

**Evaluación de la ecotoxicidad del
agua y sedimento en la zona interna
del estuario de Bahía Blanca**

Informe Final

2015 – 2016

Coordinadora: **Dra. Elisa R. Parodi**

Investigadora Principal CONICET. CCT BBca-IADO-CONICET-UNS
Profesora Asociada Ecología Acuática y Botánica Marina.
Depto. Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS

Investigadoras: **Dra. María Cecilia Gauna**

Investigadora Asistente CONICET. CCT BBca-IADO-CONICET-UNS
Auxiliar Docente Botánica Marina. Depto. Biología, Bioquímica y
Farmacia, UNS

Dra. Carolina Fernández

Investigadora Asistente CONICET. CCT BBca-IADO-CONICET-UNS
Auxiliar Docente UPSO

Dra. María Emilia Croce

Becaria Posdoctoral CONICET. CCT BBca-IADO-CONICET-UNS

El presente Informe Final 2015-2016, correspondiente al estudio de "Evaluación de la ecotoxicidad del agua en la zona interna del estuario de Bahía Blanca" se presenta al Comité Técnico Ejecutivo de la Ley 12530, e incluye tanto la información obtenida durante el desarrollo de los bioensayos realizados en agua y elutriado del sedimento recolectado durante las cuatro campañas realizadas durante el período de duración del Programa de Monitoreo de la Calidad Ambiental de la Zona Interior del estuario de Bahía Blanca entre junio de 2015 y abril de 2016, así como una interpretación integrada de sus resultados. Este estudio se llevó a cabo en el marco del Convenio (Decreto N° 955/2015) entre la Municipalidad de Bahía Blanca y el Instituto Argentino de Oceanografía (IADO – CONICET / UNS).

Este estudio incluye:

- Introducción General
 - Fundamento del estudio
 - Metodología
 - Resultados
 - Análisis de los resultados
 - Conclusiones
 - Referencias bibliográficas
 - Anexo
-

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ecotoxicología y bioensayos	3
1.2. Situación actual en el estuario de Bahía Blanca	5
2. FUNDAMENTO DEL ESTUDIO	6
2.1. Calidad ambiental en agua	6
2.2. Función del fitoplancton en el ambiente acuático	7
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo General	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. METODOLOGIA	10
4.1. Distribución de las estaciones de muestreo (E)	11
4.2. Organismos a evaluar	12
4.3. Aislamiento de las microalgas, generación y propagación de sus cultivos	14
4.4. Cultivo de las microalgas	15
4.4.1. <i>Tetraselmis suecica</i>	15
4.4.2. <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i>	15
4.5. Bioensayos	17
4.6. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del agua del estuario	19
4.6.1. Preparación de las muestras de agua a evaluar y cultivos control	19
4.6.2. Diseño experimental de los bioensayos con agua del estuario para cada sitio de muestreo	20
4.7. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del elutriado del sedimento del estuario	21
4.7.1. Preparación del elutriado del sedimento a evaluar	21
4.7.2. Diseño experimental de los bioensayos con elutriado del sedimento del estuario para cada sitio de muestreo	23
4.8. Determinación del crecimiento poblacional	24
4.8.1. Recuentos de microalgas	24
4.8.2. Procedimiento aplicado para el recuento celular durante este estudio con cámara de Neubauer	25
4.9. Determinación de clorofila "a" por el método espectrofluorométrico (APHA 1992).	27
4.10. Análisis estadísticos de los datos	28
5. RESULTADOS	30
5.1. Primer muestreo (1°M-jun'15)	31
5.1.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	31
5.1.2. Bioensayos con <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	34
5.2. Segundo muestreo (2°M-sep'15)	37
5.2.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	37
5.2.2. Bioensayos con <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	40

5.3. Tercer muestreo (3°M-dic'15)	43
5.3.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	43
5.3.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	46
5.4. Cuarto muestreo (4°M-mar'16)	49
5.4.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	49
5.4.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	52
6. ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS MICROALGAS	55
6.1. Estado fisiológico: Regresión entre densidad celular y clorofila "a"	56
6.1.1. Bioensayos control	56
6.1.2. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15	57
6.1.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15	58
6.1.4. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep'15)	59
6.1.5. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 2°M-sep'15	60
6.1.6. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15	61
6.1.7. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15	62
6.1.8. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16	63
6.1.9. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16	64
7. EVALUACIÓN DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS POBLACIONES DE MICROALGAS EVALUADAS	65
7.1. Representación gráfica del estado fisiológico de las poblaciones fitoplanctónicas evaluadas sobre la base de las variaciones de la relación densidad celular – clorofila "a" (R^2)	67
7.2. Alteraciones morfológicas observadas durante el estudio	68
7.3. Morfologías anómalas de las valvas de la diatomea <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i>	69
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS: comparación entre estaciones de muestreo	70
8.1. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E1	70
8.2. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E2	74
8.3. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E3	78
8.4. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E4	82
8.5. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E5	86
8.6. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E6	90
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS: comparación entre muestreos	94
9.1. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff.</i>	94

<i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 1er. muestreo (1°M-jun'15)	
9.2. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetsingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 2do. muestreo (2°M-sep'15)	101
9.3. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetsingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 3er. muestreo (3°M-dic'15)	107
9.4. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetsingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 4to. muestreo (4°M-mar'15)	113
10. CONCLUSIONES	122
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
12. ANEXO	134
12.1. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario provenientes del muestreo (1°M-jun'15)	135
12.2. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario provenientes del muestreo (2°M-sep'15)	144
12.3. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario provenientes del muestreo (3°M-dic'15)	153
12.4. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario provenientes del muestreo (4°M-mar'16)	162

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

La actividad humana genera grandes cantidades de desechos tóxicos que son liberados al ambiente, ingresando a los diferentes compartimentos de los ecosistemas, ya sea aire, agua, suelo o biota, dependiendo su destino de las propiedades fisicoquímicas, movilidad y persistencia de los compuestos que la integran (Pelusso, 2011).

Los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de contaminantes como consecuencia de las diferentes actividades antrópicas que tienen lugar en las cercanías de los mismos. Estos materiales derivados antropogénicamente incluyen diversos tipos de contaminantes que pueden acumular cantidades significativas de materiales peligrosos, lo cual hace que se consideren contaminados.

Cuando los desechos tóxicos son vertidos a un cuerpo de agua, dichos compuestos se particionan entre la fase acuosa y la fase particulada, siendo éstas formadoras de sedimentos a lo largo del tiempo. De esta manera los sedimentos se comportan como aceptores finales de contaminantes pudiendo actuar como fuentes secundarias de contaminación. Un sedimento contaminado se puede definir como aquel material acumulado en el fondo de cuerpos de agua conteniendo sustancias químicas en exceso, en relación a criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad, o que pueden tener efectos adversos en el ambiente o en la salud humana (Peluso 2011).

Los contaminantes asociados a los sedimentos pueden ser resuspendidos de forma natural, por procesos físicos o biológicos (bioturbación), o por la actividad humana, tal como frecuentemente ocurre en la actividad de dragado. Estos mecanismos generan la removilización y redistribución de los contaminantes a la columna de agua desde los sedimentos.

Frente a esto y considerando que junto con el desarrollo acelerado de la industria también ha crecido la cantidad de desechos y compuestos tóxicos que se acumulan en el ambiente, la ciencia se ha interesado cada vez más en conocer y proteger el ambiente, y en elaborar criterios físicos, químicos y biológicos para estimar el impacto de la actividad humana sobre el agua, el aire, el suelo y los ecosistemas en general.

1.1. Ecotoxicología y bioensayos

El creciente impacto ambiental de las actividades humanas, principalmente el vertido de sustancias químicas liberadas al ambiente por procesos productivos, ha favorecido el desarrollo de una disciplina basada en la toxicología y la ecología: la ecotoxicología, rama de la ciencia definida por Butler en 1978, que estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos y ha sido recomendada como herramienta indispensable en las evaluaciones de impacto ambiental y en la obtención de autorizaciones gubernamentales para realizar actividades productivas, tanto por los expertos del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (CPPS/PNUMA, 1985) como por la Organización Mundial de la Salud (Larraín 1995).

Hoy, la biotecnología ofrece herramientas que permiten detectar efectos producidos por compuestos tóxicos a través de un conjunto de técnicas basadas en la reacción y sensibilidad de distintos organismos vivos a diversas sustancias contaminantes presentes en el ambiente llamadas bioensayos. En otras palabras, un bioensayo es la evaluación de los efectos deletéreos de una sustancia tóxica sobre ciertos organismos.

El concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica, el cual ha sido adaptado y aplicado al diagnóstico ambiental, considerándose como un complemento a la caracterización físico-química convencional. Las pruebas de toxicidad constituyen una herramienta eficaz para la predicción de niveles de concentración de compuestos tóxicos, en los que mediante la analítica clásica no se logra obtener efectos observables, extendiéndose estas evaluaciones al ámbito de poblaciones, comunidades o ecosistemas para la identificación de elementos biológicos en riesgo.

El objetivo de este tipo de ensayos es obtener información acerca de los efectos de las sustancias contaminantes sobre los organismos integrantes de un determinado ecosistema. Para ello se procede a la observación y medición de diferentes parámetros biológicos, como las alteraciones en el desarrollo y en funciones vitales, entre otros parámetros en los organismos del ensayo, producidos por una sustancia o mezcla compleja de sustancias (Segretin Web, Cabrera Dorado 2004).

El empleo de bioensayos, realizados generalmente sobre organismos de una única especie en condiciones controladas de laboratorio, es una práctica reconocida y ampliamente utilizada en toxicología ambiental, tanto en investigación como en algunos campos reglamentarios como por ejemplo las Directivas 91/414/CEE y 67/548/CEE).

En la actualidad, se reconoce que la caracterización y medición de los tóxicos o componentes de los residuos peligrosos por separado no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de los residuos como posibles transformaciones en el ambiente pueden modificar su efecto nocivo. De ahí que el uso de ensayos biológicos esté siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de estos contaminantes (Castillo Morales 2004).

La protección del medio ambiente acuático se ha basado tradicionalmente en el establecimiento de objetivos de calidad para la protección de la vida acuática y en el establecimiento de límites de vertido a cauce público. Estas políticas basadas en el control de los vertidos de sustancias químicas individuales, cuyos límites están fijados en base al conocimiento de su toxicidad y potencial para ser degradados o bioacumulados, han sido aplicadas en todos los países occidentales con diversos grados de éxito.

Este tipo de políticas tiene la ventaja de poder fijar límites numéricos claros y de ser un sistema relativamente económico, desde el punto de vista analítico, siempre que el número de sustancias a controlar en un vertido sea pequeño.

Sin embargo, tiene numerosas limitaciones, como por ejemplo:

- Hay un número muy elevado de posibles contaminantes en los vertidos que, en muchos casos, sería necesario realizar una gran variedad de análisis diferentes.
- No es posible predecir los efectos de mezclas complejas, debido a las interacciones entre diferentes tóxicos.
- Los objetivos de calidad se encuentran, a veces, por debajo del límite de detección de los métodos de análisis.

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos

pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismos o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico.

Junto con la medición de parámetros físicos y químicos, el bioensayo permite evaluar el impacto que la actividad humana tiene en el medio ambiente, ya sea en ecosistemas abiertos como en efluentes industriales o cloacales mediante organismos indicadores presentes en el ecosistema de interés. El organismo indicador seleccionado para la batería de bioensayos ecotoxicológicos depende del ecosistema en estudio y de los compuestos tóxicos a determinar.

1.2. Situación actual en el estuario de Bahía Blanca

Como ya se mencionó, el incremento de las actividades antrópicas ha generado un aumento de los desechos y compuestos potencialmente tóxicos que se acumulan en cada ambiente, especialmente en los acuáticos, perturbando significativamente su propia dinámica, interrelaciones y equilibrios.

El estuario de Bahía Blanca no escapa a esta realidad ya que en los últimos 30 años, la ciudad de Bahía Blanca se ha expandido rápidamente. Su crecimiento demográfico ha acompañado al desarrollo del polo petroquímico con mayoría de refinerías, plantas petroquímicas y fábricas de productos sintéticos; plantas de fertilizantes y termoeléctricas, y otras industrias asentadas en la región (silos y molinos cerealeros, lavaderos de lanas, plantas textiles, curtiembres y frigoríficos, etc.) (Marcovecchio *et al.* 2001). Sumado a esto está la expansión de las actividades portuarias a través del Puerto Ingeniero White, y los

subsidiarios Puerto Rosales, Base Naval Puerto Belgrano y Puerto Galván (Perillo *et al.* 2000).

El ingreso de los residuos ocurre principalmente a través de los cursos de agua dulce que desaguan en el estuario mientras que por actividades de refinerías e industrias petroquímicas, así como del almacenamiento y transporte de petróleo y combustibles derivados, ingresan al sistema compuestos orgánicos de distintos tipos que tienden a permanecer en el sistema por las maniobras de dragado del canal principal de navegación que inciden en el transporte de sustancias potencialmente contaminantes (Marcovecchio 2014).

2.- FUNDAMENTO DEL ESTUDIO

2.1.- Calidad ambiental en agua

La preocupación por la contaminación acuática ha propiciado un auge en el desarrollo de metodologías para valorar mediante biocriterios los niveles de exposición a compuestos químicos, llegando incluso a establecerse límites permitidos de sus concentraciones tanto en agua como en sedimentos.

La evaluación de la calidad del agua se ha realizado principalmente en base a análisis físicoquímicos que son una medida instantánea del momento en que se realizan las mediciones y no permiten explicar con claridad períodos previos a la muestra. Con estos análisis físicoquímicos se puede determinar los niveles exactos de los contaminantes dentro del agua, por lo tanto estos análisis se restringen en verificar la presencia de algún compuesto específico en el agua, y permite detectar las fuentes puntuales de los mismos. Sin embargo, el carácter contaminante de un elemento químico viene definido principalmente por los daños o efectos biológicos que pueda causar.

Por otra parte la cantidad y diversidad de sustancias que pueden llegar a los sistemas acuáticos son muy numerosas, lo que hace imposible el control de todas ellas; además la complejidad que alcanzan los medios acuáticos por su propia dinámica, por las sustancias que contienen y sus interacciones o efectos sinérgicos, hacen más ineficientes a las medidas físicoquímicas puntuales (Valenzuela Perez 2013).

Estimar los efectos en la biota basándose exclusivamente en este tipo de datos es incompleto por diferentes razones. Por un lado, conocer la composición química de un efluente no proporciona información sobre sus efectos biológicos en el cuerpo de agua receptor. Por otra parte, cuando una sustancia se incorpora en un sistema acuático, las reacciones químicas que puedan ocurrir al producirse esta mezcla pueden modificar significativamente la biodisponibilidad de la sustancia, aumentando o disminuyendo su toxicidad. Para el caso de mezclas de diferentes compuestos, no es posible predecir su toxicidad con exactitud sobre los niveles de organización y escala trófica, aun conociendo las toxicidades de sus componentes individuales, dada la posibilidad de que se generen efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos de los contaminantes en los sistemas vivos. Todo esto sin considerar que monitorear todos los constituyentes en un efluente o cuerpo de agua superficial puede implicar costos elevados además de su baja practicidad (Castillo Morales 2004).

2.2. Función del fitoplancton en el ambiente acuático

La alta producción biológica de los ecosistemas marinos ha sido asociada a tramas tróficas cortas, donde la herbivoría predomina por sobre procesos como ciclaje de carbono a través del anillo microbiano y/o sedimentación de fitoplancton senescente. Sin embargo, la creciente percepción de la importancia que tienen las clases de pequeño tamaño del fitoplancton (pico- y nano-fitoplancton) y las bacterias en la utilización del carbono orgánico disuelto y particulado, están cambiando la visión del comportamiento de las comunidades pelágicas en zonas costeras y oceánicas, así como el flujo de materia a través de ellas (Azam 1998).

Los organismos más empleados para realizar biomonitoreo de ambientes acuáticos son las microalgas (Segretin Web). La importancia de incorporar el uso de algas en los protocolos de bioensayos para testear la toxicidad en ambientes marinos y estuariales se debe a que ellas determinan la productividad de los mismos, representan el inicio y sustentan el desarrollo de los restantes niveles de las redes tróficas de los ecosistemas acuáticos (Walsh *et al.* 1987).

En ellos, el principal componente es el fitoplancton, por lo que un cambio en esa comunidad, sea cualitativo o cuantitativo podría repercutir en todo el ecosistema. De esta manera, las especies de microalgas son consideradas de gran importancia para ser utilizadas en "tests" de toxicidad (Nalewajko y Olaveson 1998).

Muchos compuestos a concentraciones bajas, juegan un papel esencial en el metabolismo de las microalgas; tal es el caso del Zn y Cu (Tadros *et al.* 1990). Sin embargo, cuando las concentraciones son altas o se produce una mezcla de ellos aún a bajas concentraciones, dan origen a condiciones de contaminación del medio que provocan desbalances metabólicos en el fitoplancton (Rodríguez y Rivera 1995), llegando a producirse una inhibición del crecimiento y cambios morfológicos, generados como una respuesta fisiológica a la exposición de la mezcla o sustancia problema, que tienen como consecuencia una menor capacidad de respuesta de las poblaciones al nuevo ambiente generado (Sunda y Lewis 1978, Rand y Petrocelli 1985, Visviki y Rachlin 1994, Romero *et al.* 2001).

Por ello, resulta fundamental evaluar los efectos sobre el fitoplancton ya que se logra una respuesta sensible y fácil de monitorear, se permite evaluar la variación de dicha respuesta como un indicador del estrés al cual están sujetas las poblaciones naturales de microalgas.

El desarrollo de bioensayos con organismos nanofitoplanctónicos (hasta 10 µm) que constituyen la base de la trama alimentaria de larvas de moluscos, artrópodos y peces como así también de moluscos filtradores frente a contaminantes presentes en el sistema, permite el análisis de respuestas

- *poblacionales* a través de la tasa de crecimiento, en base a variaciones de la densidad de organismos y
- *morfofisiológicas* mediante un parámetro que referencia el estado fisiológico de los organismos como la concentración de pigmentos fotosintéticos.

Por ello, para este primer estudio de la "Evaluación ecotoxicológica de agua de la parte interna de estuario de Bahía Blanca" solicitado por el CTE se propusieron como:

3. OBJETIVOS

Considerando que es el primer estudio de la evaluación ecotoxicológica del agua del sector interno del Estuario de Bahía Blanca, se proponen:

3.1. Objetivo General

Analizar la respuesta del eslabón inicial de la cadena trófica del estuario de Bahía Blanca ante las variaciones de la calidad del agua, aportando los primeros datos sobre niveles de peligrosidad trasladables y asimilables a otros organismos para establecer, a futuro, niveles guía de protección del ambiente estuarial.

3.2. Objetivos específicos

- A. Desarrollo y estandarización de metodologías para la realización de bioensayos
 - a. Puesta a punto de técnicas de aclimatación a aguas estuariales de microalgas bajo condiciones controladas de laboratorio.
 - b. Evaluación y selección y de método adecuado para la obtención del elutriado de sedimento.
 - c. Selección y supervisión de técnicas apropiadas para la realización de los bioensayos.
 - d. Selección de parámetros representativos de la respuesta de las microalgas durante los bioensayos.
- B. Determinación de la ecotoxicidad del agua y elutriado del sedimento del estuario de Bahía Blanca mediante bioensayos con microalgas.
 - a. Evaluar la toxicidad de muestras de agua y elutriado del sedimento sobre dos microalgas planctónicas.
 - b. Analizar la dinámica de crecimiento y el estado fisiológico de las dos microalgas como indicadores de ecotoxicidad.
 - c. Identificar sitios y momentos sensibles relacionados con la variabilidad climática, actividad industrial, etc. que pudieran requerir intervención y/o manejo en futuros programas de gestión.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGIA

Para el desarrollo de este estudio de ecotoxicidad se respetó espacial y temporalmente el diseño experimental de toma de muestras propuesto para el Programa de Monitoreo de la Calidad Ambiental de la Zona Interior del estuario de Bahía Blanca:

Primer muestreo: (1°M-jun´15)

Segundo muestreo: (2°M-sep´15)

Tercer muestreo: (3°M-dic´15)

Cuarto muestreo (4°M-mar´16)

4.1. Distribución de las estaciones de muestreo (E)

E1 en proximidades de la desembocadura cloacal BB (CLO)

E2 en proximidades de Ingeniero White (IW)

E3 en Canal Galván, proximidades del Polo Petroquímico (cPG)

E4 en proximidades de Maldonado (M)

E5 en proximidades de la descarga de planta de tratamientos cloacales de la 3ra. Cuenca (3ªC).

E6 proximidades de Puerto Cuatrerros (PC)



Para permitir la evaluación de la ecotoxicidad de la parte interna del estuario, tanto las muestras de agua como las de sedimentos empleadas en este estudio constituyen submuestras de las que fueron tomadas para el monitoreo físico-químico.

4.2. Organismos a evaluar

Para la evaluación de ecotoxicidad se realizaron bioensayos con agua y elutriado de los sedimentos de la zona interna del estuario de Bahía Blanca, utilizando como especies test a las microalgas: verde *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Chlorophyta) ● y la diatomea *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* Hustedt (Bacillariophyta) ●.



Durante todo el estudio se realizaron procedimientos en el laboratorio que llevarán a:

- asegurar las condiciones fisiológicas o de aclimatación que las microalgas requieren al ser cultivadas y,
- lograr intervalos de sensibilidad propios y reproducibles para cada una de ellas en particular bajo un riguroso control de calidad.

Para una mejor comprensión de la metodología empleada en cada procedimiento para la realización de los bioensayos se define los siguientes términos:

Cultivo: organismos de prueba a utilizar durante los bioensayos, mantenidos bajo condiciones controladas de laboratorio.

Control: ensayos realizados con los organismos de prueba en un medio prístino.

Tratamiento: ensayos realizados con los organismos de prueba en el medio a evaluar.

Muestra se refiere al volumen determinado de agua de mar o elutriado de sedimento a evaluar.

4.3. Aislamiento de las microalgas, generación y propagación de sus cultivos

Todas las maniobras con las microalgas se realizaron bajo condiciones de esterilidad.



Para el aislamiento, aclimatación y mantenimiento de las microalgas se utilizó como medio de cultivo agua de mar proveniente de Pehuen Co (SW-PCo), tomada mediante embarcación a cierta distancia de la costa, filtrada, esterilizada y enriquecida con solución PES (Provasoli-Enriched Seawater, 10 ml por litro de agua de mar) según lo indicado por Starr and Zeikus (1993),. La filtración se hizo a través de una serie sucesiva de filtros de 30, 15, 5 y 1,2 μm . Se colocó en botellas Nalgene para evitar la formación de precipitados de sílice que puede interferir en el desarrollo de las microalgas y se llevó a autoclave para su esterilización.



El agua de mar filtrada y la solución Provasoli fueron esterilizadas por separado para evitar la precipitación de los componentes y se las almacenó refrigeradas.

4.4. Cultivo de las microalgas

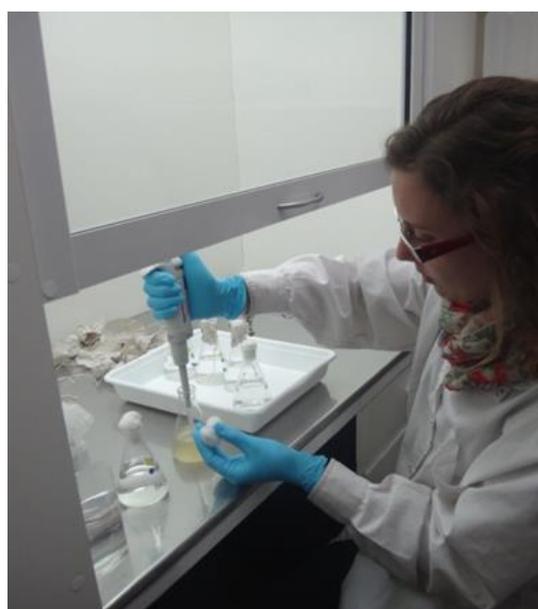
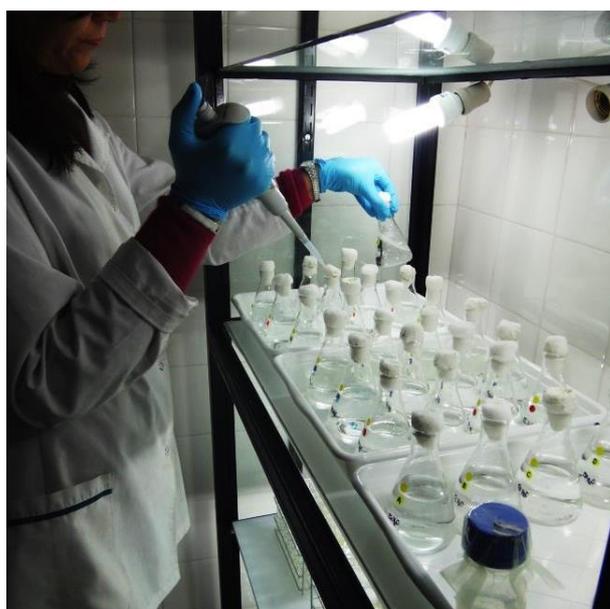
4.4.1. *Tetraselmis suecica*

La cepa de *Tetraselmis suecica* utilizada en este estudio, fue generosamente cedida por la Prof. Isabel E. de Albarracín responsable del Cepario de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (sede Trelew) con anterioridad a la ejecución del estudio. La cepa estuvo en aclimatación en el laboratorio de cultivos algales del GIBEA (Grupo de Investigación en Bioecología Acuática) del IADO, alternando sus cultivos en medio agarizado y líquido tomando las células con un asa y esparciéndolas en el medio líquido en un volumen reducido a 50 ml. Este procedimiento fue realizado en el transcurso de 45 días (Osenduko et al. 2014).

4.4.2. *Nitzschia aff. kuetzingioides*

Nitzschia aff. kuetzingioides es una diatomea pennada que forma parte de la flora fitoplanctónica del estuario de Bahía Blanca, es de fácil manejo en laboratorio, tamaño pequeño y ciclo de vida corto, por lo que posee características ventajosas para la conducción de pruebas de ecotoxicidad.

Para el aislamiento de la diatomea *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*, con una pipeta Pasteur estéril se tomó, bajo lupa, un conjunto de células de microalgas tomadas con red de fitoplancton en el estuario y se colocó en una depresión de una placa de porcelana estéril. En la depresión continua de la placa se colocaron de 3 - 4 gotas de medio de cultivo para lavar las células y eliminar partículas contaminantes. Este procedimiento de lavado se realizó varias veces empleando sucesivas depresiones de la placa estéril. Se transfirieron las células lavadas a un tubo con 3 ml de medio de cultivo. Luego el cultivo se colocó en una cámara de cultivo a temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ con iluminación luz fría proveniente de lámparas bajo consumo y con intensidad luminosa promedio de $26\text{W}/\text{m}^2$.



Periódicamente, se efectuó la observación al microscopio óptico (10x, 40x y 100x) de las alícuotas extraídas y fueron seleccionadas en cada observación, mediante pipeteo, las células de la especie de diatomea seleccionada, las que fueron transferidas a otros tubos iniciando nuevos cultivos. En caso de contaminación, se repitió el proceso de aislamiento. Estas operaciones se realizaron durante 2 meses hasta conseguir un cultivo unialgal de *N.* aff. *kuetzingioides*.

Los cultivos unialgales así obtenidos, se mantuvieron en erlenmeyers de 100 ml con 50 ml de medio bajo las condiciones de temperatura e iluminación

controladas anteriormente señaladas. Cada 3 días se realizó el agregado de 10 ml de medio y periódicamente se iniciaron nuevos cultivos para mantener la viabilidad de la cepa aislada.



4.5. Bioensayos

Para la realización de los bioensayos se utilizó la normativa establecida por EPA (United States Environmental Protection Agency): Ecological Effects Test Guidelines OCSP 850.4500: Algal Toxicity y Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1000: Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies y por el ASTM: E 1218 - 04 Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae

La batería de bioensayos fue realizada con muestras colectadas durante los cuatro muestreos (1ºM-jun'15), 2ºM-sep'15), (3ºM-dic'15) y (4ºM-mar'16):

a.- Agua de los seis sitios de muestreo (E1, E2, E3, E4, E5 y E6) más un control con:

- a.1.- *Tetraselmis suecica*
- a.2.- *Nitzschia aff. kuetzingioides*

b.- Elutriado del sedimento de los seis sitios de muestreo (E1, E2, E3, E4, E5 y E6) más un control con:

- b.1.- *Tetraselmis suecica*
- b.2.- *Nitzschia aff. kuetzingioides*



Todos los bioensayos se realizaron por cuadruplicado, en cultivo estático, sin renovación del medio.

Cada bioensayo se inició con una siembra de un inóculo de 10.000 células/ml proveniente de cultivos unialgales en fase de crecimiento exponencial adaptados al medio de cultivo utilizado como control. Cada siembra se realizó en Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 80 ml de agua filtrada y esterilizada proveniente de cada estación de muestreo.

La incubación se realizó durante 96 horas a una temperatura de 18 ± 1 °C, con iluminación continua (26 W/m^2) y agitación diaria.

Los parámetros respuesta aplicados se estimaron cada 24 horas durante toda la duración del bioensayo (0, 24, 48, 72 y 96 horas) y fueron:

- *tasa de crecimiento de la población algal* (d^{-1}) calculada mediante los cambios de biomasa en el tiempo, siendo esta última estimada indirectamente como densidad celular mediante recuentos con cámara de Neubauer, bajo microscopio óptico.

- *estado fisiológico de la población* a través de la estimación de la concentración de clorofila "a" mediante el registro de la fluorescencia de la misma con un espectrofluorómetro.

En todos los bioensayos se realizaron observaciones microscópicas de las poblaciones algales para detectar posibles alteraciones celulares.

4.6. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del agua del estuario

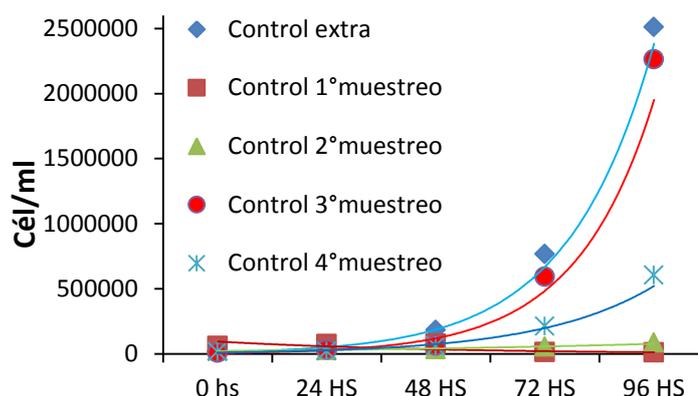
4.6.1. Preparación de las muestras de agua a evaluar y del control

En el laboratorio cada muestra de agua proveniente de E1, E2, E3, E4, E5 y E6 más el agua destinada para el control, se filtró a través de una serie de membranas de 30, 15, 5 y 1,2 μm de poro y se la esterilizó en autoclave directamente en los erlenmeyers de 100 ml destinados para desarrollar los bioensayos para evitar una posible contaminación durante el trasvase que llevara a posibles interpretaciones erróneas y fue conservada a 4°C.

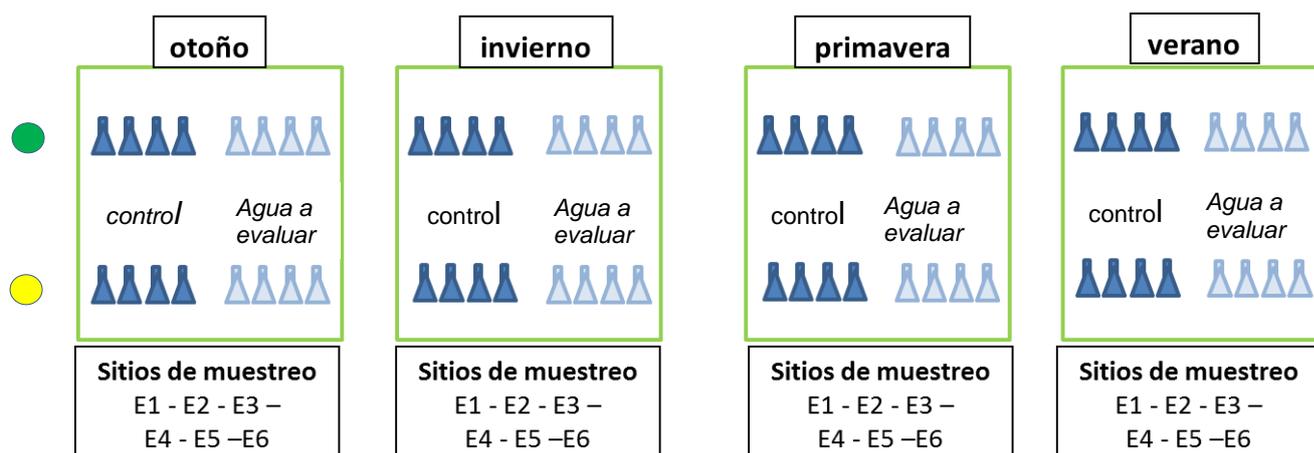


Para los controles se planeó utilizar agua proveniente de Bahía Falsa (BF), considerándola como área prístina, pero durante el desarrollo del estudio se observó un crecimiento de las microalgas menor al esperado, lo que llevó a cambiar el medio para el control, utilizando finalmente para los mismos el agua de mar identificada en este estudio como SW-PCo utilizada para el

aislamiento y mantenimiento de las microalgas. Esta decisión se tomó luego de realizar un exhaustivo análisis y reelaboración de los bioensayos con agua de mar BF más el agregado de agua de mar artificial GP2 (Spotte et al, 1984) (50% BF: 50% SW artif.) y agua de mar de las costas de Pehuen Co (SW-PCo), observándose una mejor respuesta de crecimiento en esta última. Esta mejor respuesta de crecimiento en el medio SW-PCo comparado con BF (control de los muestreos 1°, 2°, 3° y 4°) se observa en el siguiente gráfico:



4.6.2. Diseño experimental de los bioensayos con agua del estuario para cada sitio de muestreo



4.7. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del elutriado del sedimento del estuario

Se entiende por elutriado a la solución acuosa obtenida tras la adición de agua a una sustancia sólida (p.ej. sedimento) y sometida a posterior agitación.

Posteriormente la mezcla obtenida se centrifuga, se filtra o se decanta el sobrenadante para separar el sólido propiamente dicho del líquido (Garmendia et al. 2009).

4.7.1. Preparación del elutriado del sedimento a evaluar

Para la preparación del elutriado se puso a punto un nuevo método que resultó más efectivo para extraer mayor concentración de contaminantes (ver en tabla) luego de probar con métodos ya conocidos que aplicaban ultrasonido, licuado o largos procesos de resuspensión (US EPA 1992, Pica Granados y Trujillo Domínguez 2008). La tabla muestra que el método realizado por agitación y rápida recuperación del sobrenadante resultó ser más efectivo en la extracción de Cu y Zn. Los otros dos métodos analizados, licuado y sonicación y lenta recuperación de sobrenadante, proporcionaron menores valores de extracción de Cu y Zn.

Muestra	Cu	Zn
Preparación del elutriado	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)
Agitación y rápida recuperación del sobrenadante	19,3	27,6
Licuado y lenta recuperación del sobrenadante	1,2	0,4
Sonicación y lenta recuperación del sobrenadante	11,9	15,4

Las muestras de sedimento fueron guardadas a -18°C hasta la preparación del elutriado, cuidando que la misma fuera realizada dentro del tiempo aconsejado no superior al mes (Garmendia et al. 2009).

El elutriado del sedimento de cada una de las estaciones muestreadas se preparó de la siguiente manera:

- a) Se pesaron 400 g de sedimento en su estado natural, base húmeda y se los colocó en un Erlenmeyer y se le agregó agua mar control filtrada ($1,2 \mu\text{m}$) hasta completar 1600 ml (proporción 1:4).



- b) El erlenmeyer se colocó en un agitador orbital por 30 minutos a 220 rpm en un agitador orbital SK-O330-Pro.
- c) Posteriormente la mezcla se deja decantar en embudos de decantación por unos pocos minutos de modo que la mayor parte del sedimento quede en el fondo del embudo.
- d) Transcurrido ese período se retiró la fase líquida con pipetas de 20 mL pasándolo a tubos de centrifuga de 50 ml que previamente fueron enjuagado con la primera porción del sobrenadante obtenido, cuidando de no remover o resuspender el sedimento del fondo.
- e) El sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm y se filtró con filtro de fibra de vidrio de 1,2 μm .



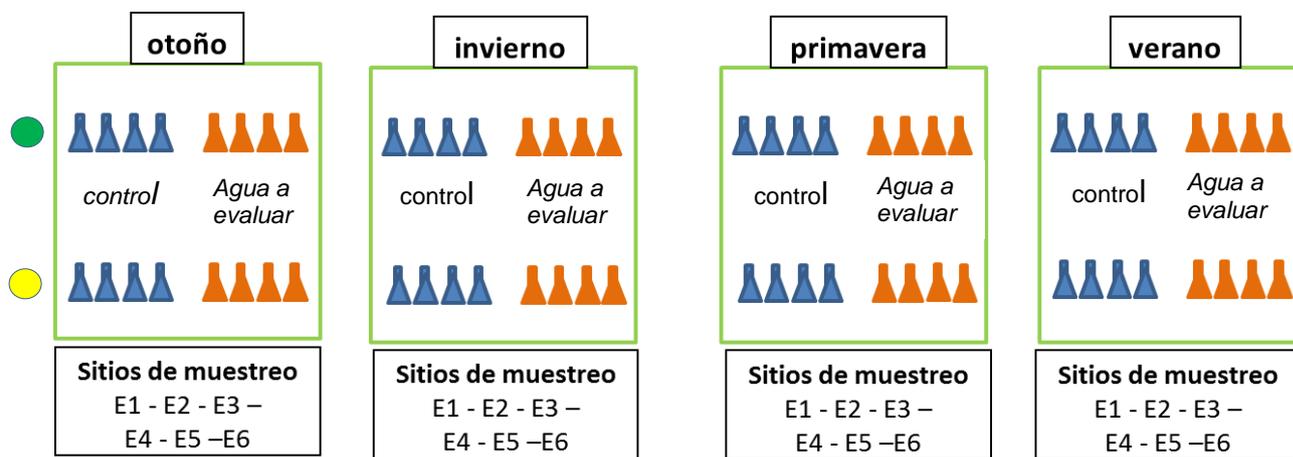
- f) Se extrajo el sobrenadante acuoso (elutriado) succionando el líquido sin resuspender lo sedimentado.
- g) El elutriado así obtenido fue esterilizado bajo luz UV por 36 horas y posteriormente mantenido en oscuridad y refrigerado a 4°C.



- h) Previamente a su uso, el contenido fue aireado suavemente durante 10 minutos y se trasvasaron directamente 60 ml a los erlenmeyers de cultivo previamente esterilizados.

Debido a que el elutriado es un extracto acuoso, el procedimiento de los bioensayos se desarrolló de la misma forma en que se llevan a cabo los bioensayos de ecotoxicidad en agua.

4.7.2. Diseño experimental de los bioensayos con elutriado del sedimento del estuario para cada sitio de muestreo



4.8. Determinación del crecimiento poblacional

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cél/mL), en peso seco, cantidad de proteína, de pigmentos, medidos directamente o en unidades de fluorescencia, volumen de las células o carbono celular total, calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica.

Este incremento puede ser estimado por diferentes métodos, entre los cuales los más utilizados en los laboratorios son el recuento celular a través del microscopio o mediante contadores de partículas, la determinación de los cambios de densidad óptica del cultivo por espectrofotometría o finalmente la cuantificación de la biomasa en peso seco, total u orgánico, o de sus componentes bioquímicos que son de interés para los fines de un cultivo en particular (proteínas, pigmentos o ácidos grasos, entre otros).

De estos métodos, el recuento celular es el más utilizado por ser un método sencillo, el cual permite además un mejor seguimiento del cultivo mediante su inspección visual. Es necesario remarcar que la correspondencia entre la concentración celular y la información proporcionada por los otros métodos (como la cantidad de pigmentos o de otros componentes celulares, que son más laboriosos y requieren de tiempo, material y equipamiento más costoso) no es constante, ya que éstos dependen del estado fisiológico de las células, de la fase de crecimiento y de las condiciones ambientales a las cuales está sometido el cultivo (Alfonso y Leal 1998).

Para obtener resultados confiables, es recomendable aplicar algunos métodos simultáneamente, incluyendo observaciones microscópicas cualitativas para evitar errores debido a la contaminación de los cultivos. En esta primera sección se describen las técnicas de recuento celular y de determinación de la densidad óptica.

4.8.1. Recuentos de microalgas

Una de las dificultades para el recuento al microscopio es obtener una buena reproducibilidad, por lo cual es importante saber seleccionar el tamaño de la

muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara. En algunos casos, puede ser necesario corroborar el volumen de la cámara que se está utilizando. Para realizar el recuento celular se han diseñado diferentes cámaras que contienen un volumen determinado de muestra entre una lámina y una laminilla rígida (cubreobjeto especial) colocada sobre plataformas laterales a una altura establecida (Alfonso y Leal 1998). La que se usa con mayor frecuencia para cultivos de microalgas es el hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer.

4.8.2. Procedimiento aplicado para el recuento celular durante este estudio con cámara de Neubauer

a) Se agitó el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea.

b) Se tomó una muestra de 1 ml y se la colocó en un Eppendorf previamente lavado y seco. Se agregó una gota de solución Lugol para fijar las células:

Solución A: pesar 10 g de yoduro de potasio (KI) y disolver en 100 ml de agua destilada.

Solución B: pesar 5 g de yodo molecular cristalino (I_2) y disolver en 10 ml de ácido acético (CH_3-COOH).

Mezclar ambas soluciones (A+B), agitar bien y mantener en frasco ámbar.

c) Cuando el cultivo estuvo muy concentrado ($>10^6$ cél/ml) se diluyó la muestra con agua de mar.

Generalmente una dilución 1:10 fue suficiente, pero fue necesario verificar que la concentración resultante fuera suficiente para obtener una precisión adecuada, la cual dependía del número de células presentes en promedio en 1 mm^2 .

