

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

Informe Final

2017 – 2018

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

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

Investigadoras: **Dra. M. Cecilia Gauna**

Investigadora Adjunta 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

El presente Informe Final 2017-2018, correspondiente al estudio de "Evaluación de la ecotoxicidad del agua y sedimento 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 estacionales realizadas durante el período de duración del Programa de Monitoreo de la Calidad Ambiental de la Zona Interior del estuario de Bahía Blanca entre agosto de 2017 y mayo de 2018 y un muestreo accesorio en proximidades del Canal Galván, Canal Maldonado y Canal Vieja - La Ballena, así como una interpretación integrada de sus resultados. Este estudio se llevó a cabo en el marco del Convenio (Decreto N° 1598/2017) 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
-

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	8
2.3. Crustaceos en la evaluación de ecotoxicidad	9
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo General	11
3.2. Objetivos específicos	12
4. METODOLOGIA	13
4.1. Distribución de los sitios de muestreo (E)	14
4.2. Muestreos accesorios	15
4.3. Organismos a evaluar	16
4.4. Aislamiento de las microalgas, generación y propagación de sus cultivos	17
4.5. Cultivo de las microalgas	17
4.5.1. <i>Tetraselmis suecica</i>	17
4.5.2. <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i>	18
4.6. Cultivo de crustaceos	19
4.6.1. Activación de cistos	19
4.6.2. Incubación de cistos	19
4.7. Bioensayos	19
4.8. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del agua del estuario	23
4.8.1. Preparación de las muestras de agua a evaluar y del control	23
4.8.2. Diseño experimental de los bioensayos con agua del estuario para cada sitio de muestreo	24
4.9. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del elutriado del sedimento del estuario	24
4.9.1. Preparación del elutriado del sedimento a evaluar	24
4.9.2. Diseño experimental de los bioensayos con elutriado del sedimento del estuario para cada sitio de muestreo	26
4.10. Determinación del crecimiento poblacional	27
4.10.1. Recuentos de microalgas	28
4.10.2. Procedimiento aplicado para el recuento celular con cámara de Neubauer	28
4.11. Determinación de clorofila "a" por el método espectrofluorométrico (APHA 1992).	30
4.12. Sensibilidad de los organismos empleados para los bioensayos	31
4.13. Microscopía electrónica de barrido	32
4.14. Análisis estadísticos de los datos	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Bioensayos de sensibilidad al Dicromato de Potasio [$K_2Cr_2O_7$] en <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i>	35
5.2. Bioensayos de sensibilidad al Dicromato de Potasio [$K_2Cr_2O_7$] en <i>Artemia salina</i>	38

5.3. Primer muestreo (1°M-ago'17)	39
5.3.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	39
5.3.1.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua del estuario	40
5.3.1.2. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en elutriado del sedimento del estuario	42
5.3.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del primer muestreo (1°M-ago'17)	44
5.3.2.1. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua del estuario	45
5.3.2.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en elutriado del sedimento del estuario	47
5.4. Segundo muestreo (2°M-dic'17)	49
5.4.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	49
5.4.1.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua del estuario	50
5.4.1.2. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en elutriado del sedimento del estuario	52
5.4.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del primer muestreo (2°M- dic'17)	54
5.4.2.1. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua del estuario	55
5.4.2.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en elutriado del sedimento del estuario	57
5.5. Tercer muestreo (3°M-feb'18)	59
5.5.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	59
5.5.1.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua del estuario	60
5.5.1.2. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en elutriado del sedimento del estuario	62
5.5.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del tercer muestreo (3°M-feb'18)	64
5.5.2.1. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua del estuario	65
5.5.2.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en elutriado del sedimento del estuario	67
5.6. Cuarto muestreo (4°M-may'18)	69
5.6.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario	69
5.6.1.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en agua del estuario	70
5.6.1.2. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en elutriado del sedimento del estuario	72
5.6.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del cuarto muestreo (4°M-may'18)	74
5.6.2.1. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua del estuario	75
5.6.2.2. Bioensayos con <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en elutriado del sedimento del estuario	77
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS: comparación entre muestreos	80
6.1. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E1	81
6.2. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E2	87
6.3. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E3	92
6.4. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E4	96
6.5. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E5	101
6.6. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia aff. kuetzingioides</i> en agua y elutriado de la estación E6	106
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS: comparación entre sitios de muestreos	112

