a las concentraciones de los demás metales. En este sentido, el hecho de que el Fe sea el metal naturalmente más abundante en las costas del canal Beagle y que además sea un metal esencial, sugiere que las concentraciones encontradas podrían responder a un proceso natural más que a un enriquecimiento por intervención antrópica.

Respecto del Cd, resultó sorprendente que, además de las altas concentraciones encontradas en lapas de ZI, se encontraran concentraciones altas en lapas y mejillones de BG, ya que este es el sitio de menor impacto. Además, las concentraciones de Cd, al igual que de los demás metales en los sedimentos de BG, se encontraron dentro de los valores más bajos. De manera similar, en un estudio realizado en las costas patagónicas, Gil *et al.* (2006) detectaron Cd en tejidos de *Mytilus edulis*, *Aulacomya atra* y *Patinigera sp* aun cuando no había sido detectado en sedimentos. Por su parte Cravo & Bebianno (2005) determinaron en un sitio prístino de las costas de Portugal, concentraciones de Cd en tejidos de *Patella aspera* entre 2 y 8 veces más elevadas que aquellos que registraron en organismos de un área contaminada. Los valores obtenidos en el presente estudio para bioacumulación de metales pesados, fueron comparados con los informados por otros autores en diferentes sitios y organismos (Tabla V.2).

Se sabe que el Cd tiene mayor solubilidad que los demás metales, en especial en sistemas oxidados. Bajo condiciones aeróbicas, el Cd es un débil competidor en la adsorción sobre oxihidróxidos metálicos (Bewers *et al.*, 1987, Morford & Emerson, 1999) y por lo tanto es factible que predominen las formas disueltas, con mayor disponibilidad para la biota. En el caso del Cd en BG, observando que las características del sedimento en ese lugar corresponden a un sistema oxigenado, y en virtud de su comportamiento frente a tal condición, cabe suponer que la mayoría del Cd se encontraría en forma disuelta, lo cual se correspondería con las bajas concentraciones observadas en el sedimento en contraposición a los altos valores observados en tejidos. Algunos autores (Cravo & Bebianno, 2005; Langston 1990) indican que una posible explicación a estos altos valores encontrados en los organismos, resulte de la similitud química entre el Cd y el Zn. Si bien solo el Zn es un metal esencial, ambos metales compiten por los mismos sitios disponibles. En tal contexto, podría suponerse que este metal al estar disuelto en mayor concentración, podría estar ganando la competencia frente al Zn y usar las vías de entrada de este metal. Por el contrario, en los sitios con menor presencia de este metal disuelto, la entrada del Cd estaría reducida a expensas de la preferente entrada del Zn. También se han encontrado relaciones entre el Cd y la producción de fitoplancton. Ansari *et al.* (2004) postulan que debido a la asociación que se establece entre los fosfatos, considerado uno de los más importantes nutrientes, y el

Cd, éste es incorporado al fitoplancton, constituyendo otra vía de entrada en organismos filtradores como los moluscos.

Considerando que durante la realización de este trabajo no existían fuentes antrópicas de Cd en BG, podría suponerse que los valores registrados responden a condiciones naturales. Si bien se han descrito fuentes naturales de Cd en otros ambientes (Bryan & Langston, 1992; Ahumada & Vargas, 2005) es recomendable un estudio más exhaustivo al respecto. Por el contrario, las altas concentraciones de Cd encontradas en ZI estarían relacionadas a las descargas de efluentes, tanto urbanas como industriales que existen en este sitio. Al respecto, se conoce que los niveles de metales acumulados en organismos marinos están en función no solo de la calidad del agua sino también de factores estacionales, como temperatura, salinidad, dieta, período de desove y variaciones individuales entre otros (Hamed & Emara, 2006; Rainbow, 2002). De esta manera, los organismos podrían tener diferentes mecanismos de incorporación y retención para un mismo metal en cada uno de los sitios.

De acuerdo con lo indicado por Regoli & Principato (1995) las diferencias en las concentraciones de Cu y Zn entre diferentes poblaciones, no necesariamente reflejan diferencias en los niveles ambientales de estos metales en los sitios. El rango en que se los registre puede deberse a factores y necesidades biológicas. Para el caso de las especies estudiadas en el presente trabajo, se conoce una etapa de acumulación de reservas que ocurre en invierno y una etapa de liberación de gametas en primavera. En consecuencia, puede existir una disminución de las concentraciones de metales en los organismos asociadas a la disminución del tejido en los organismos producto del desove. Estudios realizados por Giarratano *et al.* (2010) indicaron acumulaciones de Cu y Fe en glándula digestiva y de Zn en branquia de *M. edulis chilensis* transplantados a zonas impactadas de la Bahía Ushuaia.

Por su parte, Rainbow (1990) indica que los metales (Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Mn y Ni) juegan un papel importante en la bioquímica como cofactores enzimáticos y las correlaciones significativas entre metales y variables biológicas pueden ser debidas a las necesidades bioquímicas y/o al secuestro pasivo de estos metales.

Como fue señalado por Lau *et al.* (1998) la acumulación de metales en los moluscos está relacionada con biodisponibilidad de los metales en los sedimentos más que con la concentración total de los metales en esa matriz. Teniendo en cuenta, además,

que *M edulis chilensis* es un organismo filtrador, mientras que *N. magellanica* y *N deaurata* pastorean, las diferencias encontradas deben ser analizadas en este contexto en tanto que estas vías de entrada son sustancialmente distintas en los organismos estudiados. Este hecho sumado a la habilidad de las especies en la regulación de los metales y la estacionalidad son factores que influyen en el contenido de los metales encontrados en los organismos (Astorga *et al.*, 2007).

Finalmente, en referencia a las comparaciones realizadas con otros estudios (Tabla V.2) los valores de bioacumulación en tejidos obtenidos en el presente trabajo, son comparables a los registrados en áreas de impacto medio/bajo. De acuerdo a los valores máximos permitidos de metales pesados en moluscos bivalvos, establecidos por SENASA para consumo humano (en tejido húmedo: 1,0 µg/g Cd; 1,5 µg/g Pb; 0,5 µg/g Hg µg/g. En tejido seco: 5,0 µg/g Cd; 7,5 µg/g Pb; 2,5 Hg µg/g) las concentraciones registradas en este trabajo no exceden en ningún caso el límite establecido

Tabla V.2: Comparación de la concentración de metales pesados en tejidos del presente trabajo con otros estudios realizados en moluscos.

Especie	Autor	Referencia	Metales							
			Cd	Pb	Cu	Zn	Fe	Cr	Ni	Mn
<i>N. magellanica</i>	Presente estudio	BG	2,95	5,25	11,34	60,11	5745,83	s/d	s/d	s/d
		ZI	2,59	5,07	12,11	56,35	2929,04	s/d	s/d	s/d
		PO	1,38	5,42	11,00	59,34	2680,40	s/d	s/d	s/d
		PU	1,72	3,81	11,41	58,93	2999,66	s/d	s/d	s/d
<i>P. caerulea</i>	Hamed & Emara (2006)	Golfo de Suez Area Impactada	2,13	70,91	12,17	191,42	2940	7,99	9,88	76,3
<i>N. concinna</i>	In-Young Ahn <i>et al.</i> (2002)	Antártida Area Impactada	5,04	1,42	27,6	69,9	3133	2,16	s/d	58,5
<i>Patinigera sp</i>	Gil <i>et al.</i> (2006)	Costa Patagónica Bajo impacto	3,33	6,17	13,03	73,86	s/d	s/d	s/d	s/d
<i>P. aspera</i>	Cravo & Bebianno (2005)	Costa de Portugal área pristina	3,5 - 9,1	s/d	3,5 - 9,2	36,1 - 114-2	393 - 2152	s/d	1,8 - 7,2	s/d
<i>P. aspera</i>	Cravo & Bebianno (2005)	Costa de Portugal área contaminada	1,0 - 2,6	s/d	4,2 - 15,2	73,4 - 172,0	398 - 3101	s/d	2,9 - 11,3	s/d
<i>M. edulis chilensis</i>	Presente estudio	BG	1,58	1,88	5,58	118,77	359,24	s/d	s/d	s/d
		ZI	1,04	1,43	5,41	113,65	204,91	s/d	s/d	s/d
		PO	1,20	2,37	7,72	211,60	234,60	s/d	s/d	s/d
		AF	1,11	1,75	5,78	119,63	159,96	s/d	s/d	s/d
		PU	1,44	2,26	5,94	210,11	202,68	s/d	s/d	s/d
<i>B. barbatus</i>	Hamed & emara (2006)	Golfo de Suez Area Impactada	2,855	98,66	10,56	415,385	3,205	4,86	18,185	126,57
<i>N. galloprovincialis</i>	Nesto <i>et al.</i> , (2007)	Venecia Area Impactada	2,57	2,64	7,10	215,13	161,49	1,16	s/d	7,83
<i>M. edulis</i>	Gil <i>et al.</i> , (2006)	Costa patagónica Bajo impacto	2,505	4,945	8,7	131,42	s/d	s/d	s/d	s/d
<i>M. edulis</i>	Ahumada <i>et al.</i> , (2003)	Chile-Fiordos australes	0,9	0,7	5,7	83,1	s/d	s/d	s/d	s/d
		Sin Impacto	0,3	0,8	3	34,7	s/d	s/d	s/d	s/d
Moluscos bivalvos	SENASA	consumo humano	5	7,5	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d

Valores promedios/rangos expresados en µg/g de tejido seco. s/d: sin datos.