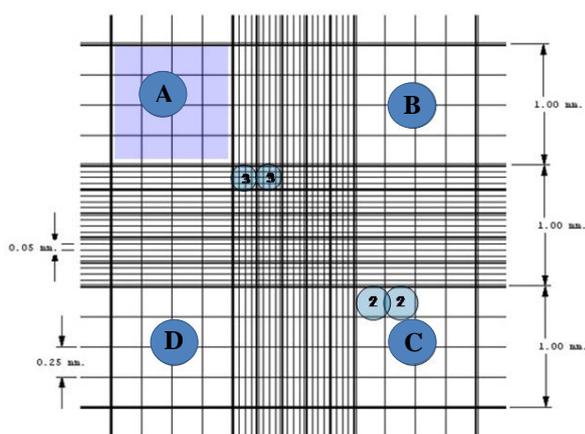
d) El tubo se agitó y se tomó una muestra con una pipeta Pasteur.



e) Se llenó la cámara con el cubreobjeto ya puesto, colocando la punta de la pipeta Pasteur en la muesca en forma de V que tiene la cámara, cuidando que el volumen depositado fuera suficiente para que una parte llegue hasta los canales laterales, pero sin inundarlos completamente.

f) Se enfocó la cámara con el objetivo 10X aunque en ocasiones cuando se trató de células pequeñas se utilizó el de 40X.

g) El registro se hizo contando las células que quedaron dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como A, B, C y D indicadas en la figura. En el caso de las células que tocaban las líneas de demarcación entre cuadros, se contaron solamente las que tocaban dos de los cuatro lados, seleccionados al azar.



h) Para obtener un recuento más preciso, se usaron tres o más submuestras de cada muestra y con éstas se calculó la concentración media.

i) Con los datos de concentración celular (cél/ml) de cada recuento en tiempos sucesivos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) se obtuvo la curva de crecimiento graficando en el eje de las "Y" los valores de concentración y en el eje de las "X" el tiempo (en horas).

4.9. Determinación de clorofila "a" por el método espectrofluorométrico (APHA 1992).

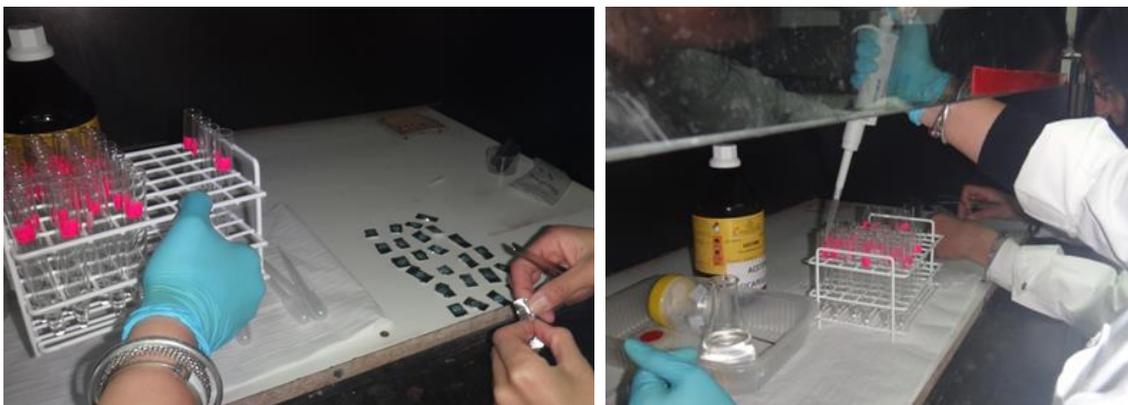
La extracción de la clorofila "a" se basa en la transferencia del pigmento a un solvente orgánico sin provocar cambios químicos en la molécula. La concentración de clorofila "a" se cuantifica por su absorbancia en un espectrofotómetro o espectrofluorómetro. Como la clorofila es soluble en solventes orgánicos, suelen usarse acetona o metanol para su extracción, ya que rompen los puentes entre el pigmento y las proteínas solubilizando las clorofilas. La determinación espectrofluorométrica de la clorofila "a" depende de la Ley de Lambert-Beer. La extracción de la clorofila debe realizarse en la oscuridad y a baja temperatura para reducir al mínimo la fotooxidación. Luego de filtrar un volumen conocido de muestra se coloca el filtro en un ultrafreezer para facilitar la ruptura de las paredes celulares y la liberación del pigmento y se agrega del solvente de extracción, se deja reposar en la oscuridad una noche, se procede a leer en el espectrofluorómetro.

Procedimiento:

Muestras de 1 ml de cada ensayo se filtraron empleando una jeringa provista con filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (0.7 μm de poro). Cada filtro fue envuelto en papel aluminio y se lo preservó en ultrafreezer a -80°C .



Previo a su lectura, cada filtro se colocó en un tubo de centrifuga, se lo desmenuzó mediante una varilla de vidrio y se le adicionaron 10 ml de acetona 90%, manteniéndolos a 4°C por 20 horas.



Después de ese tiempo, se centrifugaron para eliminar los residuos del papel de filtro y evitar interferencias en la lectura. Una alícuota de la solución extraída, se transfirió a una celda y se midió la absorbancia en un espectrofluorómetro SHIMADZU RF-5301 PC.



4.10. Análisis estadísticos de los datos

El análisis de los datos obtenidos a partir de los bioensayos – densidad de organismos y concentración de clorofila “a” - se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la USEPA (EPA/821/R/02/012) y según los criterios expuestos en la norma ISO / DIN 5667-16.

- Para expresar los resultados como media \pm error estándar de la media se realizó estadística descriptiva.
- La homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos fueron analizadas por medio de la prueba de Bartlett y la prueba de Kolmogorov Smirnov, respectivamente. En caso que fuera necesario, los datos fueron transformados para cumplir los requerimientos paramétricos.
- Para evaluar las diferencias tanto en densidad de células (n° cel/ml), tasa de crecimiento y concentración de clorofila "a" ($\mu\text{g/ml}$) en ambas especies evaluadas, *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides*, entre tratamientos (agua de mar y elutriado), entre estaciones muestreadas (E1, E2, E3, E4, E5 y E6) y entre fechas de muestreo (1 $^\circ$, 2 $^\circ$, 3 $^\circ$ y 4 $^\circ$) se realizaron Análisis de la varianza de dos vía (ANOVA doble).
- Para una correcta interpretación de los resultados de ANOVA, en los casos de diferencias significativas, fueron aplicados tests de comparaciones múltiples de Tukey.
- Para considerar diferencias estadísticas significativas en los casos que se detectó interacción entre variables, las mismas fueron analizadas separadamente, utilizando análisis de la varianza simple o de una vía. Un valor de $p < 0,05$ fue utilizado como criterio.
- Para determinar relación entre la densidad de células y la concentración de clorofila "a" en ambas especies de algas y en los tratamientos en agua y elutriado de los sedimentos se realizaron análisis de regresión lineal simple. Previo al análisis, los datos fueron transformados utilizando $\text{Ln}(x+1)$ como transformación.

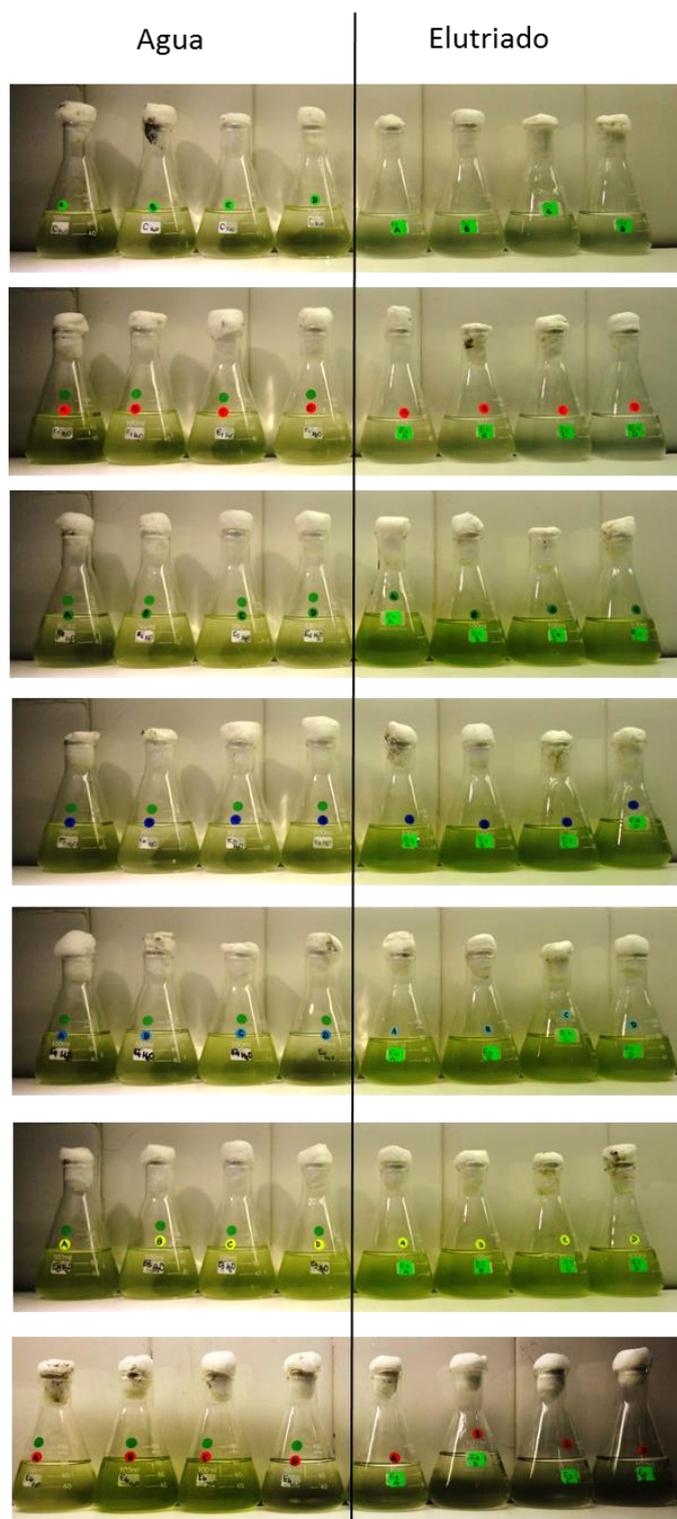
Todos los tests estadísticos fueron realizados con los paquetes estadísticos SPSS 15.0 para Windows e InfoStat 2008 (versión estudiantil).

RESULTADOS

5. Resultados

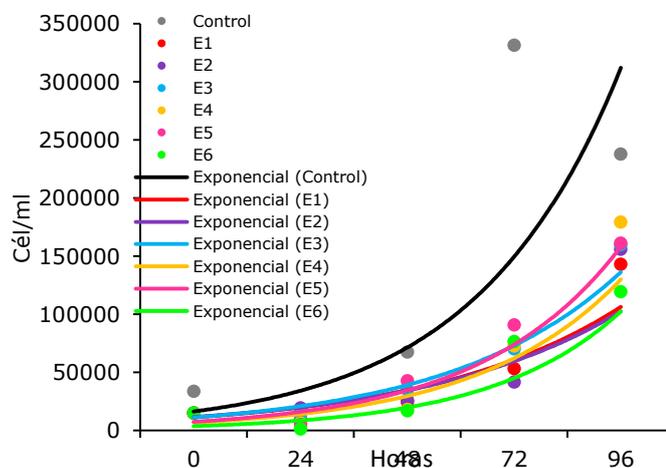
5.1. Primer muestreo (1°M-jun'15)

5.1.1. Bioensayos con *Tetraselmis suecica* en agua y elutriado del sedimento del estuario

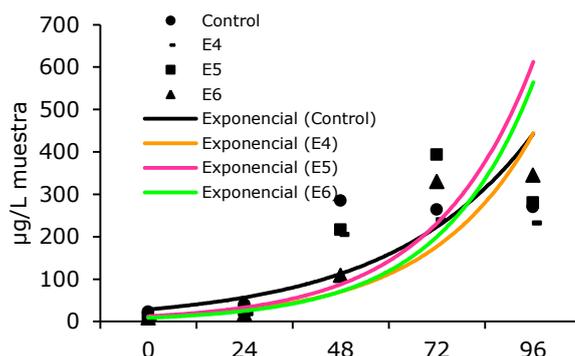
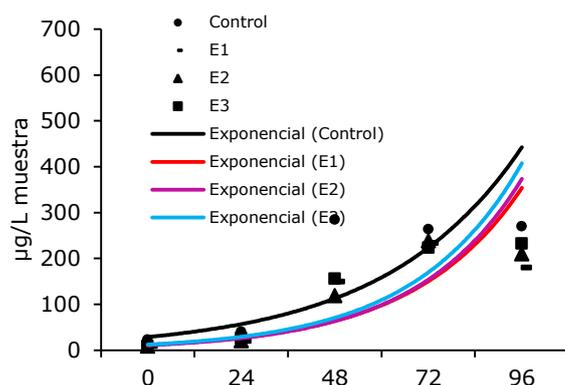


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15

Densidad celular



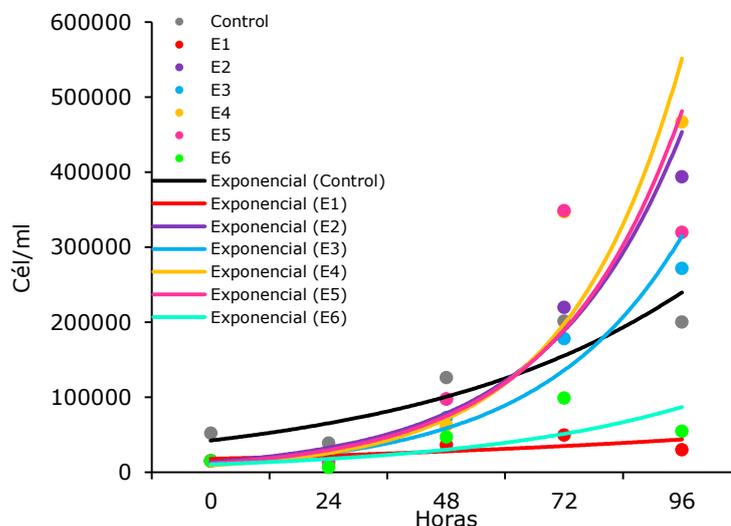
Clorofila "a"



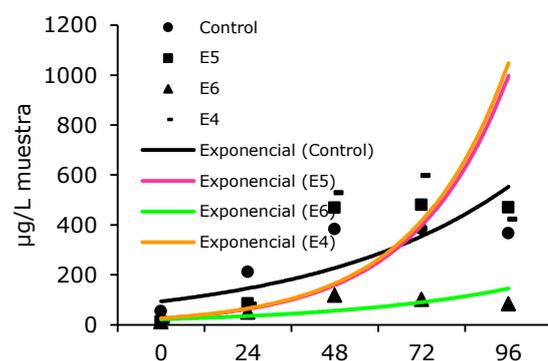
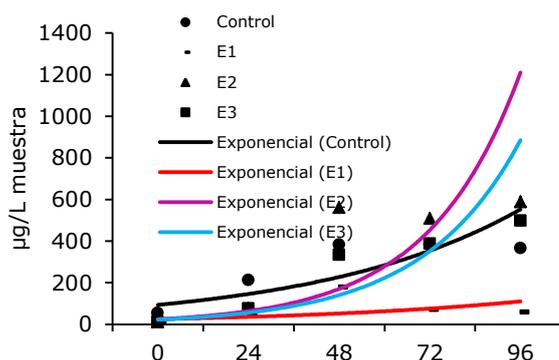
Con respecto a la densidad celular, se puede observar una mejor respuesta de crecimiento en los bioensayos con agua proveniente de los sitios E3 y E5 y un menor crecimiento en E6, si bien todas las curvas se ubicaron por debajo de la correspondiente al control. Al considerar los valores de clorofila "a" se observan algunas diferencias, ya que todas las curvas se ubican más próximas a las correspondientes al control, además los valores con agua proveniente de E5 y E6 a la hora 96 superaron al control.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15

Densidad celular

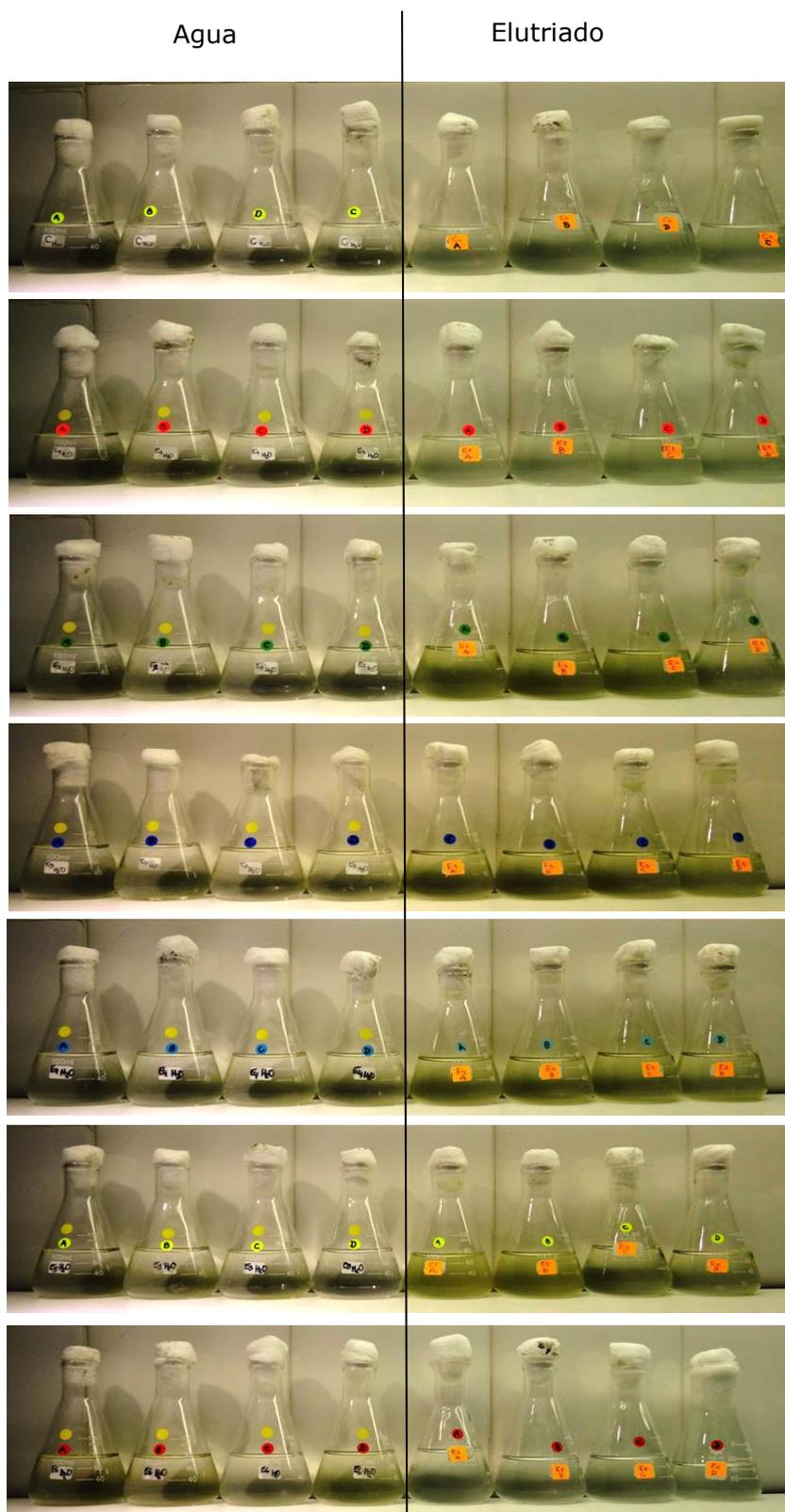


Clorofila "a"



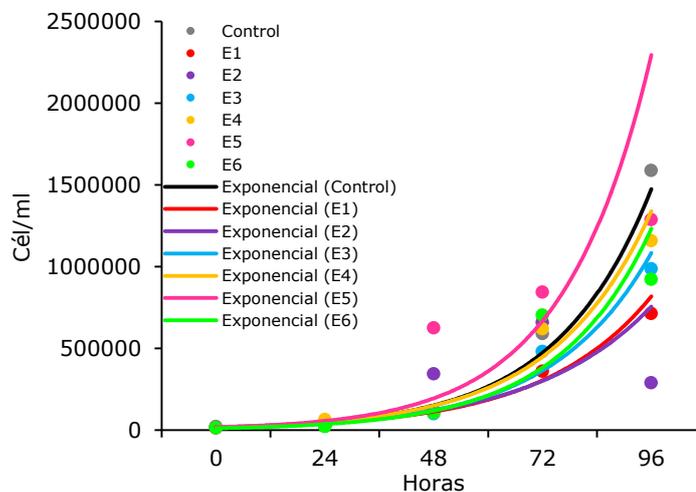
Al observar tanto la densidad celular como la clorofila "a" se puede ver que los bioensayos con elutriado del sedimento proveniente de las estaciones E2, E3, E4 y E5 presentaron una respuesta de crecimiento menor al control, este crecimiento superior al control se observó a partir de la hora 72, por otra parte los bioensayos con elutriado del sedimento proveniente de las estaciones E1 y E6 presentaron un crecimiento muy bajo.

5.1.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario

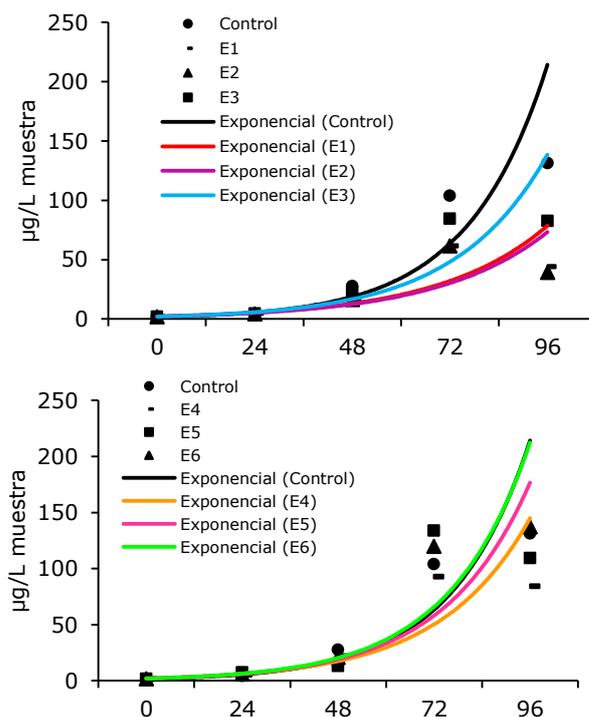


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15

Densidad celular



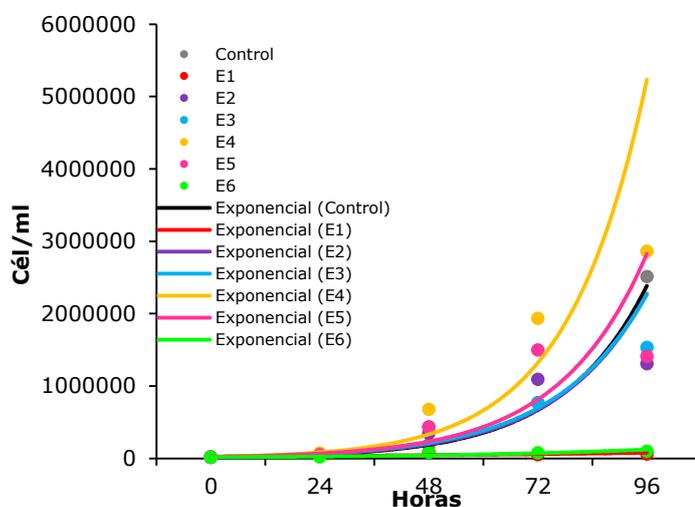
Clorofila "a"



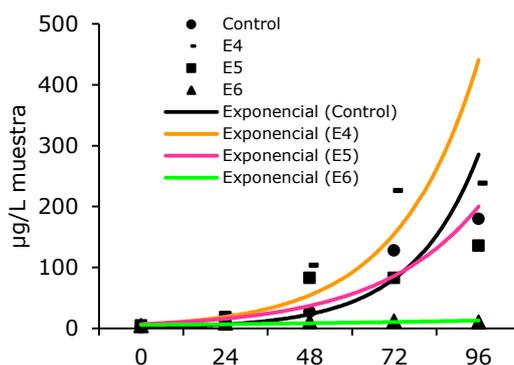
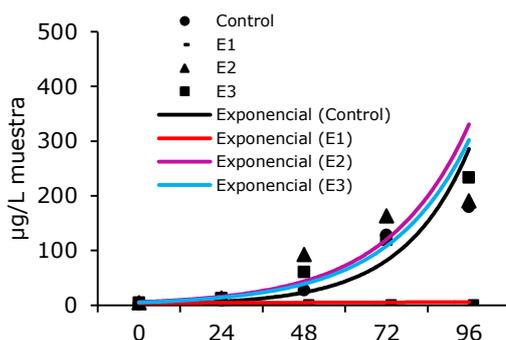
Al considerar la densidad celular se puede observar que los ensayos con agua proveniente de E5 presentaron una respuesta de crecimiento superior al control, mientras que los ensayos con agua proveniente de las restantes estaciones presentaro curvas por debajo del control, siendo E1 y E2 las que presentaron el menor crecimiento. Al considerar la clorofila "a" se observó una respuesta similar aunque ninguno de los ensayos presentó un crecimiento superior al control.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15

Densidad celular



Clorofila "a"



Al considerar la densidad celular como la concentración de clorofila "a" se pudo observar que los ensayos con elutriado del sedimento proveniente de la estación E4 presentaron una mejor respuesta de crecimiento que el control, mientras que los ensayos realizados con elutriado de las estaciones E1 y E6 presentaron un muy bajo crecimiento.

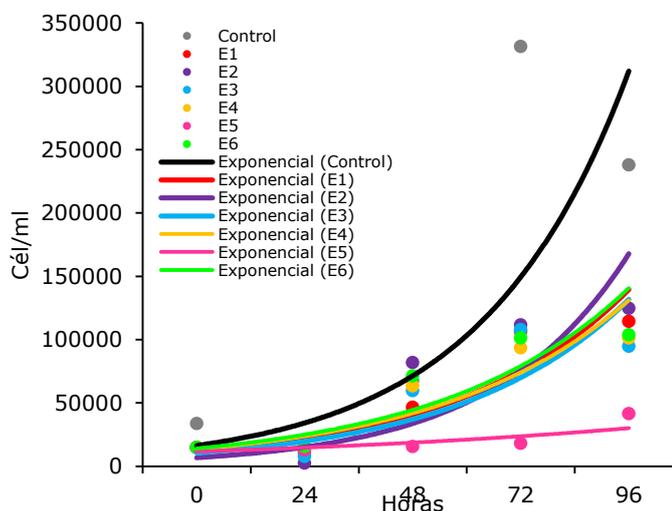
5.2. Segundo muestreo (2°M-sep'15)

5.2.1. Bioensayos con *Tetraselmis suecica* en agua y elutriado del sedimento del estuario

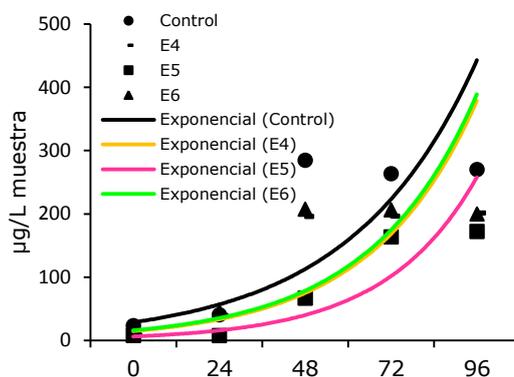
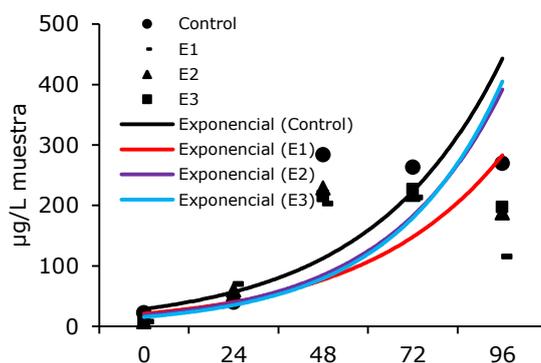


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 2°M-sep'15

Densidad celular



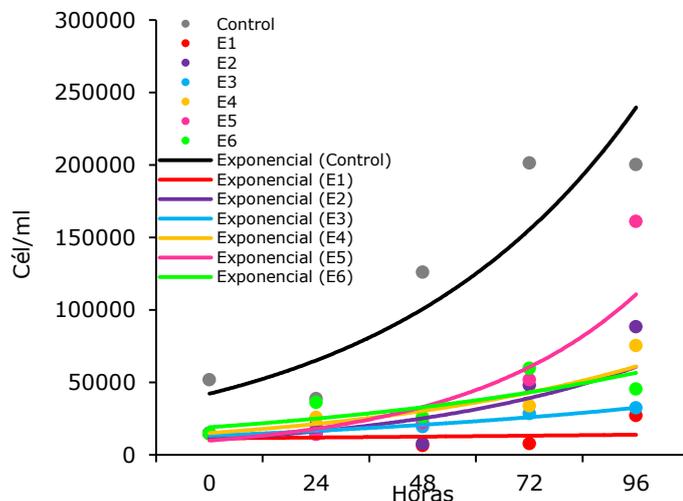
Clorofila "a"



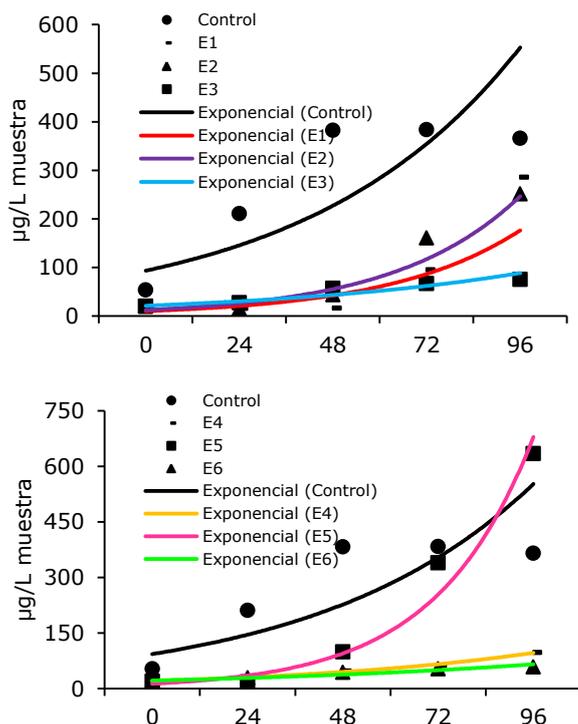
Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" se observó una respuesta de crecimiento menor al control en los bioensayos con agua proveniente de todas las estaciones, siendo más bajo con el agua proveniente de E5.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 2°M-sep'15

Densidad celular

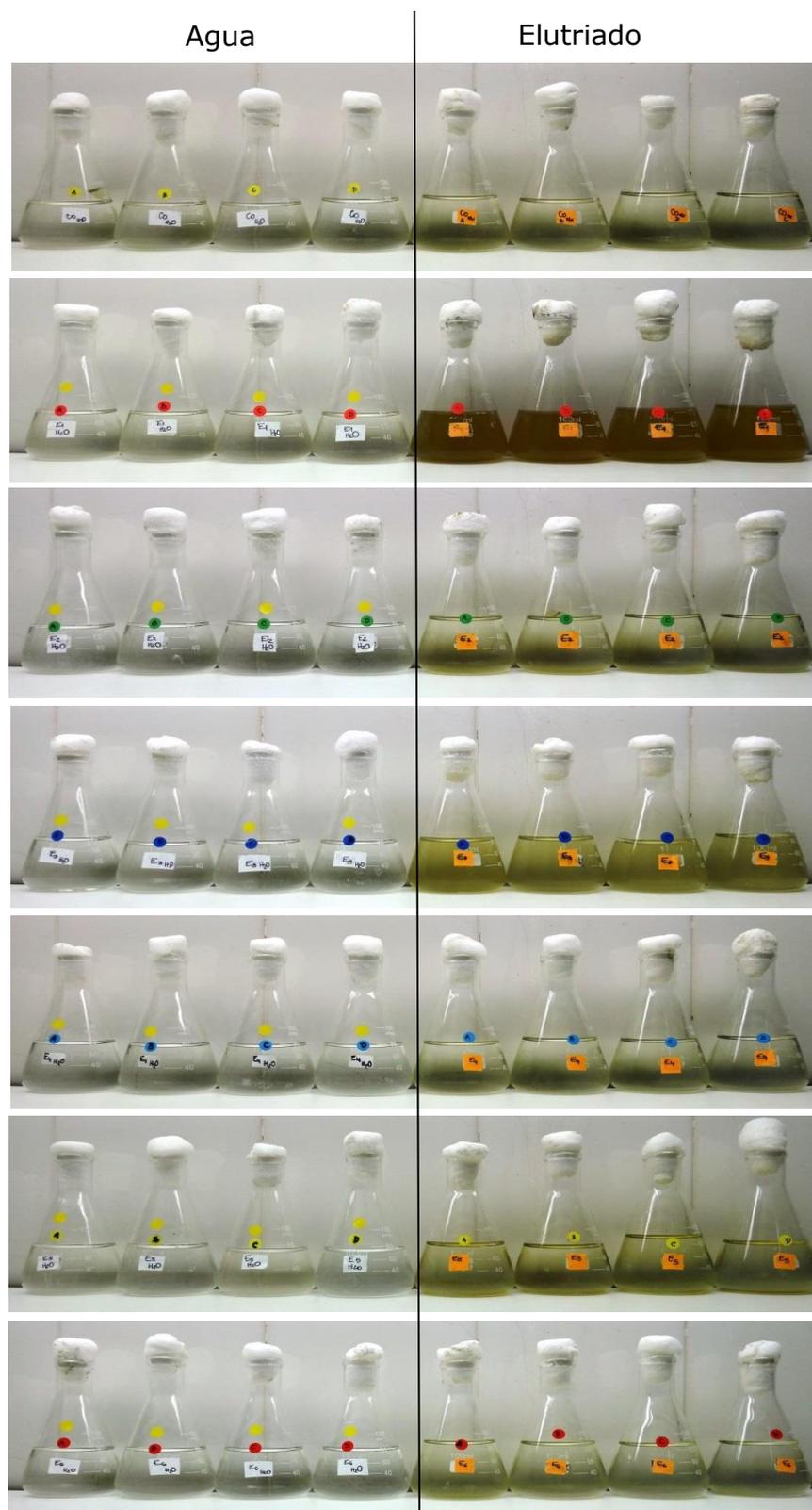


Clorofila "a"



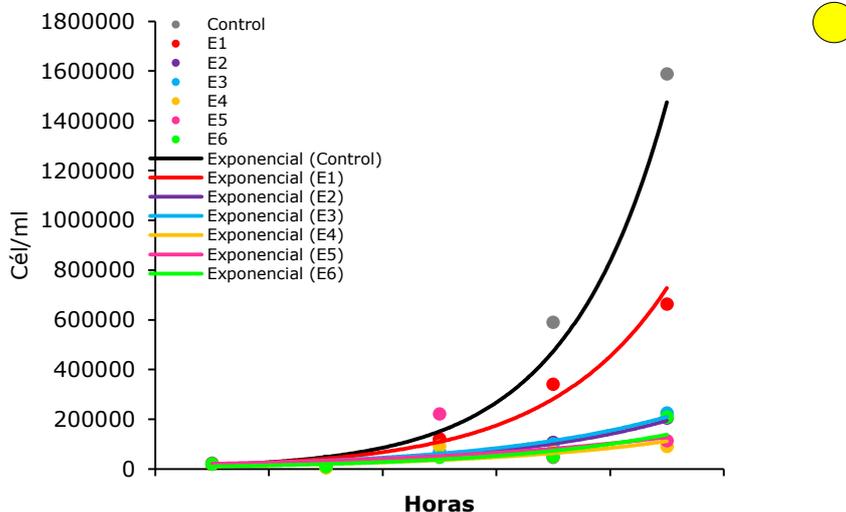
Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" los ensayos con elutriado del sedimento proveniente de todas las estaciones de monitoreo presentaron una respuesta de crecimiento menor al control, siendo muy baja en para los ensayos de las estaciones E1 y E3.

5.2.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario

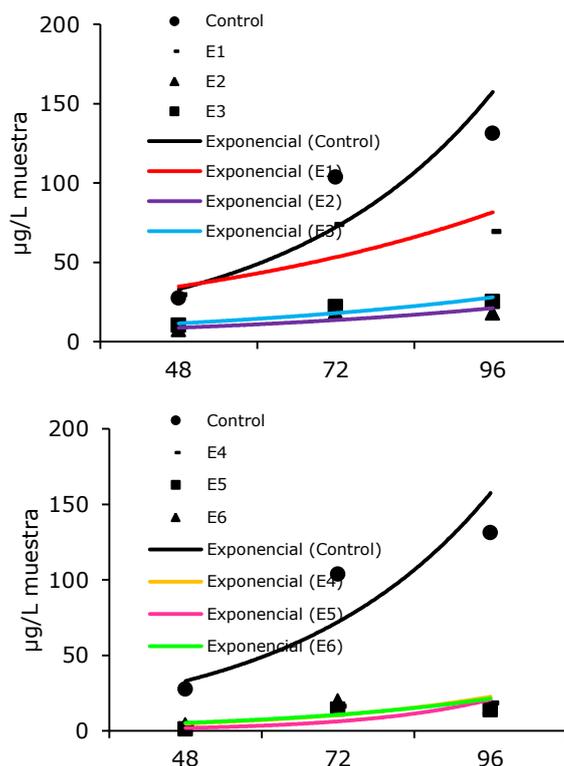


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 2°M-sep'15

Densidad celular



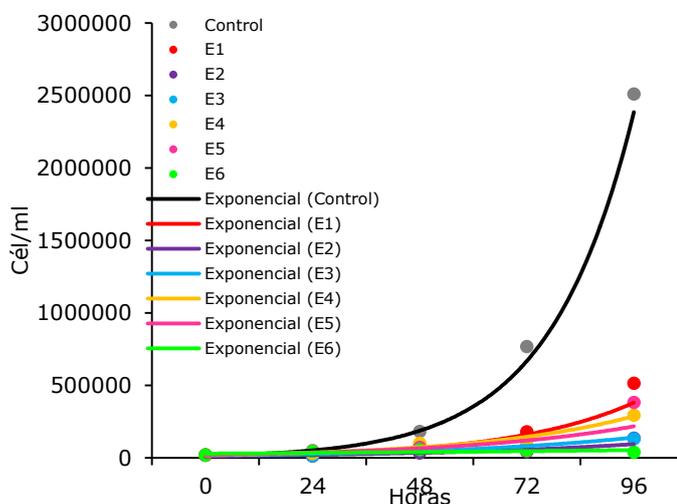
Clorofila "a"



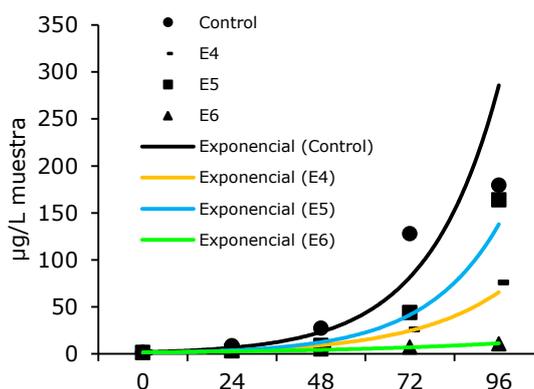
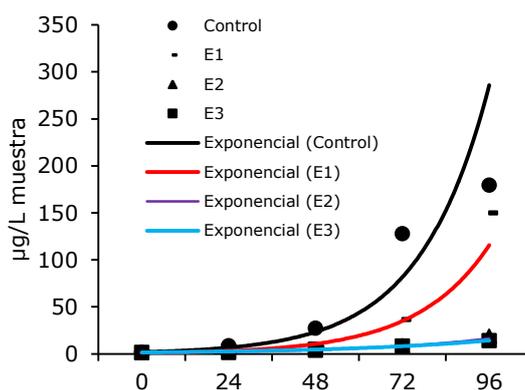
Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" se observó una respuesta de crecimiento menor al control en los bioensayos con agua proveniente de todas las estaciones de muestreo, presentando E1 los valores más cercanos al control mientras que las restantes estaciones mostraron un crecimiento considerablemente menor.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 2°M-sep'15

Densidad celular



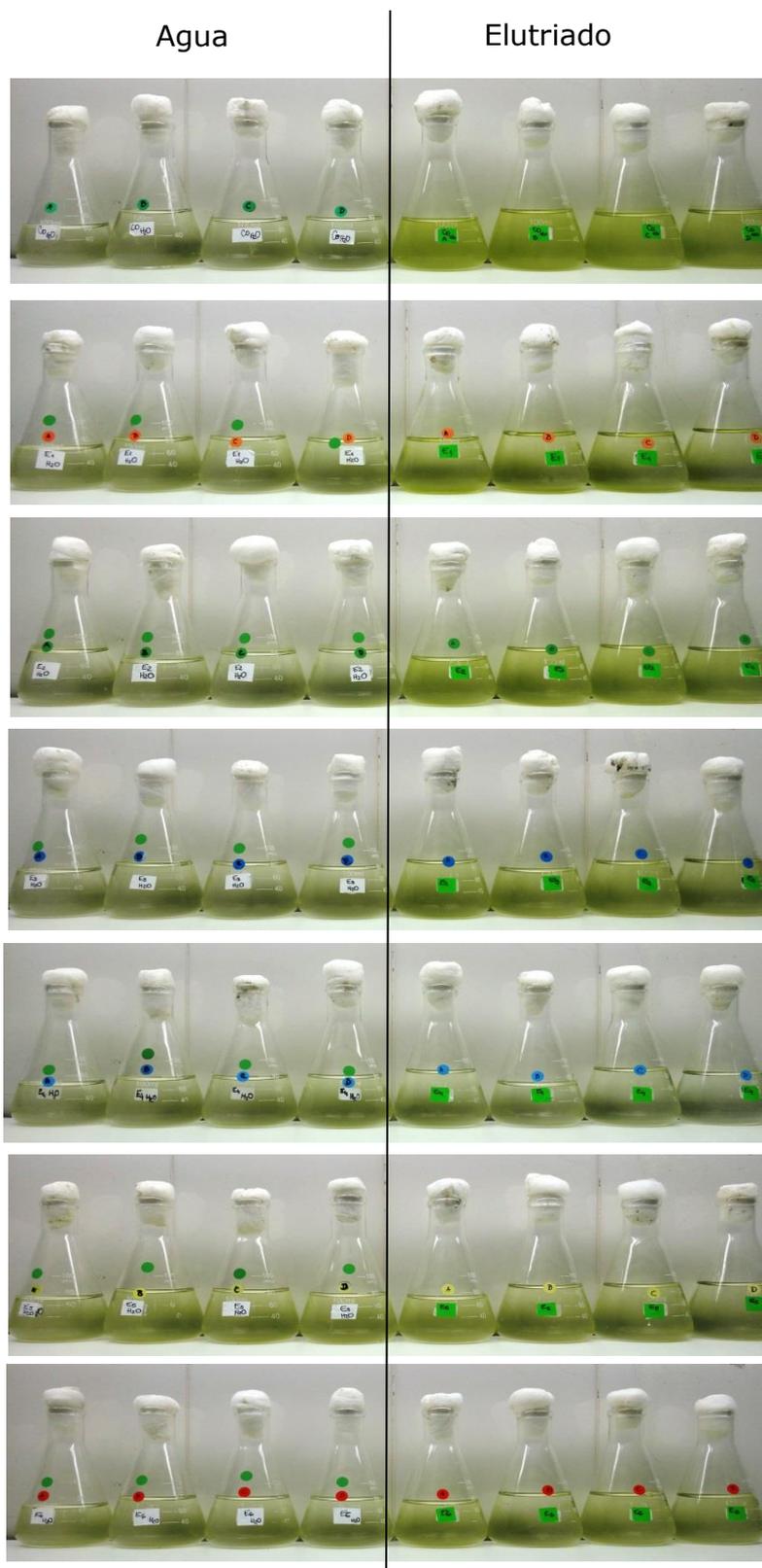
Clorofila "a"



Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" se pudo observar que los ensayos con elutriado del sedimento de todas las estaciones de monitoreo presentaron un crecimiento muy por debajo del control.