7.1. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 1er. muestreo (1°M-dic'17)	113
7.2. Resultados de los bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 2do. muestreo (2°M-dic'17)	121
7.3. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 3er. muestreo (3°M-feb'18)	129
7.4. Resultados de los Bioensayos realizados con <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en agua y elutriado del sedimento del 4to. muestreo (4°M-may'18)	137
8. Evaluación del estado fisiológico de las poblaciones de microalgas evaluadas	145
8.1. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos (1°M-ago'17) y (2°M-dic'17)	146
8.2. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos (3°M-feb'18) y (4°M-may'18)	147
9. Alteraciones morfológicas del fitoplacton	148
10. Bioensayos con <i>Artemia salina</i> Linnaeus 1758 en agua y elutriado del sedimento del estuario	157
10.1. Primer muestreo (1°M-ago'17)	157
10.1.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-ago'17)	158
10.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (1°M-ago'17)	158
10.2. Segundo muestreo (2°M-dic'17)	159
10.2.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-dic'17)	160
10.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (2°M-dic'17)	160
10.3. Tercer muestreo (3°M-Feb'18)	161
10.3.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-Feb'18)	162
10.3.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (3°M-Feb'18)	162
10.4. Cuarto muestreo (4°M-may'18)	163
10.4.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-may'18)	164
10.4.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (4°M-may'18)	164
11. ANALISIS DE RESULTADOS: Bioensayos realizados con <i>Artemia salina</i>	166
11.1. Comparación de ensayos de mortalidad de <i>Artemia salina</i> entre muestreos	166
11.2. Comparación de ensayos con <i>Artemia salina</i> entre las diferentes estaciones y fechas de muestreo	168
12. Bioensayos con microalgas y <i>Artemia salina</i> en elutriado del sedimento del estuario en Puerto Galván, Tercera Cuenca y Canal Vieja.	173
12.1. Bioensayos con <i>Tetraselmis suecica</i> en elutriado del sedimento del estuario	173
12.1.1. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Canal Vieja (CV) (Ma-14dic'17)	174
12.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Puerto Galván (PG) (Ma-15dic'17)	175
12.1.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Tercera Cuenca (TC) (Ma-12dic'17)	176
12.2. Bioensayos con <i>Nitzschia</i> aff. <i>kuetzingioides</i> en elutriado del sedimento del estuario	178
12.2.1. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Canal Vieja (CV) (Ma-14dic'17)	179
12.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Tercera Cuenca (TC) (Ma-12dic'17)	180
12.2.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Puerto Galván (PG) (Ma-15dic'17)	181
12.3. Bioensayos con <i>A. salina</i> en elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos accesorios	183
13. ANÁLISIS DE RESULTADOS: Bioensayos en elutriado de sedimentos del estuario	186

provenientes de Puerto Galván, Tercera Cuenca y Canal Vieja	
13.1. Bioensayos realizados con <i>T. suecica</i> y <i>N. aff. kuetzingioides</i> en elutriado del sedimento en muestras provenientes de Canal Vieja, Puerto Galván y Tercera Cuenca	186
13.2. Estado fisiológico: Regresión entre densidad celular- clorofila "a"	191
14. Comparación de tasas de crecimiento estimadas en cada estación de muestreo en el estudio realizado en 2015-2016 con este estudio actual 2017-2018	193
14.1. Estación de muestreo E1	193
14.2. Estación de muestreo E2	194
14.3. Estación de muestreo E3	195
14.4. Estación de muestreo E4	196
14.5. Estación de muestreo E5	197
14.6. Estación de muestreo E6	198
15. CONCLUSIONES	199
16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	211

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).

A nivel mundial, más de 3 mil millones de personas viven en cercanía a las costas marinas (Neumann *et al.*, 2015). Los océanos han sido aceptados como un gran reservorio para la eliminación de esos desechos. Muchos contaminantes químicos, incluidos compuestos organoclorados, herbicidas, desechos domésticos y municipales, productos derivados del petróleo y metales pesados actualmente son reconocidos como compuestos adversos que afectan los ambientes oceánicos, incluso cuando son liberados a bajos niveles (Haynes y Johnson 2000; Pinto *et al.*, 2003).