Características biológicas

El cálculo del índice de condición (IC) fue el que brindó una información clara en lo que respecta a la comparación entre sitios. Tanto en *M. edulis chilensis* como en *N. deaurata* los valores encontrados fueron, en general, mayores en AF mientras que en *N. maguellanica* fueron mayores en ZI y PU. Al respecto, en estudios realizados por Acosta *et al.* (2006) y Arrieche *et al.* (2002) en mejillones de la especie *Perna perna* y *Perna viridis*, se determinó que el IC más alto estaba relacionado con incrementos de los tejidos reproductivos y era además coincidente con el aumento de la clorofila-*a*. En este sentido, estudios realizados por Lodeiros & Himmelman, (2000) mencionan a la disponibilidad de alimento y el incremento de la temperatura como principales influyentes en el aumento del IC. En el presente estudio, coincidentemente los valores más altos de concentración de clorofila-*a* se encontraron en AF. Además, ZI y PU fueron los sitios con mayor concentración de nutrientes en general mientras que BG fue el sitio con menor productividad y presencia de nutrientes. Si se considera la disponibilidad de alimento como una causa importante de influencia sobre el IC, estos resultados explicarían los altos valores encontrados en los organismos de AF, ZI y PU. Se ha reportado que, en condiciones naturales el alto índice de condición está asociado con la biomasa fitoplanctónica, que es la que condiciona el ciclo reproductivo (Arrieche *et al.*, 2002). Respecto a esto y de acuerdo a lo expuesto por Acosta *et al.* (2006), podría indicarse que los organismos muestran una condición fisiológica dependiente de factores endógenos como la reproducción, con una notable interacción con los factores ambientales, principalmente la temperatura y la disponibilidad de alimento.

ACP integrador

Tanto los factores ambientales como la bioacumulación de metales en tejidos son factores importantes que determinan en su conjunto o por interacción la respuesta de los organismos cuantificada a través de los biomarcadores (Cravo & Bebianno, 2005; Lionetto *et al.*, 2003; Livingstone 2003). Al respecto, el ACP realizado en el presente estudio, permitió una integración de las respuestas observadas

De acuerdo al análisis observado en mejillones, se determinó que los valores de CAT, GST y SOD en branquia, CAT y LPO en glándula digestiva y LPO en manto, estuvieron fuertemente relacionadas al aumento de OD en el agua (Asociación en CPI,

sección resultados). Así, se estableció un gradiente indicando que a mayores concentraciones de OD ocurre una mayor actividad enzimática, que de acuerdo a lo expuesto en párrafos anteriores (Wilhem Filho 2000 y 2001), se produce para contrarrestar el incremento de las EROs. Los aumentos en la LPO estarían reflejando la exposición a oxidantes, siendo más evidente para la primavera-II. Respecto del CP 2, las principales variaciones estarían vinculadas a altos valores de nutrientes, excepto nitrato, asociadas a incrementos en la actividad de GST en glándula digestiva. Esta misma asociación entre nutrientes y GST fue observada en el ACP para *N. magellanica*, al mismo tiempo que fue asociada de manera inversa con las concentraciones de Fe en tejidos. Para las dos especies, se observó que PU fue el sitio con mayor actividad de GST asociada a nutrientes. Al respecto, de acuerdo a Regoli & Principato (1995) la GST actúa como catalizadora de una amplia variedad de reacciones de conjugación del glutatión reducido (GSH) con compuesto xenobiótico que contienen centros electrofílicos. El GSH es considerado uno de los más importantes agentes involucrados en proteger a la membrana celular de la LPO generada por radicales oxígeno. Además es el cofactor de muchas enzimas, catalizando la detoxificación y excreción de varios compuestos tóxicos.

Por otro lado, el ACP realizado en *N. magellanica*, determinó además que los elevados niveles de LPO se asociaron a aumentos en las concentraciones de Cu en tejido. En condiciones fisiológicas normales, la mitocondria es el principal sitio de generación de EROs (O_2^- y H_2O_2) en los organismos debido a la reducción del O_2 a lo largo de la cadena respiratoria. Pero, por otro lado, en presencia de metales como el Fe o Cu pueden generarse EROs (OH^-) como un efecto indirecto a través de reacciones químicas (Reacción de Fenton). La exposición a ambientes con altos niveles de metales induce un incremento en la LPO (Regoli 1992). Según lo observado por Viarengo *et al.* (1990) el Cu produce una fuerte inducción de los procesos de LPO en organismos marinos pero el incremento en la actividad de GST podría, de acuerdo a lo observado por Canesi *et al.* (1999) proteger a los mejillones de la LPO. En este sentido Stohs & Bagchi (1995) han postulado que el Cu y en forma similar el Fe actúan como catalizadores en la formación de especies reactivas de oxígeno y catalizan la peroxidación de membranas lipídicas. Los resultados del ACP en *N. magellanica*

también permitieron establecer una fuerte asociación entre las más altas concentraciones de Zn y Cd en tejidos con elevadas cantidades de MOP y clorofila-*a* relacionadas además con aumentos en la temperatura. Esto podría corroborar lo mencionado anteriormente respecto de la entrada conjunta de Cd y Zn.

Si bien en el presente trabajo no se encontraron asociaciones entre los biomarcadores y el Cd en los tejidos, trabajos previos realizados en la misma área de estudio con mejillones transplantados (Giarratano, 2010) indicaron aumentos de la actividad de SOD en glándula digestiva. El Cd también puede generar EROs debido a un efecto inhibitorio en el transporte de electrones en la mitocondria (Halliwell, 1992; Stohs *et al.*, 2000). Como resultado, la cadena respiratoria se vuelve altamente reductora y los electrones son transferidos directamente al oxígeno disponible, llevando a un aumento en la formación de EROs. En general, los metales pueden tanto estimular la formación de EROs como inhibir la vía normal por la cual estas especies reactivas son removidas de las células (Regoli & Principato, 1995).

Por último, el ACP realizado para *N. deaurata*, indicó que aumentos en la actividad de SOD y niveles de LPO estuvieron asociados con aumentos en la temperatura, el pH y la concentración de silicato y con disminuciones en la salinidad. Esto podría producirse como resultado de la relación temperatura- aumento del metabolismo- incremento de producción interna de EROs-activación del sistema antioxidante, mencionado anteriormente. Por otro lado, el aumento de silicatos y la baja salinidad son indicadores de ingresos de agua dulce provenientes de ríos o arroyos, por lo tanto la asociación con los biomarcadores podría estar indicando el efecto de algún compuesto no determinado presente en tales afluentes. Al respecto, estudios realizados en el Laboratorio de Ecotoxicología y contaminación Acuática del CADIC indican la presencia, en efluentes urbanos que llegan a la zona costera, de sustancias químicas componentes de productos comerciales de higiene y cuidado personal, derivados farmacológicos y químicos presentes en solventes y pinturas (Lic. Diodato, com. pers.)

Algo similar podría estar ocurriendo en la asociación observada en ZI y AF entre CAT, GST y LPO en gónada con la concentración de fosfato. Es conocido que tanto los agroquímicos como los detergentes se encuentran entre los principales productos que lo contienen (Ramírez Corrales, 2006; Smith, 1999), por lo tanto si ZI y AF son dos de los sitios afectados por efluentes, la detección de fosfato sería un indicativo de ello y

permitiría suponer la entrada conjunta de otros contaminantes no determinados que estimulen la actividad de las enzimas y el aumento de los niveles de LPO. Otra posibilidad es aquella reportada por Sheehan & Power (1999) quienes indicaron que la disponibilidad de nutrientes es uno de los factores que determina la actividad de las enzimas de defensa antioxidante en moluscos bivalvos a lo largo del año. En consecuencia, el incremento en la disponibilidad de nutrientes observada en el presente estudio, podría generar un aumento en el metabolismo que desencadene una respuesta de activación sobre las enzimas. Al respecto se han informado oscilaciones en los niveles de EROs como consecuencia de variaciones en el metabolismo de mejillones (Wilhelm Filho *et al.*, 2001) y peces (Pavlovic' *et al.*, 2004, Wilhelm Filho *et al.*, 1993) y similares resultados fueron indicados también por Manduzio *et al.* (2004). De todas formas, como para esta especie no se midieron variables de acumulación de metales en tejidos, sería recomendable una ampliación de los estudios con esta especie para la inclusión de variables que permitan una mayor explicación del comportamiento de biomarcadores.

En resumen, los biomarcadores analizados demostraron cierta asociación organismo/ambiente. Los biomarcadores pueden responder a un estrés tóxico con diferente grado de especificidad y diferentes respuestas pueden obtenerse como resultado de una exposición (Regoli *et al.*, 1998). En general, muchos de estos mecanismos de defensa responden incrementando sus niveles como respuesta adaptativa a la exposición a un tóxico, aunque también en la literatura se mencionan efectos de inhibición (Regoli & Principato, 1995). Es importante remarcar que las especies analizadas son organismos residentes de las zonas en estudio, por lo que la baja o nula respuesta de algunos biomarcadores podría estar estrechamente relacionada a esta característica. Se sabe que existen mecanismos adaptativos observados en organismos residentes de áreas contaminadas. Como consecuencia, y especialmente en ambientes bajo procesos de contaminación crónica, los organismos podrían no exhibir la respuesta biológica esperada (Nigro *et al.*, 2006; Regoli & Principato, 1995). El estrés oxidativo es un fenómeno altamente estacional (Lesser & Kruse, 2004) y su modulación debido a contaminantes ambientales es un factor que puede complicar la interpretación en estudios de biomonitorio (Sheehan & Power, 1999).