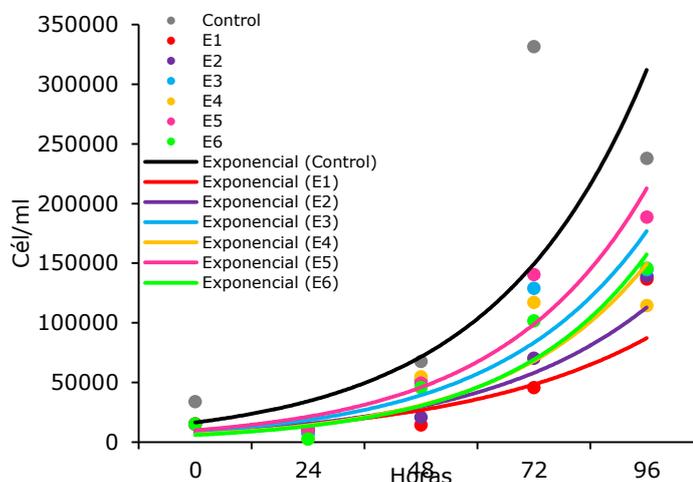
5.3. Tercer muestreo (3°M-dic'15)

5.3.1. Bioensayos con *Tetraselmis suecica* en agua y elutriado del sedimento del estuario

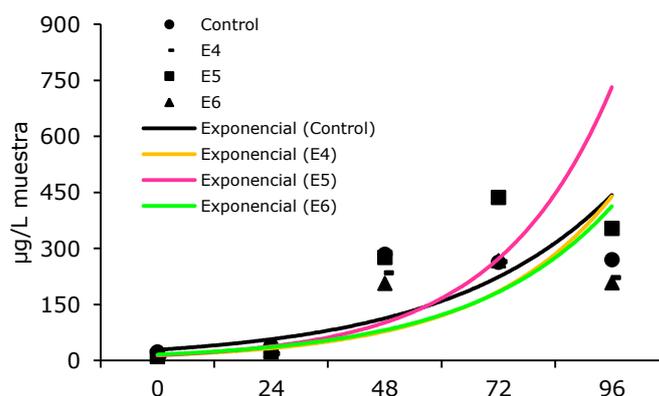
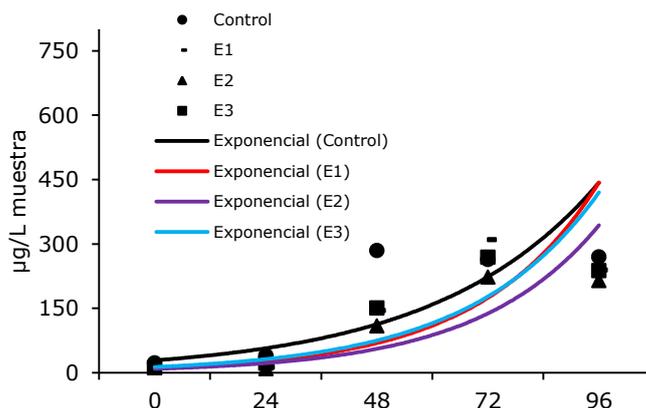


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15

Densidad celular



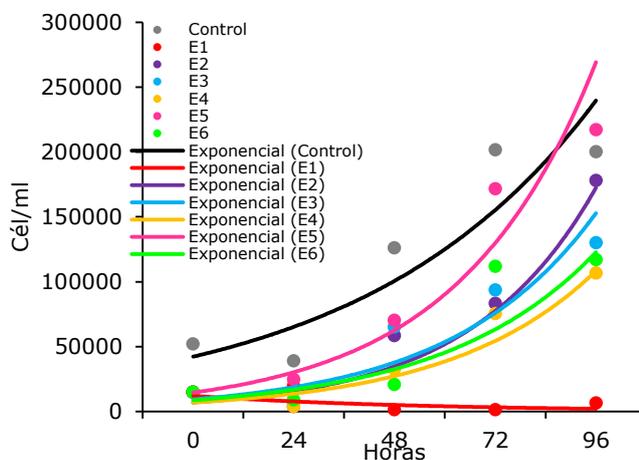
Clorofila "a"



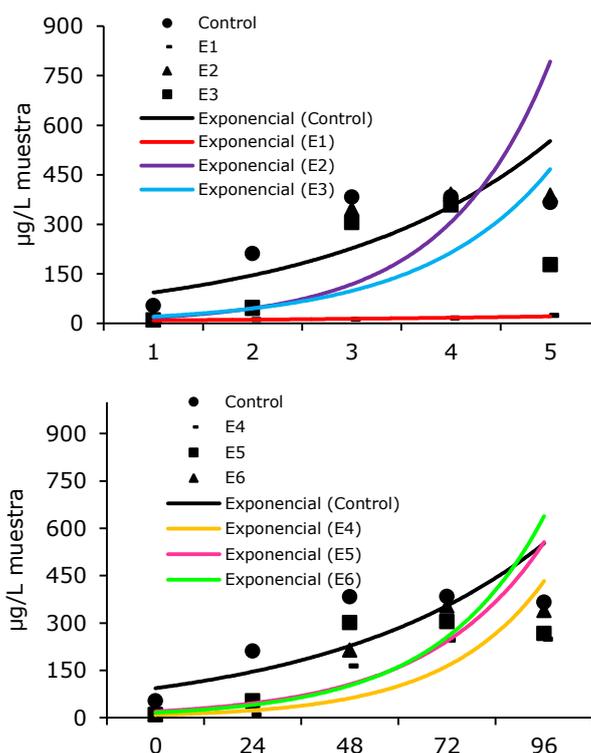
Al considerar la densidad celular se pudo observar que los ensayos con agua proveniente de todas las estaciones de muestreo presentaron un crecimiento menor al control. Al considerar la concentración de clorofila "a", si bien se observó una respuesta de crecimiento similar, los ensayos con agua proveniente de la estación E5 presentaron un crecimiento superior al control.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15

Densidad celular



Clorofila "a"



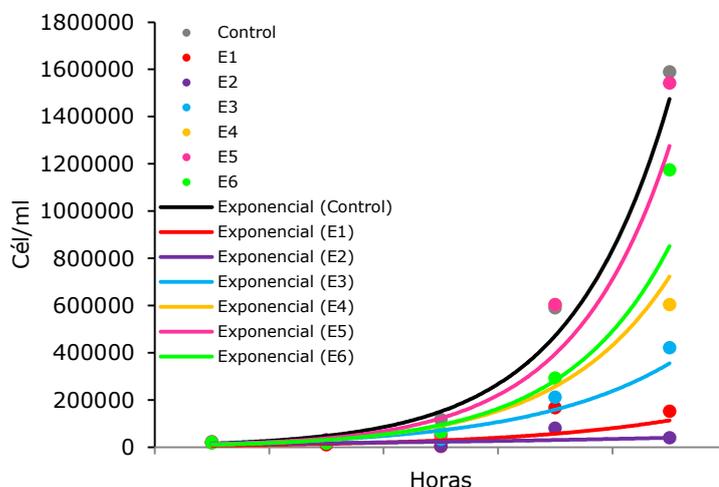
Al considerar la densidad celular, con excepción de los ensayos con elutriado de sedimentos provenientes de E5 que presentaron una mayor densidad de células que el control a la hora 96, los ensayos con elutriados de las restantes estaciones presentaron un crecimiento bajo, siendo éste marcadamente bajo en los elutriados de E1. Al considerar la concentración de clorofila "a" se observaron ligeras diferencias, presentando los ensayos con elutriados de E2 y E6 una mayor concentración de clorofila que el control a la hora 96, si bien la curva de clorofila para elutriados de E1 también fue marcadamente baja.

5.3.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario

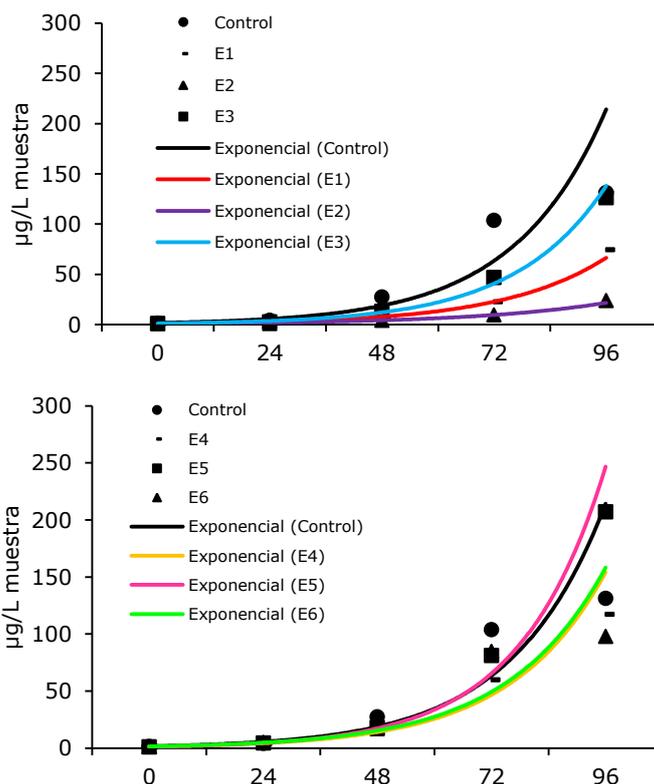


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15

Densidad celular



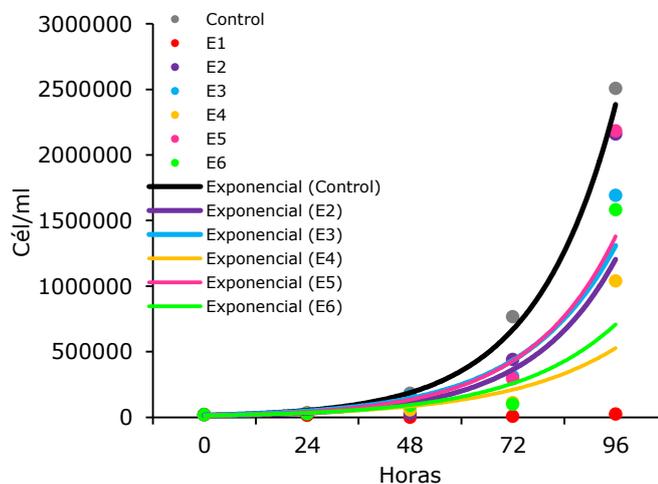
Clorofila "a"



Al considerar la densidad celular se observó que los ensayos con agua proveniente de todas las estaciones de muestreo presentaron una respuesta de crecimiento menor al control, siendo especialmente baja en aguas de E1 y E2. Al considerar la concentración de clorofila "a" se observó una respuesta similar, sólo que los ensayos con agua de E5 presentaron una curva de crecimiento superior al control.

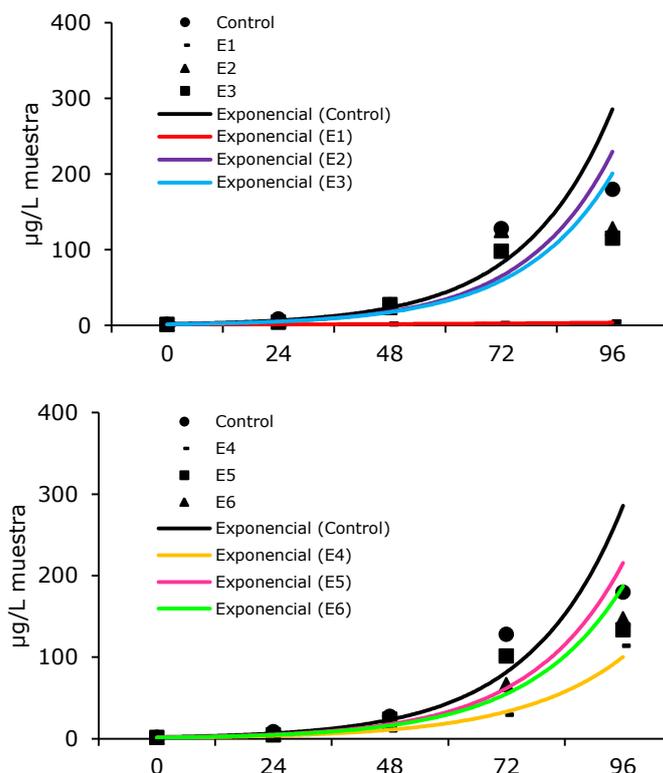
Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15

Densidad celular



* No hay línea de tendencia exponencial para E1, porque la abundancia cayó a cero a las 48 horas y después fue muy baja.

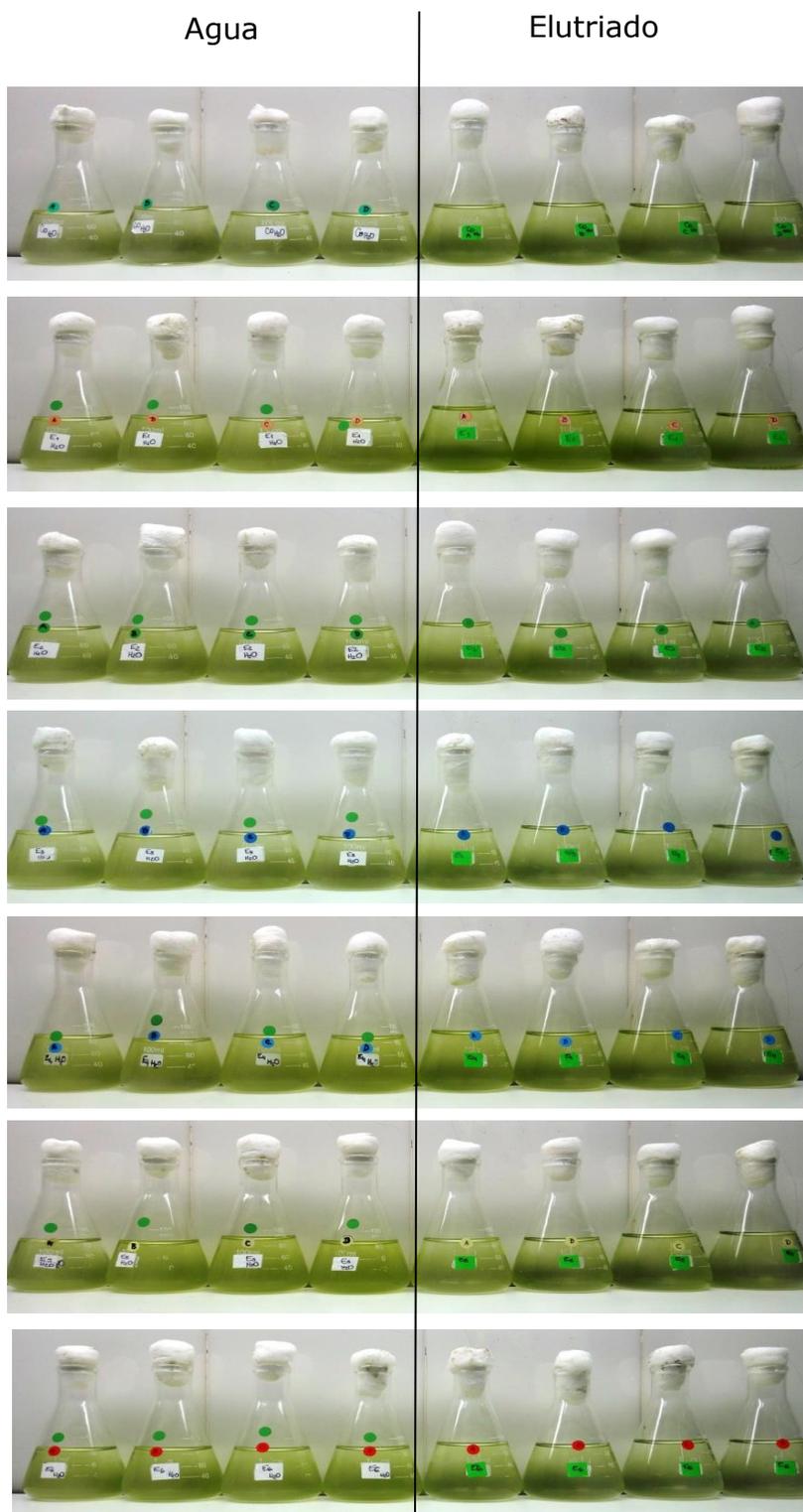
Clorofila "a"



Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" se observó que los ensayos con elutriado de sedimentos provenientes de todas las estaciones presentaron un crecimiento menor al control, siendo especialmente bajo en los elutriados de E1.

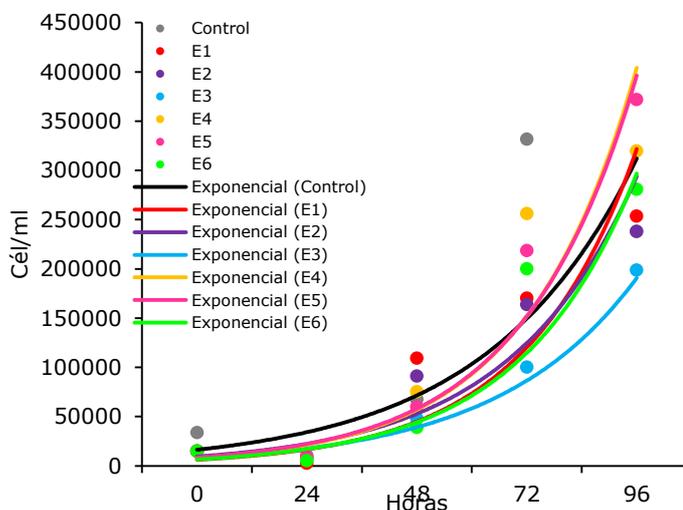
5.4. Cuarto muestreo (4°M-mar'16)

5.4.1. Bioensayos con *Tetraselmis suecica* en agua y elutriado del sedimento del estuario

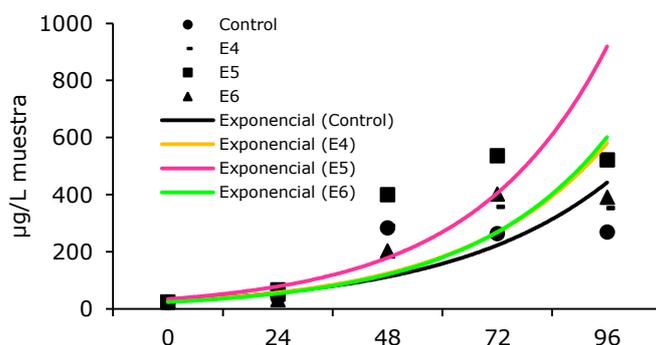
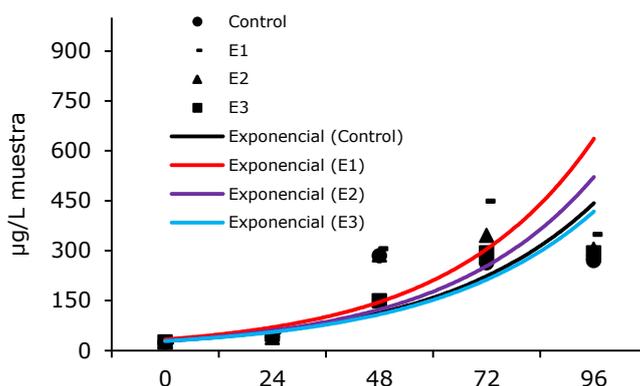


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16

Densidad celular



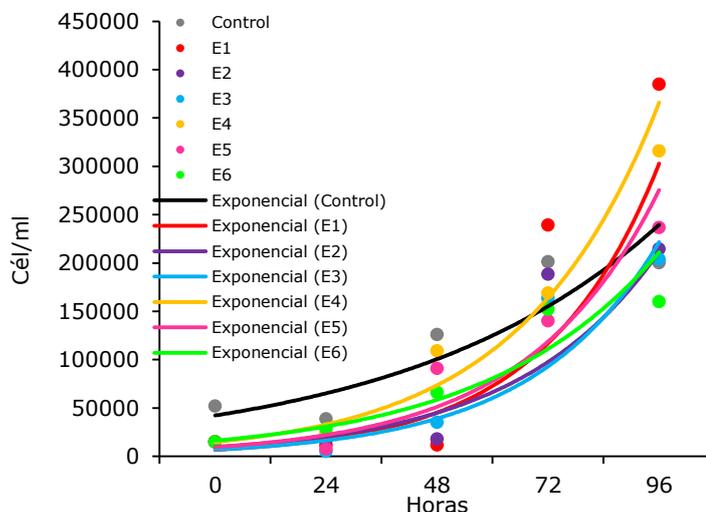
Clorofila "a"



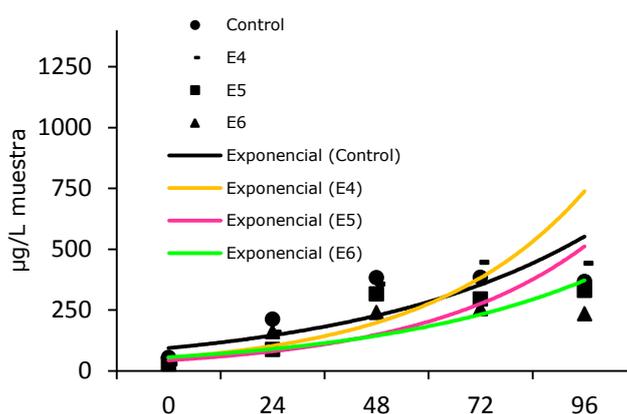
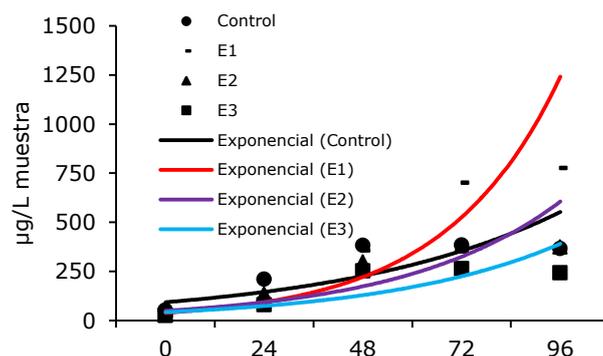
Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" los ensayos con agua proveniente de todas las estaciones de muestreo presentaron una respuesta de crecimiento muy similar al control, si bien considerando la densidad celular las curvas se encontraron ligeramente por debajo del control y considerando la clorofila ligeramente por encima.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16

Densidad celular

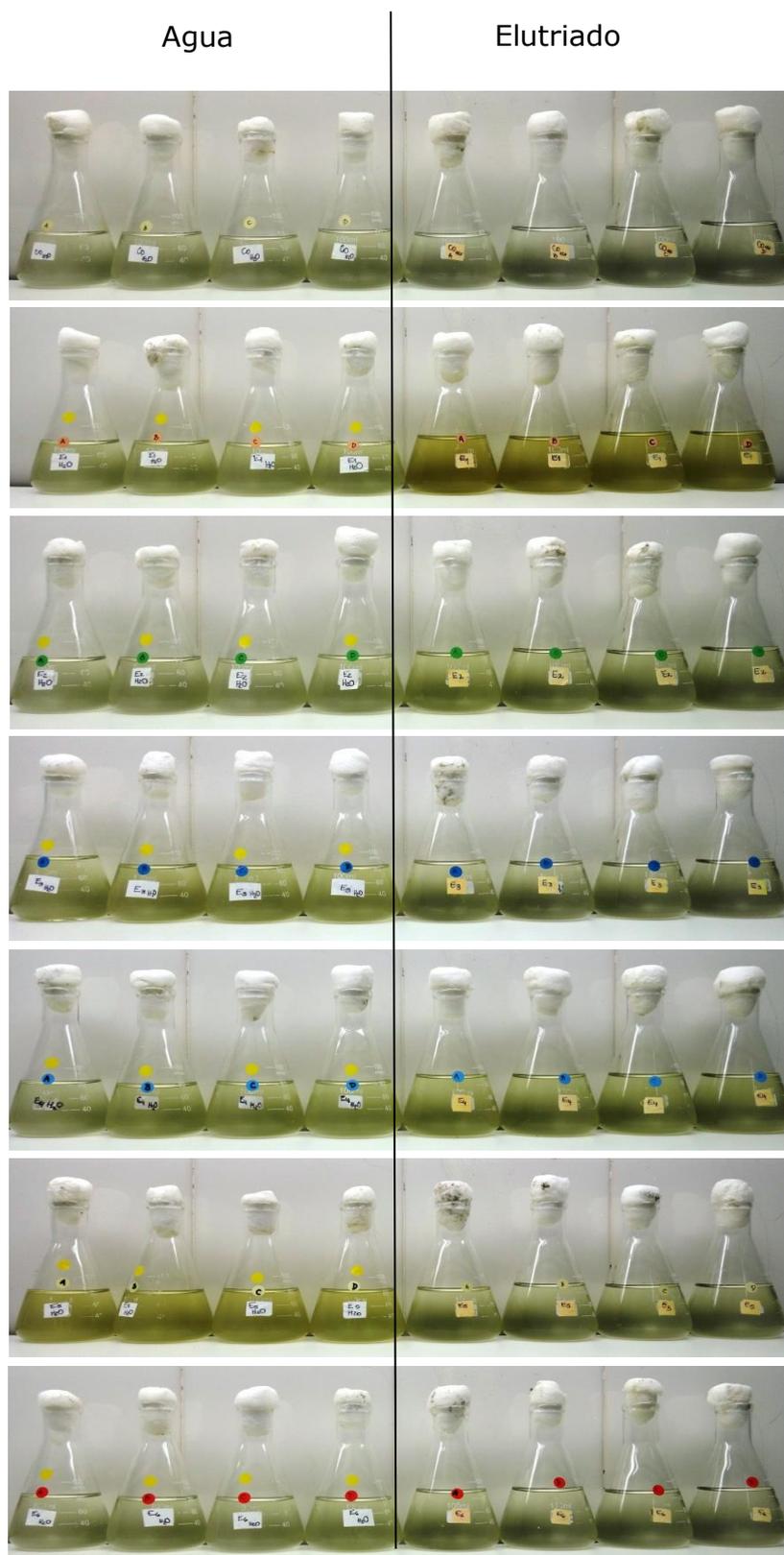


Clorofila "a"



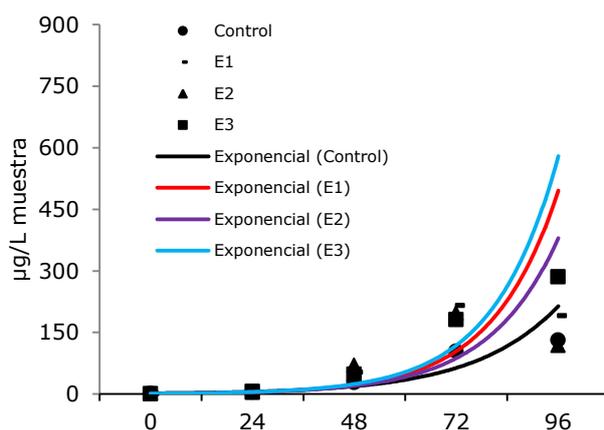
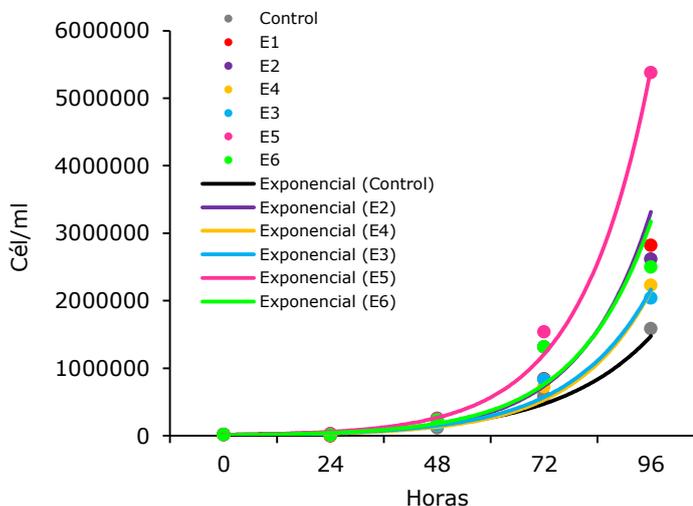
Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" los bioensayos con elutriado de sedimentos provenientes de todas las estaciones de muestreo presentaron curvas similares al control, si bien para las estaciones E1, E4 y E5 se observaron valores ligeramente superiores a la hora 72 y 96.

5.4.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario

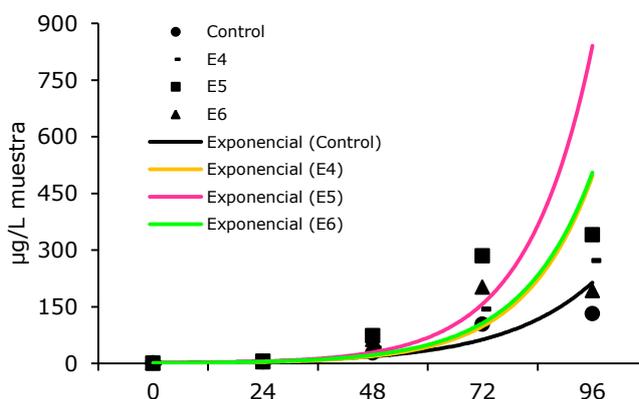


Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16

Densidad celular



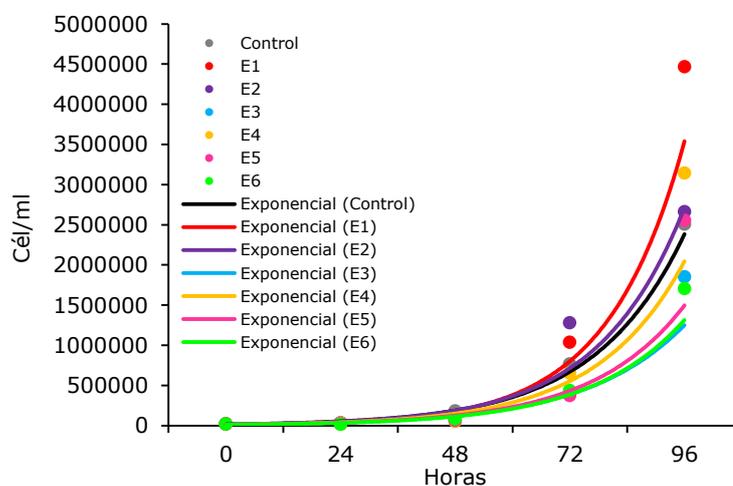
Clorofila "a"



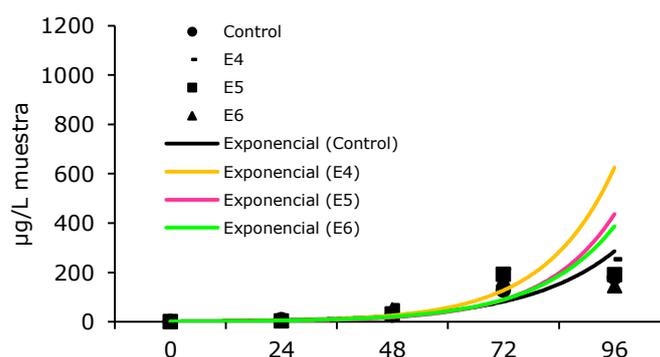
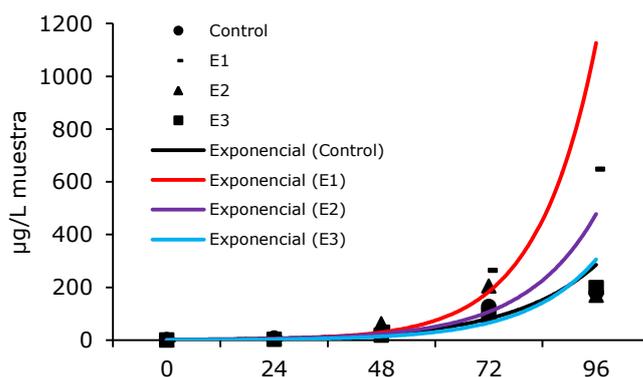
Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" se observó una respuesta de crecimiento mayor en los ensayos con agua proveniente de todas las estaciones de muestreo con respecto al control, presentando E5 el mayor crecimiento.

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16

Densidad celular



Clorofila "a"



Al considerar tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" los ensayos con elutriado proveniente de todas las estaciones de monitoreo presentaron una respuesta de crecimiento similar al control, aunque considerando la densidad sólo E1 y E2 presentaron curvas por encima de la curva del control mientras que al considerar la clorofila todas las estaciones presentaron curvas ligeramente por encima de la del control.

6. Estado fisiológico de las microalgas

En los ensayos control con ambas especies de microalgas siempre se hallaron regresiones significativas positivas entre la densidad de microalgas y el contenido de clorofila "a", lo cual resulta esperable ya que el contenido de clorofila "a" es un estimador de la biomasa celular.

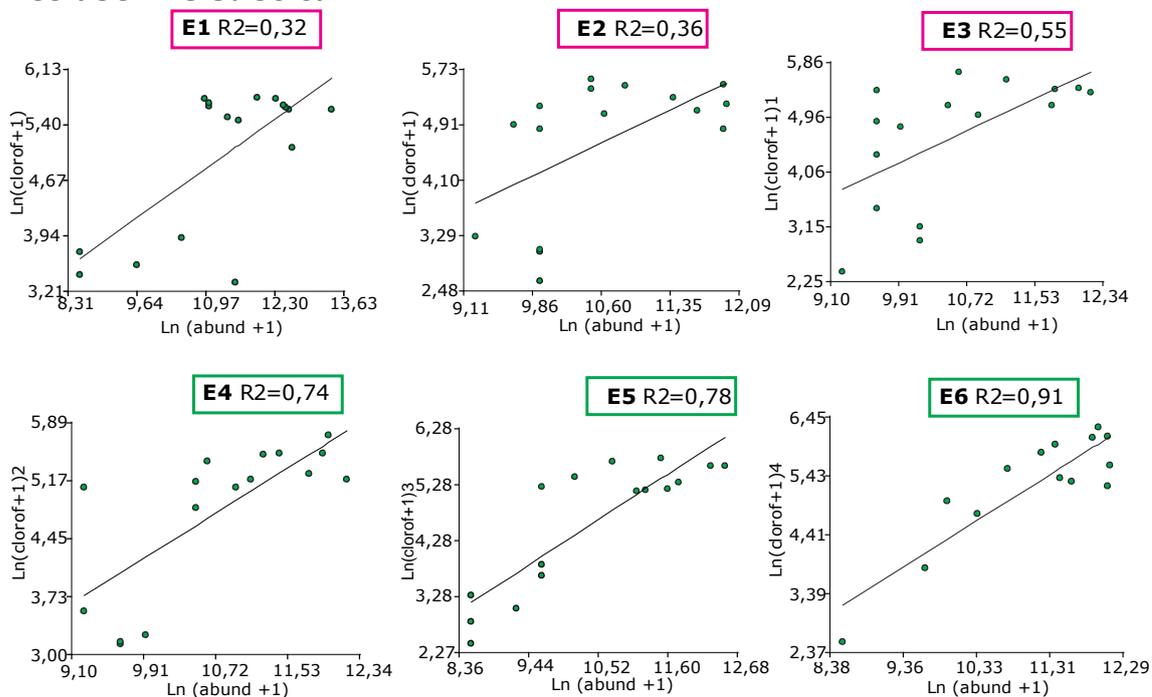
Sin embargo, en algunas oportunidades durante el desarrollo de los bioensayos se observó una falta de regresión entre estas dos variables, este desacople podría indicar una sensibilidad en el estado fisiológico de las microalgas. Hernández et al. (2011) han señalado que un debilitamiento del estado fisiológico podría estar provocado bien por la presencia de contaminantes específicos o por la mezcla de los mismos en el medio evaluado.

Este desacople también se pudo observar en las curvas de crecimiento presentadas en el punto anterior de esta misma sección, ya que en muchos casos hubo diferencias marcadas entre las curvas obtenidas al graficar los valores de los recuentos celulares y los valores de clorofila "a" a lo largo del ensayo.

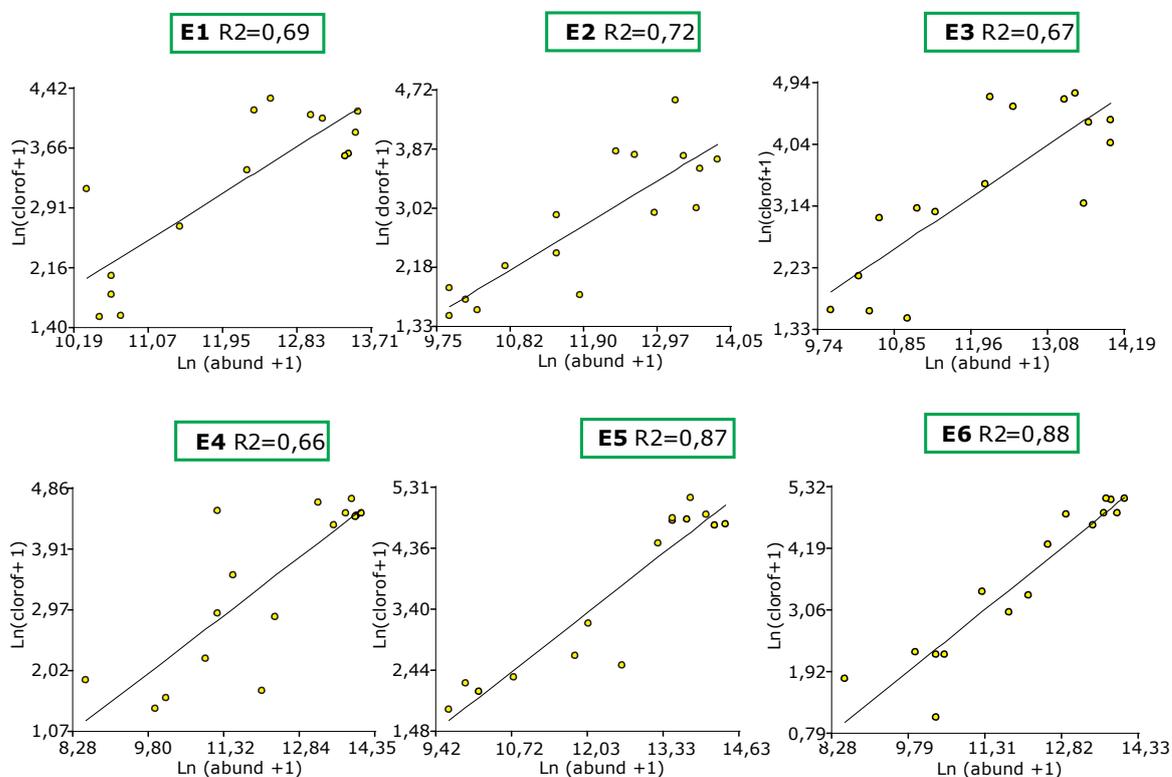
Como se ha señalado, el contenido de clorofila "a" depende directamente del contenido de elementos biogénicos en el agua (Zhuravel et al. 2009). Por ello, esta característica es más sensible al efecto de contaminantes en comparación con el número de células.