Estos materiales derivados antropogénicamente incluyen diversos tipos de contaminantes que pueden acumular cantidades significativas de materiales peligrosos, lo cual hace que se los consideren como contaminantes.

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 ellos mismos 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). Además, 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*. Esta rama de la ciencia fue definida en 1978 por Butler, y estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades. 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, 1989) como por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Larraín 1995).

La ecotoxicología 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 (Castillo Morales, 2004).

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. Por lo tanto, 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. Para ello se procede a la observación y medición de diferentes parámetros biológicos de magnificación e inhibición, tales como alteraciones en el desarrollo y en funciones vitales, muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos y/o histológicos producidos por una sustancia o mezcla compleja de sustancias (Segretin Web, Cabrera Dorado 2004). Estas alteraciones en los parámetros biológicos, 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 organismo 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.

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

Existen diversos organismos de protección ambiental (*Environment Canada, Environmental Protection Agency*) y de estandarización (ASTM, OECD, AOAC, ISO) que han concretado la elaboración e implementación de sistemas de diagnóstico, base para la generación de estrategias ecosistémicas de protección. Ello, orientado a la obtención de respuestas estandarizadas de laboratorio que permiten asegurar, dentro de un cierto grado de confiabilidad, la medida obtenida (Castillo Morales 2004).

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, por lo cual, 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.

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). Además, existe un continuo aporte atmosférico de sustancias, proveniente de la utilización de combustibles fósiles, humos y partículas en suspensión producto de actividades industriales y urbanas (Arias *et al.*, 2010).

Este impacto antrópico sobre el estuario Bahía Blanca fue corroborado a través de la evaluación de la ecotoxicidad del agua y sedimentos de la parte interna del mismo realizado durante 2015 y 2016 (Parodi *et al.* 2016)

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 toma de 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. 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 y 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.

2.3. Crustáceos en la evaluación de ecotoxicidad

La adopción e implementación de la legislación europea sobre Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (REACH) (EC, 2006) requirió datos de toxicidad adicionales que promuevan la disminución de los vertebrados utilizados en las pruebas de toxicidad, alentando estrategias alternativas con invertebrados, plantas, así como cultivos de órganos, tejidos y células (Dvorak *et al.*, 2012).

Durante los últimos 50 años, se evaluaron diversos invertebrados para investigar su sensibilidad a muchos agentes físicos y químicos para su posible uso como modelos de preselección o detección. Entre varios invertebrados examinados y evaluados para investigar su sensibilidad a muchas sustancias físicas y químicas, el género *Artemia*, es uno de los géneros mayormente utilizados. Diferentes especies de *Artemia* fueron reconocidas y catalogadas como organismos de prueba de toxicidad utilizados para el monitoreo de

emisiones por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Van Steertegem y Persoone 1993).

Artemia spp. es un importante organismo de ambientes hipersalinos que se alimenta principalmente de fitoplancton y es un importante consumidor primario (Sorgeloos et al., 1976; Vanhaecke et al. 1987; Triantaphyllidis et al. 1998), además de poseer importancia económica ya que se utilizan en acuicultura y en acuarismo.

Normalmente, se emplea como organismo de prueba para estudios ecotoxicológicos. Los niveles moleculares, celulares y fisiológicos de *Artemia* spp. cambian drásticamente cuando están bajo estrés por contaminación (Marigómez et al., 2004). En la actualidad, una variedad de pruebas de toxicidad con *Artemia* spp. se han llevado a cabo incluyendo tanto métodos crónicos a corto plazo como a largo plazo.

Las pruebas de toxicidad a corto plazo se usan con mayor frecuencia, se han desarrollado algunos protocolos a largo plazo en los últimos 10 años, pero ninguno de ellos es un método estandarizado internacionalmente como la Organización Internacional de Normas (ISO), la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) y por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE).