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

VI. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

El objetivo general de este trabajo fue estudiar y monitorear la zona costera, lindante a la ciudad de Ushuaia, en la cual se observa la incidencia de contaminación proveniente de descargas de origen múltiple.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. Existen zonas que se diferencian por las características de los compuestos presentes en las matrices estudiadas. Tales compuestos están relacionados a la ubicación de los sitios ligados a las potenciales fuentes de contaminación. Estas zonas son ZI, PO y PU caracterizadas por contaminación de origen Urbano-Industrial
2. En lo que respecta específicamente a la presencia de metales pesados, se encontraron patrones y tendencias diferentes entre las concentraciones en sedimento y las concentraciones en organismos que indicarían diferentes condiciones de biodisponibilidad en cada sitio. Las concentraciones de metales en sedimentos en ZI, PO y PU se encontraron por encima del V.S.E.B. y junto con AF, superiores a sedimentos considerados propios de ambientes “*No contaminados*”. En tanto que para el caso de los organismos, los valores resultaron similares a aquellos reportados en la literatura para ambientes de nivel medio a bajo de contaminación y no sobrepasan los límites Cd y Pb establecidos por SENASA como aptos para consumo humano de moluscos bivalvos.
3. Se encontraron diferentes respuestas en los biomarcadores medidos en cada especie y/u órgano. Todos mostraron diferencias entre sitios pero, respecto a la estacionalidad, CAT fue la que mostró un patrón estacional homogéneo en todos los sitios en las tres especies estudiadas. Un comportamiento similar se observó en la LPO mientras que en GST se observaron diferentes patrones de estacionalidad en cada sitio. Por su parte, SOD si bien permitió la diferenciación entre sitios, fue el biomarcador que presentó mayores dificultades en su medición, con mucha variación dentro de un mismo sitio y fechas en las que no se registró niveles de actividad, particularmente en lapas.
4. La asociación entre biomarcadores y variables ambientales fue observada en las tres especies pudiendo establecerse algunas diferencias entre ellas: los

biomarcadores en *N. magellanica* ofrecieron mayor información con relación a los metales pesados en tejidos, mientras que en *M. edulis chilensis* las respuestas estuvieron principalmente vinculadas a la presencia de nutrientes. Por su parte las respuestas de *N. deaurata*, considerando que no se midieron metales en los tejidos de esta especie, solo mostraron vínculos con la temperatura, pH y salinidad, por lo que resulta necesario ampliar los estudios para esta especie.

5. Finalmente, en lo que respecta al aporte de este estudio en otros ámbitos, los datos generados aquí contribuyeron a la elaboración de un informe presentado en Audiencia Pública en el marco de implementación del Plan de Manejo Integrado Costero de la ciudad de Ushuaia. Dicho plan, el cual fue dictado como Ordenanza Municipal en 2010, contribuirá significativamente al mejoramiento y regulación del frente costero de la ciudad. En este mismo contexto, se brindaron conferencias, capacitaciones y publicaciones especiales en medios de divulgación (diarios locales), informando sobre la acción de los contaminantes y las condiciones ambientales observadas en este estudio, esperando contribuir a la concientización de la población en general y al mejoramiento de la calidad de nuestras costas.

La aplicación de biomarcadores como los empleados en este estudio, se ha vuelto una herramienta muy utilizada en la actualidad en evaluaciones ambientales ya que podrían ayudar a predecir el efecto de ciertos químicos de interés en programas de monitoreo y auxiliar en la toma de decisiones en la protección de los recursos vivos. Sin embargo, en la literatura también se hace notar que son muy pocos los biomarcadores específicos para un compuesto determinado por lo que en general se implementa el uso de un conjunto de biomarcadores para los estudios de monitoreo. A pesar de esto, los biomarcadores resultan una herramienta relativamente de rápido análisis y efectiva en muestreos que, necesariamente se deben complementar con otros análisis ambientales, tal como fue abordado en el presente trabajo.

Finalmente la importancia de investigaciones como las aquí realizadas, radica en que no solo se genera un conocimiento de base, escaso en esta región, y que es aplicable a investigaciones futuras más específicas y exhaustivas, sino que además se contribuye a concientizar sobre el potencial grado de deterioro de las poblaciones residentes costeras

y la perturbación que indirectamente los asentamientos urbanos tienen sobre los ecosistemas naturales. Este conocimiento se espera sea considerado especialmente al momento de diseñar e implementar nuevos proyectos urbanísticos, usos de la costa y/o acciones de remediación en caso de ser necesarias.



BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, V., Prieto, A. & Lodeiros, C. 2006.** Índice de condición de los mejillones *Perna perna* y *Perna viridis* (Bivalvia:Mytilidae) bajo un sistema suspendido de cultivo en la Ensenada de Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela. *Zootecnia Tropical* 24(2): 177-192.
- Ahumada, R. 2006.** Metales menores y trazas de los sedimentos superficiales de canales y fiordos australes. In: Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. N. Silva & S. Palma (eds.). 2006. Comité Oceanográfico Nacional - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 77-81.
- Ahumada, R. & Vargas, J. 2005.** Trace metals: inputs, sedimentation and accumulation in san Vicente Bay, Chile. *Environmental Monitoring and Assessment* (2005) 100: 11-22
- Ahumada, R., Gerli, L., Sánchez, I. & Fernández, E. 2003.** Metales trazas en aguas costeras y organismos de canales y fiordos australes. In: Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. N. Silva & S. Palma (eds.). 2006. Comité Oceanográfico Nacional - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp 45-49.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. 2005.** Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol.Ecol.* 318, 21-30.
- Almeida, E., Bainy, A., de Melo Loureiro, A., Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Babosa, L., Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Ronsei, G., Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Gracioso Martins, A., Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P. 2007.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146: 588-600.
- Amat Infante, P.D., Pierra Conde, A., Casals Blet, I., Vazquez Abella, D. 2006.** Estudio de la contaminación por metales pesados en sedimentos y ostiones de la

- bahía de Manzanillo, Cuba. *Journal of the Mexican Chemical Society*, Vol 46, 4, 357-361.
- Amin O. & Comoglio, L. 1999.** Efectos del cadmio, plomo y cinc en el desarrollo larval de la centolla (*Lithodes santolla*). Proceedings de VIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Trujillo, Perú. 884-885.
- Amin O. & Comoglio, L. 2010.** Effects of copper on the physiological responses of the commercial crab *Lithodes santolla* (Decapoda: Anomura) larvae. *Scientia Marina* 74 (2): 215-221.
- Amin, O.; L. Ferrer and J. Marcovecchio. 1996 a.** Heavy metal concentrations in littorals sediments from the Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Env. Monitoring and Assesment* 41 (3): 219-231.
- Amin, O.; Andrade, J.; Marcovecchio, J. and L. Comoglio. 1996 b.** Heavy metal concentrations in the mussel *Mytilus edulis chilensis* from the coast near Ushuaia city (Tierra del Fuego, Argentina). *Int. Conference on Pollution Processes in Coastal Environments*. Marcovecchio J. (eds). Pag. 335-339.
- Amin O., Andrade, S., Ferrer, L., Comoglio, L., Marcovecchio, J., N. San Román. 1997.** Use of Macroalgae as bioindicator of heavy metals concentration in coastal zone of Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Proc. of Int. Symp. of Cold Region Devel. (ISCORD 97)* 337:340.
- Amin O.; Rodríguez, E.; Hernando, M.; Comoglio, L.; Lopez, L. and Medesani, D. 1998.** Effects of lead and cadmium on hatching of the Southern King Crab *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Invertebrate Reproduction and Development* 33: (1) 81-85.
- Amin O., Comoglio L; Asteasuain R; Freije H. and Marcovecchio J. 1999.** Land influence on nutrients distribution in a coastal area close to Ushuaia city, Tierra del Fuego, Argentina. 4th Open Science Meeting. LOICZ. Bahía Blanca, Argentina 15-18 Nov. 1999.
- Amin O.A., Comoglio L.I., Ferrer L., Marcovecchio J.E., 2000.** Variación en la concentración de plomo, zinc y cadmio en el mejillón *Mytilus edulis* transplantado dentro de la Bahía de Ushuaia, Tierra del Fuego. *Proc Jornadas Nacionales de*

- Ciencias del Mar, 11-14 de Septiembre de 2000, puerto Madryn, Chubut, Argentina. pp. 31.
- Amin, O.; Comoglio, L. & Rodriguez, E. 2003.** Toxicity of cadmium, lead and zinc to larval stage of *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 71 (3): 527-534.
- Amin, O., Giarratano, E., Duarte, C., Comoglio, L., 2007.** Use of biomarkers in resident organisms from Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Argentina) as a tool for environmental monitoring. (Preliminary results.) Proceedings of 17th Annual Meeting SETAC Europe, May 20-24, 2007, Porto, Portugal, pp 222.
- Amin, O., Comoglio, L. & Diodato, S. 2009.** Estudio de efluentes en Bahía Ushuaia – Bahía Golondrina – Bahía Encerrada. Informe Técnico. Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Acuática. Diciembre de 2009, 16pp.
- Amin, O., Comoglio, L., Spetter, C., Duarte, C., Asteasuain, R., Freije, R., Marcovecchio, J. 2010a.** Assessment of land influence on a high latitude marine coastal system: Tierra del Fuego, southernmost Argentina. Environ Monit Asses in press.
- Amin, O., Comoglio, L. & Sericano, J. 2010b.** Polynuclear Aromatic and Chlorinated Hydrocarbons in Mussels from the Coastal Zone of Ushuaia, Tierra Del Fuego, Argentina. Environmental Toxicology and Chemistry. In press.
- Ansaldo, M., Najle, R., Luquet, C.M. 2005.** Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. Marine Environmental Research, 59: 381-390.
- Ansari, T., Marr, I. & Tariq, N. 2004.** Heavy Metals in Marine Pollution Perspective- A Mini Review. J Applied Sci 4(1), 1-20.
- Arrieche D., B. Licet, N. García, C. Lodeiros y A. Prieto. 2002.** Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae), del Morro de Guarapo, Venezuela. Interciencia, 27(11): 613-619
- Astorga, M.S., Rodríguez, E.M., Díaz Romero, C. 2007.** Comparison of mineral and trace element concentrations in two mollusks from the Strait of Magellan (Chile). J.FoodComp.Anal.20, 273–279.