6.1.2. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15

Tetraselmis suecica

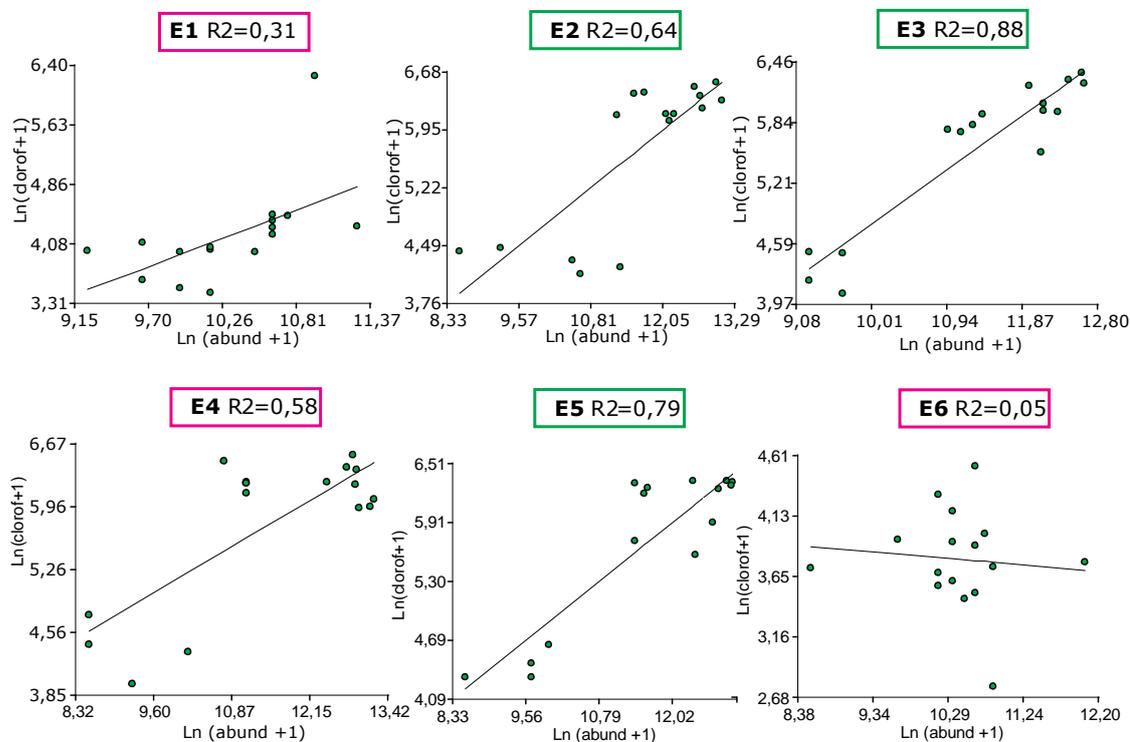


Nitzschia aff. kuetzingioides

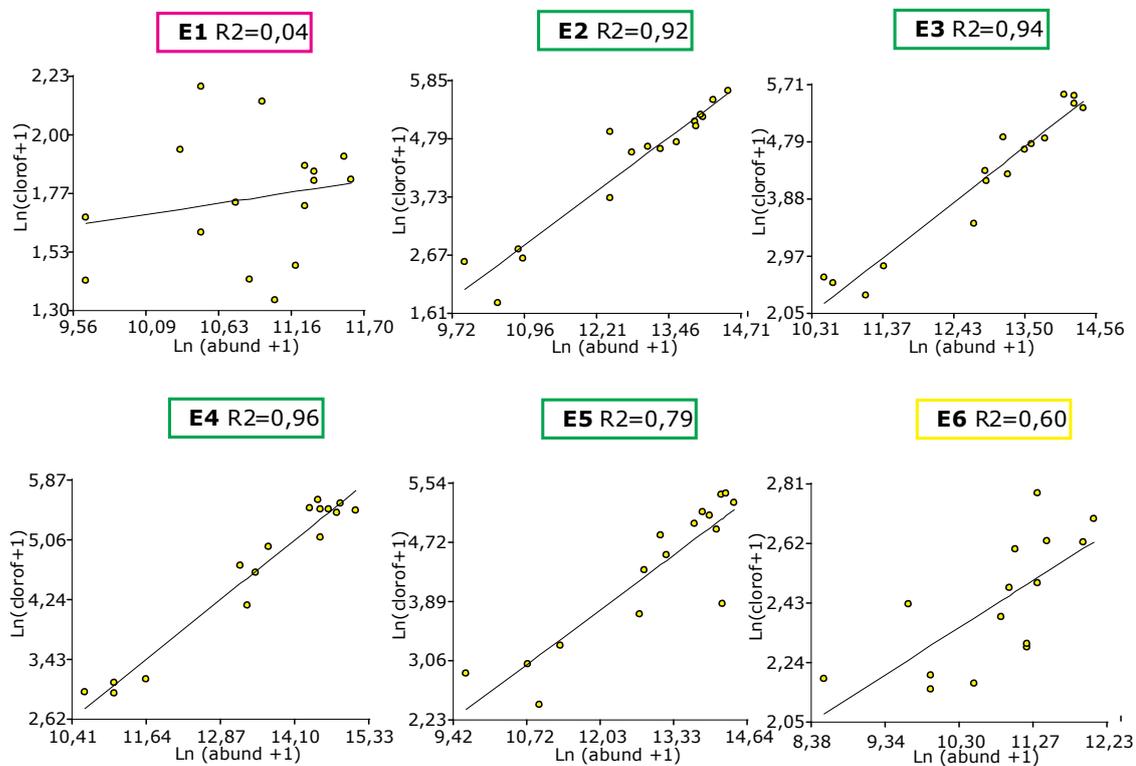


6.1.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 1°M-jun'15

Tetraselmis suecica

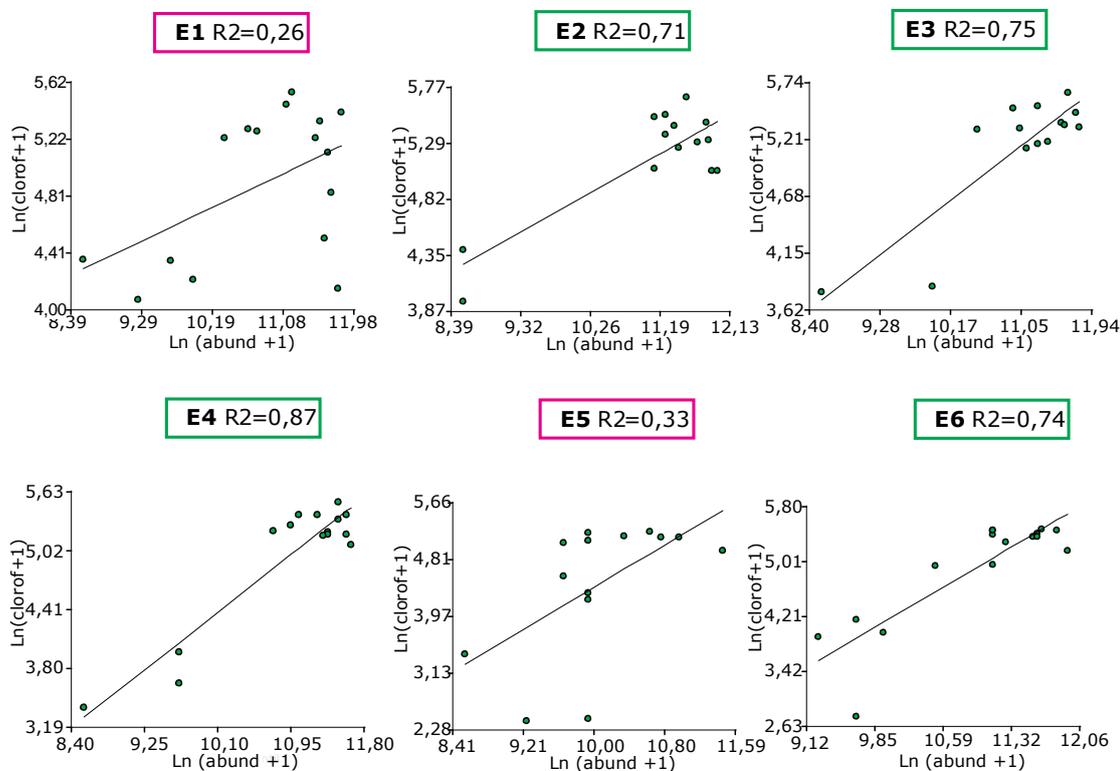


Nitzschia aff. kuetzingioides

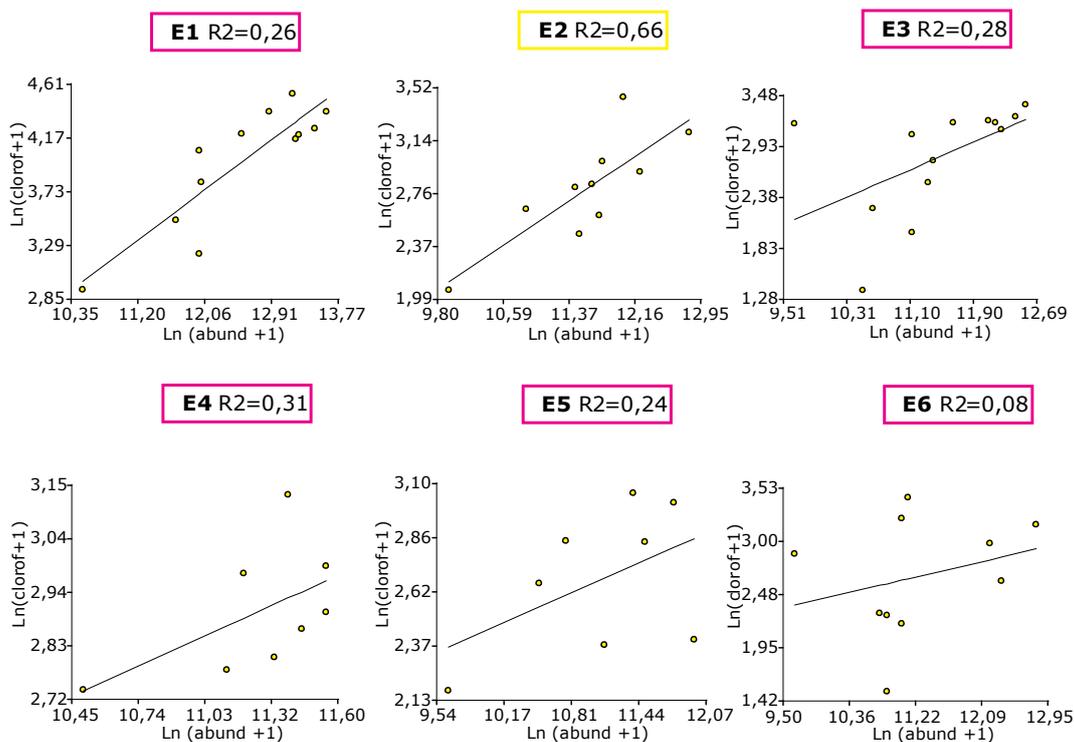


6.1.4. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep'15)

Tetraselmis suecica

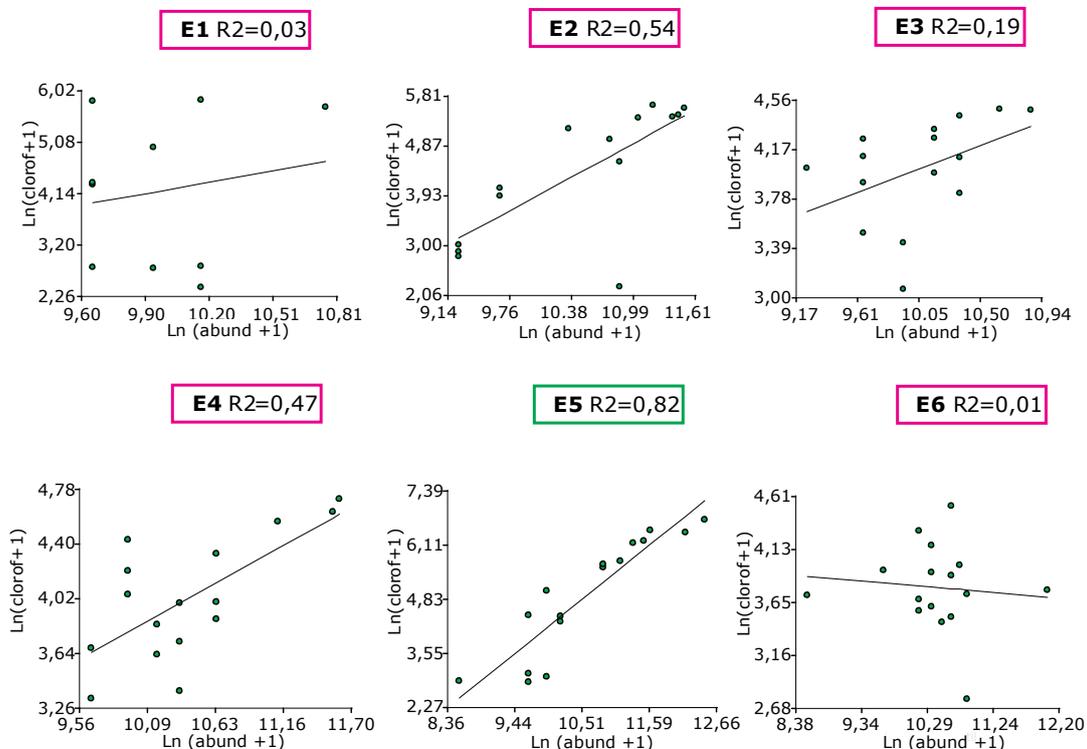


Nitzschia aff. kuetzingioides

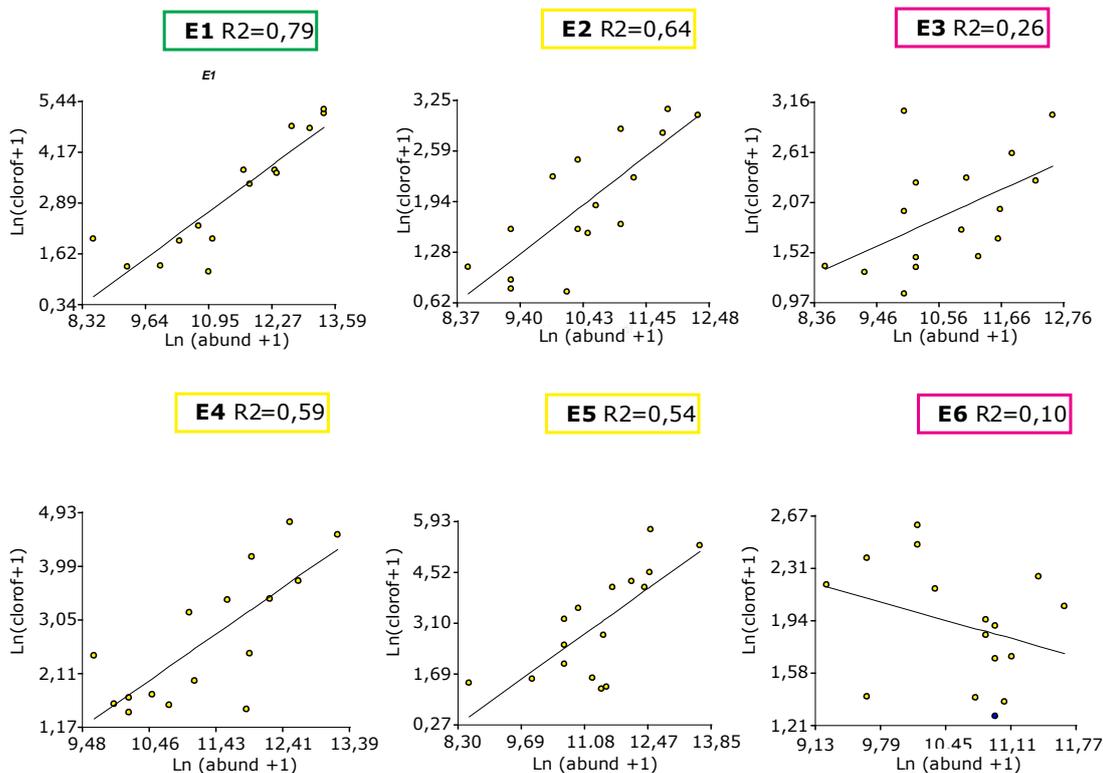


6.1.5. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 2°M-sep'15

Tetraselmis suecica

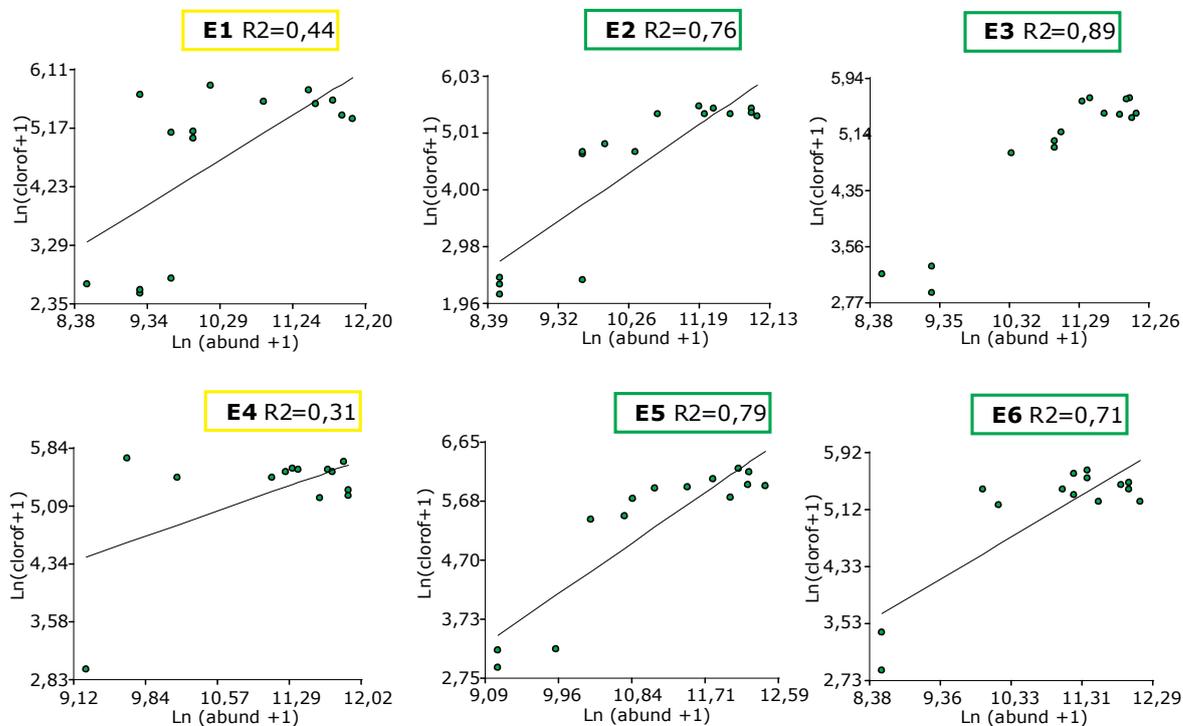


Nitzschia aff. kuetzingioides

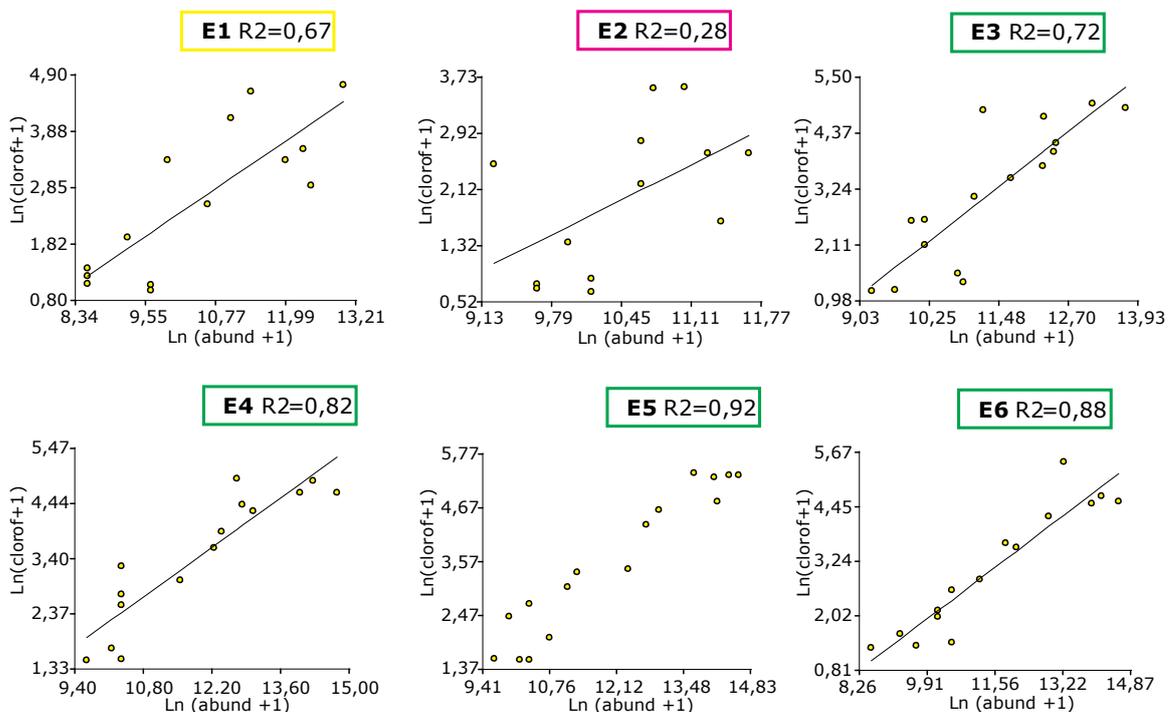


6.1.6. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15

Tetraselmis suecica

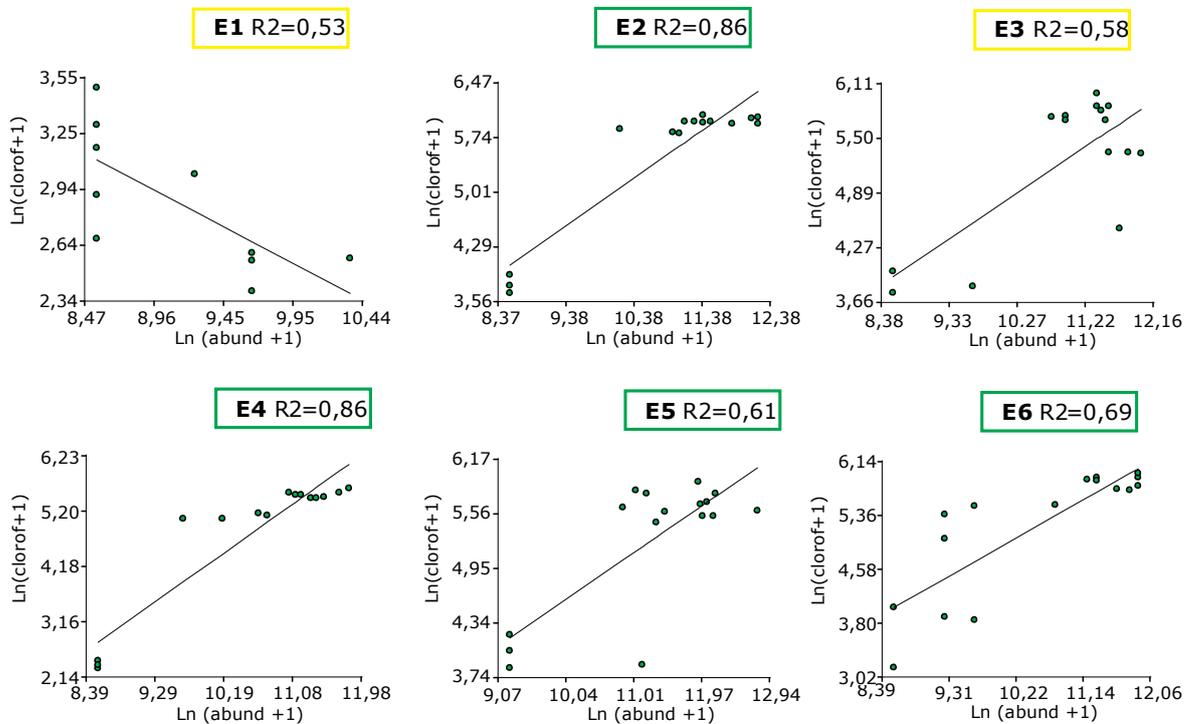


Nitzschia aff. kuetzingioides

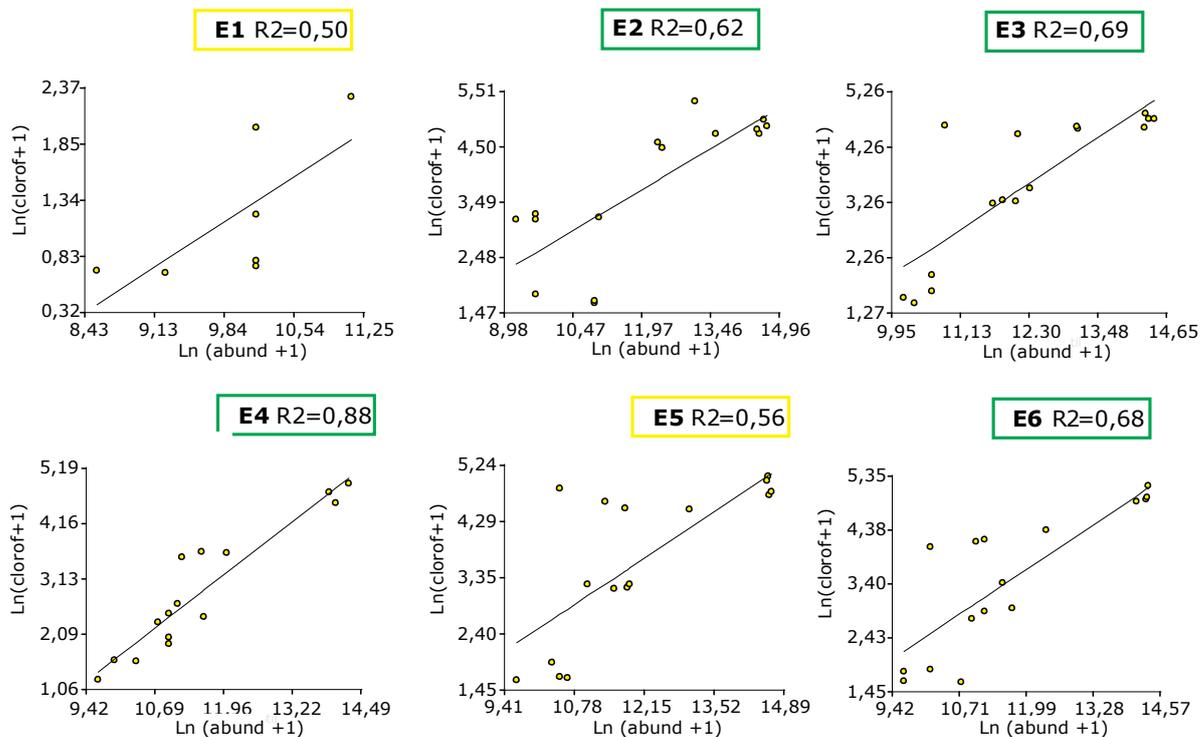


6.1.7. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 3°M-dic'15

Tetraselmis suecica

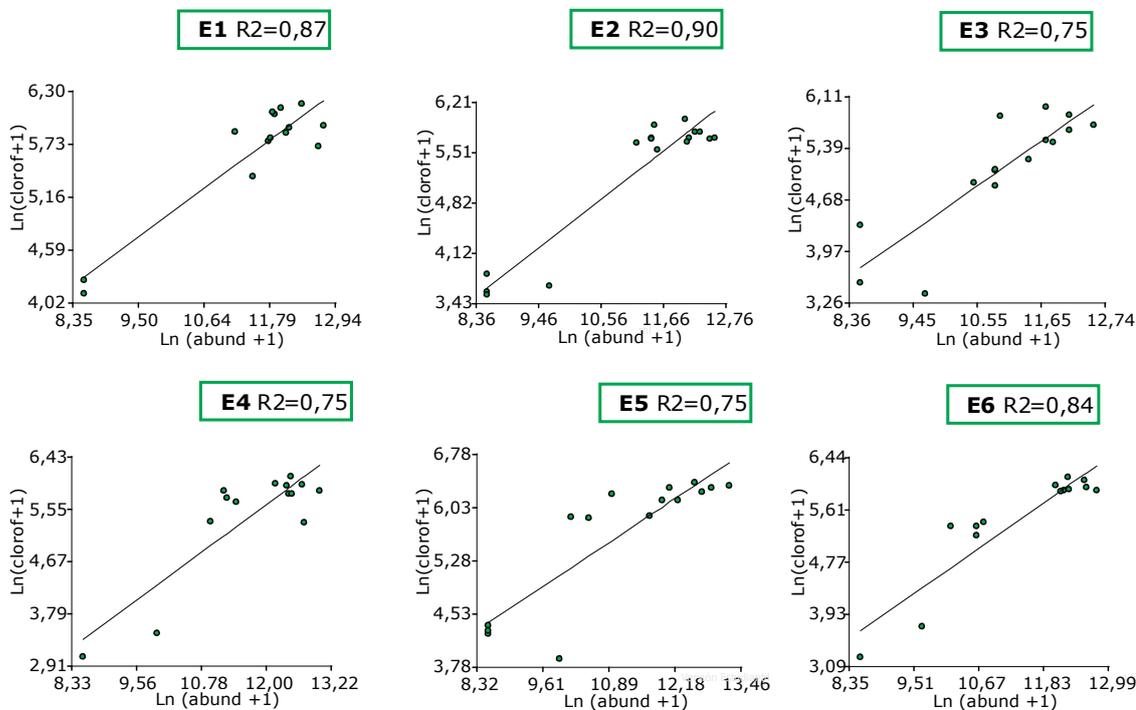


Nitzschia aff. kuetzingioides

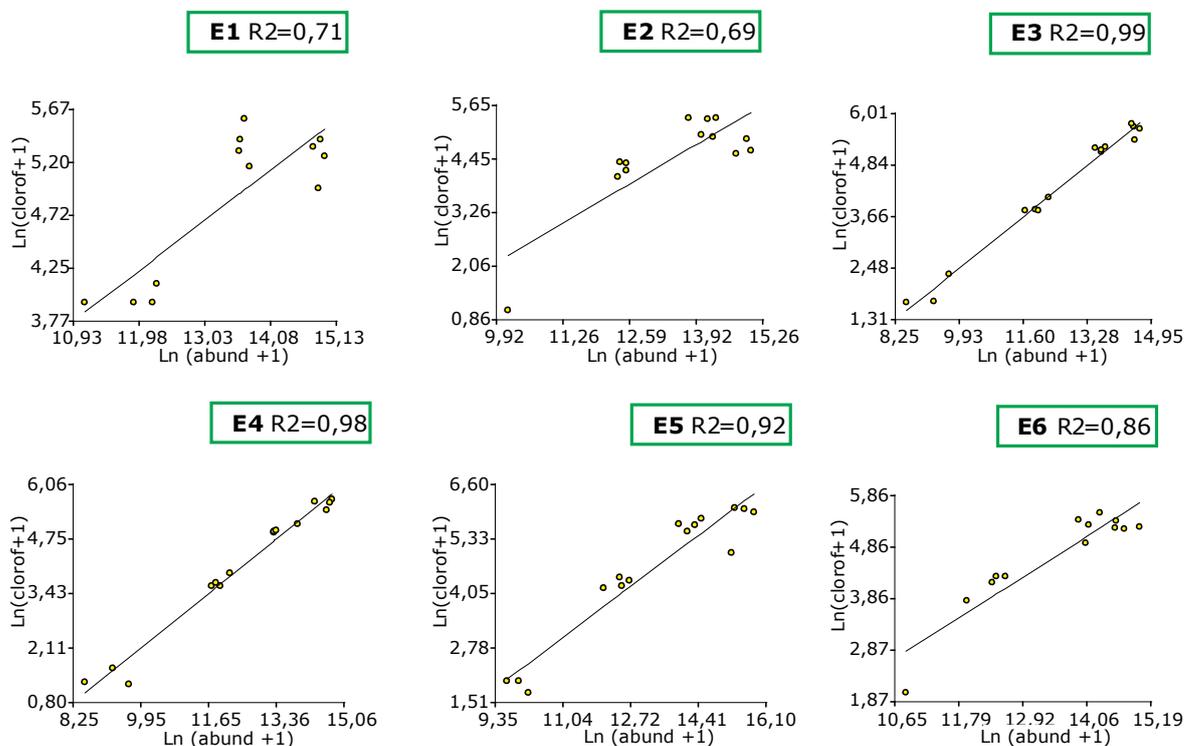


6.1.8. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16

Tetraselmis suecica

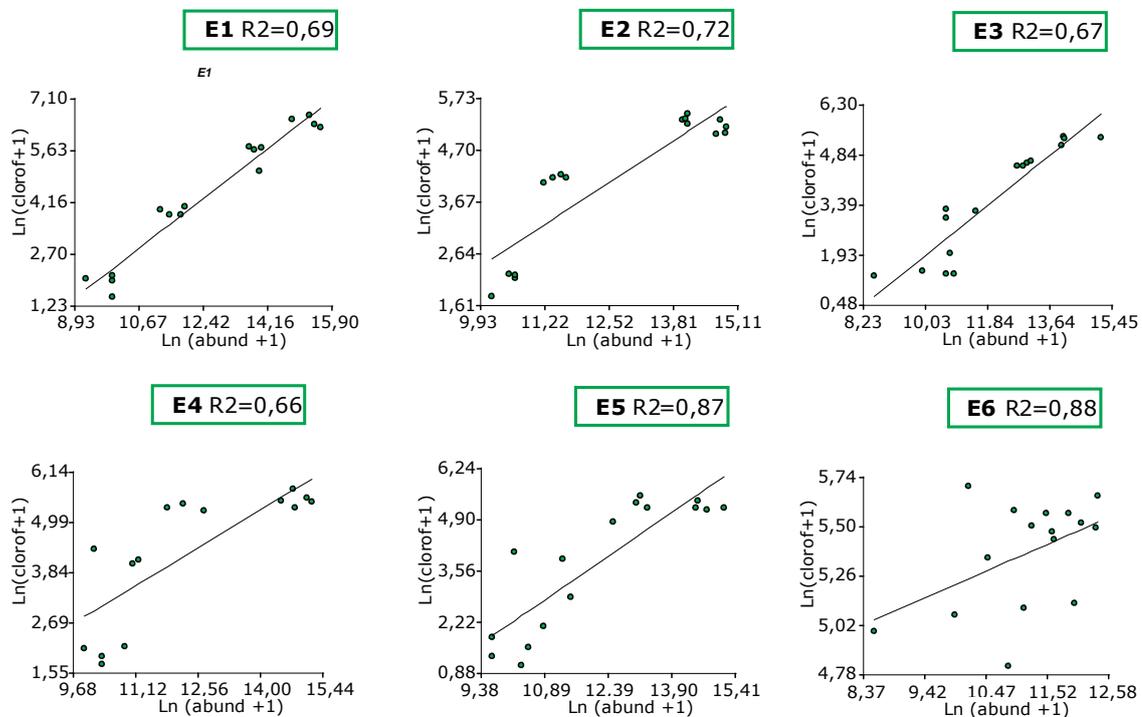


Nitzschia aff. kuetzingioides

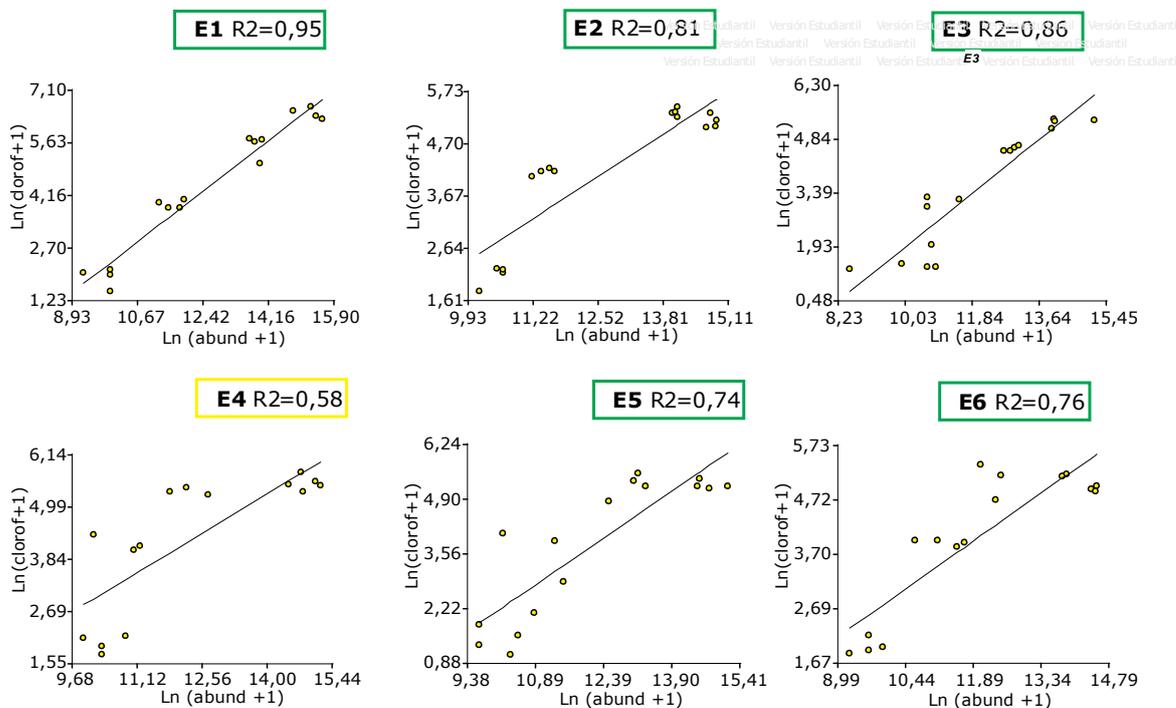


6.1.9. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo 4°M-mar'16

Tetraselmis suecica



Nitzschia aff. kuetzingioides



7. Evaluación del estado fisiológico de las poblaciones de microalgas evaluadas

Este análisis se basó en la regresión entre las dos variables evaluadas durante los bioensayos: densidad celular – clorofila “a”. La falta de regresión entre ambas variables se podría interpretar como la existencia de una situación problemática en el estado fisiológico o morfo-fisiológico de las microalgas evaluadas.

Muestreo (1°M-jun'15)

Se observó una falta de regresión en las estaciones:

E1: para *T. suecica* en los bioensayos con agua y elutriado y para *N. aff. kuetzingioides* en los bioensayos con elutriado;

E2 y E3: para *T. suecica* en los bioensayos en agua;

E4: para *T. suecica* en los bioensayos en elutriado;

E6: para *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* en los bioensayos con elutriado.

Muestreo (2°M-sep'15)

Se observó un patrón llamativo, con una falta de regresión entre las dos variables en casi todos los sitios de muestreo:

E1: en los bioensayos con *T. suecica* tanto en agua como en elutriado;

E3: en los bioensayos con *N. aff. kuetzingioides* en agua y elutriado y *T. suecica* en elutriado;

E4: en los bioensayos de *N. aff. kuetzingioides* en agua y *T. suecica* en elutriado;

E5: en los bioensayos de *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* en agua;

E6: en los bioensayos de *N. aff. kuetzingioides* en agua y elutriado y *T. suecica* en elutriado.

Muestreo (3°M-dic'15)

Se observó una regresión no significativa para los sitios:

E2: en los bioensayos con *N. aff. kuetzingioides* en agua;

E3: en los bioensayos con *T. suecica* en elutriado;

E6: en los bioensayos con *T. suecica* en elutriado.

Muestreo (4°M-mar'16)

Durante este muestreo no se observó desacople entre la concentración de clorofila "a" y la densidad celular

En términos generales en el muestreo **(2°M-sep'15)** se observaron las menores densidades celulares y concentraciones de clorofila "a", mientras que en **(4°M-mar'16)** se observaron las mayores densidades y las mayores concentraciones de clorofila "a", esto coincide con el mayor desacople entre estas dos variables registrado en **(2°M-sep'15)** y el menor desacople en el muestreo **(4°M-mar'16)**.

Asimismo, en la estación **E1** se observó una mayor frecuencia de desacople entre la clorofila "a" y la densidad celular, lo cual coincide con el hecho de que en esta estación se registraron densidades celulares comparativamente bajas. Esto podría deberse a que los factores que afectaron el crecimiento poblacional estarían también influyendo en el estado fisiológico o morfofisiológico de las microalgas.

7.1. Representación gráfica del estado fisiológico de las poblaciones fitoplanctónicas evaluadas sobre la base de las variaciones de la relación densidad celular – clorofila "a" (R^2)

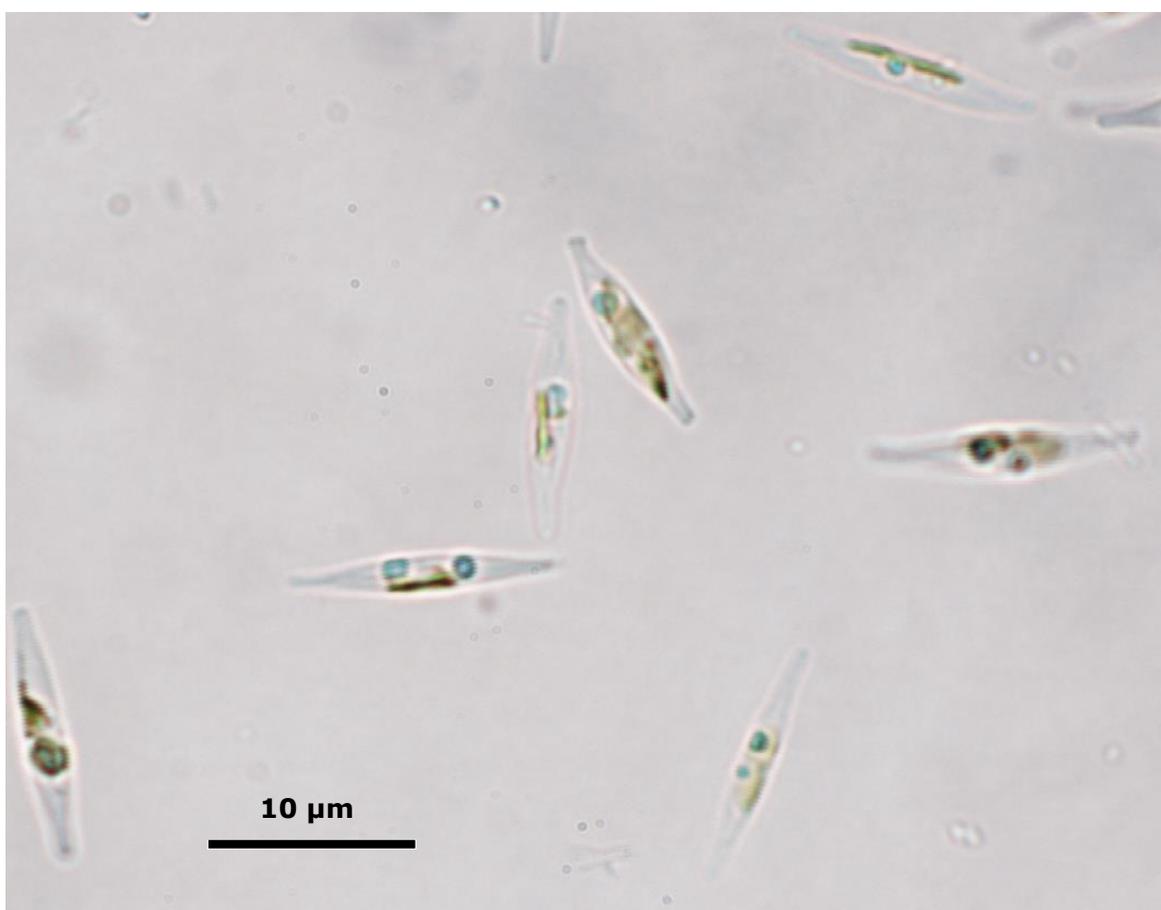
		1°M-jun'15		2°-sep'15		3°M-dic'15		4°M-mar'16	
		Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.
		C	<i>Tetraselmis suecica</i>	●	●	●	●	●	●
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	●	●	●	●	●	●	●	●
E1	<i>Tetraselmis suecica</i>	○	○	○	●	○	●	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	○	●	○	○	○	●	○	●
E2	<i>Tetraselmis suecica</i>	○	●	○	●	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	○	●	○	●	○	●	○	○
E3	<i>Tetraselmis suecica</i>	●	○	○	●	○	●	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	○	●	○	○	○	○	●	○
E4	<i>Tetraselmis suecica</i>	○	●	○	●	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	○	●	○	●	○	○	●	●
E5	<i>Tetraselmis suecica</i>	○	○	○	○	○	●	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	○	○	○	●	●	●	○	○
E6	<i>Tetraselmis suecica</i>	●	●	○	●	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	○	●	○	○	○	○	○	○

7.2. Alteraciones morfológicas observadas durante el estudio

La presencia de células anormales de diatomeas en una población o comunidad puede ser indicador de algún estrés ambiental como disminución de la calidad del agua (Gómez y Licursi, 2003) o contaminación química (Debenest et al., 2008).

Algunas alteraciones en el contorno de las valvas son transportadas mecánicamente durante la reproducción, dando lugar a toda una población con una morfología diferente a la de la línea parental (Hustedt, 1956) incidiendo en la calidad y disponibilidad de alimento para zooplancton y larvas de crustáceos y peces.

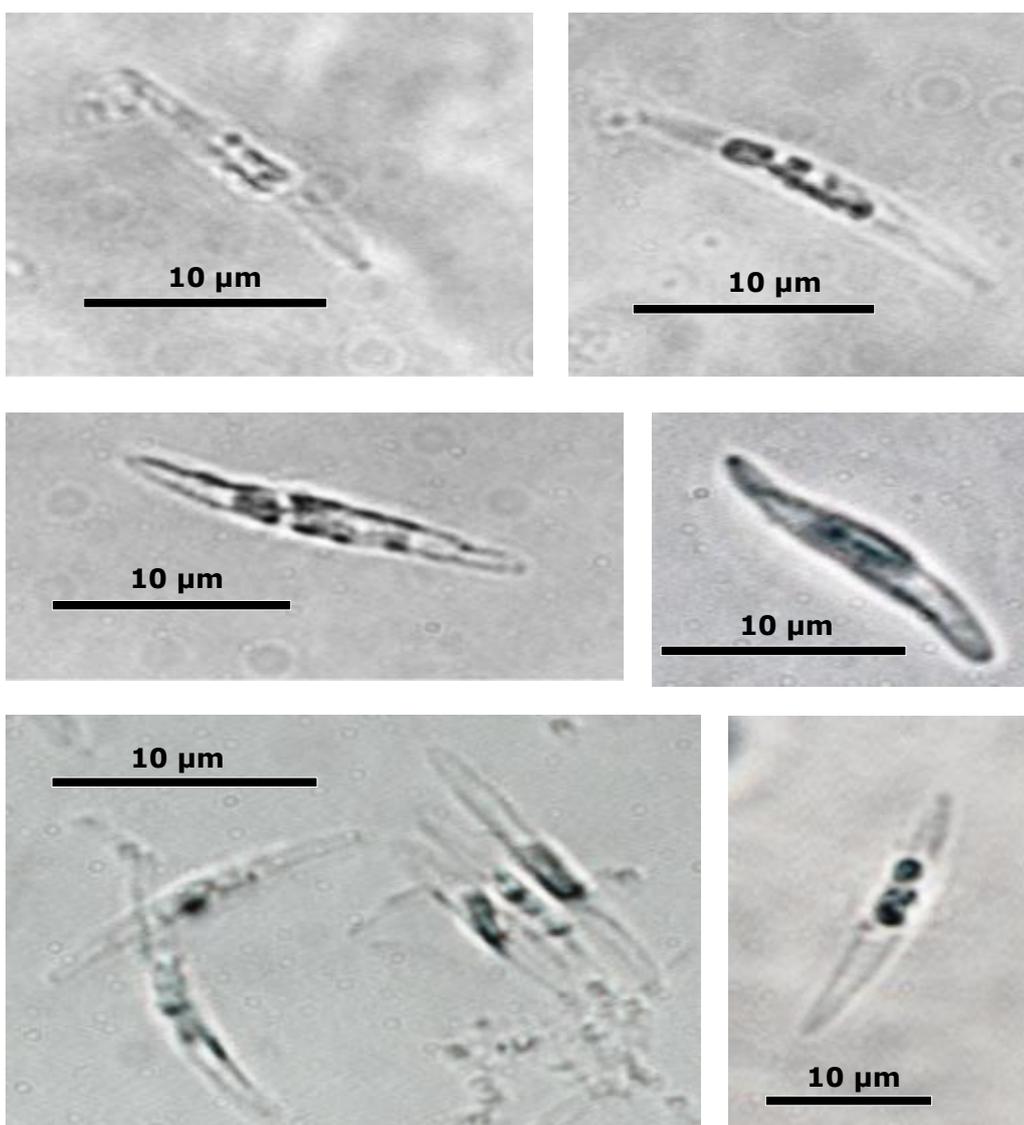
Aspecto normal de *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* en el cultivo control
(microscopía óptica)



7.3. Morfologías anómalas de las valvas de la diatomea *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*

Durante los recuentos celulares realizados con microscopio óptico al final de los bioensayos, tanto en agua como en elutriado del sedimento, se observaron diferencias en las formas y el contorno valvar de la diatomea.

Según Morin et al. (2007) una definida alteración morfológica en diatomeas podría considerarse como una herramienta válida para proporcionar una primera aproximación sobre la calidad del agua.



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:
Comparación entre estaciones de muestreo

8. Análisis de los resultados entre los cuatro muestreos (1°M-jun'15), (2°M-sep'15), (3°M-dic'15) y (4°M-mar'16)

Durante los bioensayos se analizaron:

- **Densidad** (n° ind.ml⁻¹)
- **Clorofila "a"** (mg.ml⁻¹)
- **Tasa de crecimiento** (día⁻¹)

8.1. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado de la estación E1

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,15	0,2915	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=7,59 Elutriado: F=34,86	<0,05 <0,01	* **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,27	0,6099	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=16,03 Elutriado: F=191,95	<0,05 <0,01	* **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=13,14	<0,05	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=9,18 Elutriado: F=34,07	<0,05 <0,01	* **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,21	0,6536	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=229,57 Elutriado: F=38,30	<0,01 <0,01	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,29	0,1405	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=23,98 Elutriado: F=136,10	<0,01 <0,01	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,53	0,2266	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=20,55 Elutriado: F=47,25	<0,01 <0,01	** **

Tabla 1: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos para la estación E1. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Tetraselmis suecica

Los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* tanto en **agua** como en **elutriado** en muestras provenientes de la Estación **E1**, no presentaron diferencias significativas al evaluar densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Sin embargo, la tasa de crecimiento celular de la microalga fue diferente al comparar los resultados obtenidos en los bioensayos con **agua** y **elutriado** del sedimento (Tabla 1). La tasa de crecimiento de *T.*

suecica durante el bioensayo en **elutriado** del sedimento fue considerablemente menor, no superando el valor medio de $0,34 \text{ día}^{-1}$ (Fig. 1a).

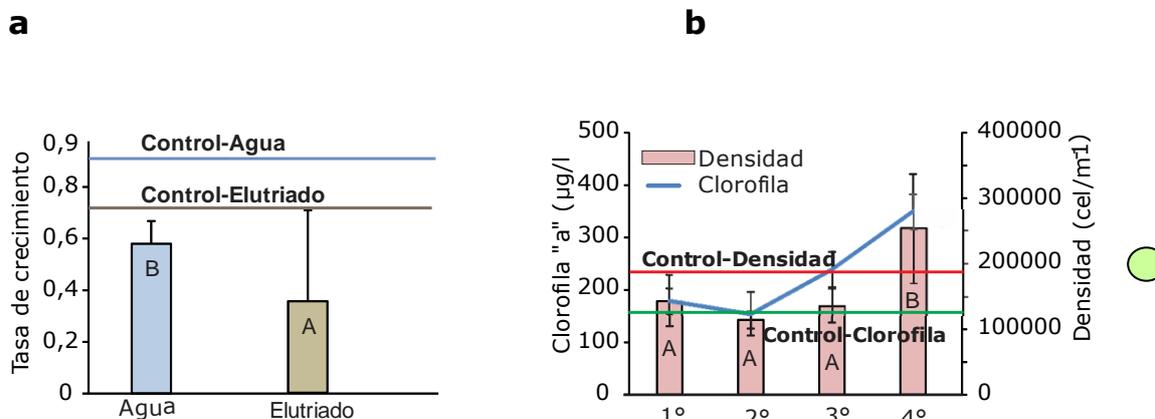


Figura 1: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○) en agua y elutriado de sedimento de E1. a) Variación de la tasa de crecimiento en agua y elutriado de sedimento. **b) En agua.** Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a" en los 4 muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Al comparar entre muestreos los resultados de los bioensayos con *T. suecica* realizados en **agua** del estuario se pudieron observar diferencias significativas para densidad de individuos, clorofila "a" y tasa de crecimiento (Tabla 1), pudiéndose señalar que tanto densidad, concentración de clorofila "a" (Fig. 1b) como la tasa de crecimiento (Fig. 2a) fueron menores en el bioensayo con agua de los muestreos (1°M-jun'15), (2°M-sep'15), (3°M-dic'15) y mayor en la del (4°M-mar'16).

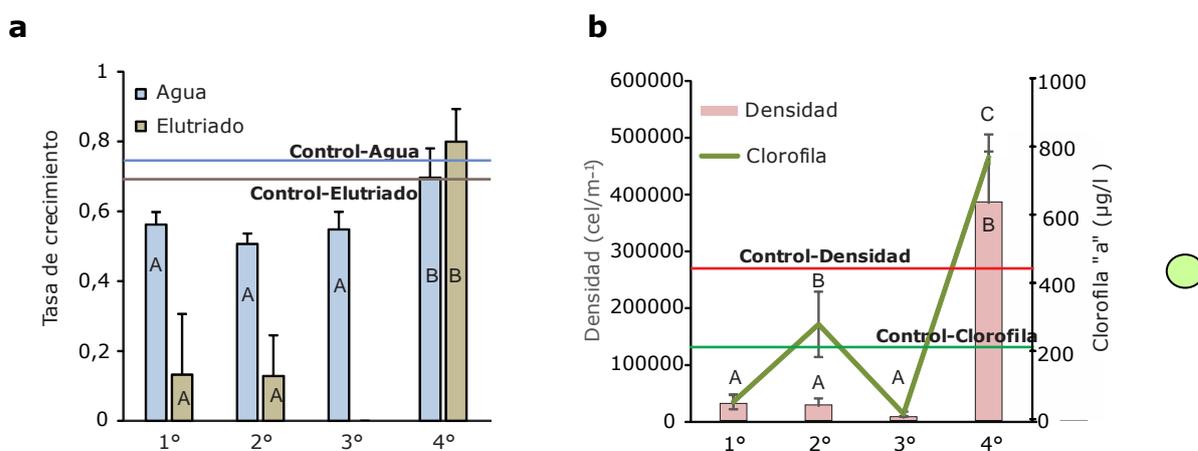


Figura 2: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○). Comparación entre muestreos en E1. a) En agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. **b) En elutriado de sedimento.** Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes

indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Durante los bioensayos realizados en **elutriado** del sedimento de E1, la densidad de individuos y la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* presentaron el mismo patrón entre las fechas muestreadas. Los valores menores fueron observados en (1°M-jun'15), (2°M-sep'15) y (3°M-dic'15) y los mayores en (4°M-mar'16) (Fig. 2b). La tasa de crecimiento de *T. suecica* para la tercera fecha muestreada dio valores menores de cero. Valores positivos y bajos fueron observados con las muestras colectadas durante los muestreos (1°M-jun'15) y (2°M-sep'15). Los mayores valores de crecimiento se observaron en (4°M-mar'16) (Fig. 2a).

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación **E1**, la densidad, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* no presentaron diferencias significativas en los dos tratamientos considerados: **agua** y **elutriado** (Tabla 1).

Al comparar las variables analizadas entre muestreos y para ambos tratamientos se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas para las tres variables (Tabla 1).

Se pudo notar un patrón muy similar en la variación de estas variables a lo largo de las fechas muestreadas. Por lo general, en los muestreos (1°M-jun'15), (2°M-sep'15) y (3°M-dic'15) se observaron los menores valores y en (4°M-mar'16) los mayores (Figs. 3 a, b y 4). Observando las figuras 3 (a y b) y 4 se puede evidenciar un considerable decline en densidad, concentración de clorofila y tasa de crecimiento en los bioensayos con muestras del (3°M-dic'15).

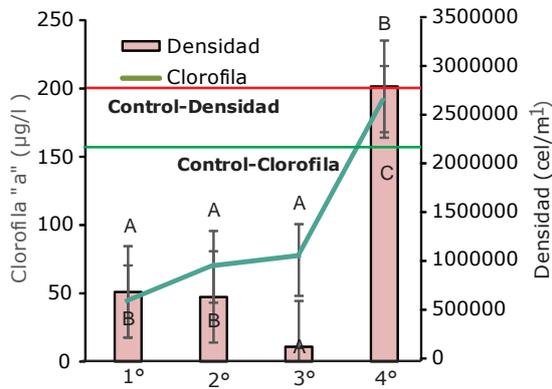
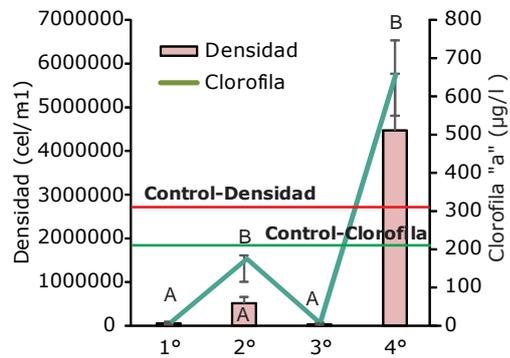
a**b**

Figura 3: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Comparación entre muestreos en E1. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". a) En agua. b) En elutriado de sedimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

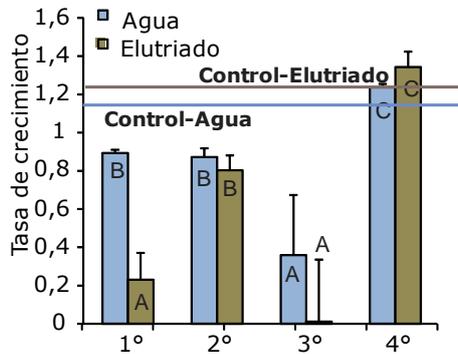


Figura 4: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○) en agua y elutriado de sedimento de E1. Variación de la tasa de crecimiento en los 4 muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

8.2. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado de la estación E2

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,67	0,1124	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=9,06 Elutriado: F=34,83	<0,05 <0,01	* **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=22,84	<0,01	**
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=28,12 Elutriado: F=22,55	<0,01 <0,01	** **
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,30	0,2629	n.s.	
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=7,88 Elutriado: F=49,46	<0,05 <0,01	* **
	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,24	0,0818	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=29,27 Elutriado: F=60,98	<0,01 <0,01	** **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=10,40	<0,05	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=46,18 Elutriado: F=16,00	<0,01 <0,05	** *
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,44	0,0738	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=29,60 Elutriado: F=77,21	<0,01 <0,01	** **

Tabla 2: Resumen de resultados de ANOVA para las variables densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos para la estación E2. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Tetraselmis suecica

Al comparar los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en agua y elutriado del sedimento de la **E2** no se pudieron detectar diferencias significativas en cuanto a densidad de individuos y tasa de crecimiento (Tabla 2), mientras que si se pueden señalar diferencias significativas en ambos tratamientos en la concentración de clorofila "a", que fue mayor en los bioensayos realizados con el **elutriado** (Fig. 5a).

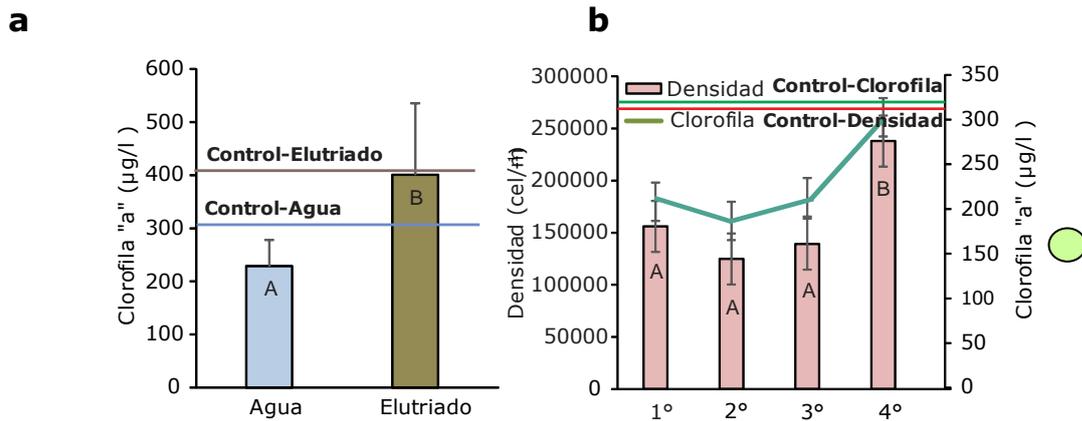


Figura 5: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○). Comparación entre muestreos en E2. a) en agua y elutriado de sedimento. Variación en concentración de clorofila "a". **b) En agua.** Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Si analizamos los bioensayos entre sí teniendo en cuenta los muestreos, en los realizados en **agua** de **E2**, se pudieron observar diferencias significativas tanto para la densidad de individuos como la concentración de clorofila "a" (Fig. 5b) y la tasa de crecimiento de *T. suecica* (Fig. 6a) (Tabla 2), dichos valores fueron menores en los muestreos (1°M-jun'15), (2°M-sep'15) y (3°M-dic'15) y mayores en (4°M-mar'16).

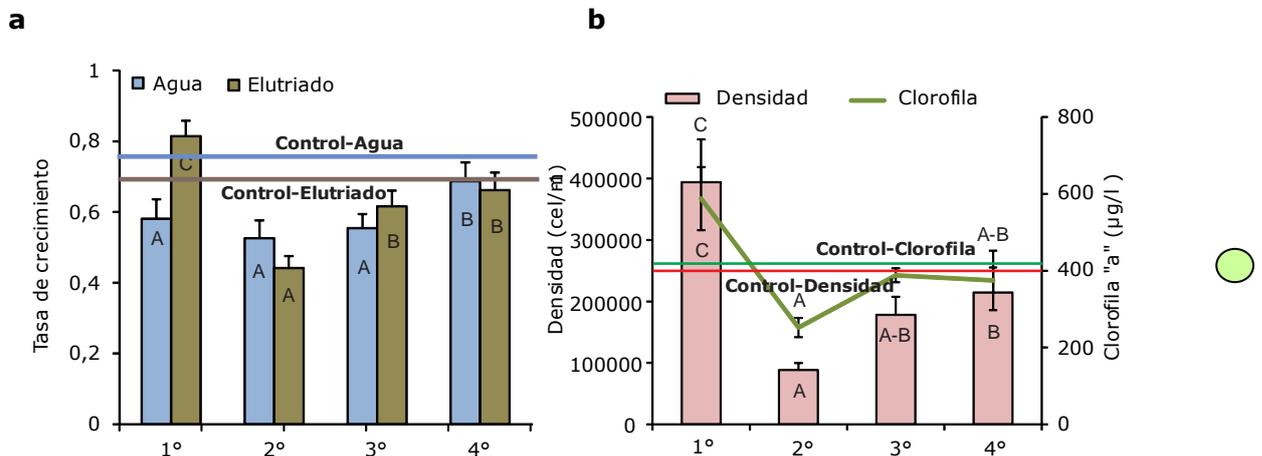


Figura 6: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○). Comparación entre muestreos en E2. a) En agua y elutriado de sedimento. Variación de tasa de crecimiento. **b) En elutriado de sedimento.** Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

En los bioensayos realizados con el **elutriado del sedimento de E2**, la densidad de individuos y la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* presentaron el mismo patrón entre las fechas muestreadas. *T. suecica* fue menos abundante y presentó menor concentración de clorofila "a" en los bioensayos de la segunda fecha de muestreo y más abundante y con mayor concentración de clorofila "a" la hora 96 de experimentación con muestras colectadas durante (1ºjun'15) (Fig. 6b).

La tasa de crecimiento de *T. suecica* en muestras de elutriado fue mayor en las muestras correspondientes al (1ºM-jun'15) y menor a (2ºM-sep'15). Este patrón fue inverso al observado en el tratamiento **agua** (Fig. 6a).

Nitzschia aff. kuetzingioides

La variación de la densidad de individuos y la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* en los bioensayos en **agua** y **elutriado** de sedimento de **E2** no presentó diferencias (Tabla 2). Sin embargo, la concentración de clorofila "a" extraída al final del bioensayo (96 horas) varió entre los tratamientos (Tabla 2) siendo mayor en el bioensayo realizado con el **elutriado** (Fig. 7a).

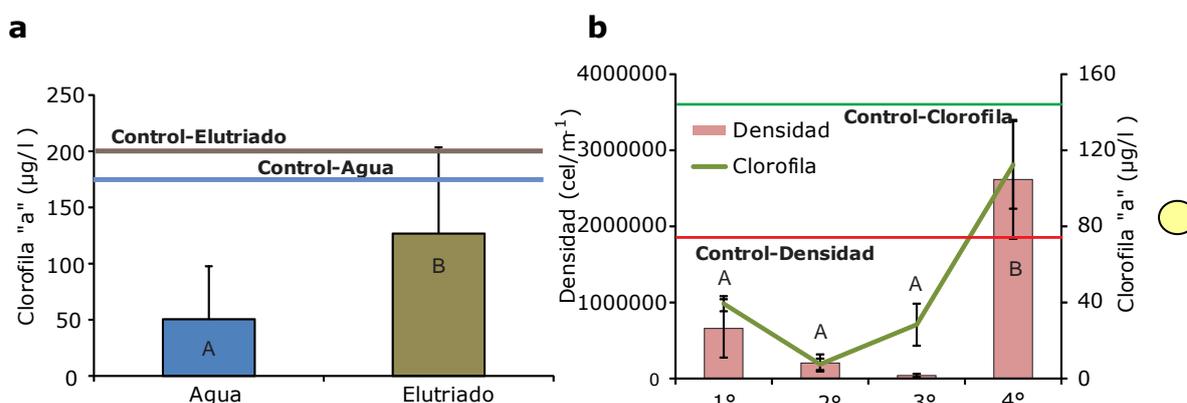


Figura 7: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Comparación entre los muestreos en E2. a) En agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". b) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para ambos se pudieron observar diferencias significativas para las tres variables (Tabla 2).

Se pudo evidenciar un patrón similar en la distribución de estas variables a lo largo de las fechas muestreadas. Por lo general, en los muestreos (1°M-jun'15), (2°M-sep'15) y (3°M-dic'15) se observaron los menores valores y en el muestreo (4°m-mar'16) los mayores (Figs.7b, 8a y b). Una diferenciación a lo anterior, fue evidenciada en muestras de **elutriado** en la variable concentración de clorofila, donde los valores mayores estuvieron dados conjuntamente en las fechas (1°M-jun'15), (3°M-dic'15) y (4°M-mar'16) (Fig. 8a).

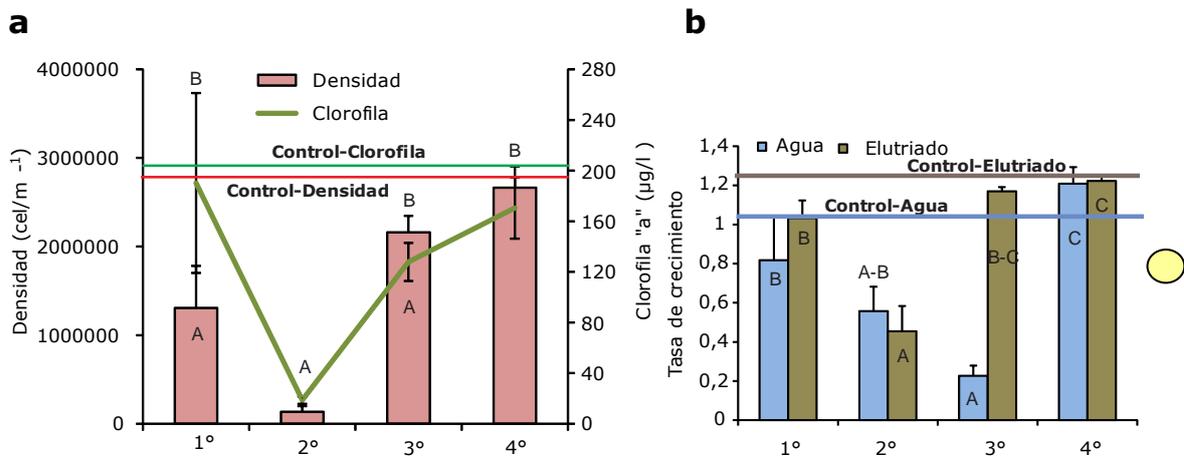


Figura 8: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (⊙). Comparación entre muestreos en E2. a) En elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". **b) En agua y elutriado de sedimento.** Variación de la densidad de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

8.3. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado de la estación E3

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,14	0,7122	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=5,19 Elutriado: F=50,47	<0,05 <0,01	* **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,04	0,8462	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=3,60 Elutriado: F=48,19	<0,05 <0,01	* **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,25	0,6205	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=147,47 Elutriado: F=63,58	<0,01 <0,01	** **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,69	0,2041	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=47,51 Elutriado: F=6,39	<0,01 <0,05	** *
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,34	0,5622	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=71,45 Elutriado: F=89,53	<0,01 <0,01	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,19	0,6667	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=147,17 Elutriado: F=22,48	<0,01 <0,01	** **

Tabla 3: Resumen de resultados de ANOVA para las variables densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos para la estación E3. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Tetraselmis suecica

Al analizar la respuesta de *Tetraselmis suecica* en los bioensayos realizados en agua y elutriado, no se pudieron detectar diferencias significativas en cuanto a densidad, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento (Tabla 3).

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para el tratamiento realizado en **agua** se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas para las tres variables (Tabla 3). En muestras de agua, tanto la densidad como la concentración de clorofila "a" (Fig. 9a) y la tasa de crecimiento de *T. suecica* (Fig. 10) fue menor en (2°M-sep'15) y mayores en los muestreos (1°M-jun'15), (3°M-dic'15) y (4°M-mar'16).

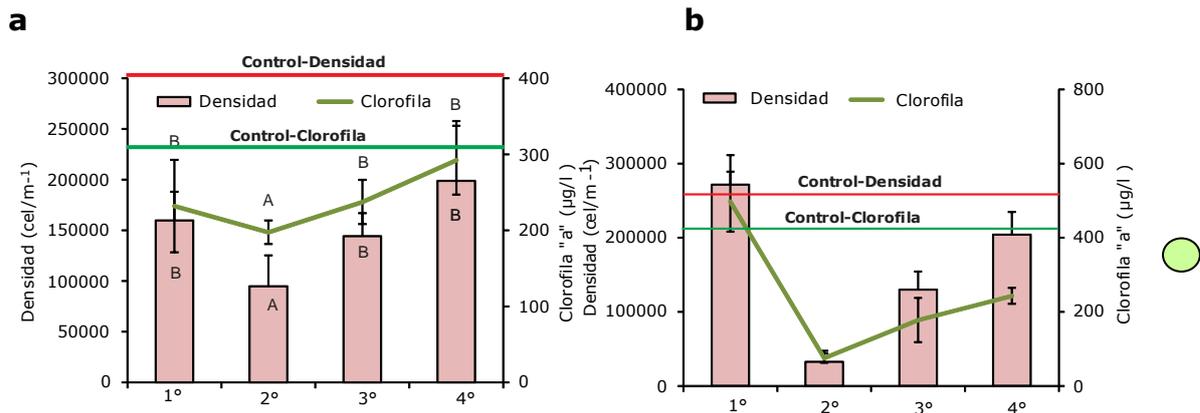


Figura 9: E3. Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○). Comparación entre muestreos en E3. a) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". **b) En elutriado de sedimento.** Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a" Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Para las muestras de **elutriado**, la densidad y la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* presentaron el mismo patrón entre las fechas muestreadas. *T. suecica* fue menos abundante y presentó menor concentración de clorofila "a" en el muestreo (2°M-sep'15) y más abundante y con mayor concentración de clorofila "a" las 96 horas de experimentación con las muestras colectadas durante (1°M-jun'15) (Fig. 9b).

Por otro lado, la tasa de crecimiento de *T. suecica* en muestras de **elutriado** fue también menor en las muestras correspondientes a (2°M-sep'15) y fueron registrados los mayores valores en la muestra de (4°M-mar'16) (Fig. 10).

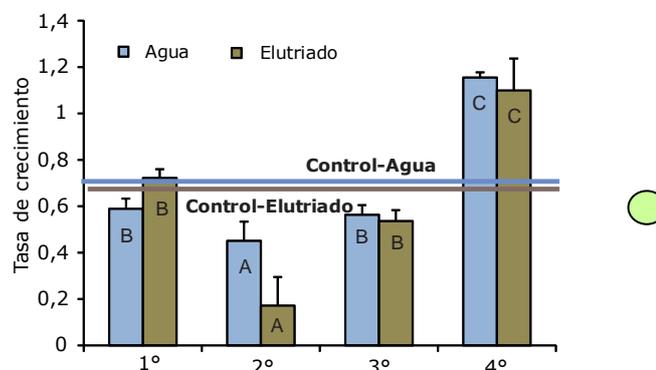


Figura 10: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○) en agua y elutriado de sedimento. Comparación entre muestreos en E3. Variación de la tasa de crecimiento en los 4 muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación **E3**, la densidad, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* no fue diferente al evaluar las muestras de agua y elutriado (Tabla 3).

Al considerar las diferentes fechas de muestreo, se pudieron evidenciar diferencias significativas entre las tres variables evaluadas para **agua** y **elutriado** (Tabla 3). Para muestras de **agua**, la menor densidad y concentración de clorofila "a" de *N. aff. kuetzingioides* se registraron en (2°M-sep'15) y los máximos valores en el muestreo (4°M-mar'16) (Fig. 11a).

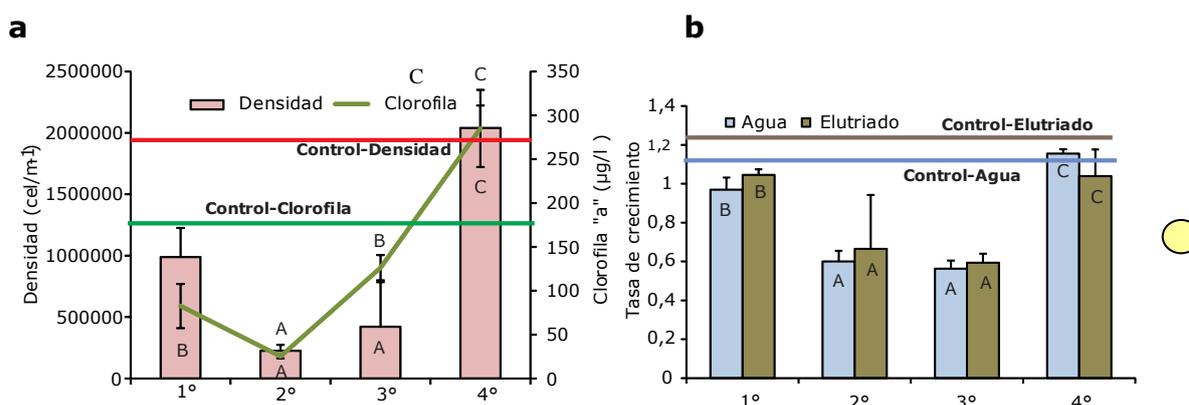


Figura 11: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). a) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a" b) En agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0,05 Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

La tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* presentó un patrón similar en las máximas tasas, pero las menores tasas de crecimiento se observaron en los bioensayos con muestras del (3°M-dic'15) (Fig. 11b).

Para muestras de **elutriado** de sedimento, también la menor densidad, la menor concentración de clorofila y menor tasa de crecimiento fueron registradas en (2°M-sep'15), y para esta última variable también en el (3°M-dic'15) (Figs. 11b y 12).

En **elutriado**, *N. aff. kuetzingioides* la tasa de crecimiento fue considerablemente menor en las muestras tomadas durante (3°M-sep'15)

respecto al muestreo (4°M-mar'16) donde se observó la mayor tasa de crecimiento (Fig. 11b).

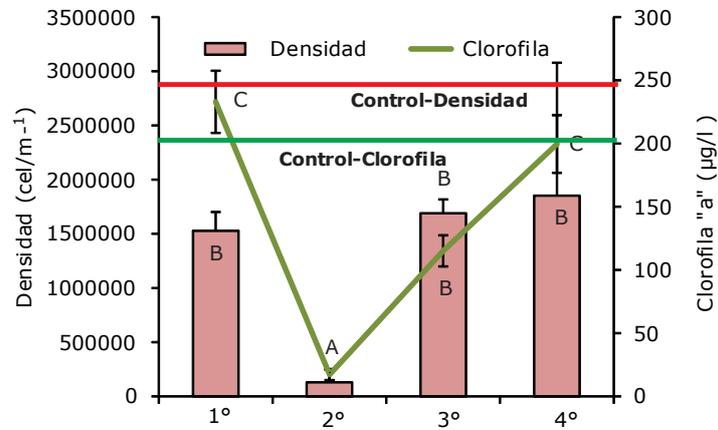


Figura 12: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Comparación entre muestreos en E3, en elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05 Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

8.4. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado de la estación E4

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,04	0,0914	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=21,36 Elutriado: F=46,61	<0,01 <0,01	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,96	0,3363	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=12,37 Elutriado: F=95,38	<0,01 <0,01	** **
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,41	0,2451	n.s.	
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=13,22 Elutriado: F=18,95	<0,01 <0,01	** **
	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=4,33	<0,05	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=17,64 Elutriado: F=28,99	<0,01 <0,01	** **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,38	0,1334	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=162,86 Elutriado: F=28,14	<0,01 <0,01	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,39	0,2483	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=37,72 Elutriado: F=21,64	<0,01 <0,01	** **

Tabla 4: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos para la estación E4. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Tetraselmis suecica

Al comparar los resultados de los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en **agua** y en **elutriado**, no se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas, en densidad, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento (Tabla 4).

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para el tratamiento realizado en **agua** se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas para las tres variables (Tabla 4). En muestras de **agua**, tanto la densidad y la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* (Fig. 13a) fueron menores en los nuestros (1°M-sep'15), (2°M-sep'15) y (3°M-dic'15) y mayores en (4°M-mar'16).

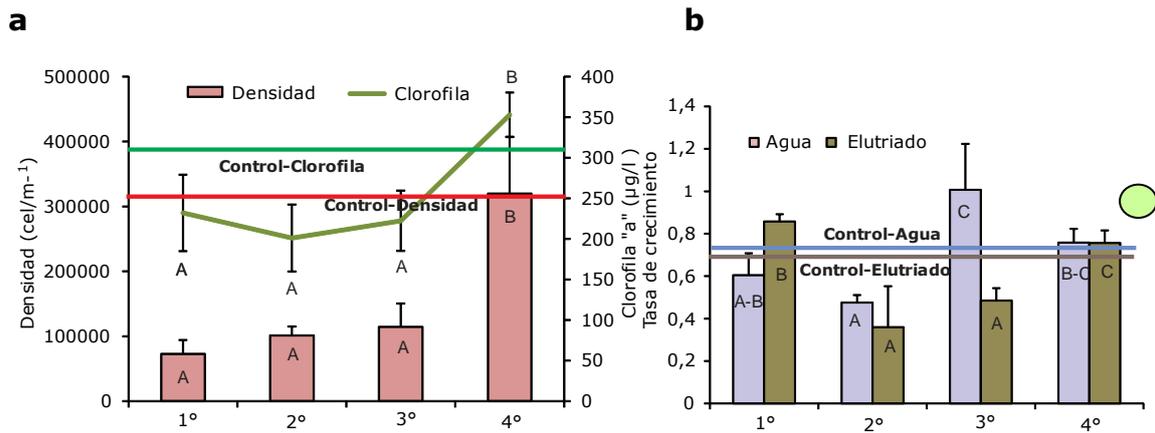


Figura 13: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (●). Comparación entre muestreos en E4. a) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". **b) En agua y elutriado de sedimento.** Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en cultivos control.

En muestras de **agua**, la tasa de crecimiento de *T. suecica* fue baja también en (2°M-sep'15), pero las mayores tasas de crecimientos se observaron en el muestreo (3°M-dic'15) (Fig. 13b).

Para las muestras de **elutriado**, la densidad y la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* presentaron el mismo patrón entre las fechas muestreadas. *T. suecica* fue menos abundante y presentó menor concentración de clorofila "a" en los bioensayos con muestras tomadas durante (2°M-sep'15) y más abundante y con mayor concentración de clorofila "a" la hora 96 de experimentación con las del muestreo (1°M-jun'15) y también con la del (4°M-mar'16) para la segunda variable analizada (Fig. 14).

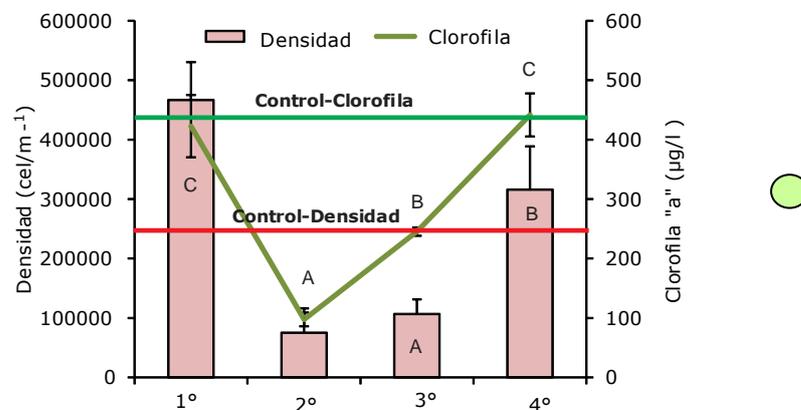


Figura 14: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (●) en elutriado de sedimento de E4. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a" en los 4 muestreos. Letras

diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Por otro lado, la tasa de crecimiento de *T. suecica* durante los bioensayos con **elutriado** fue también mayor en los correspondientes al muestreo (1°M-jun'15) seguido por el (4°M-mar'16 (Fig. 13b). Este patrón estuvo en concordancia con el observado para la concentración de clorofila "a" analizada en **elutriado**.

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación E4, la densidad de *Nitzschia aff. kuetzingioides* fue estadísticamente diferente al evaluar las muestras de **agua** y **elutriado** (Tabla 4). La densidad de la diatomea fue mayor en las muestras de **elutriado** (Fig. 15a).

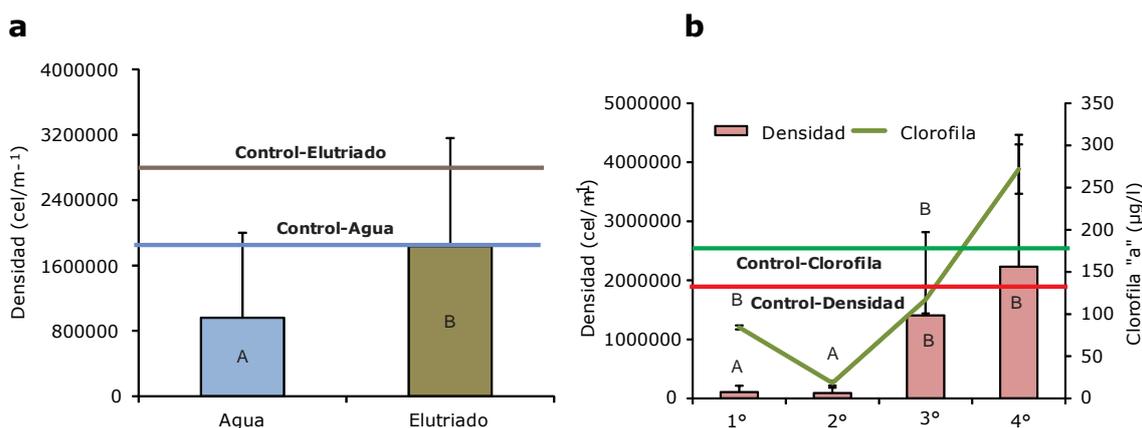


Figura 15: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Comparación entre muestreos en E4. a) En agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. b) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a" Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

En cambio, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento no difirieron entre los bioensayos realizados con **agua** y **elutriado** (Tabla 4).

Al considerar las diferentes fechas de muestreo, se pudieron evidenciar diferencias significativas entre las tres variables evaluadas para ambos tratamientos (Tabla 4). Para muestras de **agua**, la menor densidad y concentración de clorofila "a" de *N. aff. kuetzingioides* se registraron en el muestreo (2°M-sep'15) y los máximos valores en el muestreo (4°M-mar'16) (Fig. 15b).

Las mayores tasas de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* se observaron conjuntamente en (1°M-jun'15), (3°M-dic'15) y (4°M-mar'16) (Fig. 16a).

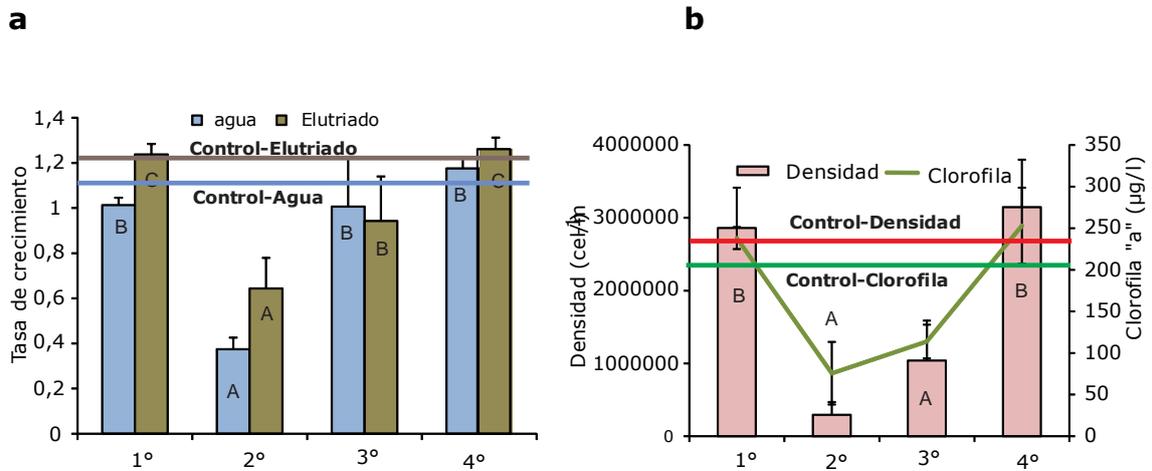


Figura 16: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Comparación entre muestreos en E4. a) En agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. b) En elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Para muestras de **elutriado**, también la menor densidad, la menor concentración de clorofila y menor tasa de crecimiento fueron registradas en la (2°M-sep'15), coincidentemente con el tratamiento **agua** (Figs. 16a y b).

8.5. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado de la estación E5

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,07	0,3088	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=11,93 Elutriado: F=3,36	<0,01 0,0551	** n.s.
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,79	0,1057	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=18,43 Elutriado: F=14,22	<0,01 <0,01	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,07	0,0902	ns
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=27,80 Elutriado: F=3,29	<0,01 0,0580	** ns
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,58	0,4540	ns
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=33,57 Elutriado: F=17,03	<0,01 <0,01	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,10	0,7567	ns
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=0,10 Elutriado: F=0,73	<0,01 0,5536	** ns
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,26	0,6116	ns
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=70,03 Elutriado: F=25,25	<0,01 <0,01	** **

Tabla 5: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos para la estación E5. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Tetraselmis suecica

Al comparar los bioensayos realizados en *Tetraselmis suecica* con agua y elutriado no se pudieron detectar diferencias significativas en cuanto a densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento (Tabla 5).