- Balestrini, C., Manzella, G. & Lovrich, G. 1998.** Simulación de corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. Servicio de Hidrografía Naval. Departamento de Oceanografía. Informe Técnico N° 98. Agosto 1998, Armada Argentina.
- Beltrame, M.O., 2008.** Tesis doctoral: “Dinámica biogeoquímica de nutrientes y metales pesados en ambientes intermareales de la laguna costera Mar Chiquita: potenciales efectos ecotoxicológicos sobre especies claves del ecosistema”. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.
- Bendschneider, K. & Robinson, R.J. 1952.** A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*, 11:87 – 96.
- Beutler, E. 1982.** Catalase. In: Beutler E, editor. *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton Inc., pp 105-106.
- Bewers, J.M., Barry, P.J. & MacGregor, D.J. 1987.** Distribution and cycling of cadmium in the environment. En: Nriagu JO, Series Editor. *Advances in Environmental Science and Technology*. Vol. 19. Nriagu JO & JB Sprague (eds), *Cadmium in the aquatic environment 1*: 1-18. John Wiley & Sons Inc., Nueva York.
- Bligh E.G. & Dyer WJ. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911 –917.
- Bondel, S. 1988.** Geografía de Tierra del Fuego, guía docente para su enseñanza. Museo Territorial-Consejo Territorial de Educación; 165 pp. Ushuaia.
- Botté, S. 2005.** El rol de la vegetación en el ciclo biogeoquímico de metales pesados, en humedales del estuario de Bahía Blanca. Tesis doctoral. Universidad nacional de Sur. Bahía Blanca. Argentina, 290 pp.
- Braga, E., Chiozzini, V., Berbel, G. Maluf, J., Aguiar, V., Charo, M., Molina, D., Romero, S., Eichler, B. 2008.** Nutrient distributions over the Southwestern South Atlantic continental shelf from Mar del Plata (Argentina) to Itajaí (Brazil): Winter– summer aspects. *Continental Shelf Research* 28 (2008) 1649– 1661
- 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: 267–278.

- Bryan, G.W. & Langston, W.J. 1992.** Bioavailability, accumulations and effects of heavy metals in sediments with special reference to U.K. estuarine: a review. *Environ. Pollut.* 76: 89-131.
- Buege J.A & Aust S.D. 1972.** Microsomal Lipoperoxidation. *Methods Enzymology* 52:302-307
- Bujalesky, G. 1998.** Holocene coastal evolution of Tierra del Fuego, Argentina. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*. Balkema Publishers, 11: 247-282.
- Bujalesky, G., Aliotta, S., & Isla, F. 2004.** Facies del subfondo del canal Beagle, tierra del Fuego. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 59 (1): 29-37.
- Cancio, I., Babe, A. & Cajaraville, M.P. 1999.** Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Physiol.* 123 (C): 138-144.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G. 1999.** Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* 46: 67-76.
- Carcelles, A.R. 1950.** Catálogo de los moluscos marinos de la Patagonia. Tirada del museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" e Instituto Nacional de Investigación de Ciencias Naturales. Extra, nueva serie No 8. De los Anales del Museo Nahuel Huapi Perito Dr Francisco P. Moreno. Buenos Aires, 2 (1950) 41-100.
- Commendatore, M., Esteves, J.L., Gil, M., Santinelli, N., Sastre, V., Solís, M. 1996.** Manual para la obtención, conservación de muestras de agua sedimentos y organismos. Plan de Manejo Integrado de la Zona costero Patagónica. Pto Madryn N° 11: 1-65
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C., 1995.** Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. Temporal changes in methallothionein concentrations in soft tissues. *J.Fish.Aquat.Sci.* 52, 690-702.
- Cravo, A. & Bebianno, M.J. 2005.** Bioaccumulation of metals in the soft tissue of *Patella aspera*: Application of metal/shell weight indices. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 571-586.

- Da Ros, L., Nasci, C., Marigomez, J.A., Soto, M. 2000.** Biomarkers and trace metals in the digestive glands of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Mar. Envir. Res.* 50, 417-423.
- Da Ros, L., Meneghetti, F. & Nasci, C. 2002.** Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the lagoon of Venice (north-east Italy). *Mar. Environ. Res.* 54, 817- 822.
- Daniel, W.W., 1978.** Applied Nonparametric Statistics. Houghton Mifflin Co., Boston, 635 pp.
- Dickson, M. L., & Orchardo, J. 2001.** Oxygen production and respiration in the Antarctic Polar Front region during the austral spring and summer. *Deep Sea Research I*, 48, 4101-4126.
- Dirección Provincial de Puertos de Tierra del Fuego,** página web oficial: www.puertoushuaia.gov.ar
- Eberlein K. & Kattner, G. 1987.** Automatic method for determination of orthophosphate and total dissolved phosphorus in the marine environment. *Fresenius. Z. Anal. Chem.*, 326: 354 – 357.
- Espina, S. & Venegas, C. 2005.** Ecotoxicología y contaminación, p 79-120. In : A. B. Botello, J Rendon-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernandez (Eds). Golfo de Mexico contaminación e impacto ambiental: diagnostico y tendencia, 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche. Univ. Nal. Auton. De México, instituto Nacional de Ecología. 696 pp.
- Esteves, J. & Amin, O. 2004.** Evaluación de la contaminación urbana de las bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina. (Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sud). Informe Técnico. Consolidación e Implementación del Plan de Manejo de la zona Costera patagónica (PMZCP) ARG/02/G31 – GEF/PNUD , 64 pp.
- Fernández, M.E.; Comoglio, L.; Amin, O. 2005.** Respuestas del mejillón *Mytilus edulis chilensis* mantenido en condiciones ambientales en la zona costera próxima a Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. VII Congreso SETAC LA. Química y Toxicología ambiental en América Latina. Santiago, Chile. 16 al 20 de Octubre.

- Ferrari, L. 2006.** Generalidades sobre Ecotoxicología. En: *Genética Toxicológica*. Mudry, M.D. y Carballo, M.A. (Eds). Editorial De los Cuatro Vientos. Buenos Aires, 2006, p. 393-421.
- Förstner, U. & Salomons, W. 1980.** Trace metal analysis on polluted sediments. Part I: assessment of sources and intensities. *Environ Tech Letters* 1, 494-505.
- Förstner, U. & Wittmann, G.T. (Eds.), 1983.** *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlang, Heidelberg, pp 486.
- Freeman, B. 1989.** *Environmental Ecology. The Impact of Pollution and Other Stresses on Ecosystem Structure and Function*. Academic Press, New York.
- Geracitano L.A, Monserrat J.M, Bainy A.C.D., Bianchini A. 2000.** Avaliação do estresse oxidativo em *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereidae): condições de manutenção dos animais em laboratório. In: Espíndola ELG, Botta Paschoal CMR, Rocha O, Camino Boher MB, de Oliveira Neto AB (eds.) *Ecotoxicologia. Perspectivas para o século XXI*. RiMA, São Carlos, p 129.
- Giarratano, E., 2010.** Evaluación de la contaminación en la zona costera próxima a Ushuaia (Tierra del Fuego) mediante el uso del mejillón *Mytilus edulis chilensis* como especie indicadora. Universidad Nacional del Comahue. Tesis doctoral. 270 p.
- Giarratano, E., Duarte, C., Amin, O., 2010.** Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal Waters of Beagle Channel. *Ecotoxicol Environ Saf* 73, 270–279.
- Gil, M. 2001.** Eutroficación: Rol del nitrógeno en ecosistemas marinos costeros. Tesis Doctoral en Ingeniería Química. Bahía Blanca, Universidad Nacional del Sur, 127 pp.
- Gil, M., Torres, A., Harvey, M., Esteves, J.L. 2006.** Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41(2): 167 – 176.
- Gil, M., Torres, A., Amín, O. & Estéves, J. 2011.** Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina). *Mar Pollut Bull* 62, 201–207.
- González-Lozano, M.C., Méndez-Rodríguez, L.C., López-Veneroni D.G. & Vázquez-Botello, A. 2006.** Evaluación de la contaminación en sedimentos del

- área portuaria y zona costera de salina Cruz, Oaxaca, México. INCI, sep. 2006, vol.31, no.9, p.647-656. ISSN 0378-1844.
- Grashoff K., Erhardt, M, Kremling, K. 1983.** Methods of Seawater Analysis, 2nd Edition, Verlag-Chemie, Weinheim: 365-366.
- Guzmán Amaya, P., Villanueva, S. & Botello, A. 2005.** Metales en tres lagunas costeras del estado de Veracruz, p. 361-372. In: A.V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernandez (Eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.
- Habig, W.H. & Jakoby, W.B., 1981.** Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Methods Enzymol 398-405.
- Hager, S. & Schemel, L. 1996.** Dissolved inorganic nitrogen, phosphorus and silicon in South San Francisco Bay. Major factor affecting distributions. In: San Francisco Bay: The Ecosystem, ed. J. Hollibaugh. American Association for the Advancement of Science, San Francisco, CA, USA, pp 189-216.
- Halliwell, B., 1992.** Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 59, 1609-1623.
- Hamed, M. & Emara, H., 2006.** Marine molluscs as biomonitors for heavy metal levels in the Gulf of Suez, Red Sea. J Mar Syst 60, 220-234.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H. 1965.** Fluorometric determination of chlorophyll. J Cons Int Explor Mer 30, 3-15.
- In-Young Ahn, Ko-Woon Kim, Heeseon J. Choi. 2002.** A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. Baseline / Marine Pollution Bulletin 44: 421-431.
- Isla, F., Bujalesky, G. & Coronato, A. 1999.** Procesos estuarinos en el canal Beagle, Tierra del Fuego. Revista de la Asociación Geológica Argentina, 54 (4): 307-318.
- Iturraspe R. J. y Schroeder C. 1989.** Clima en el Beagle. CADIC. Informe inédito. 12 pp.