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para el tratamiento realizado en **agua** se pudieron observar diferencias significativas para las tres variables (Tabla 5). En muestras de **agua**, tanto la densidad, la concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* fueron menores en los muestreos (1°M-jun'15), (2°M-sep'15 y, (3°M-dic'15) y mayores con las muestras del (4°M-mar'16). (Figs. 17a y b).

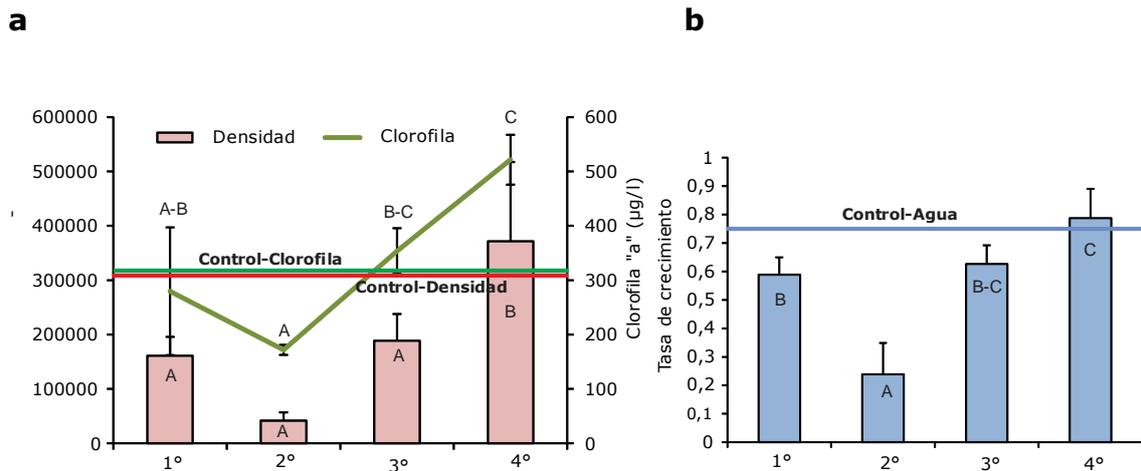


Figura 17: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○) en agua. Comparación entre los cuatro muestreos E5. a) Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". **b)** Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

En los bioensayos con **elutriado**, la densidad y la tasa de crecimiento no se diferenciaron al comparar las fechas de muestreo (Tabla 5). Se pudo detectar una patrón diferencial entre los muestreos únicamente para la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* con bajos valores en los bioensayos correspondientes al muestreo (3°M-dic'15) y alcanzando los máximos en los del (2°M-sep'15) (Fig. 18).

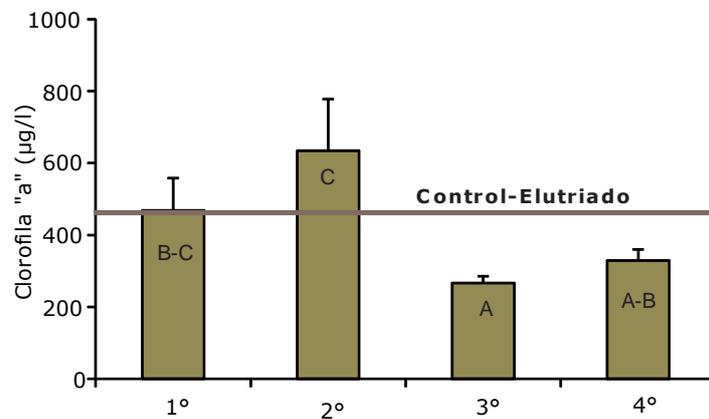


Figura 18: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○) en elutriado de sedimento de E5. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a" en los 4 muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en cultivos control.

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación 5 (E5), la densidad, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* no fue estadísticamente diferente al evaluar las muestras de agua y elutriado (Tabla 5).

Al considerar las diferentes fechas de muestreo, se pudieron evidenciar diferencias significativas entre las tres variables evaluadas para ambos tratamientos, excepto para variable clorofila "a" analizado en muestras de elutriado (Tabla 5). Para muestras de **agua**, la menor densidad y concentración de clorofila "a" de *N. aff. kuetzingioides* se registraron en las muestras de (2°M-sep'15) y los máximos valores en el muestreo (4°M-mar'16) (Fig. 19a).

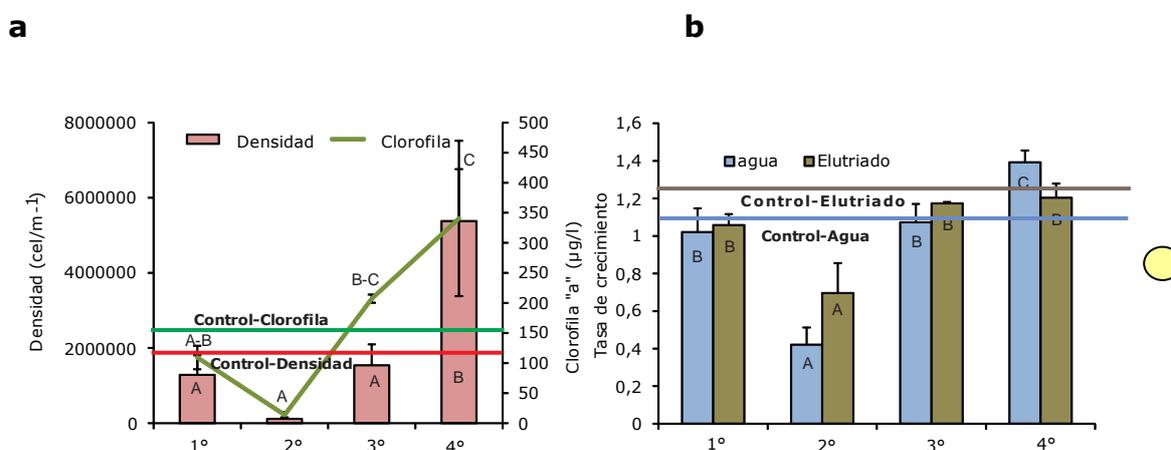


Figura 19: Bioensayos realizados con *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* (○) en agua y elutriado de sedimento de E5. Comparación entre los muestreos. a) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". b) En agua y elutriado. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05 Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

La tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* presentó un patrón similar al detallado para las variable densidad y concentración de clorofila "a" (Fig. 19b).

En los bioensayos con el **elutriado** del sedimento, también la menor densidad celular y menor tasa de crecimiento fueron registradas durante el muestreo (2°M-sep'15) y los máximos valores en el (4°M-mar'16) (Figs. 19b y 20).

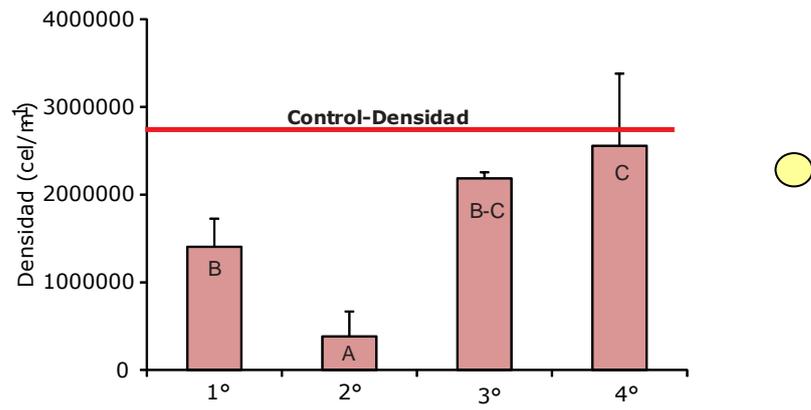


Figura 20: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○) en elutriado de sedimento de E5. Variación de la densidad de individuos en los 4 muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

8.6. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado de la estación E6

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=6,41	<0,05	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=6,39 Elutriado: F=11,55	<0,01 <0,01	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=5,90	<0,05	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=3,49 Elutriado: F=50,52	0,055 <0,01	n.s. **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=5,27	<0,05	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=3,21 Elutriado: F=22,01	0,0619 <0,01	n.s. **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,15	0,2925	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=13,59 Elutriado: F=50,43	<0,01 <0,01	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,70	0,2026	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=65,09 Elutriado: F=130,16	<0,01 <0,01	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,25	0,2728	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=3,99 Elutriado: F=83,17	<0,05 <0,01	* **

Tabla 6: Resumen de resultados de ANOVA para la estación E6. Densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos para la estación E6. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Tetraselmis suecica

Al comparar los dos tratamientos utilizados al evaluar la especie *Tetraselmis suecica*, se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas, cuando se analizaron las variables densidad, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento (Tabla 6). En esta estación se observó un mayor grado de magnitud de estas tres variables en el tratamiento **agua** (Figs. 21a y b).

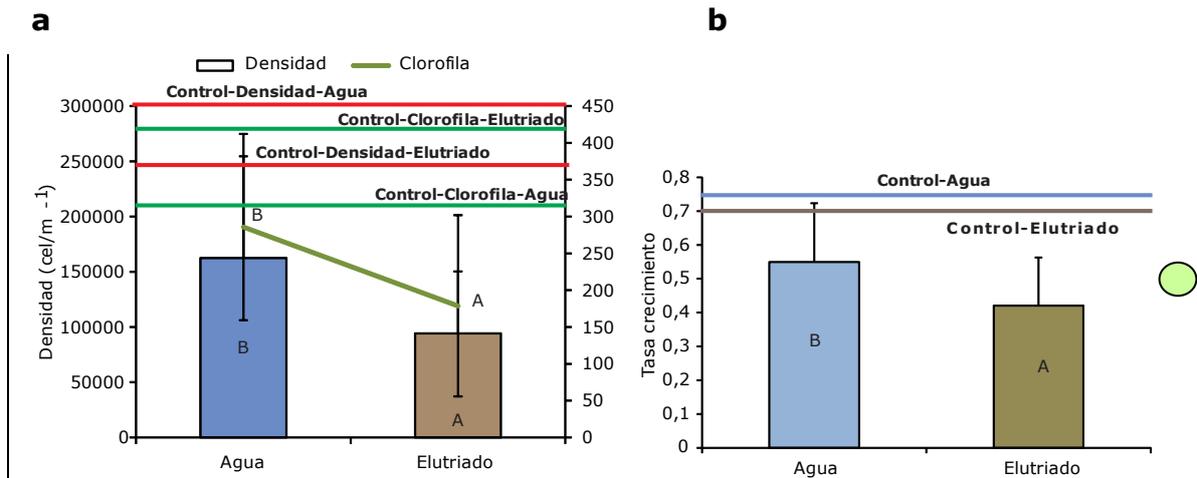


Figura 21: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○) en agua y elutriado de sedimento de E6. Comparación entre tratamientos. a) Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". b) Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para el tratamiento realizado en **agua** se pudieron observar diferencias significativas sólo para la densidad celular de *T. suecica* (Tabla 6), en la cual se observó el mayor número de células en los bioensayos realizados con muestras de (4°M-mar'16) (Fig. 22a).

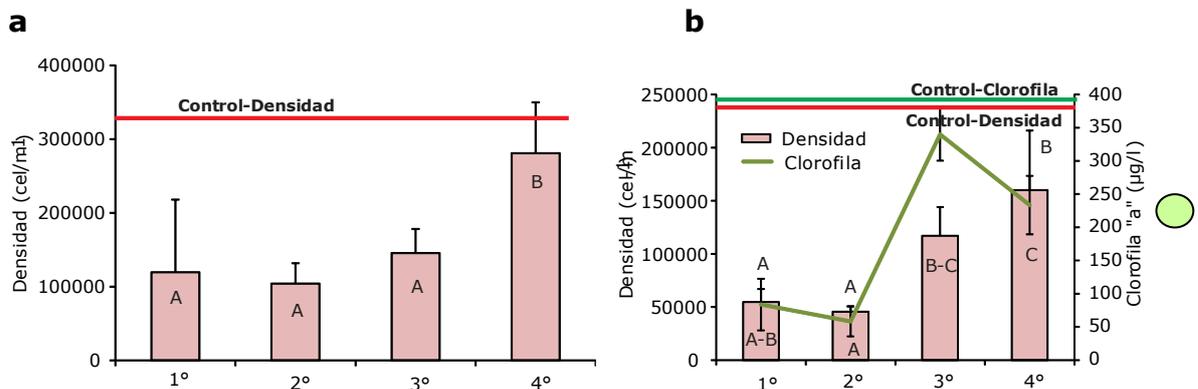


Figura 22: Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* (○). Comparación en los cuatro muestreos en E6. a) En agua. Variación de la densidad de individuos. b) En elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en cultivos control.

Para las muestras de **elutriado**, tanto la densidad celular como la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento se diferenciaron al comparar las fechas de muestreo (Tabla 6). La densidad y la tasa de

crecimiento tuvieron el mismo patrón, fueron bajas en (2°M-sep'15) y altas en el muestreo (4°M-mar'16) (Figs. 22b).

Se pudo detectar un patrón diferencial en concentración de clorofila "a" respecto a las anteriores, difiriéndose es que los valores fueron máximos durante el muestreo (3°M-dic'15) y no en el (4°M-mar'16) Fig. 37).

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación 6 (E6), la densidad, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* no fue estadísticamente diferente al evaluar las muestras de agua y elutriado (Tabla 6).

Al considerar las diferentes fechas de muestreo, se pudieron evidenciar diferencias significativas entre las tres variables evaluadas para ambos tratamientos, excepto para variable clorofila "a" analizado en muestras de **elutriado** (Tabla 6).

Para muestras de **agua**, la menor densidad, concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* se registraron en las muestras del (2°M-sep'15) y los máximos valores en el muestro (4°M-mar'16) (Figs. 23a y b).

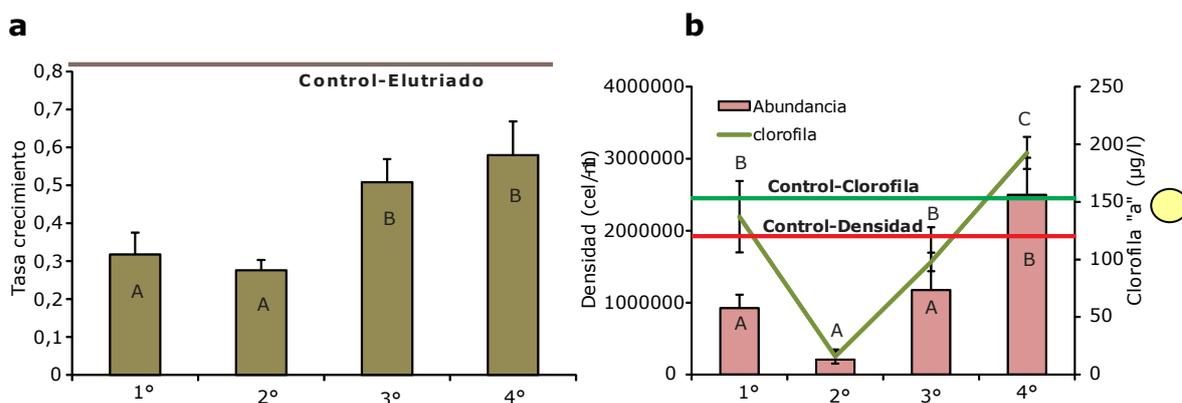


Figura 23: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Comparación entre muestreos en E6. a) En elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. b) En agua. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05 Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

Para muestras de **elutriado**, también la menor densidad, la menor concentración de clorofila y menor tasa de crecimiento fueron registradas

en (2°M-sep'15), y los máximos valores fueron observados tanto en los bioensayos con muestras de (3°M-dic'15) y (4°M-mar'16) (Figs. 24a y b).

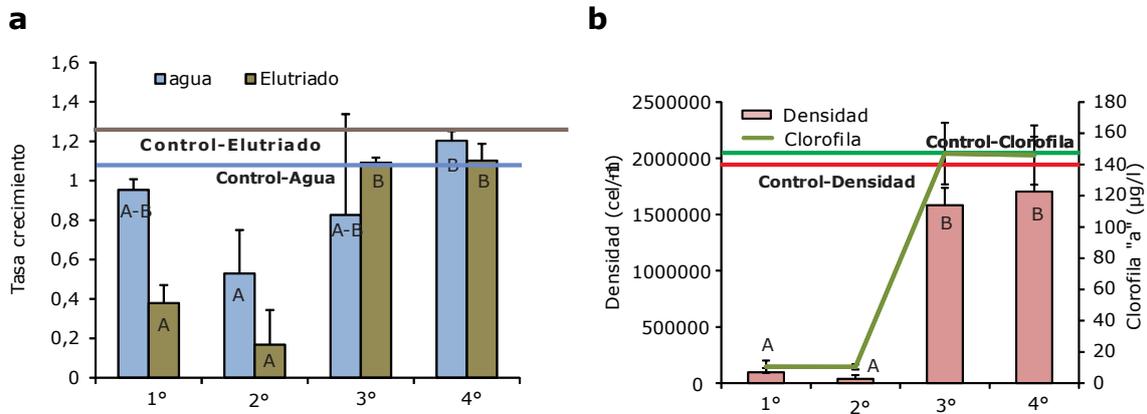


Figura 24: Bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Comparación entre muestreo en E6. a) En agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. b) En elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y las líneas horizontales valores medidos en el control.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: Comparación entre muestreos

9. Análisis de resultados: Comparación entre muestreos

En esta sección se repiten algunos gráficos para facilitar su análisis.

9.1. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 1er. muestreo (1°M-jun'15)

Se analizaron:

- **Densidad celular** (nº individuos.ml⁻¹).
- **Clorofila "a"** (mg.ml⁻¹)
- **Tasa de crecimiento celular** (d⁻¹)

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=11,25	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,67 Elutriado: F=48,34	0,1777 n.s. <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=8,37	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,21 Elutriado: F=40,91	0,3387 n.s. <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,54	0,4668 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,62 Elutriado: F=75,91	0,1919 n.s. <0,01 **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=5,91	<0,05 *
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=4,58 Elutriado: F=39,28	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=10,64	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=14,51 Elutriado: F=25,38	<0,01 ** <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,85	0,1798 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=2,87 Elutriado: F=106,6	<0,05 * <0,01 **

Tabla 7: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento de las diferentes estaciones para el primer muestreo. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Densidad celular

Los bioensayos realizados con ambas especies *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* mostraron, al comparar los tratamientos **agua** y **elutriado** del sedimento a las 96 horas, diferencias significativas en la densidad celular de organismos, con valores mayores para los bioensayos con **elutriado** (Figs. 25a y b).

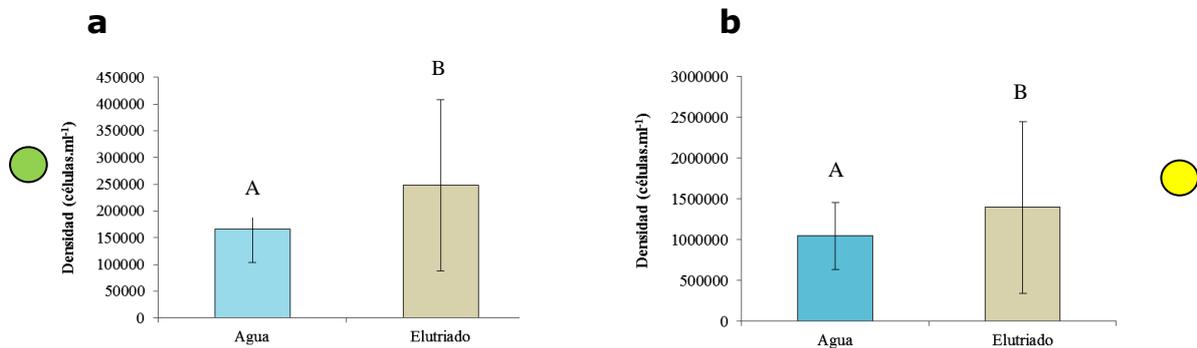


Figura 25: Variación en la densidad celular promedio en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

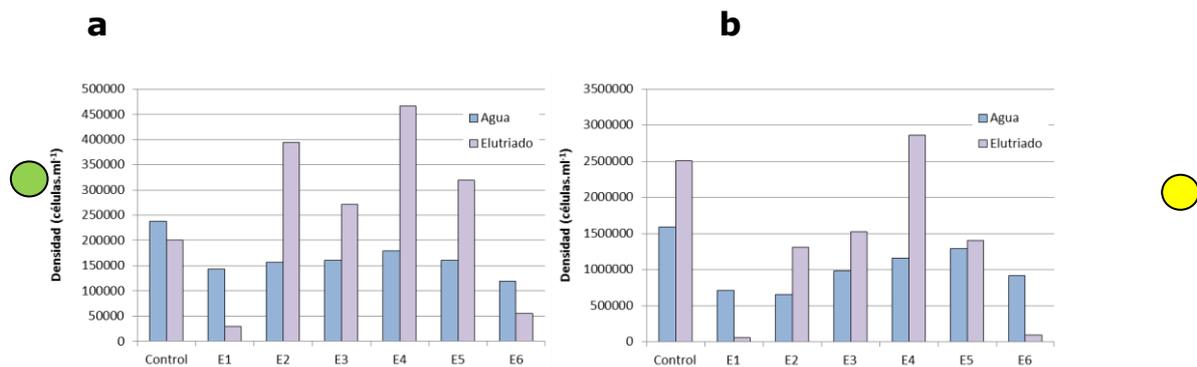


Figura 26: Detalle de la variación de la densidad celular en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●).

Con respecto a las estaciones de muestreo, para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** no se hallaron diferencias significativas entre

las estaciones de muestreo, mientras que para los bioensayos con **elutriado** sí (Figs. 27 a y b).

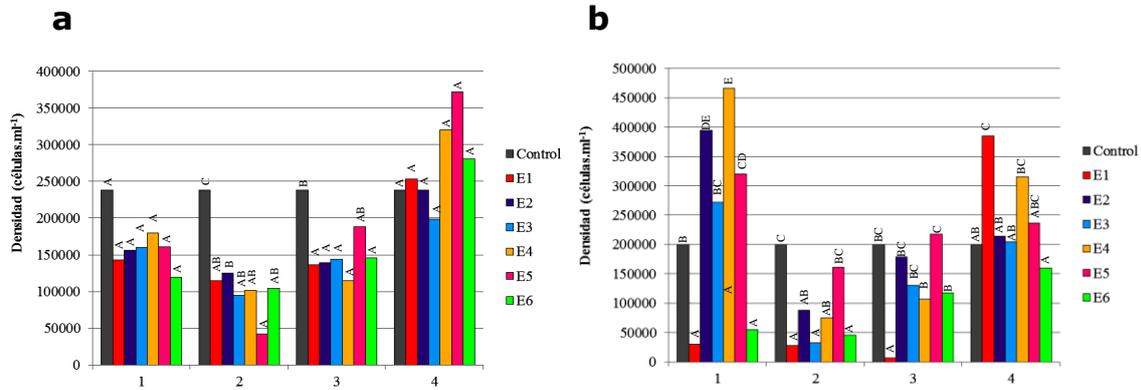


Figura 27: Variación de la densidad celular de *Tetraselmis suecica* (●) durante los bioensayos a lo largo de los 4 muestreos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Por otro lado, para los bioensayos con la diatomea *N. aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo tanto en **agua** como en **elutriado** (Figs. 28a y b).

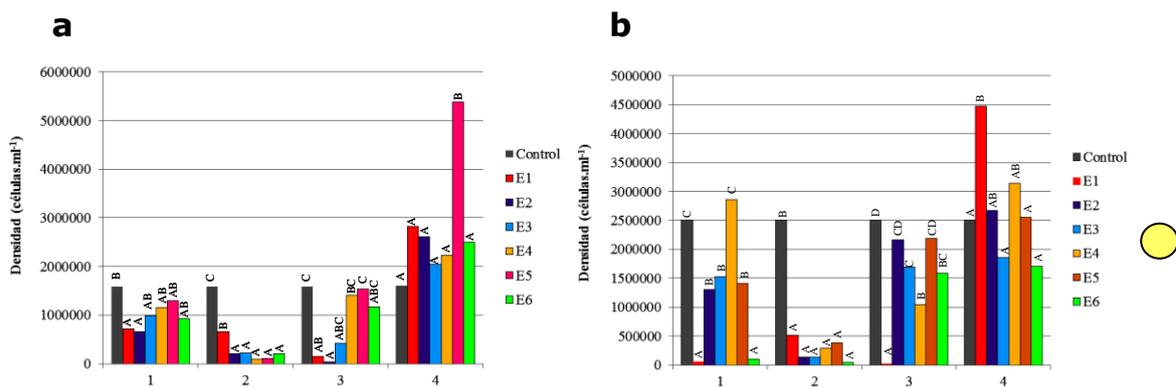


Figura 28: Variación de la densidad celular de *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●) durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

Clorofila "a"

Se hallaron diferencias significativas en la concentración de clorofila "a" a las 96 horas para ambas especies *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado**, con valores estadísticamente mayores para el elutriado (Figs. 29a y b).

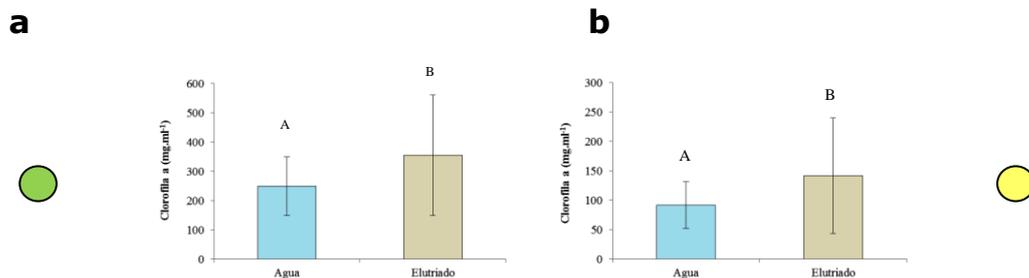


Figura 29: Variación en la concentración de clorofila a en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

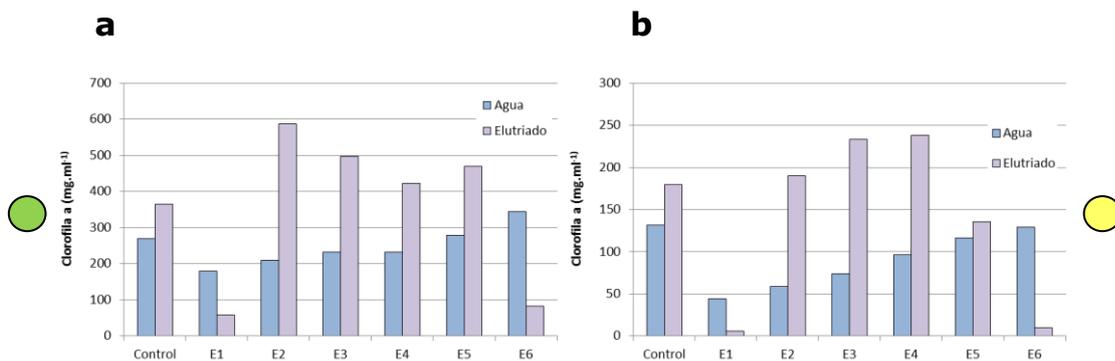


Figura 30: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●).

No se hallaron diferencias significativas entre los sitios de muestreo durante los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua**, mientras que sí las hubo para los realizados con **elutriado** (Figs. 31a y b).

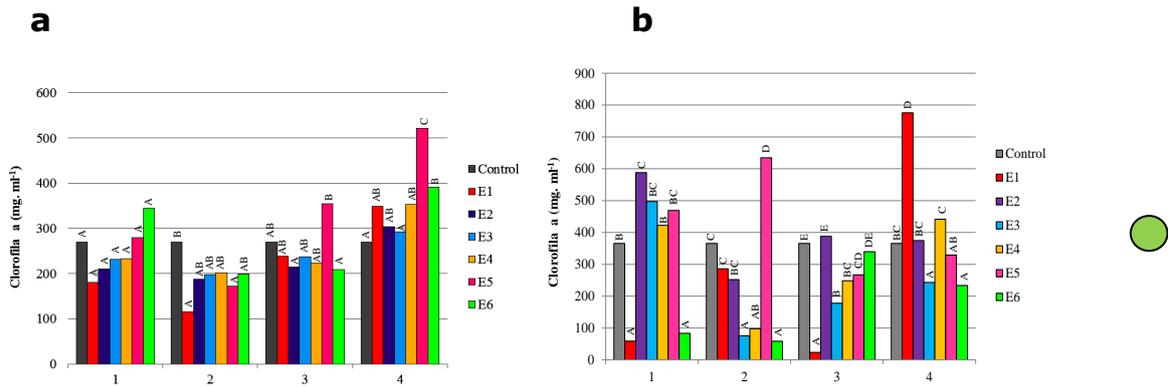


Figura 31: Variación de la clorofila "a" de *Tetraselmis suecica* (●) a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Para *N. aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre las distintas estaciones de muestreo tanto para los bioensayos con **agua** como con **elutriado** (Figs. 32 a y b).

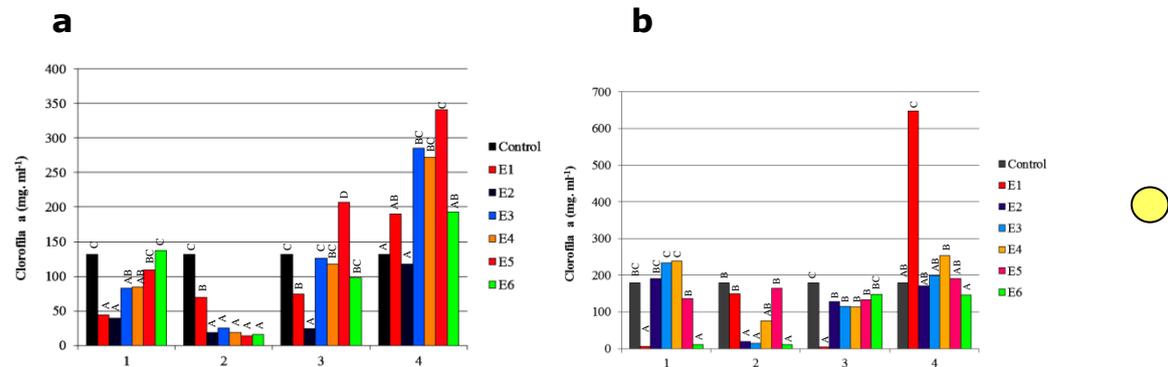


Figura 32: Variación de la clorofila "a" de *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●) a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Las tasas de crecimiento de ambas especies evaluadas (*Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides*) no presentaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con agua y elutriado (Figs. 33a y b).

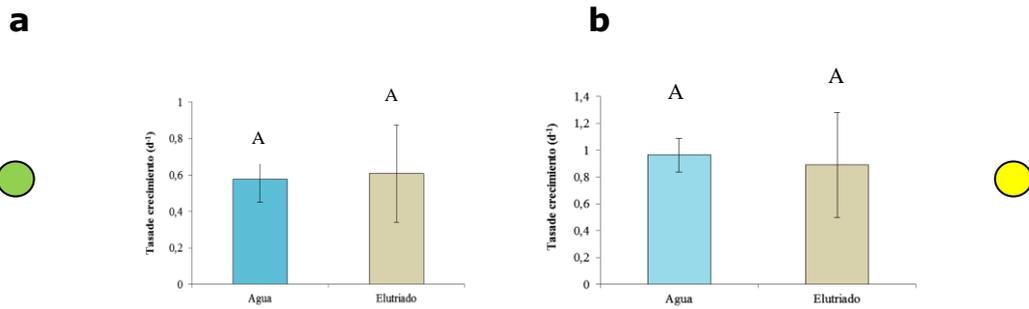


Figura 33: Variación en la tasa de crecimiento en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

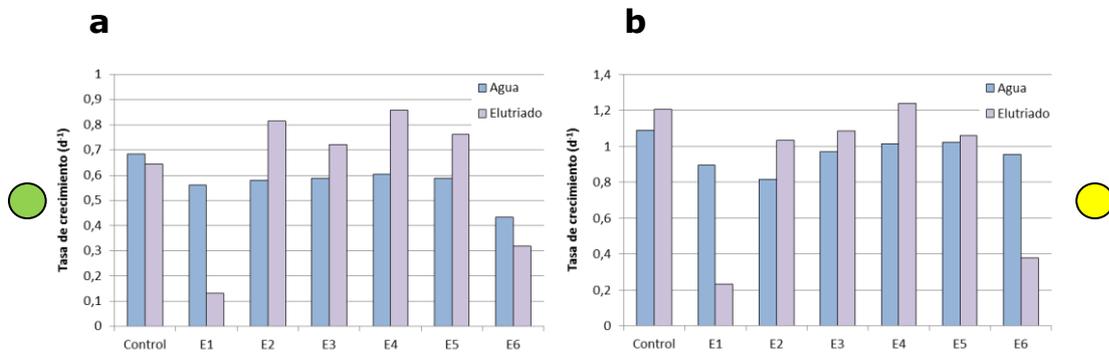


Figura 34: Detalle de la variación en la tasa de crecimiento en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo.. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●).

Al analizar los resultados entre estaciones de muestreo de bioensayos con *T. suecica* en **agua** no se hallaron diferencias significativas, mientras que si las hubo para los con **elutriado** del sedimento. (Figs. 35a y b).

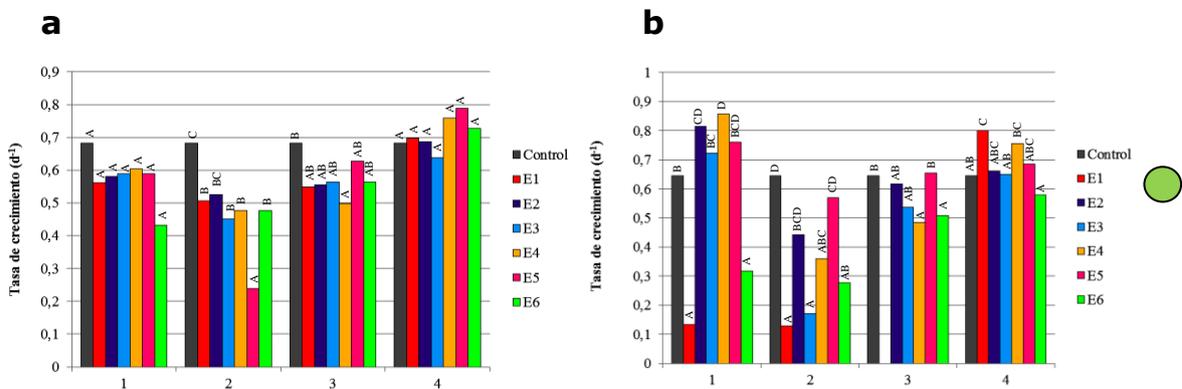


Figura 35: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* (●) durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado de sedimento.

Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en **agua** como **elutriado** (Figs. 36a y b).

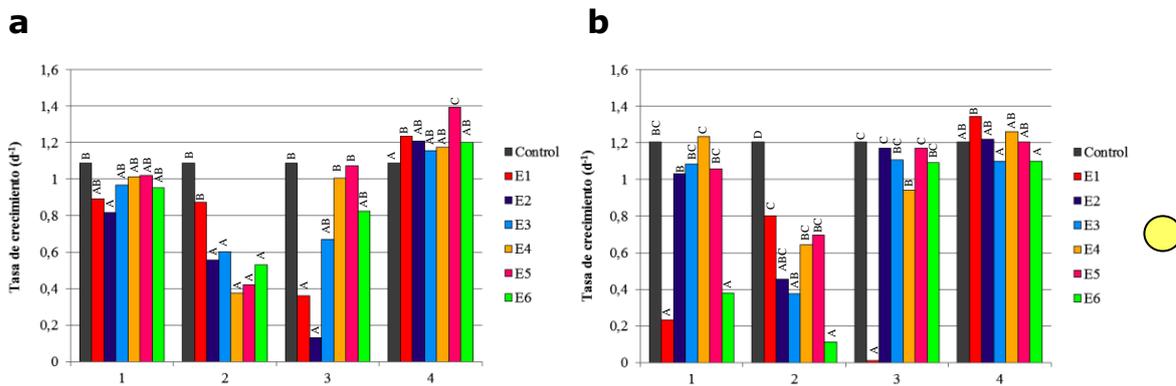


Figura 36: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* (☉) durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

9.2. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 2do. muestreo (2°M-sep'15)

Se analizaron:

- **Densidad celular** (n° individuos.ml⁻¹).
- **Clorofila "a"** (mg.ml⁻¹)
- **Tasa de crecimiento celular** (d⁻¹)

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=4,58	<0,05 *
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=13,86 Elutriado: F=12,56	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,44	0,1252 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=2,93 Elutriado: F=34,67	<0,05 * <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=8,24	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=14,07 Elutriado: F=12,27	<0,01 ** <0,01 **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,53	0,0665 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=46,56 Elutriado: F=69,97	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=16,47	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=96,38 Elutriado: F=11,12	<0,01 ** <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,02	0,8854 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=22,11 Elutriado: F=16,65	<0,01 ** <0,01 **

Tabla 8: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento de las diferentes estaciones para el segundo muestreo. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Densidad celular

Para *Tetraselmis suecica* se hallaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado**, con valores de densidad celular mayores en **agua** (Fig. 37a), mientras que para los bioensayos con *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas (Fig. 37b).

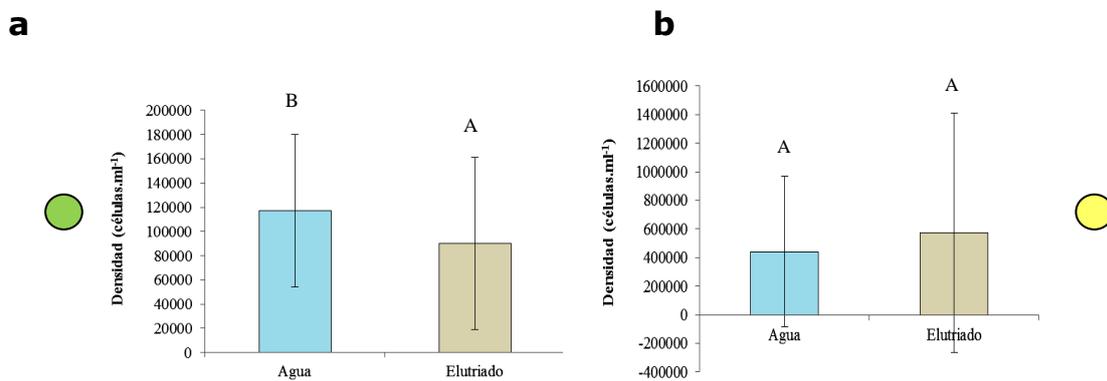


Figura 37: Variación en la densidad celular en bioensayos realizados con agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

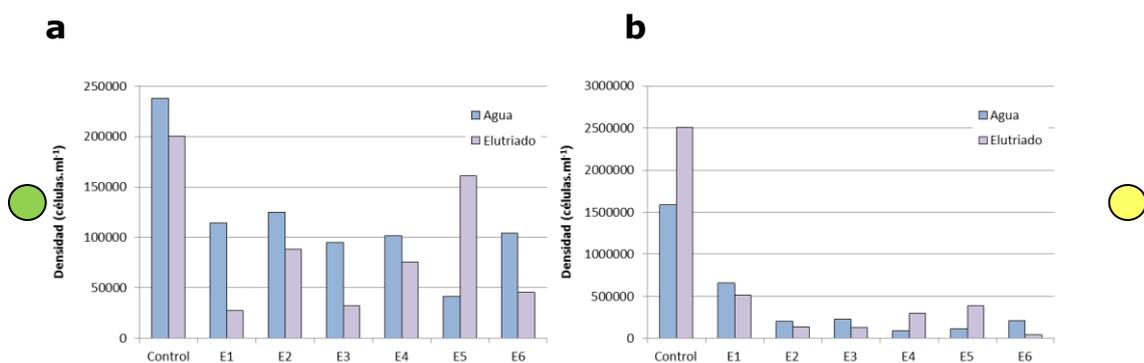


Figura 38: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* (●).

Con respecto a los sitios de muestreo, para ambas especies se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con **agua** como **elutriado** (Figs. 39a y b, 40a y b).

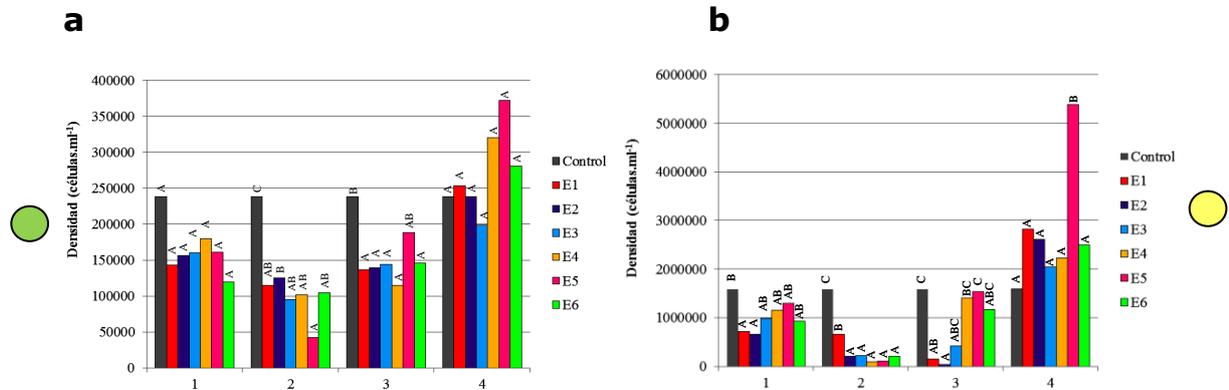


Figura 39: Variación de la densidad celular a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

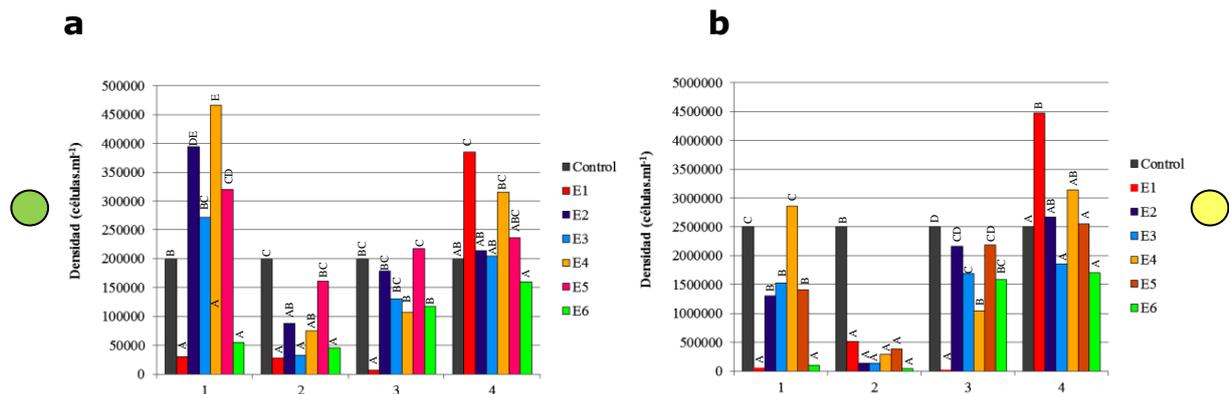


Figura 40: Variación de la densidad celular a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente

Clorofila "a"

Para *Tetraselmis suecica* no se hallaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con agua y elutriado (Fig. 41a), mientras que para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron valores mayores para el elutriado (Fig. 41b).

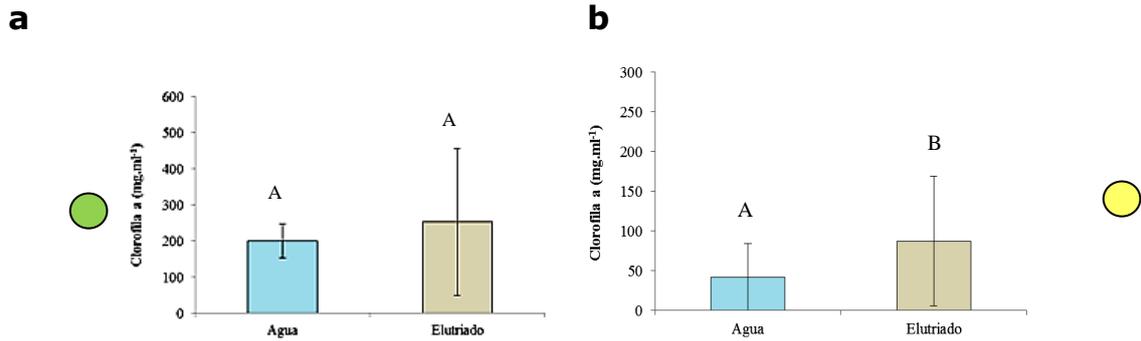


Figura 41: Variación en la concentración de clorofila a en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

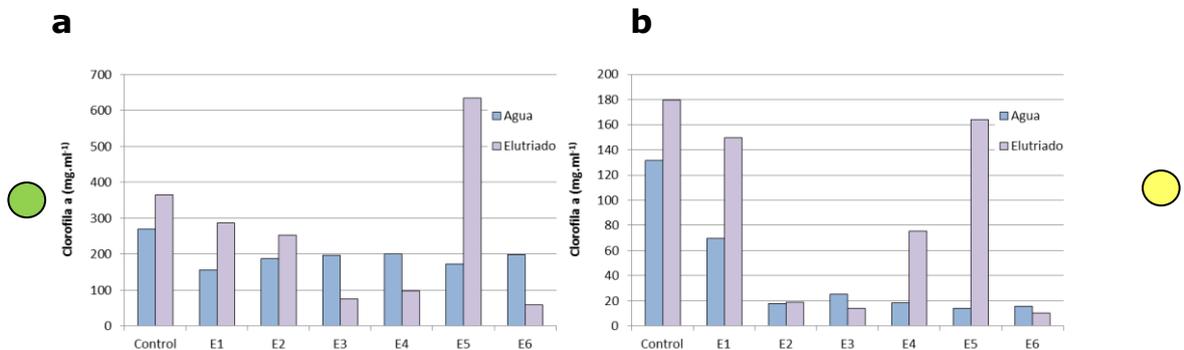


Figura 42: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○).

Con respecto a los sitios de muestreo, para ambas especies *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con agua como elutriado (Figs. 43a y b, 44a y b).

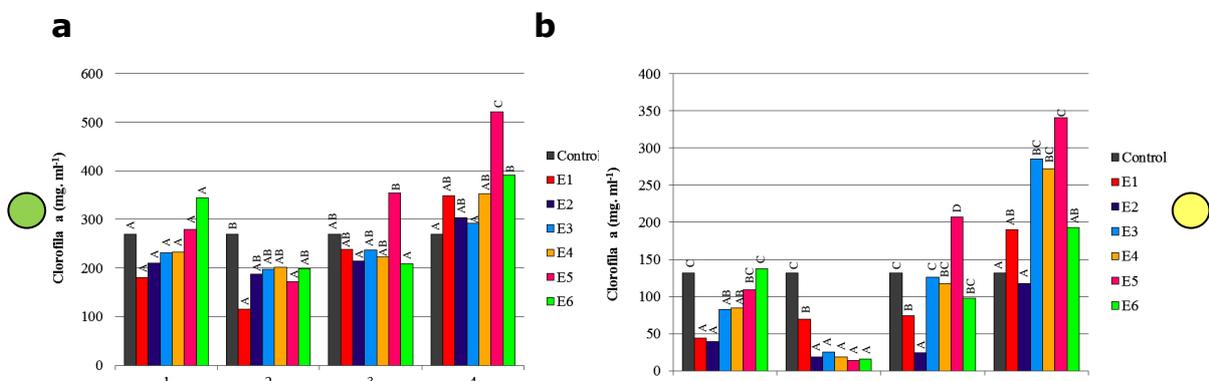


Figura 43: Variación de la clorofila "a" a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

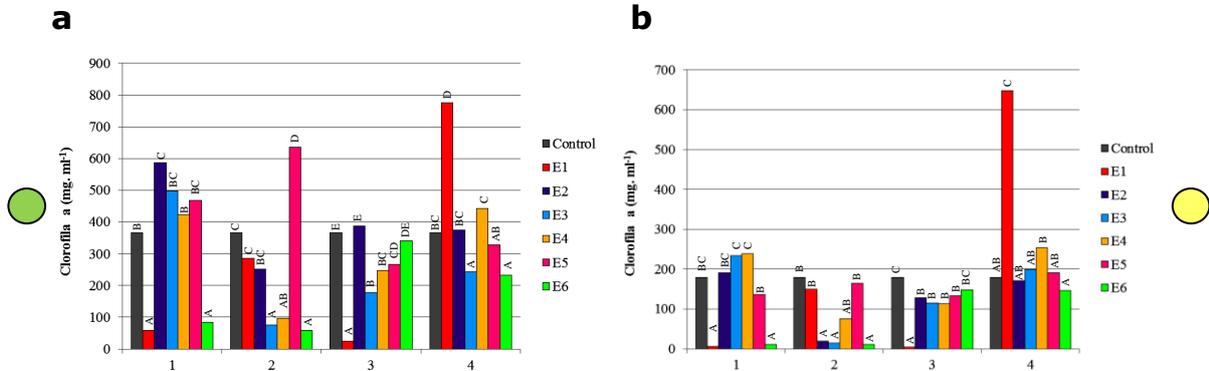


Figura 44: Variación de la clorofila "a" a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Al comparar los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** del sedimento se hallaron diferencias significativas, con tasas de crecimiento mayores para **agua** (Fig. 45a), mientras que para los bioensayos realizados con la diatomea *N. aff. kuetzingioides* no las hubo (Fig. 45b).

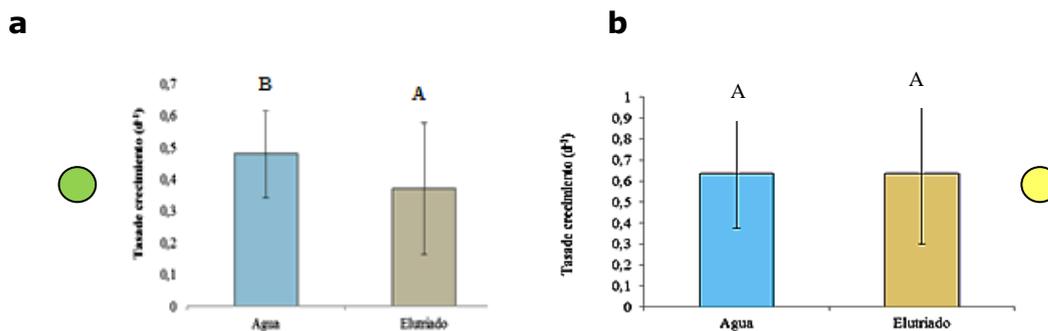


Figura 45: Variación en la tasa de crecimiento en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

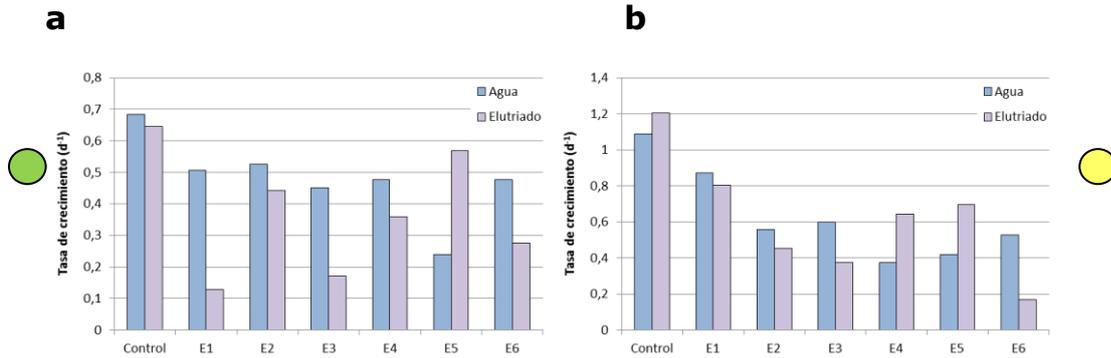


Figura 46: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○).

Para ambas especies *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con **agua** como con **elutriado** (Figs. 47a y b, 48a y b).

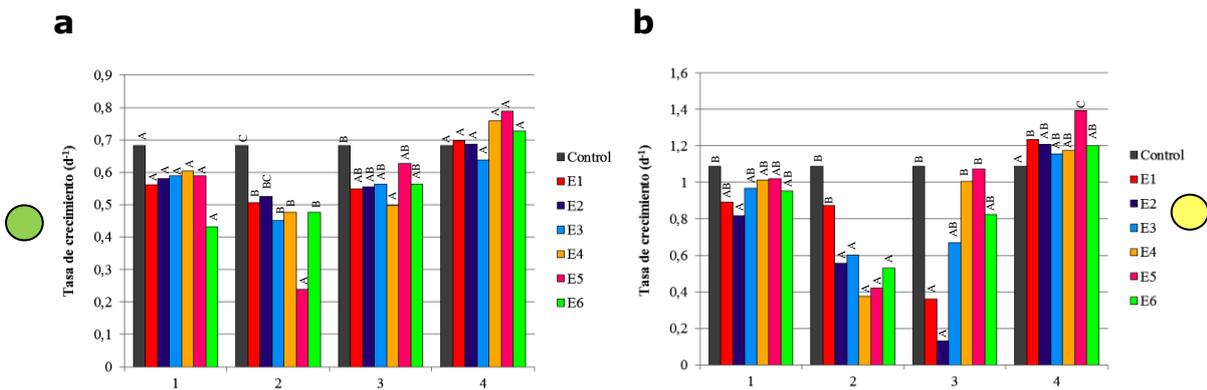


Figura 47: Variación en la tasa de crecimiento a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

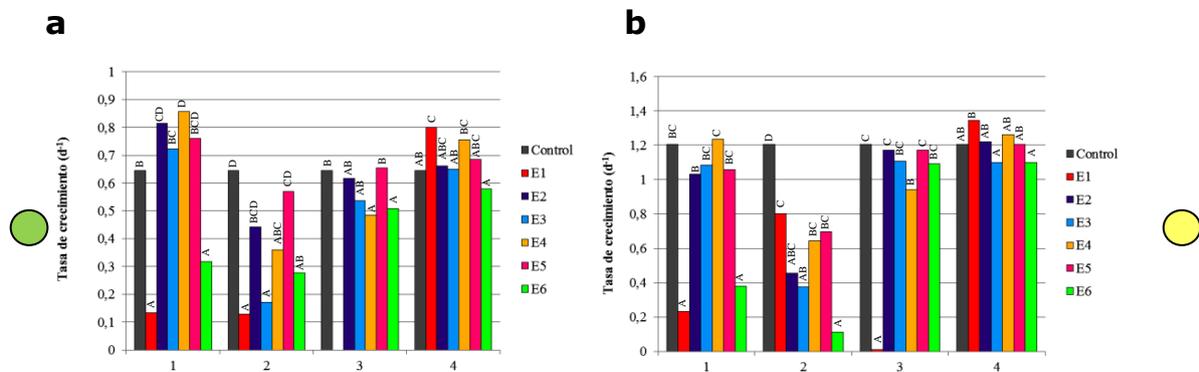


Figura 48: Variación en la tasa de crecimiento a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

9.3. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 3er. muestreo (3°M-dic'15)

Se analizaron:

- **Densidad celular** (n° individuos.ml⁻¹)
- **Clorofila "a"** (mg.ml⁻¹)
- **Tasa de crecimiento celular** (d⁻¹)

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,99	0,0904 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control°	Agua: F=4,52 Elutriado: F=12,1	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,34	0,5631 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=3,33 Elutriado: F=49,53	<0,05 * <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,02	0,8857 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=3,93 Elutriado: F=6,22	<0,01 ** <0,01 **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=19,33	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=5,84 Elutriado: F=37,56	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,33	0,5705 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=32,71 Elutriado: F=40,47	<0,01 ** <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=10,86	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=5,85 Elutriado: F=36,23	<0,01 ** <0,01 **

Tabla 9: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento de las diferentes estaciones para el 3er.muestreo. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Densidad celular

Al comparar los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** del 3er. muestreo no se hallaron diferencias significativas (Fig. 49a), mientras que para los bioensayos con *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* se hallaron densidades celulares mayores en elutriado del sedimento (Fig. 49b).

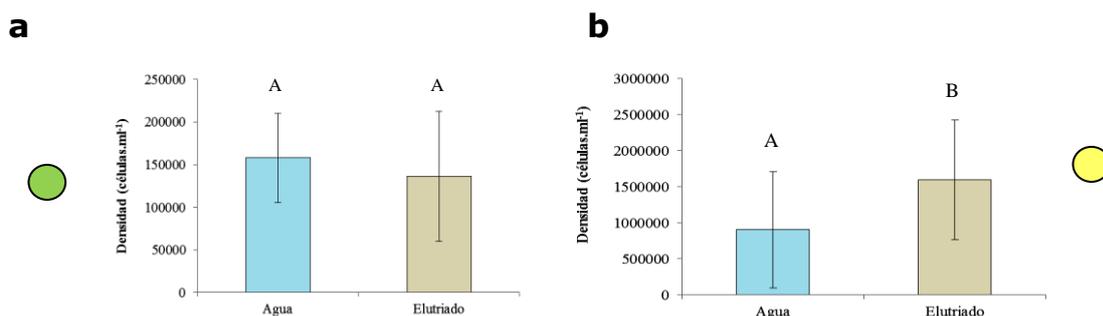


Figura 49: Variación en la densidad celular en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

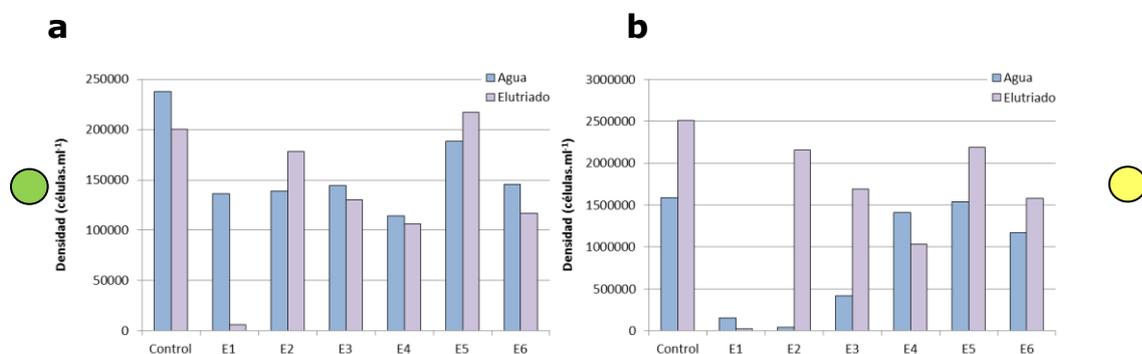


Figura 50: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* (●).

Con respecto a los sitios de muestreo, para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con agua como elutriado (Figs. 51a y b, 52a y b).

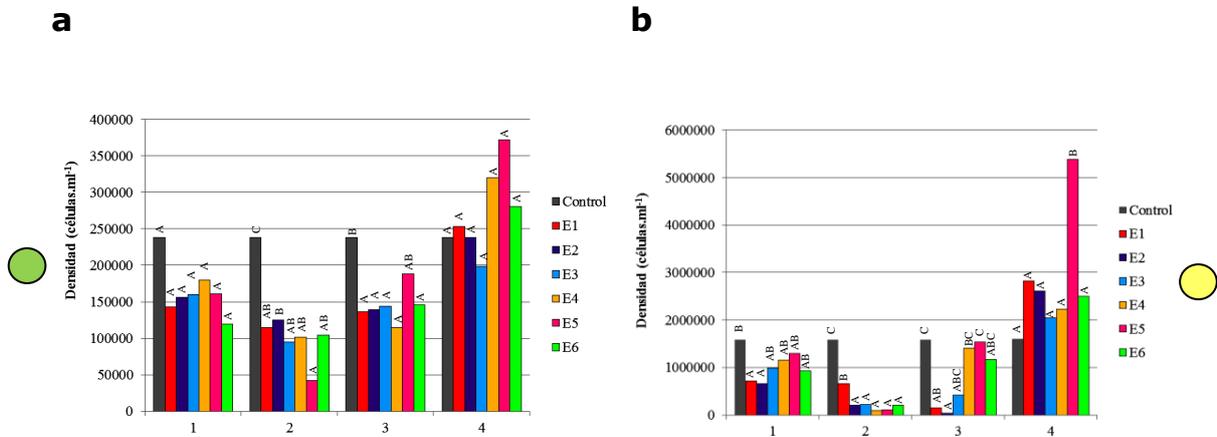


Figura 51: Variación de la densidad a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

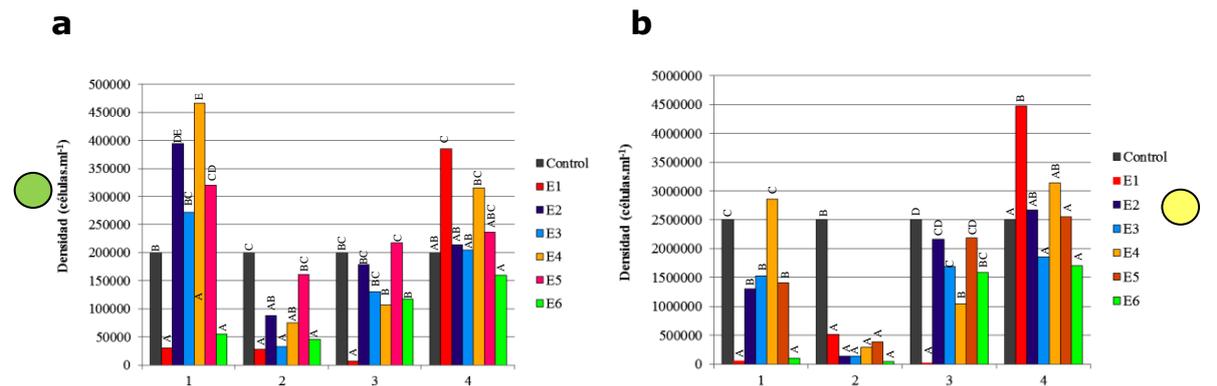


Figura 52: Variación de la densidad celular a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Clorofila "a"

Para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas en la concentración de clorofila "a" al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado** (Figs. 53a y b).

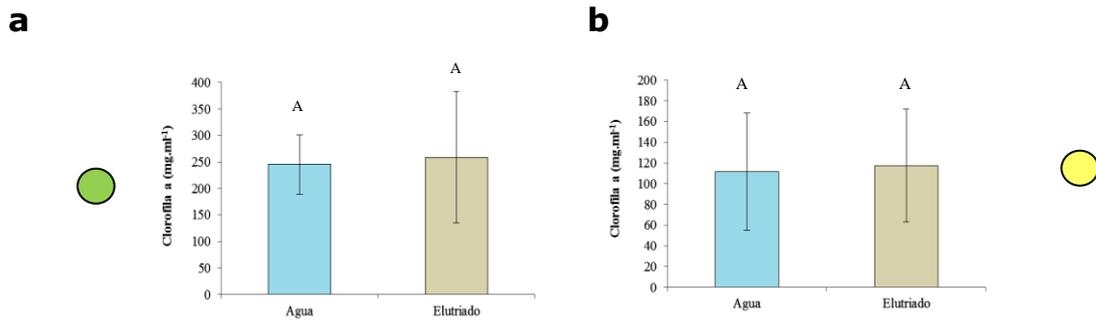


Figura 53: Variación en la concentración de clorofila a en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

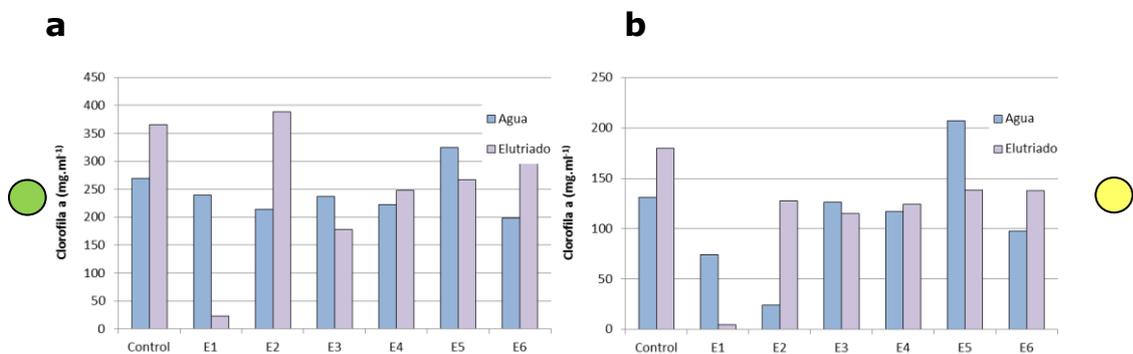


Figura 54: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○).

Con respecto a los sitios de muestreo, para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con **agua** como **elutriado** (Figs. 55a y b, 56a y b).

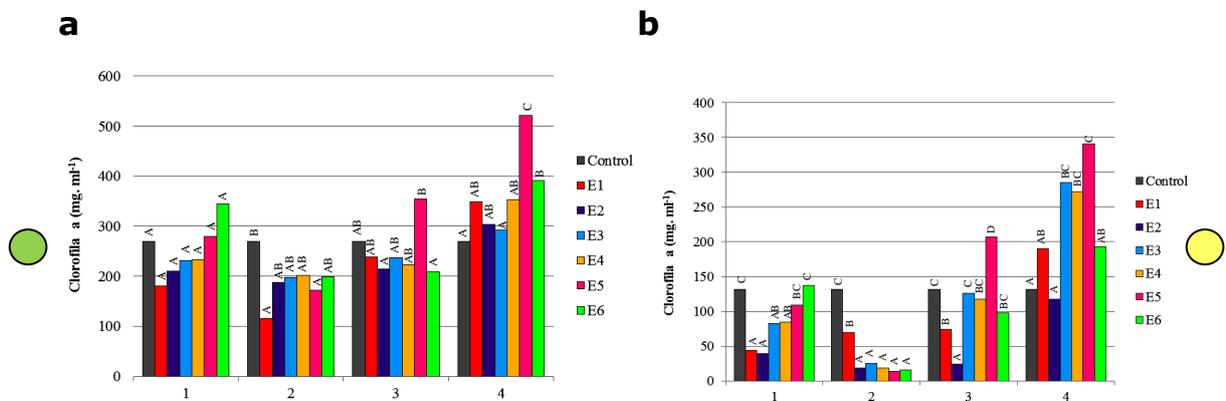


Figura 55: Variación de la clorofila "a" a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

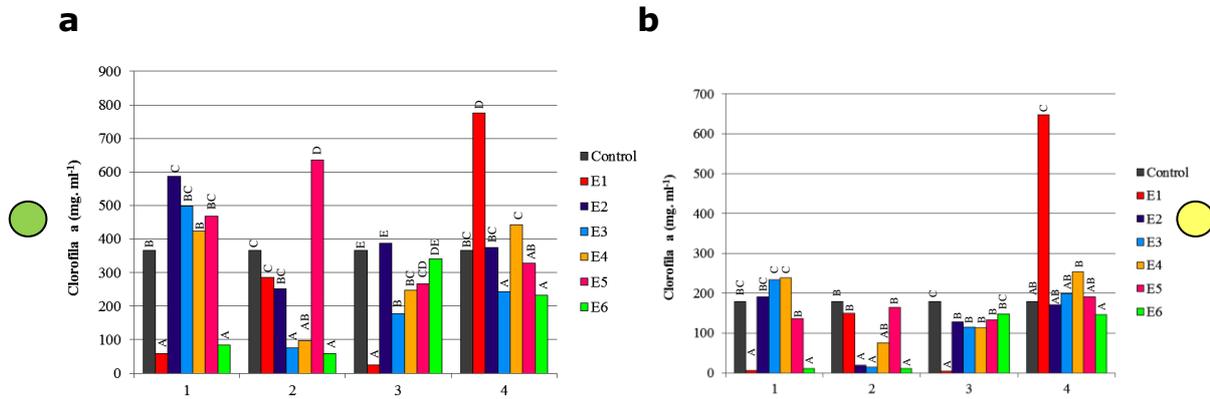


Figura 56: Variación de la clorofila "a" a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

En el análisis de los resultados de los bioensayos en elutriado de sedimentos con *T. suecica*, **E1** no se incluyó en el ANOVA porque la tasa de crecimiento fue negativa.

Para *Tetraselmis suecica* no se hallaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con agua y elutriado (Fig. 57a), mientras que para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron tasas de crecimiento mayores en **elutriado** (Fig. 57b).

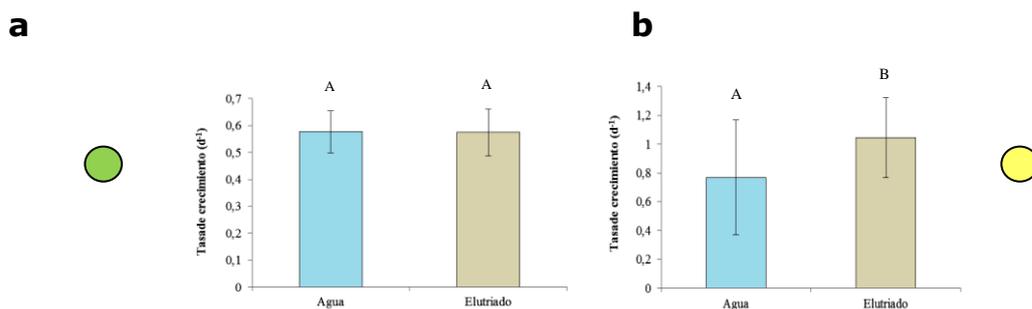


Figura 57: Variación en la tasa de crecimiento en bioensayos realizados con agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

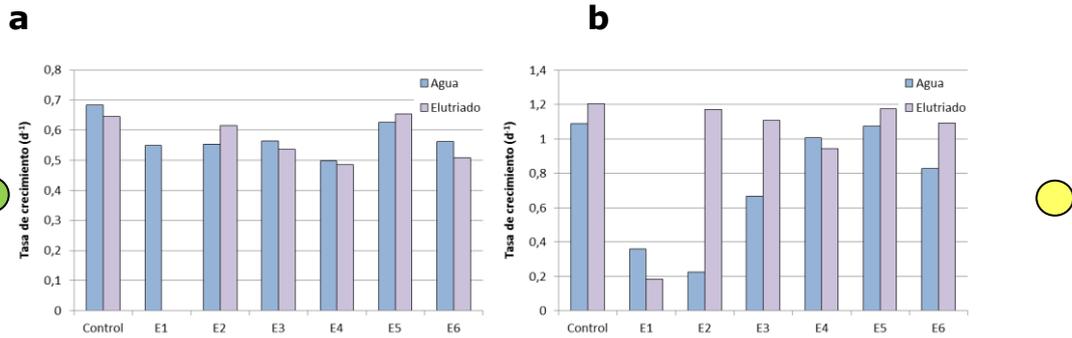


Figura 58: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●).

Con respecto a los sitios de muestreo, para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con **agua** como **elutriado** (Figs. 59a y b, 60a y b).

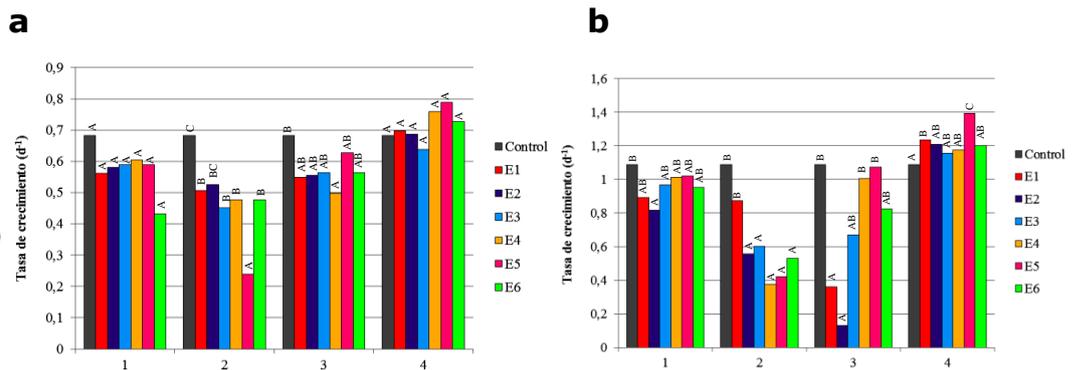


Figura 59: Variación en la tasa de crecimiento a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

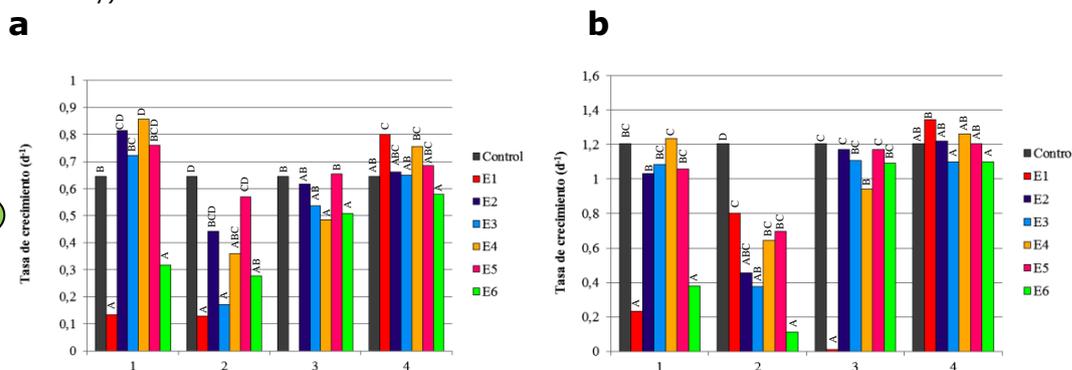


Figura 60: Variación en la tasa de crecimiento a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

9.4. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 4to. muestreo (4°M-mar'15)

Se analizaron:

- **Densidad celular** (nº individuos.ml⁻¹).
- **Clorofila "a"** (mg.ml⁻¹)
- **Tasa de crecimiento celular** (d⁻¹)

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,39	0,2437 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control°	Agua: F=1,88 Elutriado: F=5,73	0,1326 n.s. <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,7	0,199 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=15,86 Elutriado: F=66,91	<0,01 ** <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,9	0,1742 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,78 Elutriado: F=5,23	0,151 n.s. <0,01 **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,02	0,8851 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=13,49 Elutriado: F=5,01	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,57	0,2161 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=8,89 Elutriado: F=61,28	<0,01 ** <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,02	0,8791 n.s.
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=12,45 Elutriado: F=4,82	<0,01 ** <0,01 **

Tabla 10: Resumen de resultados de ANOVA para densidad de individuos, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento de las diferentes estaciones para el 4to. muestreo. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Densidad celular

Para ambas especies de microalgas *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas en la densidad celular al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado** (Figs. 61a y b).

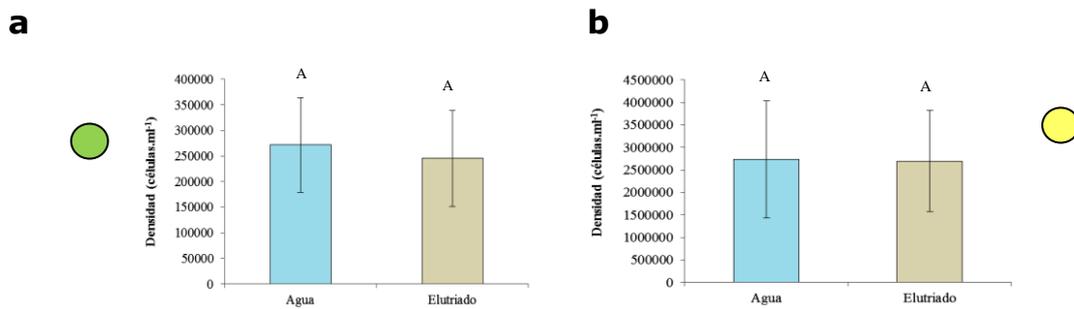


Figura 61: Variación en la densidad celular en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

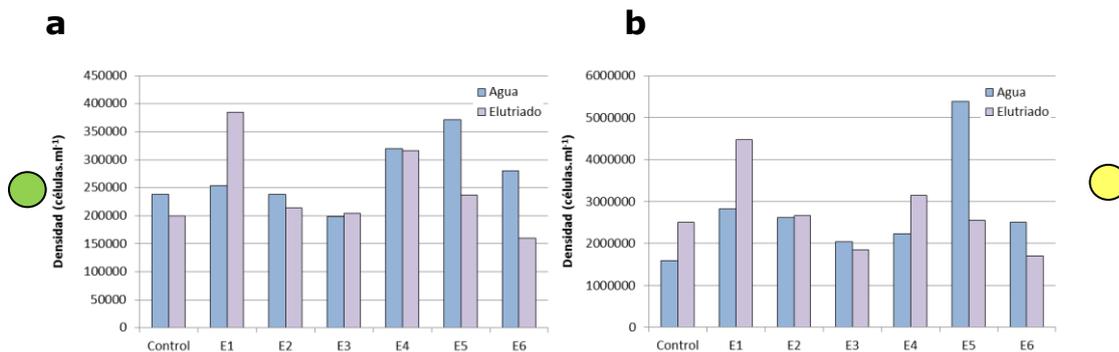


Figura 62: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●).

Con respecto a los sitios de muestreo, para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las estaciones de muestreo (Fig. 63a), mientras que en **elutriado** se hallaron diferencias significativas (Fig. 63b).

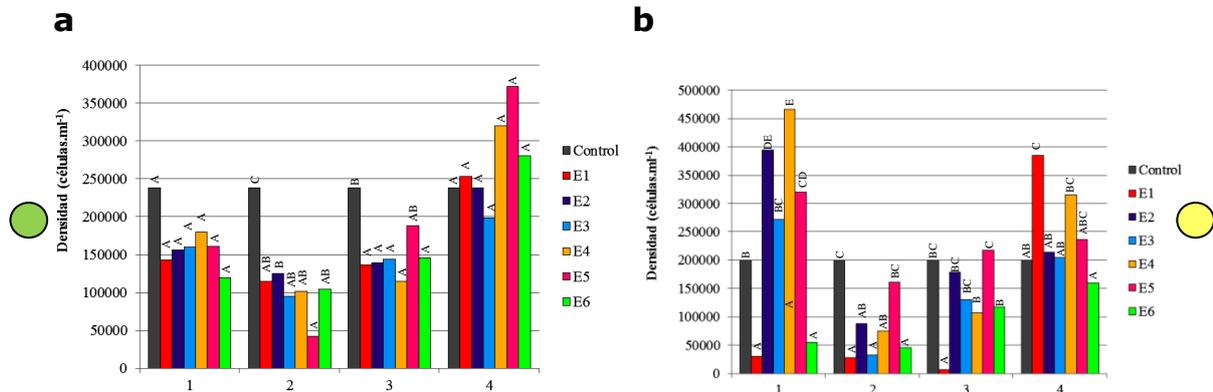


Figura 63: Variación de la densidad celular durante los bioensayos con agua a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en **agua** como **elutriado** (Figs. 64a y b).

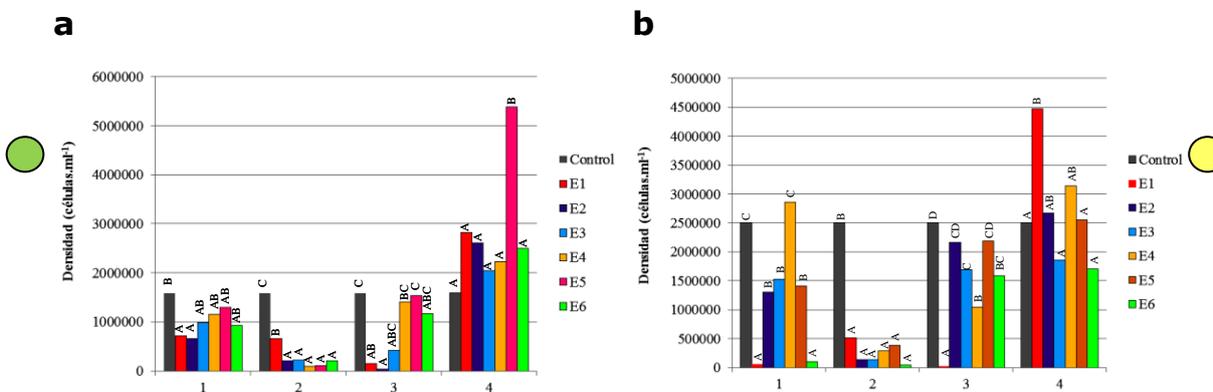


Figura 64: Variación de la densidad celular a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

Clorofila "a"

Para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas en la concentración de clorofila "a" al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado** (Figs. 65a y b).

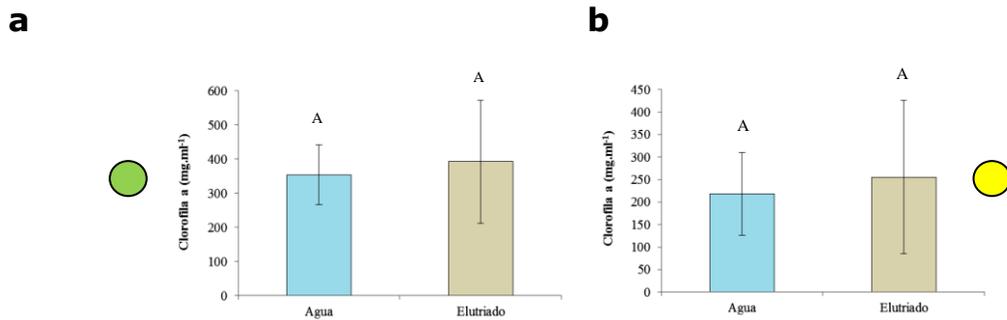


Figura 65: Variación de la concentración de clorofila "a" durante bioensayos realizados con con agua y elutriado de sedimento en el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

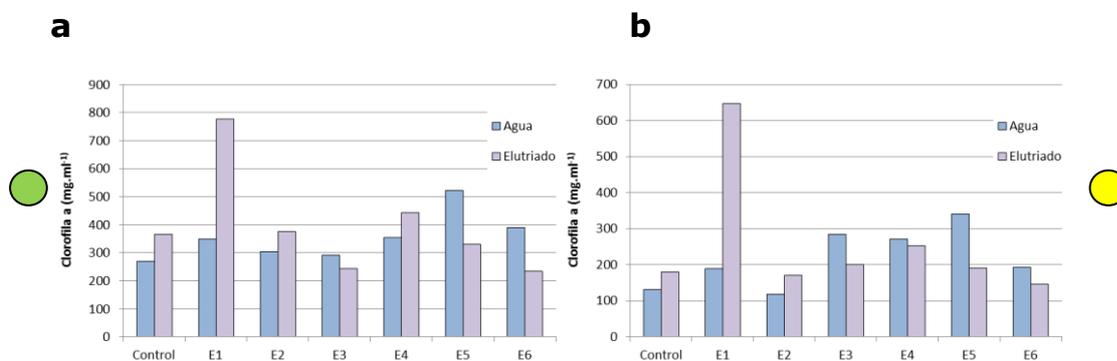


Figura 66: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○).

Con respecto a los sitios de muestreo, para ambas especies se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo tanto en los bioensayos con **agua** como **elutriado** (Figs. 67a y b, 68a y b).

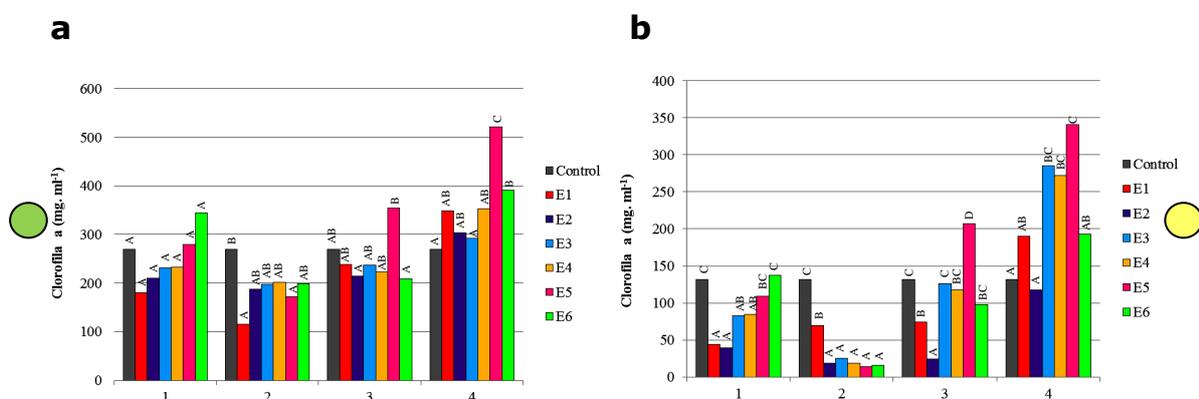


Figura 67: Variación de la clorofila "a" a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

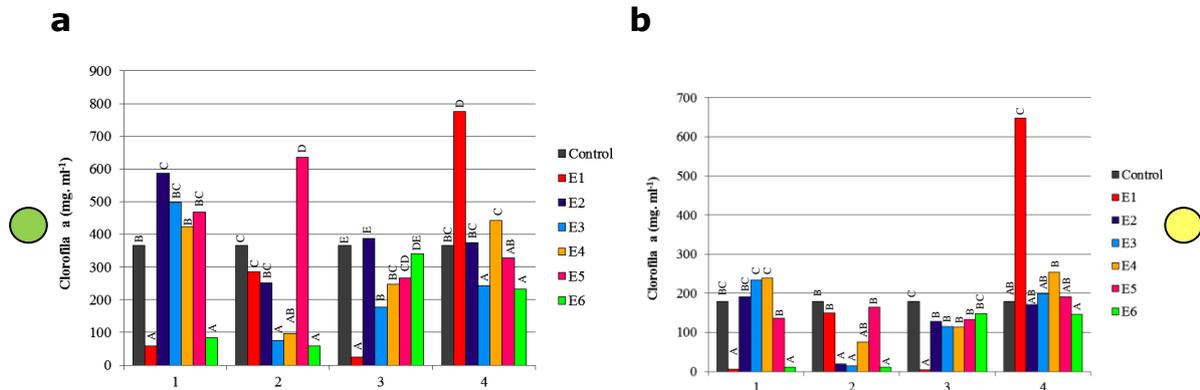


Figura 68: Variación de la clorofila "a" a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos con elutriado del sedimento. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento al comparar los bioensayos con agua y elutriado (Figs. 69a y b).