- Iturraspe, R. y Scrhoeder, C. 2002.** Datos Climáticos de Ushuaia. Información proporcionada por el Secedoc, base de datos climáticos del CADIC y Base Aeronaval Ushuaia.
- Klamer, J., Hegeman, W., Smedes, F. 1990.** Comparison of grain size correction procedures for organic micropollutants and heavy metals in marine sediments. *Hydrob* 208, 213-220.
- Langston, W.J. 1990.** Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. In: Furnes, R.W., Rainbow, P.S., editors. *Heavy metals in the Marine environment*. CRC. Press. New York, 256 pp.
- Lasta, M.L., Ciocco, N.F., Bremec, C.S., Roux, A. 1998.** Moluscos Bivalvos y Gasterópodos. En: Boschi, E.E. (Ed). *Los moluscos de interés pesquero. Cultivos y estrategias reproductivas de bivalvos y equinodermos*. pp 115-142. Serie: El Mar Argentino y sus recursos pesqueros II. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo (INIDEP).
- Lau, S., Mohamed, M., Tan Chi Yena, A., Su'ut, S., 1998.** Accumulation of heavy metals in freshwater mollusks. *Sci. Total Environ.* 214, 113–121.
- Leiniö, S. & Lehtonen, K. 2005.** Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 140: 408-421.
- Lesser, M.P. 2006.** Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Rev. Physiol.* 68:253–78.
- Lesser, M.P., Kruse, V.A., 2004.** Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 495– 504.
- Lionetto, M., Caricato, R., Giordano, M., Pascariello, M., Marinosci, L. & Schettino, T. 2003.** Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar Pollut Bull* 46: 324–330.
- Livingstone, D.R. 1991.** Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In Gilles R, ed, *Advances in comparative and Environmental Physiology*. Vol 7. Springer, Berlin. pp 45- 185.

- Livingstone, D.R. 2001.** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42: 656–666.
- Livingstone, D.R. 2003.** Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue Méd. Vét.*, 154 (6): 427-430.
- Livingstone, D. R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L. D., Porte, C., Fitzpatrick, P. J., Forlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P. 1995.** Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zostericessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: Biochemical studies. *Mar. Environ. Res.* 39, 235–240.
- Lodeiros C. y H. Himmelman. 2000.** Identification of factors affecting growth and survival of the tropical scallop *Euvola (Pecten) ziczac* in the Golfo de Cariaco, Venezuela. *Aquaculture*, 182: 91-114.
- Long, E.R., McDonald, D.D., Smith, S.L & Calder, F.D., 1995.** Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Management*, 19(1): 81-97.
- Malanga, G., Estevez, M.S., Calvo, J., Puntarulo, S. 2004.** Oxidative stress in limpets exposed to different environmental conditions in the Beagle Channel. *Aquatic Toxicology* 69: 299–309.
- Malanga, G., Estevez, M., Calvo, J., Abele, D. & Puntarulo, S. 2007.** The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146: 551-558.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B. 2004.** Seasonal variations in antioxidant defenses in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*, 70 (1), 83-93.
- Marcovecchio, J. & Ferrer, L. 2005.** Distribution and Geochemical Partitioning of Heavy Metals in Sediments of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *J Coastal Res.* 21 (4), 826-834.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. 1978.** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87, 206-210.

- Misra, H.P. & Fridovich I. 1972.** The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247(10):3170–3175.
- Monserrat, J.M., Bianchini, A., Rebelo, M., 1997.** Toxicity and Anticholinesterase effect of formulated Methyl Parathion to the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* Decapoda, Grapsidae) pre-exposed to sesamol. *Comp. Biochem. Physiol. C* 3, 329–334.
- Monserrat, J.M., Ventura Lima, J., Ribas Ferreira, J.L., Acosta, D., Longaray Garcia, M., Baptista Ramos, P., Barros Moraes, T., Cougo dos Santos, L. & Lund Amado, L. 2008.** Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 148, Issue 3, pp 287-292.
- Morford, J. & Emerson, S. 1999.** The geochemistry of redox-sensitive trace metals in sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63: 1735-1750.
- Morriconi, E. 1999.** Reproductive biology of the limpet *Nacella (P) deaurata* (Gmelin, 1971) in Bahía Lapataia (Beagle Channel). *Scientia Marina*, 63 (Supl.1): 417-426.
- Morriconi, E. 2005.** Ecología reproductiva de moluscos Gasterópodos del canal Beagle. Tesis Doctoral: Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina, 164 pp.
- Morriconi, E.R. & Calvo., J. 1993.** Influencia ambiental en el crecimiento alométrico de la valva de *Nacella (Patinigera) deaurata* (Gmelin, 1791) en el Canal Beagle. *Malacologia*, 35: 1-6.
- Murphy J. & Riley, J.P. 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27:31-36.
- Nasci, C., Campesan, G., Fossato, V.U., Tallandini, L., Turchetto, M. 1991.** Induction of cytochrome P-450 and mixed function oxygenase activity by low concentrations of polychlorinated biphenyls in marine fish *Zosterisessor ophiocephalus* (Pall.). *Aquat. Toxicol* 19, 281-290.
- Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Fossato V.U., 1998.** Assessment of the impact of chemical pollutants on mussel, *Mytilus galloprovincialis*, from the Venice Lagoon, Italy. *Mar. Env. Res.* 46 (1-5), 279-282.

- Nasci, C., Da Ros, L., Nesto, N., Sporni, L., Passarini, F., Pavoni, B. 2000. Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Mar. Env. Res.* 50, 425-430.
- Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M. & Da Ros, L. 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 55 (2007) 469 - 484.
- Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology* 77 (2006) 339-347.
- Owens, N.J. 1986. Estuarine nitrification: a naturally occurring fluidized bed reaction? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 22: 31-44.
- Páez Osuna, F. 2005a. Fuentes de Metales en la Zona Costera Marina, p. 329-342. In: A. V. Botello; J. Rendón-von Osten; G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.
- Páez Osuna, F. 2005b. Efectos de los metales, p. 343-360. In: A. V. Botello; J. Rendón-von Osten; G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.
- Pascuarelli, C. 1987. Geomorfología ambiental de la ciudad de Ushuaia. CADIC-Municipalidad de Ushuaia. Informe inédito. 29 pp.
- Pavlovic', S.Z., Belic', D., Blagojevic', D.P., Radoji'ic', R.M., Z' ikic', R.V., Sai'ic', Z.S., Lajxic', G.G., Spasic', M.B., 2004. Seasonal variations of cytosolic antioxidant enzyme activities in liver and white muscle of thinlip gray mullet (*Liza ramada* Risso) from the Adriatic Sea. *Cryo-Lett.* 25, 273- 285.
- Peterson, D., Festa, J. & Comonos, T. 1978. Numerical simulation of dissolved silica in the San Francisco Bay. *Estuarine, coastal and Shelf Science* 7: 99-116.

- Plan de ordenamiento urbano – Plan Estratégico - Ushuaia 2003.** Municipalidad de Ushuaia Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur, 105pp.
- Ponce, J.F. 2006.** Geomorfología aplicada en la Ciudad de Ushuaia. Monografía inédita. CADIC, 19 pp.
- Popovich, C., Marcovecchio, J. 2008.** Spatial and temporal variability of phytoplankton and environmental factors in a temperate estuary of South America (Atlantic coast, Argentina). *Continental Shelf Research* 28 (2008) 236–244.
- Power, A. & Sheehan, D. 1996.** Seasonal variations in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114 (C): 99–103.
- Rainbow, P. S. 1990.** Heavy metal levels in marine invertebrates. In: *Heavy Metals in the Marine Environment*. (R. W. Furness & P. S. Rainbow, eds), pp. 67-79. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rainbow, P.S. 2002.** Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120: 497e507.
- Ramírez Corrales, J.M. 2006.** Detergentes orgánicos sintéticos y ambiente. *Hidrogénesis*, vol.4 • nº1.
- Regoli, F. 1992.** Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar Ecol Prog Ser* 84:63–69
- Regoli F. & Principato, G. 1995.** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat Toxicol* 31:143–164.
- Regoli, F., Hummel, H., Amiard-Triquet, C., Larroux, C., Sukhotin, A. 1998.** Trace Metals and Variations of Antioxidant Enzymes in Arctic Bivalve Populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 594–601.
- Rodríguez, E. 2006.** Capítulo XVII: Biomarcadores en fauna acuática: Estudios de campo y de laboratorio en un contexto toxicológico, pp 459-479. En: *Genética Toxicológica*. Mudry, M.D. y Carballo, M.A. Ed De los cuatro vientos. Buenos Aires, 2006.

- Roig, C. (2004).** Antecedentes sobre turberas en Tierra del Fuego. In D. E. Blanco, & V. M. de la Balze (Eds.), *Los Turbales de la Patagonia: Bases para su inventario y la conservación de su biodiversidad* (pp. 33–43). Buenos Aires, Argentina: Wetlands International.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M. & Girard, J.P. 2003.** Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* 122 (2003) 369–378.
- Salibian, A. 1998.** La Ecotoxicología acuática como ciencia integradora. *Rev. Museo Argentino de Ciencias Naturales. Vol. Extra Nueva serie N°146:1-7.*
- Sanders, B. 1990.** Stress proteins: Potential as multitiered biomarkers. P. 165. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (Eds). *Biomarker of Environmental Contamination.* Lewis Publishers. Boca Raton, USA.
- Santini, G., Chelazzi, G., 1995.** Glycogen content and rates of depletion in two limpets with different foraging regimes. *Comp. Biochem. Physiol.* 11 A, 271–277.
- Schvezov, N. & Amin, O. 2009.** Respuesta de *Paramoeva sp* (Crustacea, Anfiboda) a la exposición a sedimentos de la zona costera próxima a la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Proceedings of IX Congreso de la Sociedad de Química y Toxicología Ambiental (SETAC LA) y II Congreso Peruano de Ecotoxicología y Química Ambiental (SETAC Perú), October, 5th 2009, pp 28-29.*
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). RTCR 409: 2008.** Reglamento de límites máximos microbiológicos y de residuos de medicamentos y contaminantes para los productos y subproductos de la pesca y de acuicultura destinados al consumo humano. Decreto n° 34687-MAG, Buenos Aires, Argentina.
- Servicio de Información Ambiental y Geográfica–SIAG del Centro Austral de Investigaciones Científicas –CADIC, 2010.**
- Sheehan, D. & Power, A. 1999.** Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defense mechanism of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 123 (C): 193–199.
- Simpson, R.D. 1982.** Reproduction and lipids in the subantarctic limpet *Nacella (patinigera) macquariensis* Finlay, (1927). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*56, 33–48.

- Smith, V.H., Tilman, G.D. & Nekola, J.C. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100:179-196.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1981. *Biometria. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume Ed, Madrid.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J. 1995. Seasonal variation in the mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 157-164.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18 (2), 321-336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E. & Bagchi, E. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19: 201- 213.
- Strickland J.D.H. & Parsons T.R. 1972. *A Practical Handbook of the Seawater Analysis*. Fisheries research Board of Canada, Bulletin 167 (2nd ed.), pp 310.
- Technicon Autoanalyzer II®. 1973. *Industrial Methods* N° 186-72 W/B.
- Torres, A., Gil, M., Amín, O., Esteves, J.L. 2009. Environmental Characterization of a Eutrophicated Semi-Enclosed System: Nutrient Budget (Encerrada Bay, Tierra del Fuego Island, Patagonia, Argentina). *Water Air Soil Pollut* 204: 259 - 270.
- Tortorelli, M.C., 1987. Contribución al estudio de los ciclos reproductivos del mejillón patagónico, *Mytilus chilensis* (Hupé), y de la cholga, *Aulacomya ater* (Molina), en el Canal Beagle. PhD thesis. UBA FCEyN, Buenos Aires, Argentina.
- Treguer P. & Le Corre, P. 1975a. Analyse des sels nutritifs sur autoanalizar II. Manuel D'Analyse des Sels Nutritifs Dans L'Eau de Mer, Univ. Bretagne Occidentale, France, pp 11-22.
- US NRC, 1989. *Biologic markers in reproductive toxicology*. US National Research Council. Washingto, DC, National Academy Press.
- Usero, J., Morillo, J. & Gracia, I. 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59 (2005) 1175 - 1181.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 178-189.

- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen N.P.E. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review. *Environ.Toxicol. Pharmacol*: 13: 57-149.
- Vazquez Botello; A., Rojas Galviz, J.L.; Benítez, J.A. y Zárata Lomelí, D. 1997.** Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, EPOMEX Serie Científica 5. 666 pp.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M. 1990.** Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Lam. Comp. Biochem. Physiol.* 97 (C):37-42.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D. 1991.** Seasonal variations in the antioxidant defense enzymes and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 (C1-C2): 187-190.
- Wilhelm Filho, D., De Giulivi, C., Boveris, A., 1993.** Antioxidant defences in marine fish I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106, 409- 413.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G., Boveris, A.,2000.** Comparative antioxidant defences in vertebrates—emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 7, 33- 45.
- Wilhem Filho, D., T. Tribess, T., Gáspari, C., Claudio, F.D.,Torres, M.A., Magalhaes A.R.M. 2001.** Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*) *Aquaculture* 203: 149-158.
- WHO. 1993.** Biomarkers in risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria No. 155, IPCS/WHO. Geneva.

ANEXO TÉCNICAS UTILIZADAS

Extracción de Clorofila-a
(Holm-Hansen, *et al.*, 1965)

Filtrado

Filtrar las muestras de agua (al menos 1 L) con filtros GF/C.
Preservar los filtros en freezer en tubos de centrifuga (tapados y a oscuras).

Procedimiento

1. Colocar 5 ml de metanol en cada tubo que contiene el filtro.
2. Dejar 1 hora a oscuras y en la heladera (mantener tapado con bolsas negras).
3. Medir en fluorómetro (SIEMPRE mantener tapadas y a oscuras las muestras).

Medición

1. Colocar el tubo de lectura con metanol en el fluorómetro y llevar a 0. Descartar.
2. Agitar la muestra, volcar en el tubo de medición. Registrar el valor. Agregar 3 gotas de CLH 1 N. Registrar el valor.
3. Descartar y continuar enjuagando el tubo entre una muestra y otra con agua y con metanol.

Cuantificación

Clorofila a
(*ug/L ó mg/m3*)

= ([0,03 * (valor sin CLH – con CLH)] / (vol filtrado en L * 100)) * (10 / vol metanol en ml.)

Técnica para determinación de MOP en agua
(Strickland & Parsons, 1972)

SOLUCIÓN OXIDANTE (vol. Final 1000 ml):

4,84 gr de Dicromato de Potasio en 20 ml de H₂O destilada.
Luego agregar 500 ml con H₂SO₄ concentrado (densidad 1,8), lentamente. Completar volumen final.

ESTA SOLUCIÓN ES ESTABLE INDEFINIDAMENTE.

ESTANDAR CONCENTRADO DE GLUCOSA (volumen final 100 ml):

7,5 gr de Glucosa (Dextrosa Anhidra)
Llevar a volumen final de 100 ml con H₂O destilada.

Agregar algunos cristales de HgCl₂.

CONSERVAR EN HELADERA. DESCARTAR SI SE OBSERVA TURBIDEZ.

De esta solución concentrada se prepara la **SOLUCIÓN DE TRABAJO**:

Tomar de 10 ml y diluir en 1 L de H₂O destilada (1 ml = 300 µg de Carbón).
Conviene hacer menos cantidad (1 ml sln: 99 ml de H₂O destilada) ya que se USA EN EL DÍA Y SE DESCARTA.

MATERIAL A UTILIZAR: todo debe lavarse con detergente, solución sulfocrómica (o sulfonítrica) y agua destilada.

- Probetas 50 ml con tapa.
- Tubos de 10 ml para centrifugar
- Pinzas
- Cubeta 1 cm paso óptico.
- Vaso de precipitado o recipiente similar para realizar el baño caliente a 100 °C.
- Plancha calefactora y campana de extracción.
- Matraces para preparar soluciones.

METODOLOGÍA

1. Calcinar filtros GF/C en sobrecitos de aluminio a 450-500 °C . No debe pasarse de 500°C porque se arruinan los filtros. Manipular siempre con pinzas.
2. Filtrar 1 L de muestra. Agregar 2 ml de Sulfato de Sodio (45 g de sulfato de Sodio Anhidro en 1000 ml de H₂O destilada), hacer vacío y agregar otros 2 ml (esto es para eliminar los cloruros). Conservar en freezer dentro de los sobres de aluminio.

- Colocar los filtros (blancos, muestras y estándares) en el fondo de probetas de 50 ml.
- Seguir los siguientes pasos: para saber cuanto oxidante y agua usar verificar la siguiente tabla:

Carbón (µg)	ml oxidante	ml H2O dest.	Long celda (cm)
Hasta 300	2	0,8 (llevar a 100 ml)	10
300-700	4	1,6 (llevar a 50 ml)	2,5
700-2000	10	4 (llevar a 50 ml)	1

BLANCOS	1 ml Ac Fosf	Agitar →	Baño 100- 110 °C 30 min	→	Dejar enfriar tapado	→	10 ml Sln Ox + 4 ml H2O Bid.	→	Baño 100-110 °C 60 min.
ESTANDARES	1 ml Ac. Fosf	Agitar →	Baño 100- 110 °C 30 min	→	Dejar enfriar tapado	→	10 ml Sln Ox + 4 ml Std de Glucosa	→	Baño 100-110 °C 60 min
MUESTRAS	1 ml Ac. Fosf + 1 ml de H2O Bid.	Agitar →	Baño 100- 110 °C 30 min	→	Dejar enfriar tapado	→	10 ml Sln Ox + 4 ml H2O Bid	→	Baño 100-110 °C 60 min

DEJAR ENFRIAR Y LLEVAR A VOL FINAL DE 50 ml CON H2O Bid.