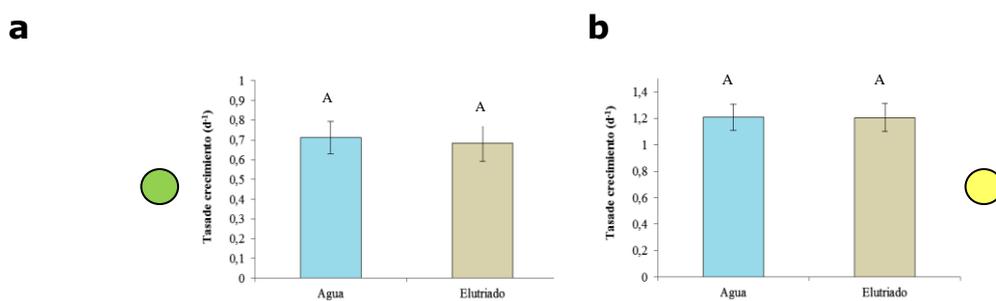


Figura 69: Variación de la tasa de crecimiento en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (●). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (●). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

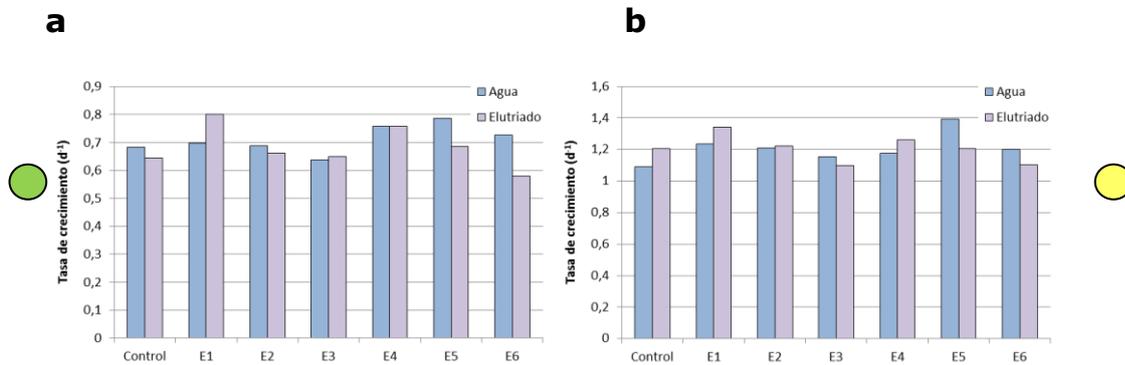


Figura 70: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica* (○). b) *Nitzschia aff. kuetzingioides* (○).

Con respecto a los sitios de muestreo, para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en agua no se hallaron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo (Fig. 71a), mientras que en elutriado se hallaron diferencias significativas (Fig. 71b).

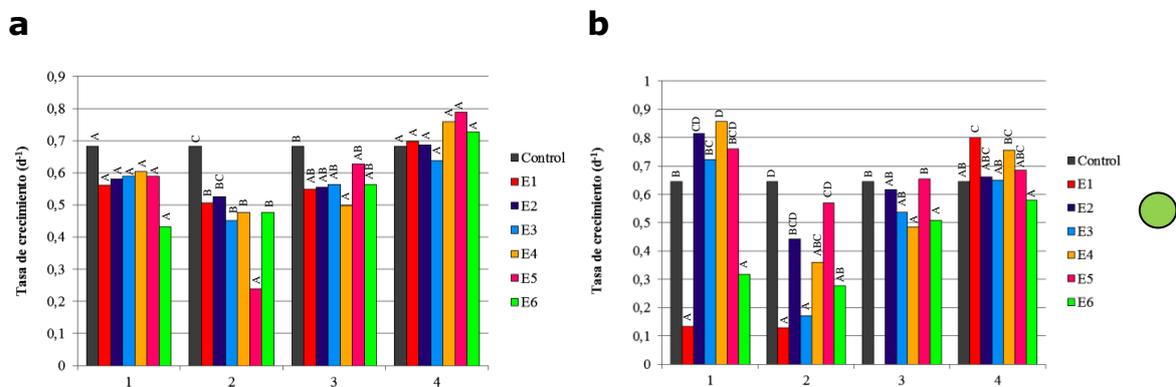


Figura 71: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* (○) durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a). En agua. b) En elutriado del sedimento (○). Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre estaciones de muestreo tanto en agua como elutriado (Fig. 72a y b).

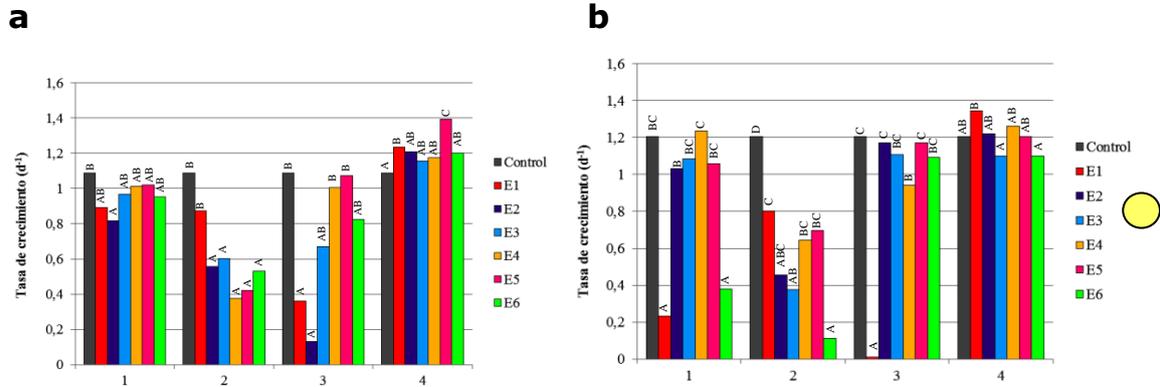


Figura 72: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* (☉) a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

CONCLUSIONES

En este primer estudio se llevó a cabo una evaluación de la ecotoxicidad de del agua y sedimentos de la parte interna del estuario de Bahía Blanca, por medio de bioensayos utilizando poblaciones de dos organismos fitoplanctónicos representantes del primer eslabón de la cadena trófica, en los que se determinaron sus dinámicas de crecimiento y estados fisiológicos.

Se probó la significación estadística de los resultados y se elaboraron síntesis gráficas interpretativas.

DC: dinámica crecimiento EF: estado fisiológico			1°M-jun'15		2°M-sep'15		3°M-dic'15		4°M-mar'16	
			Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.
C	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	●	●	●	●	●	●	●	●
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	●	○	●	○	●	○	●
		EF	●	●	●	●	●	●	●	●
E1 (CLO)	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	●	○	●	○	●	○	●
		EF	○	○	○	●	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	●	○	○	●	●	○	●
		EF	○	●	○	○	○	○	○	●
E2 (IW)	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	●	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	○	○	●	●	●	○	●
		EF	○	●	○	○	○	○	○	○
E3 (cPG)	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	○	○	●	○	○	○	○
		EF	○	○	○	●	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	○	○	●	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
E4 (M)	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
E5 (3aC)	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
E6 (PC)	<i>Tetraselmis suecica</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○
	<i>Nizschia aff. kuetzingioides</i>	DC	○	○	○	○	○	○	○	○
		EF	○	○	○	○	○	○	○	○

Síntesis gráfica valorativa del estado ecotoxicológico de la zona interna del estuario de Bahía Blanca sobre la base de la evaluación de la dinámica de crecimiento y estado fisiológico, en agua y elutriado, de las poblaciones de los dos organismos fitoplanctónicos evaluados.

	<i>T. suecica</i>					<i>N. aff. kuetzingioides</i>				
	●	○	○	○	○	●	○	○	○	○
DC (cél/ml)	<50000	50000-100000	100000 - 200000	200000 - 300000	>300000	<200000	200000 - 500000	500000 - 1000000	1000000 - 2000000	>2000000
EF (R ²)	<0,2	0,2-0,45	0,45-0,65	0,65-0,9	>0,9	<0,2	0,2-0,45	0,45-0,65	0,65-0,9	>0,9

A partir del análisis integral de los resultados se concluye que:

- La decisión de seleccionar las especies de microalgas *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* para la concreción de los bioensayos estuvo basada en criterios tales como la sensibilidad, la relevancia ecológica y la disponibilidad para bioensayos. La misma resultó adecuada ya que pudo determinarse un comportamiento diferencial de las 3 variables biológicas contempladas para el desarrollo de los mismos: densidad celular, concentración de clorofila "a" y crecimiento de la población.
- Se logró la estandarización de los bioensayos ajustándolos a la normativa vigente a través de la puesta a punto de la metodología utilizada (aclimatación de microalgas, obtención del elutriado, etc.), alcanzando la reproductividad experimental y confiabilidad en la comparación de resultados entre diferentes experiencias, como así también la identificación de las principales fuentes de potenciales errores.
- La utilización de organismos nanoplanctónicos de dos diferentes especies en la realización de los bioensayos otorgó una mayor relevancia ecológica a las valoraciones ya que ambos organismos no presentaron las mismas respuestas al ser expuestos tanto en agua como en elutriado del sedimento de las estaciones de muestreo seleccionadas. Además, se comprobó que ambas especies evaluadas presentan un patrón de crecimiento diferente.
- Durante los tres primeros muestreos de junio, septiembre y diciembre de 2015 se observó un desacople entre la concentración de clorofila "a" y la densidad de individuos. Esta situación representó un buen indicador del estado fisiológico de los organismos, ya que el mismo coincidió con situaciones de baja densidad de individuos, lo cual indicaría que los factores que afectan al crecimiento poblacional estarían también influyendo sobre el estado fisiológico de las microalgas. Este fenómeno fue más frecuentemente observado en las

estaciones **E1** (CLO) y **E6** (PC), aunque en el muestreo de septiembre dicho desacople se observó en todos los sitios.

- Se registró una fuerte inhibición del crecimiento de las microalgas en los bioensayos en agua y fundamentalmente en elutriado del sedimento en **E1** (CLO) y **E6** (PC). Esta situación coincidió con un aumento de las concentraciones de metales pesados y compuestos aromáticos (PAHs) registrados en el sedimento en estos dos sitios de muestreo. Sin embargo, por no ser este un estudio de asociación causa-efecto, no se puede inferir sobre la naturaleza de los compuestos responsables de los efectos observados sobre el crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides*. En efecto, por haberse utilizado un medio de cultivo no sintético, que contiene una gran diversidad de compuestos (metales, PAHs y probablemente muchos otros compuestos no determinados) es imposible individualizar la respuesta de las microalgas a cada uno de estos compuestos, además de la ocurrencia en simultáneo de diferentes compuestos que puede generar un efecto sinérgico o antagónico entre ellos.
- Asimismo, en septiembre de 2015 pudo evidenciarse un efecto inhibitor del crecimiento de las microalgas en todas las estaciones de muestreo tanto en agua como en elutriado del sedimento coincidentemente con el registro más bajo de nutrientes, inclusive en **E1** (Clo) estación caracterizada por su alto contenido de materia orgánica. Esto ocasionaría una mayor sensibilización de los organismos a la presencia de sustancias contaminantes específicas que están en bajas concentraciones o la mezcla de ellas.
- La respuesta de las microalgas sugiere una elevada movilidad de compuestos potencialmente ecotoxicológicos, tanto en agua como similar en sedimentos y, consecuentemente, una alta capacidad de restauración integral del sistema, ya que durante los bioensayos realizados tanto en agua como en elutriado de sedimento provenientes del muestreo de marzo de 2016 en ambas especies se

observó un aumento de todas las variables relacionadas con el crecimiento (densidad, clorofila "a" y tasa de crecimiento). Esto fue coincidente con una mayor concentración de nutrientes (nitratos, sílice disuelto y fósforo reactivo soluble) registrada en esa fecha y a una disminución importante de las concentraciones de metales pesados.

- Las alteraciones morfológicas observadas podrían reflejar una situación puntual de estrés ambiental de tipo físico o químico que ameritan una mayor profundización de los estudios para detectar los efectos de los contaminantes individuales y múltiples y sus efectos sinérgicos adicionales, con el fin de conformar una herramienta fiable para la evaluación de calidad de la masa de agua del estuario.
- Los sitios de muestreo **E1** (CLO) y **E6** (PC) representan sitios más sensibles que requerirían especial atención en futuros programas de gestión ambiental. Sin embargo, en los restantes sitios de muestreo también se observaron alteraciones en el crecimiento y estado fisiológico de las microalgas que podrían estar asociados con situaciones de vertidos puntuales de sustancias contaminantes y por lo tanto se recomienda continuar con la evaluación.
- Como era de esperar, no se detectó una respuesta identificatoria válida para una caracterización estacional de la calidad del agua o del sedimento, ya que tanto los vuelcos de aguas residuales urbanas y la mayor parte de las actividades antrópicas desarrolladas en el estuario no siguen un patrón estacional y sí están sujetas a la operatividad de los sistemas domésticos e industriales, por lo que futuros estudios deberían ajustarse a ese patrón temporal.
- Este estudio de la ecotoxicidad del agua y sedimento del estuario permitió analizar la respuesta del eslabón inicial de la cadena trófica del estuario de Bahía Blanca ante las variaciones de la calidad del agua, aportando los primeros datos sobre niveles de peligrosidad trasladable y asimilable a otros organismos. Su continuación

permitirá identificar sitios que requieran la intervención y/o el manejo en futuros programas de gestión para establecer niveles guía de protección del ambiente estuarial y su biota.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso E, Leal S. 1998. Creación y mantenimiento de un cepario de microalgas. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana, Cuba, 21 pp.
- ASTM E1218-04. 2012. Standart Guide for conducting static toxicity test with microalgae. ASTM International Helping our world ware better. ESA.
- Azam F. 1998. Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *Science* 280 (5364):694-696.
- American Public Health Association (APHA). 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18 Edición. Washington.
- Arias AH, Vazquez-Botello A, Tombesi NB, Ponce-Vélez G, Freije RH, Marcovecchio JE, 2010. Presence, distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environmental Monitoring & Assessment* 160 (1-4), 301-314.
- Cabrera Dorado JJ. 2000. Estudio sobre la toxicidad de los vertidos en Huelva. Tesis Master en Tecnología Química y Ambiental.
- Castillo Morales, G (ed.). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: IMTA, 198 pp.
- Canadá: IDRC, 2004. Cuadrado DG, SS Ginsberg, EA Gómez, 2004. Geomorfología del estuario. En: Piccolo MC, MS Hoffmeyer (eds), El ecosistema del estuario de Bahía Blanca, EdiUNS (ISBN 987-9281-96), Bahía Blanca (Argentina).
- Debenest T, Silvestre J, Coste M, Delmas F, Pinelli E. 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: induction of nucleus alterations and silica wall abnormalities. *Aquat. Toxicol.* 88 (1) 88-94.
- Falasco E, Bona F, Marco Ginepro M, Hlúbiková D, Hoffmann L, Ector L. 2009. Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. *Water SA.* 35: 595-606.
- Freije RH, Spetter CV, Marcovecchio JE, Popovich CA, Botté SE, Negrín VL, Arias AH, Delucchi F, Asteasuain RO. 2008. Water chemistry and nutrients of the Bahía Blanca Estuary. En: R Neves, J Baretta, M Mateus (eds), *Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America. Part B: From shallow water to the deep fjord: the study sites*, IST Scientific Publishers, Lisbon (Portugal), (623 pp.), Chapter 23, pp. 243-256. (ISBN: 978-972-8469-74-0)
- Garmendia JM, Menchaca I, Belzunce MJ, Revilla M. 2009. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Revista de Investigación Marina* 11: 25 pp.
- Gómez N, Licursi M (2003) Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedwigia* **77** (3-4) 389-398.
- Hernández E, Aguirre NJ, Palacio JA. 2011. Relationship between chlorophyll a pigment and algal geometric biovolume determination in a floodplain lake (Ciénaga Ayapel, Córdoba, Colombia). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 60:159-169.

- Hustedt F. 1956 Kieselalgen (Diatomeen). Einführung in die Kleinlebewelt. Kosmos Verlag, Stuttgart. 70 pp. ISO /DIS 5667-16:2016. Water quality - Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples.
- Larraín A. 1995. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Cien. Tecn. Mar CONA. (N.º Esp.): 39-47.
- Marcovecchio JE, 2000. Land-based sources and activities affecting the marine environment at the Upper Southwestern Atlantic Ocean: an overview. UNEP Regional Seas Reports & Studies N°170: 67 pp.
- Marcovecchio JE, Andrade JS, Ferrer LD, Asteasuain RO, De Marco SG, Gavio MA, Scarlato NA, Freije RH, Pucci AE. 2001. Mercury distribution in estuarine environments from Argentina: the detoxification and recovery of salt-marshes after 15 years. Wetland Ecology and Management 9 (4), 317-322.
- Marcovecchio JE, Ferrer LD. 2005. Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahía Blanca estuary, Argentina. Journal of Coastal Research 21 (4), 826-834.
- Marcovecchio JE. 2014. Programa de Monitoreo de la Calidad Ambiental de la Zona Interior del Estuario de Bahía Blanca. bahiablanca.gov.ar/cte/doc/Informe Final Estuario de Bahia Blanca 2014.pdf
- Morin S, Vivas-Nogues M, Duong TT, Boudou A, Coste M, Delmas F. 2007. Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). Fundam. Appl. Limnol. (Arch. Hydrobiol.) 168 (2) 179-187.
- Nalewajko C, Olaveson MM. 1998. Ecophysiological considerations in microalgal toxicity test. En Wells PG, Lee K and Blaise Ch (Eds). Microscale testing in aquatic toxicity: advances, technical and practice. CRC Press. Boca Raton. pp. 289-309.
- Osenduko O, Dean AP, Davies H, Pittman JK. 2014. Acclimatation of microalgae to wastewater environments involves increased oxidative stress tolerance activity. Plant and cell physiology 55(10):1848-1857.
- Peluso ML. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis Doctoral. UN La Plata. <http://hdl.handle.net/10915/18420>.
- Perillo GME, Piccolo MC, Marcovecchio JE. 2006. Coastal oceanography of the western south Atlantic continental shelf (33° to 55°S). En: AR Robinson, KH Brink (eds), The Sea. The Global Coastal Ocean: Interdisciplinary Regional Studies and Syntheses, Vol.14 – Part A, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, Ch.9, pp. 295-327. (ISBN- 0-674-01527-4).
- Perillo GME, Piccolo MC, Parodi ER, Freije RH. 2001. The Bahía Blanca estuary. En: U Seelinger, B Kjerfve (eds.), Coastal Marine Ecosystems of Latin America, Springer-Verlag, Heidelberg (Germany), pp.205-217.
- Pica Granados Y, Trujillo Domínguez G. 2007. Procedimiento para la generación de extractos orgánicos y elutriados de suelos y sedimentos para su análisis en ensayos de toxicidad. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México. Compiladoras:

- Ramírez Romero P, Mendoza Cantú A. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. México. 428 pp.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (CPPS/PNUMA). 1985
- Rand GM, Petrocelli SR. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Hemisphere Pub. Corp. Washington.
- Rand GM, Wells PG, McCarty LS. 1995. Introduction to aquatic toxicology. En: Rand, G. M. (eds) Fundamental of aquatic toxicology. Taylor and Francis, Washinton, DC., 3-66.
- Rodríguez L, Rivera D. 1995. Efecto del cobre y cadmio en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher y *Dunaliella salina* Teodoresco. Estudios Oceanológicos. 14: 61-74.
- Romero Y, Lodeiros C, Esclapés M, Marín N, Guevara M, Morales E. 2001. Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. Interciencia 27(3): 104-106
- Ronco AE, Sobrero C, Grassi V, Kaminski L, Massoio L, Mina L. 2000. Watertox bioassay intercalibration network: results from Argentina. Environmental Toxicology: 287-297.
- Segretin ME. Biomonitorio ambiental y tratamiento de efluentes. <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Biomonitorio%20y%20tratamiento%20de%20efluentes.pdf>
- Sunda WG, Lewis JM. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. Limnol.23:870-876.
- Starr RC, Zeikus JA. 1993. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. J Phycol 29: 1-106.
- Tadros M, Bulthia P, Smith W. 1990. Differential response of marine diatoms to trace metal. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44: 826-831.
- US EPA. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition October 2002.
- US EPA. 2012. OCSPP 850-4500. Algal toxicology. Ecological effects test guidelines. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (7101). USA
- Valenzuela Perez JT. 2013. Calibracion y estimacion de la sensibilidad toxicológica de *Lemna valdiviana* Phil (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante dicromato de potasio y sulfato de cobre como toxicos de referencia. Tesis. Universidad Austral de Chile.
- Visviki I, Rachlin W. 1994. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chamydomonas bullosa* to copper and cadmium effects on growth. Arch. Env. Comp. Toxicol. 26: 149-153.
- Walsh G, M Yoder, L Laughlin, E Lores. 1987. Responses of marine unicellular algae to brominated organic compound in six growth media. Ecotox. Envir. Safety 14: 215-222.

Wright DA, Welbourn P. 2002. Environmental Toxicology. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge Univ.

Zar JH.1996. Biostatistical analysis. 3rd. ed. Prentice Hall, New Jersey.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. Method 1311 Toxicity Characteristic Leaching Procedure.

ANEXO

12.1. Bioensayos en agua y elutriado del sedimento del estuario

Primer muestreo (1°M-jun´15)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun '15)

Tetraselmis suecica. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua Tetraselmis	28	0,32	0,13	34,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,2751E+10	6	5458539048	1,67	0,1777
Columna1	3,2751E+10	6	5458539048	1,67	0,1777
Error	6,8614E+10	21	3267333333		
Total	1,0137E+11	27			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=131392,24505

Error: 3267333333,3333 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E6	119600	4	28580,3	A
E1	143000	4	28580,3	A
E2	156000	4	28580,3	A
E3	159900	4	28580,3	A
E5	161200	4	28580,3	A
E4	179400	4	28580,3	A
Control	237900	4	28580,3	A

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun ´ 15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Tetraselmis suecica</i>	28	0,26	0,05	39,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	69936,33	6	11656,05	1,21	0,3387
Columna1	69936,33	6	11656,05	1,21	0,3387
Error	201834,32	21	9611,16		
Total	271770,65	27			

Test:Tukey Alfa=0,05

DMS=225,35172

Error: 9611,1582 gl:

21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E1	180,01	4	49,02	A
E2	209,6	4	49,02	A
E3	231,93	4	49,02	A
E4	232,15	4	49,02	A
Control	269,67	4	49,02	A
E5	279,73	4	49,02	A
E6	345,06	4	49,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado Tetraselmis	28	0,93	0,91	19,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,4836E+11	6	1,0806E+11	48,34	<0,0001
Columna1	6,4836E+11	6	1,0806E+11	48,34	<0,0001
Error	4,6941E+10	21	2235306667		
Total	6,953E+11	27			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=108677,98268

Error: 2235306666,6667 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.				
E1	29900	4	23639,51	A			
E6	54600	4	23639,51	A			
Control	200200	4	23639,51		B		
E3	271700	4	23639,51		B	C	
E5	319800	4	23639,51			C	D
E2	393900	4	23639,51				D
E4	466700	4	23639,51				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado				
<i>Tetraselmis</i>	28	0,92	0,9	18,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1013980,01	6	168996,67	40,91	<0,0001
Columna1	1013980,01	6	168996,67	40,91	<0,0001
Error	86740,38	21	4130,49		
Total	1100720,39	27			

Test:Tukey Alfa=0,05

DMS=147,73181

Error: 4130,4944 gl:

21

Columna1	Medias	n	E.E.			
E1	58,86	4	32,13	A		
E6	83,6	4	32,13	A		
Control	365,75	4	32,13		B	
E4	422,54	4	32,13		B	
E5	468,85	4	32,13		B	C
E3	497,34	4	32,13		B	C
E2	587,89	4	32,13			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun ´ 15)

Nitzschia aff. kuetzingioides. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,5774E+12	6	4,2956E+11	4,58	0,004
Columna1	2,5774E+12	6	4,2956E+11	4,58	0,004
Error	1,9702E+12	21	9,3817E+10		
Total	4,5475E+12	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=704067,45792

Error: 93817211428,5714 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.		
E2	659100	4	153147,98	A	
E1	713700	4	153147,98	A	
E6	923000	4	153147,98	A	B
E3	988000	4	153147,98	A	B
E4	1158300	4	153147,98	A	B
E5	1288300	4	153147,98	A	B
Control	1588600	4	153147,98		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun ´ 15)

***Nitzschia aff. kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i>	27	0,81	0,76	21,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	33593,14	6	5598,86	14,51	<0,0001
Columna2	33593,14	6	5598,86	14,51	<0,0001
Error	7716,61	20	385,83		
Total	41309,75	26			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=46,44119

Error: 385,8305 gl: 20

Columna2	Medias	n	E.E.		
E2	39,34	3	11,34	A	
E1	44,11	4	9,82	A	
E3	82,59	4	9,82	A	B
E4	84,26	4	9,82	A	B
E5	109,27	4	9,82		B C
Control	131,31	4	9,82		C
E6	137,1	4	9,82		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun´15)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	28	0,92	0,89	24,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,7558E+1	3	4,5929E+1	39,28	<0,000
Columna1	2,7558E+1	3	4,5929E+1	39,28	<0,000
Error	2,4558E+1	21	1,1694E+1		
Total	3,0013E+1	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=786062,10299

Error: 116941240000,0000 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E1	57200	4	170983,36	A
E6	96200	4	170983,36	A
E2	1307800	4	170983,36	B
E5	1405300	4	170983,36	B
E3	1528800	4	170983,36	B
Control	2509000	4	170983,36	C
E4	2860000	4	170983,36	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (1°M-jun '15)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	28	0,92	0,89	24,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,7558E+1	3	4,5929E+1	39,28	<0,000
Columna1	2,7558E+1	3	4,5929E+1	39,28	<0,000
Error	2,4558E+1	21	1,1694E+1		
Total	3,0013E+1	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=786062,10299

Error: 116941240000,0000 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E1	57200	4	170983,36	A
E6	96200	4	170983,36	A
E2	1307800	4	170983,36	B
E5	1405300	4	170983,36	B
E3	1528800	4	170983,36	B
Control	2509000	4	170983,36	C
E4	2860000	4	170983,36	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

12.2. Bioensayos en agua y elutriado del sedimento del estuario

Segundo muestreo (2°M-sep´15)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

Tetraselmis suecica. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Tetraselmis</i>	28	0,8	0,74	27,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,5081E+1	6	1,418E+10	13,86	<0,000
Columna1	8,5081E+1	6	1,418E+10	13,86	<0,000
Error	2,1483E+1	21	102301333		1
Total	1,0656E+1	27	3		

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=73521,38143

Error: 1023013333,3333 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.		
E5	41600	4	15992,29	A	
E3	94900	4	15992,29	A	B
E4	101400	4	15992,29	A	B
E6	104000	4	15992,29	A	B
E1	114400	4	15992,29	A	B
E2	124800	4	15992,29		B
Control	237900	4	15992,29		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Agua <i>Tetraselmis</i>		26	0,48	0,32	19,6

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27230,65	6	4538,44	2,93	0,0338
Columna1	27230,65	6	4538,44	2,93	0,0338
Error	29416,3	19	1548,23		
Total	56646,95	25			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=97,69499

Error: 1548,2265 gl:

19

Columna1	Medias	n	E.E.		
E1	155	2	27,82	A	
E5	171,79	4	19,67	A	
E2	188,08	4	19,67	A	B
E3	197,56	4	19,67	A	B
E6	199,49	4	19,67	A	B
E4	201,08	4	19,67	A	B
Control	269,67	4	19,67		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Tetraselmis</i>	28	0,78	0,72	41,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,0659E+11	6	1,7765E+10	12,56	<0,0001
Columna1	1,0659E+11	6	1,7765E+10	12,56	<0,0001
Error	2,9697E+10	21	1414127619		
Total	1,3628E+11	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=86440,50866

Error: 1414127619,0476 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.			
E1	27300	4	18802,44	A		
E3	32500	4	18802,44	A		
E6	45500	4	18802,44	A		
E4	75400	4	18802,44	A	B	
E2	88400	4	18802,44	A	B	
E5	161200	4	18802,44		B	C
Control	200200	4	18802,44			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Elutriado <i>Tetraselmis</i>		28	0,91	0,88	27,6

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1012446,29	6	168741,05	34,67	<0,0001
Columna2	1012446,29	6	168741,05	34,67	<0,0001
Error	102213,14	21	4867,29		
Total	1114659,43	27			

Test:Tukey Alfa=0,05

DMS=160,36763

Error: 4867,2922 gl:

21

Columna2	Medias	n	E.E.			
E6	58,3	4	34,88	A		
E3	75,29	4	34,88	A		
E4	97,49	4	34,88	A	B	
E2	251,94	4	34,88		B	C
E1	285,87	4	34,88			C
Control	365,75	4	34,88			C
E5	634,64	4	34,88			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

Nitzschia aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia</i>	28	0,93	0,91	35,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,0111E+1	6	1,1685E+1	46,56	<0,000
Columna1	7,0111E+1	6	1,1685E+1	46,56	<0,000
Error	5,2705E+1	21	2,5098E+1		1
Total	7,5382E+1	27	0		

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=364157,56717

Error: 25097626666,6667 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.		
E4	91000	4	79211,15	A	
E5	113100	4	79211,15	A	
E2	205400	4	79211,15	A	
E6	208000	4	79211,15	A	
E3	224900	4	79211,15	A	
E1	663000	4	79211,15		B
Control	1588600	4	79211,15		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

***Nitzschia aff. kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia</i>	28	0,96	0,95	21,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	46517,59	6	7752,93	96,38	<0,0001
Columna2	46517,59	6	7752,93	96,38	<0,0001
Error	1689,32	21	80,44		
Total	48206,91	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=20,61668

Error: 80,4436 gl: 21

Columna2	Medias	n	E.E.		
E5	13,8	4	4,48	A	
E6	15,76	4	4,48	A	
E2	18,04	4	4,48	A	
E4	18,25	4	4,48	A	
E3	25,21	4	4,48	A	
E1	69,38	4	4,48		B
Control	131,31	4	4,48		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	28	0,95	0,94	36,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,8146E+13	6	3,0244E+12	69,97	<0,0001
Columna1	1,8146E+13	6	3,0244E+12	69,97	<0,0001
Error	9,0769E+11	21	4,3223E+10		
Total	1,9054E+13	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=477893,42823

Error: 43223118095,2381 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E6	39000	4	103950,85	A
E3	131300	4	103950,85	A
E2	135200	4	103950,85	A
E4	295100	4	103950,85	A
E5	383500	4	103950,85	A
E1	514800	4	103950,85	A
Control	2509000	4	103950,85	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (2°M-sep´15)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	28	0,76	0,69	51,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	137561,75	6	22926,96	11,12	<0,0001
Columna2	137561,75	6	22926,96	11,12	<0,0001
Error	43300,65	21	2061,94		
Total	180862,4	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=104,37839

Error: 2061,9359 gl:

21

Columna2	Medias	n	E.E.		
E6	10,4	4	22,7	A	
E3	13,9	4	22,7	A	
E2	18,69	4	22,7	A	
E4	75,68	4	22,7	A	B
E1	149,72	4	22,7		B
E5	163,79	4	22,7		B
Control	179,49	4	22,7		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

12.3. Bioensayos en agua y elutriado del sedimento del estuario

Tercer muestreo (3°M-dic´15)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

Tetraselmis suecica. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Tetraselmis</i>	28	0,56	0,44	24,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,1504E+1 0	6	691741142 9	4,52	0,0043
Columna1	4,1504E+1 0	6	691741142 9	4,52	0,0043
Error	3,2171E+1 0	21	153194476 2		
Total	7,3675E+1 0	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=89969,34622

Error: 1531944761,9048 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.		
E4	114400	4	19570,03	A	
E1	136500	4	19570,03	A	
E2	139100	4	19570,03	A	
E3	144300	4	19570,03	A	
E6	145600	4	19570,03	A	
E5	188500	4	19570,03	A	B
Control	237900	4	19570,03		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Tetraselmis</i>	27	0,5	0,35	18,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	40500,72	6	6750,12	3,33	0,0195
Columna1	40500,72	6	6750,12	3,33	0,0195
Error	40596,15	20	2029,81		
Total	81096,87	26			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=106,52031

Error: 2029,8073 gl: 20

Columna1	Medias	n	E.E.		
E6	198,41	3	26,01	A	
E2	214,53	4	22,53	A	
E4	222,32	4	22,53	A	B
E3	237,39	4	22,53	A	B
E1	238,85	4	22,53	A	B
Control	269,67	4	22,53	A	B
E5	324,69	4	22,53		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

Tetraselmis suecica. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Tetraselmis</i>	28	0,78	0,71	30,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,22E+11	6	2,0334E+10	12,1	<0,000
Columna1	1,22E+11	6	2,0334E+10	12,1	<0,000
Error	3,5294E+10	21	168066476		
Total	1,573E+11	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=94235,28727

Error: 1680664761,9048 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.		
E1	6500	4	20497,96	A	
E4	106600	4	20497,96		B
E6	117000	4	20497,96		B
E3	130000	4	20497,96		B C
E2	178100	4	20497,96		B C
Control	200200	4	20497,96		B C
E5	217100	4	20497,96		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Tetraselmis</i>	28	0,93	0,92	13,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	386824,75	6	64470,79	49,53	<0,0001
Columna3	386824,75	6	64470,79	49,53	<0,0001
Error	27336,65	21	1301,75		
Total	414161,4	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=82,93465

Error: 1301,7454 gl: 21

Columna3	Medias	n	E.E.				
E1	23,7	4	18,04	A			
E3	177,79	4	18,04		B		
E4	248,25	4	18,04		B	C	
E5	266,96	4	18,04			C	D
E6	339,81	4	18,04				D E
Control	365,75	4	18,04				E
E2	387,99	4	18,04				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

Nitzschia aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia</i>	28	0,63	0,52	61,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,0987E+13	6	1,8311E+12	5,84	0,001
Columna1	1,0987E+13	6	1,8311E+12	5,84	0,001
Error	6,5812E+12	21	3,1339E+11		
Total	1,7568E+13	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1286818,15960

Error: 313392312380,9526 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.			
E2	40300	4	279907,27	A		
E1	152100	4	279907,27	A	B	
E3	421200	4	279907,27	A	B	C
E6	1173900	4	279907,27	A	B	C
E4	1407900	4	279907,27		B	C
E5	1541800	4	279907,27			C
Control	1588600	4	279907,27			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

***Nitzschia aff. kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia</i>	27	0,91	0,88	17,6

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	75818,24	6	12636,37	32,71	<0,000
Columna1	75818,24	6	12636,37	32,71	<0,000
Error	7727,13	20	386,36		1
Total	83545,37	26			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=46,47284

Error: 386,3566 gl: 20

Columna1	Medias	n	E.E.			
E2	24,01	4	9,83	A		
E1	74,41	4	9,83		B	
E6	97,88	3	11,35		B	C
E4	117,23	4	9,83		B	C
E3	126,27	4	9,83			C
Control	131,31	4	9,83			C
E5	207,12	4	9,83			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic´15)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	28	0,91	0,89	17,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,7148E+13	6	2,858E+12	37,56	<0,0001
Columna1	1,7148E+13	6	2,858E+12	37,56	<0,0001
Error	1,5978E+12	21	7,6085E+10		
Total	1,8746E+13	27			

Test:Tukey Alfa=0,05

DMS=634047,60355

Error: 76084765714,2855 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.			
E1	24700	4	137917,34	A		
E4	1038700	4	137917,34		B	
E6	1582100	4	137917,34		B	C
E3	1691300	4	137917,34			C
E2	2159300	4	137917,34			C D
E5	2185300	4	137917,34			C D
Control	2509000	4	137917,34			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (3°M-dic'15)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	27	0,92	0,9	14,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	71308,22	6	11884,7	40,47	<0,0001
Columna4	71308,22	6	11884,7	40,47	<0,0001
Error	5872,65	20	293,63		
Total	77180,87	26			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=40,51419

Error: 293,6326 gl: 20

Columna4	Medias	n	E.E.			
E1	4,59	4	8,57	A		
E4	113,85	3	9,89		B	
E3	115,14	4	8,57		B	
E2	127,86	4	8,57		B	
E5	133,07	4	8,57		B	
E6	147	4	8,57		B	C
Control	179,49	4	8,57			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

12.4. Bioensayos en agua y elutriado del sedimento del estuario

Cuarto muestreo (4°M-mar´16)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Tetraselmis</i>	28	0,35	0,16	31,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,1329E+10	6	1,3555E+10	1,88	0,1326
Columna1	8,1329E+10	6	1,3555E+10	1,88	0,1326
Error	1,5172E+11	21	7224830476		
Total	2,3305E+11	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=195383,03084

Error: 7224830476,1905 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E3	198900	4	42499,5	A
Control	237900	4	42499,5	A
E2	237900	4	42499,5	A
E1	253500	4	42499,5	A
E6	280800	4	42499,5	A
E4	319800	4	42499,5	A
E5	371800	4	42499,5	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Tetraselmis</i>	28	0,82	0,77	11,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	171438,9	2	28573,15	15,86	<0,000
Columna1	171438,9	2	28573,15	15,86	<0,000
Error	37837,13	21	1801,77		1
Total	209276,0	5			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=97,57139

Error: 1801,7683 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.		
Control	269,67	4	21,22	A	
E3	292,36	4	21,22	A	
E2	304,12	4	21,22	A	B
E1	348,57	4	21,22	A	B
E4	353,03	4	21,22	A	B
E6	390,56	4	21,22		B
E5	521,62	4	21,22		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Tetraselmis</i>	27	0,95	0,94	11,4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	805267,2	6	134211,2	66,91	<0,000
Columna3	805267,2	6	134211,2	66,91	<0,000
Error	40119,62	20	2005,98		
Total	845386,8	26			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=105,89328

Error: 2005,9808 gl: 20

Columna3	Medias	n	E.E.			
E6	233,41	4	22,39	A		
E3	243,06	4	22,39	A		
E5	329,01	4	22,39	A	B	
Control	365,75	4	22,39		B	C
E2	374,72	4	22,39		B	C
E4	441,7	3	25,86			C
E1	775,64	4	22,39			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Tetraselmis suecica*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Tetraselmis</i>	27	0,95	0,94	11,4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	805267,2	6	134211,2	66,91	<0,000
Columna3	805267,2	6	134211,2	66,91	<0,000
Error	40119,62	20	2005,98		
Total	845386,8	26			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=105,89328

Error: 2005,9808 gl: 20

Columna3	Medias	n	E.E.			
E6	233,41	4	22,39	A		
E3	243,06	4	22,39	A		
E5	329,01	4	22,39	A	B	
Control	365,75	4	22,39		B	C
E2	374,72	4	22,39		B	C
E4	441,7	3	25,86			C
E1	775,64	4	22,39			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

Nitzschia aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia</i>	28	0,79	0,74	24,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,6507E+13	6	6,0845E+12	13,49	<0,0001
Columna1	3,6507E+13	6	6,0845E+12	13,49	<0,0001
Error	9,4691E+12	21	4,5091E+11		
Total	4,5976E+13	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1543537,49197

Error: 450908417142,8557 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
Control	1588600	4	335748,57	A
E3	2039700	4	335748,57	A
E4	2232100	4	335748,57	A
E6	2499900	4	335748,57	A
E2	2616900	4	335748,57	A
E1	2821000	4	335748,57	A
E5	5380700	4	335748,57	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Nitzschia aff. kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Agua <i>Nitzschia</i>	28	0,72	0,64	25,5

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	165575,28	6	27595,88	8,89	0,0001
Columna1	165575,28	6	27595,88	8,89	0,0001
Error	65199,85	21	3104,75		
Total	230775,14	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=128,08158

Error: 3104,7549 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.			
E2	117,78	4	27,86	A		
Control	131,31	4	27,86	A		
E1	190,13	4	27,86	A	B	
E6	192,6	4	27,86	A	B	
E4	271,97	4	27,86		B	C
E3	284,94	4	27,86		B	C
E5	340,56	4	27,86			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Densidad Celular**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Elutriado <i>Nitzschia</i>		28	0,59	0,47	30,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,0391E+13		6 3,3986E+12	5,01	0,0025
Columna1	2,0391E+13		6 3,3986E+12	5,01	0,0025
Error	1,4234E+13	21	6,7779E+11		
Total	3,4625E+13	27			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1892439,33670

Error: 677794297142,8574 gl: 21

Columna1	Medias	n	E.E.	
E6	1704300	4	411641,32	A
E3	1852500	4	411641,32	A
Control	2509000	4	411641,32	A
E5	2555800	4	411641,32	A
E2	2665000	4	411641,32	A
E4	3146000	4	411641,32	A
E1	4469400	4	411641,32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Bioensayos con elutriado del estuario proveniente del muestreo (4°M-mar´16)

***Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Análisis de la varianza. Concentración Clorofila "a"**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Elutriado <i>Nitzschia</i>	28	0,95	0,93	17,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
	744735,0		124122,5		<0,000
Modelo.	7	6	1	61,28	1
	744735,0		124122,5		<0,000
Columna4	7	6	1	61,28	1
Error	42533,24	21	2025,39		
	787268,3				
Total	1	27			

Test: Tukey Alfa=0,05

DMS=103,44930

Error: 2025,3922 gl:

21

Columna4	Medias	n	E.E.		
E6	146,06	4	22,5	A	
E2	170,43	4	22,5	A	B
Control	179,49	4	22,5	A	B
E5	191,02	4	22,5	A	B
E3	199,66	4	22,5	A	B
E4	253,04	4	22,5		B
E1	647,82	4	22,5		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)