- Tapar. Dejar decantar los restos de filtros. Si fuera necesario centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos en tubos debidamente acondicionados.
- Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 440 (puede leerse también Transmitancia). Medir los blancos contra H₂O destilada, si dan en el rango adecuado continuar: medir la extinción del blanco CONTRA LA MUESTRA, o sea, se pone a "0" con muestra o estándar y se lee el blanco. Si la lectura sobrepasa de 0,8 (sería un equivalente de menos del 15% de Transmitancia), la determinación debe repetirse porque la cantidad de oxidante que se usó fue poca.
- Calcular

$$mg \text{ de } C \text{ por } m^3 = (E \times F \times v) / V$$

Donde:

E es la corrección de la extinción observada (en abs) por la absorbancia del Cr (E=1.1*E_{observ}),

$F = 120(\text{mgC/ml}) / E_{\text{Std}}$ (E_{Std} es la extinción promedio de los 3 estándares y debe dar un valor aprox. a 275)

V volumen de la muestra filtrada en litros

v volumen de oxidante empleado en ml.

La concentración de la Sln de trabajo de Glucosa es: 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Los valores esperados, que indican que la extracción se hizo correctamente son:

BLANCOS: Entre 1 – 1,1 de absorbancia (sería entre 10 – 7,9 %T) generalmente si el primero de los blancos cumple con los requisitos no se lee el otro y si uno no entra en el rango se desecha.

ESTANDARES: 40 ± 2 %T. Si dan mal, pero se tienen lecturas anteriores (del mismo concentrado de glucosa) se pueden usar esos y para la próxima verificar que el patrón no se haya deteriorado.

Las conversiones de Trans/Abs pueden consultarse en la tabla o realizar esta cuenta:

$$\text{Abs} = \log (100/\% T)$$

DETERMINACIÓN DE AMONIO (Strickland & Parsons, 1972)

Reactivos:

- Agua destilada
- Solución de **Fenol** : 20 g de Fenol cristalino en 200 ml 95 % v/v de alcohol etílico
- Solución de **Nitroprusiato de Sodio** : 1 g $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua demonizada.

Mantener en botella ámbar. Solución estable por no más de un mes.

- **Reactivo alcalino** : 100 g Citrato de Sodio
5 g hidróxido de Sodio.

Ambos en 500 ml de agua destilada. Solución estable para siempre.

- Solución de **Hipoclorito**: Lavandina comercial con fecha de elaboración no superior a un mes.
- Solución **Oxidante** : 100 ml de Reactivo Alcalino
25 ml de Hipoclorito

Mantener tapada. Preparar esta solución en el momento de usarla.

Metodología

A la muestra de 25 ml adicionar 1 ml de Fenol + 1 ml de Nitroprusiato de Sodio + 2,5 ml de solución oxidante.

Tapar y mezclar bien luego de cada adición.

Finalmente, dejar reposar la solución 1 hora mínimo a T° ambiente manteniendo en oscuridad.

- √ Se lee a **640 nm** contra agua destilada.
- √ Los blancos se realizan con agua destilada más todos los reactivos adicionados como lo indica el protocolo. La lectura no debe exceder 0,075.
- √ La lectura se corrige por el blanco y se calcula de la siguiente forma:

$$\mu\text{g} - \text{at N/litro} = F \times E$$

Donde :

F es un factor constante

E es la extinción

Tampón para homogenización
(Catalasa, Superóxido dismutasa, Glutatión S-Transferasa)

	Para 100 ml $m(g) = PM(g) * V(L) * M$	Para 500 ml $m(g) = PM(g) * V(lt) * M$
Tris Base 20 Mm PM 121,1	$m(g) = 121,1g * 0,1 L * 0,02$ $m(g) = \mathbf{0,2422 g}$	$m(g) = 121,1g * 0,5 lt * 0,020$ $m(g) = \mathbf{1,211 g}$
EDTA 1 Mm PM 292,2	$m(g) = 292,2 g * 0,1 L * 0,001$ $m(g) = \mathbf{0,2922 g}$	$m(g) = 292,2 g * 0,5 lt * 0,001$ $m(g) = \mathbf{0,1461 g}$
DTT 1 Mm PM 154,3	$m(g) = 154,3 g * 0,1 L * 0,001$ $m(g) = \mathbf{0,01543 g}$	$m(g) = 154,3 g * 0,5 lt * 0,001$ $m(g) = \mathbf{0,07715 g}$
SACAROSE 0,5 M PM 342,3	$m(g) = 342,3 g * 0,1 L * 0,5$ $m(g) = \mathbf{17,115 g}$	$m(g) = 342,3 g * 0,5 lt * 0,5$ $m(g) = \mathbf{85,575 g}$
KCL 0,15 M PM 74,55	$m(g) = 74,55 g * 0,1 L * 0,15$ $m(g) = \mathbf{1,11824 g}$	$m(g) = 74,55 g * 0,5 lt * 0,15$ $m(g) = \mathbf{5,5912 g}$
Llevar a volumen con agua destilada, ajustar a pH 7,6		

	Para 10 ml $m(g) = PM(g) * V(L) * M$
PMSF en etanol 100 mM PM 174,2	$m(g) = 174,2 g * 0,010 L * 0,1$ $m(g) = \mathbf{0,1742 g}$
Se lleva a volumen con etanol	

Conservación: el **PMSF** se conserva en congelador.

El **tampón** de homogenización en freezer (si no se usa).

Procedimiento:

- Se toman 500 ml de la solución PMSF y se adicionan a 500 ml del tampón de homogenización, obteniendo una concentración final de PMSF de 0,1 mM.

Esta solución final se prepara en el momento.

- Se homogeniza la muestra en una relación 1: 3 (peso : volumen)
- Se centrifuga 30 minutos a 9000 G y se colecta el sobrenadante.

Tampón para homogenización
Preparación de las muestras para LPO

Buffer Tris Base 0,1 M pH 7,8 (buffer de homogenización)

	Para 500 ml	Para 1000 ml
Tris Base 0,1 M	$m(g) = PM(g) * V(L) * M$	$m(g) = PM(g) * V(L) * M$
PM 121,1	$m(g) = 121,1 \text{ g} * 0,5 \text{ L} * 0,1$	$m(g) = 121,1 \text{ g} * 1 \text{ L} * 0,1$
	$m(g) = 6,055 \text{ gr}$	$m(g) = 12,11 \text{ gr}$

Disolver en agua destilada, ajustar pH con CHL concentrado.
 Conservar en heladera, si no se usa guardar en freezer.

Procedimiento

- Se pesa X gr de muestra (aprox 0,5 gr) en frío.
- Se agrega Buffer Tris 0,1 M pH 7,8 en una relación 1,4 (1 parte de tejido en 3 partes de Buffer)
- Se homogenizan en frío y se pasa a eppendorf en frío.
- Se centrifuga en frío 10 minutos a 9000 rpm.
- Tomar el sobrenadante, ponerlo en eppendorf. Guardar en freezer hasta su uso.

DETERMINACIÓN DE CATALASA (Beutler, 1982)

TAMPÓN PARA CATALASA pH 8,00

	Para 100 ml	Para 500 ml.
TRIS base 1 M PM 121,1	$m(g) = PM (g) * V (litro) * M$ $m(g) = 121,1 g * 0,1 litro * 1$ $m(g) = 12,11 g$	$m(g) = PM (g) * V (litro) * M$ $m(g) = 121,1 g * 0,5 litros * 1$ $m(g) = 6,055 g$
EDTA 5 mM PM 292,2	$m(g) = PM (g) * V (litro) * M$ $m(g) = 292,2g * 0,1 litro * 0,005$ $m(g) = 0,1461 g$	$m(g) = PM (g) * V (litro) * M$ $m(g) = 292,2g * 0,5 litros * 0,005$ $m(g) = 0,7305 g$
Disolver en agua destilada. Se ajusta el pH con HCL		

MEDIO DE REACCIÓN

- 1- **Solución 1**: colocar 50 μ l de H₂O₂ 30% en 50 ml de agua destilada. Concentración de la solución 10 nM.
- 2- Retirar 5 ml y descartarlos.
- 3- Adicionar a la **Solución 1** restante: 2,5 ml del tampón de catalasa + 2 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO

- o Colocar el medio de reacción en baño de maría a 30 C°
- o En la cubeta de cuarzo colocar 10 μ l de muestra + 990 μ l del medio de reacción
- o Blanco 10 μ l del tampón de homogenización + 990 μ l de medio de reacción
- o Leer en espectro a 240 nm (las lecturas deben dar una relación lineal decreciente).

En caso de interferencia se prepara una solución de sales biliares (al 5%) y se procede como se indica a continuación:

Preparar 5 gr de sales biliares en 100 ml de tampón de homogenización.

Agregar 1:1 en un eppendorf (1 de sales y 1 de muestra) y de ahí se toma la alícuota que está ahora diluida. Para los cálculos finales se debe considerar esta nueva dilución.

Cálculo

Act específica: $(\Delta \text{ abs minuto}^{-1} * \text{dilución}) / (0,071 * \text{vol muestra (ml)} * [\text{proteínas}]) = \text{unidad de enzima}$

0,071 = coeficiente de ext. Molar de la molécula de H₂O₂

UNIDADES: Cantidad de enzima que degrada 1 μ M de H₂O₂/min /mg proteínas.

DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN S- TRANSFERASA
(Habig & Jakoby, 1981)

▪ **Reactivos**

TAMPON PARA REACCIÓN: Fosfato de Potasio (0,1 M) pH 7,0

	500 ml	100 ml
1-Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) PM 136,1 // 0,05 M	$m(g) = PM (g) * V (L) * M$ KH₂PO₄ $m(g) = 136,1 g * 0,500 L * 0,05M$ $m(g) = 3,4025 g$	$m(g) = PM (g) * V (L) * M$ KH₂PO₄ $m(g) = 136,1 g * 0,100 L * 0,05M$ $m(g) = 0,6805 g$
2-Fosfato d Potasio dibásico (K ₂ HPO ₄) PM 174,2 // 0,05 M	K₂HPO₄ $m(g) = 174,2 g * 0,500 L * 0,05M$ $m(g) = 4,355 g$	K₂HPO₄ $m(g) = 174,2 g * 0,100 L * 0,05M$ $m(g) = 0,871 g$
3-Completar con agua destilada		
4-Llevar a pH 7,0 con HCL o KOH		
5-Disolver en agua destilada		
<i>Obs: guardar en freezer</i>		

CDNB

	1 ml
1-cloro-2,4 di-nitrobenzeno (CDNB) PM 202,6 50 mM Disolver en 1 ml de Etanol 100%	$m(g) = PM (g) * V (L) * M$ $m(g) = 202,6 g * 0,001 L * 0,05M$ $m(g) = 0,03039 g/ml$
<i>Obs: preparar en un tubo plástico, tapar con parafilm M y agitar hasta disolver completamente. Dejar siempre en hielo. Lo que se prepara y sobra se tira. Debe homogeneizarse muy bien en el vortex.</i>	

GLUTATIÓN REDUCIDA (GSH)

	1000 µL
GSH: PM 307,3 – 100 Mm Disolver en Tampón fosfato 0,1 M - pH 7,0	$m(g) = PM (g) * V (L) * M$ $m(g) = 307,3 g * 0,001 L * 0,1 M$ $m(g) = 0,03072 g$
<i>Obs: preparar en un eppendorf. Dejar siempre en hielo. El sobrante se puede guardar en freezer.</i>	

▪ Procedimiento

- Colocar el tampón de reacción en tubos: **980 µl** para el blanco
960 µl para muestras

Poner a baño maría a **25°C** por 15 minutos (hacer por duplicado y considerar tubos de más para posibles repeticiones).

Preparación para la medición:

- Agregar en el tubo del tampón:

	BLANCO	MUESTRA
1° Volumen de muestra (µl)	-----	20
2° Volumen CNDB 50mM (µl)	20	20

- Agregar en las cubetas:

	BLANCO	MUESTRA
1° Volumen de muestra (µl)	10	10
2° tubo con la mezcla del tampón	total	total

- Lectura en espectrofotómetro a **340 nm**: se toma una lectura cada **30 segundos durante dos minutos**. La lectura debería ir aumentando.

Obs: si se debe realizar una dilución, ésta se hace en un eppendorff aparte colocando muestra y buffer de homoenización pH 7,6 en la cantidad necesaria. De allí se toman siempre **20 µl para mantener el volumen final**.

CÁLCULO

Actividad enzimática = $(\Delta \text{ Abs. de la muestra} * \text{ dilución}) / (\text{mg proteína/ml} * \text{ volumen} * \epsilon)$

ϵ (Coeficiente de extinción) = $9,6 \text{ nM}^{-1} * \text{ cm}^{-1}$

Unidades de GST = $\text{mM} * \text{ cm} * \text{ mg prot.}$

DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA
(Misra & Fridovich, 1972)

REACTIVOS:

Buffer glicina pH 10,2

	Para 100 ml $m(g) = PM(g) * V(L) * M$	Para 200 ml $m(g) = PM(g) * V(L) * M$
Glicina (ácido aminoacético) 50 mM PM 75,07	$m(g) = 75,07 \text{ g} * 0,1 \text{ L} * 0,05$ $m(g) = 0,37535 \text{ g}$	$m(g) = 75,07 \text{ g} * 0,2 \text{ L} * 0,05$ $m(g) = 0,7507 \text{ g}$
Llevar a volumen con agua destilada, ajustar pH con OHNa 1N		

	Para 5 ml	Para 1 ml
Adrenalina 60 mM	55 mg	11 mg
pH 2	35 μ l de HCL puro	7 μ l de HCL puro
Pesar la adrenalina en la oscuridad, preparar en el día, llevar a volumen con agua destilada		

TÉCNICA:

- √ Se colocan 2,85 ml de Buffer en tubos de vidrio de 10 ml en baño a 30° C.
- √ Se lee a 480 nm en espectrofotómetro.
- √ Se pone en cubeta 2,85 ml de Buffer, se lleva a 0 la lectura del espectro.
- √ Blanco: 2,85 ml de Buffer y 50 μ l de adrenalina

- √ Muestra: se toma X μ l de muestra (sobre un lateral de la cubeta), 50 μ l de adrenalina (sobre el otro lateral), se agrega 2,85 ml de Buffer. Se hace por lo menos con dos volúmenes distintos de muestra.

- √ Se registra la absorción cada 30 segundos durante 150 segundos.

- √ La diferencia de absorbancia del blanco es de 100% y el de la muestra X% de actividad.

- √ Se calcula el porcentaje de inhibición (100-X%) para cada volumen de muestra de manera de tener un valor por encima y otro por debajo del 50%.

- √ Los blancos y muestra deben procesarse con el mismo volumen de adrenalina.

LIPOPEROXIDACIÓN

(Buege & Aust, (1972).

Solución de trabajo

	Para 100 ml.	Para 500 ml.
Ácido tricloro acético	15 gr.	75 gr.
Ácido Tiobarbitúrico	0,375 gr.	1,875 gr
Ácido clorhídrico (concentrado)	2,1 ml.	10,5 ml.
Completar el volumen con agua destilada		

- Rotular tubos por duplicado + blancos.
- Sacar la solución de trabajo de la heladera.
- Descongelar muestras – pasar por vórtex.

MUESTRAS: 400 μ l. + 800 μ l de solución de trabajo (en tubos de vidrio de 10 ml)

BLANCO: 400 μ l de TRIS 0,1M PH 7,8 + 800 μ l de TCA TBA HCL

- Poner en agua hirviendo **15 minutos**.
- Sacar y poner en baño helado **10 minutos** como mínimo.
- Centrifugar **10 minutos** a **2300 rpm**.
- Medir sobrenadante en espectrofotómetro a **535 nm**.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES (Markwell *et al.*, 1978)
REACTIVOS

Para 1 Litro

Solución A:

2 % Na ₂ CO ₃ -----	20 gr
0,4 % NaOH-----	4 gr
0,16 % Tartrato de Na y K-----	1.6 gr
1 % SDS (duodecil Sulfato de Sodio)-----	10 gr
ó Lauril Sulfato de Sodio	

Solución estable indefinidamente. Conservar a Temperatura ambiente.

Solución B: 4 % SO₄Cu-5H₂O (en heladera)

Solución C: 100 partes de A + 1 parte de B (preparar en el día)

Solución E: 1 parte de Folin-Ciocalteu : 1 parte de H₂O. Preparar en el momento, proteger de la luz.

PROCEDIMIENTO: (todas las muestras por triplicado)

1. Homogenizar la muestra en buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,5 en una relación 1:3 v/v (0,5 gr de tejido)
2. Digerir en una solución de NaOH 1 N durante la noche a 37° C 1:5 v/v.
3. De la muestra digerida, diluir 1:3 asumiendo un 5 % de proteínas/peso húmedo. Recordar agitar antes de tomar la alícuota.
4. Agregar un máximo de 200 µl de muestra + agua.
5. Agregar 800 µl de Sln C, agitar en vórtex y dejar reposar 30 min.
6. Agregar 100 µl de Sln E agitar en vórtex y esperar 30 minutos antes de leer.
7. Leer en espectrofotómetro a 750 nm.

CURVA ESTANDAR

La Solución madre del estándar de Albúmina es 3,8 gr / dl = 38 mg / ml. De esta solución tomar 10 µl y llevar a 1000 µl con agua destilada fría. Con esta nueva Sln realizar una curva estándar de Albúmina (0,38 mg/ml) en el rango: 5,7-11,4- 17,1- 22,8- 34,2- 45,6 µg tomando 15- 30- 45- 60- 90- 120 y 150 µl. En todos los casos llevar a 200 µl con agua destilada y proceder igual que con las muestras (ítems 5, 6 y 7).

EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES (Bligh & Dyer, 1959)

1. Pesar aproximadamente 0,8 g de la muestra de tejido húmedo en tubos de 10 ml. Mantener frío. Todas las homogenizaciones se hacen en frío.
2. Agregar 2 ml de metanol y homogenizar 1 min.
3. Agregar 1 ml de cloroformo y homogenizar 1 min.
4. Agregar 1 ml de cloroformo y homogenizar 1 min.
5. Agregar 1 ml de ClNa.H₂O (1.8 % ClNa)
6. Filtrar con papel Watman #1 en ampolla de decantación. Humedecer el filtro previamente con mezcla metanol:cloroformo. Lavar con mezcla metanol:cloroformo 1:1, tanto el filtro como el tubo.
7. Dejar separar fases, con los tubos tapados, al menos 30 minutos.
8. Se agrega metanol:ClNa 1:1 para llevar a una relación 1:1:0.9 v/v Cloroformo:Metanol:SlnClNa.
9. Dejar 10 minutos aproximadamente y coleccionar la fase inferior en frasco tarado. Secar en estufa (40-50°C).
10. Agregar 1 ml de cloroformo:acetona 1:1. Evaporar a seco.
11. Secar en estufa a 40-50°C.
12. Pesar hasta verificar peso constante.

U.N.R.C
Biblioteca Central



69060

09060