Los métodos para probar la inmovilización/mortalidad solo están estandarizados en Italia por la Agencia Italiana para la Protección del Medio Ambiente, el Instituto Italiano para la Investigación del Agua (APAT IRSA-CNR) y la Agencia Italiana de Normalización en el sector Químico (Unichim). A pesar del uso frecuente y generalizado de *Artemia* spp. en pruebas de toxicidad, todavía falta la armonización de los protocolos seguidos por las actividades de estandarización internacional y son urgentemente necesarios ejercicios de calibración (Libralato, 2014).

Entre las principales ventajas de la utilización de *Artemia* spp. en pruebas de toxicidad se citan:

- (1) rapidez en la eclosión de cistos,
- (2) rentabilidad,
- (3) accesibilidad de larvas nauplios eclosionadas de cistos con homogeneidad poblacional que se pueden adquirir comercialmente, lo que prescinde de las necesidades del autocultivo (Manfra et al., 2012; Nunes et al., 2006).

Otros factores ventajosos son: buen conocimiento de sus características biológicas y ecológicas, tamaño pequeño que permite una fácil operación manipulación y mantenimiento en condiciones controladas de laboratorio, así como su adaptabilidad bien desarrollada a condiciones diversificadas de prueba (Kokkali *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2006).

En un aspecto ambiental, la fase larvaria de *Artemia* spp., se emplea para evaluar la toxicidad de varias sustancias metálicas peligrosas como arsénico (As) y cobre (Cu) (Brix *et al.*, 2003), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y cromo (Cr) (Leis *et al.*, 2014), cobalto (Co) y níquel (Ni) (Kissa *et al.*, 1984), estaño (Sn) (Hadjispyrou *et al.*, 2001), zinc (Zn) (Garaventa *et al.*, 2010), permanganato de potasio, dicromato de potasio y nitrato de plata (Vanhaecke *et al.*, 1980), antibióticos (Migliore *et al.*, 1993a, b, 1997), nanomateriales diseñados por ingeniería (Callegaro *et al.*, 2015), poliestireno de tamaño nanométrico (Bergami *et al.*, 2016), amianto (Stewart y Schurr, 1980), compuestos fenólicos (Guerra, 2001), oligoelementos (Petrucci *et al.*, 1995), herbicidas insecticidas, pesticidas (Varó *et al.*, 1997, 2002), productos farmacéuticos (Xu *et al.*, 2015), agentes anticorrosivos (Manfra *et al.*, 2015a, 2016), toxinas (Beattie *et al.*, 2003), aguas residuales (Libralato *et al.*, 2010b) y descargas marinas (Manfra *et al.*, 2010).

2.- OBJETIVOS

Para este segundo estudio de la "Evaluación de la ecotoxicidad del agua en la zona interna del estuario de Bahía Blanca" solicitado por el CTE se propusieron los siguientes objetivos:

3.1. Objetivos Generales

- Analizar la respuesta de organismos pertenecientes a dos niveles tróficos diferentes: fitoplancton (productores primarios) y zooplancton (consumidores primarios)
- Analizar la existencia de morfologías anómalas en diatomeas tanto al final de los bioensayos como en el ambiente natural que permitan identificar

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. Evaluar la ecotoxicidad de muestras de agua y elutriado del sedimento del estuario de Bahía Blanca sobre organismos planctónicos (microalgas y larvas de invertebrados) a través de bioensayos.

- B. Desarrollo y estandarización de metodologías para la realización de bioensayos:
 - a. Aclimatación de microalgas a aguas estuariales bajo condiciones controladas de laboratorio.
 - b. 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.
- C. Analizar la dinámica de crecimiento y el estado fisiológico de las dos microalgas como indicadores de ecotoxicidad.
- D. Relacionar los resultados de los ensayos ecotoxicológicos con los parámetros fisicoquímicos y sustancias potencialmente contaminantes presentes en agua y en el elutriado del sedimento del estuario.
- E. Detectar anomalías morfológicas en organismos utilizados en la realización de los bioensayos y verificar si las mismas están presentes en las poblaciones naturales del estuario.
- F. Identificar sitios y momentos sensibles relacionados con la variabilidad climática, actividad industrial, etc.
- G. Corroborar la caracterización como sitios sensibles a aquellos identificados como tal durante el Primer estudio realizado durante 2015-2016 e identificar nuevos sitios 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-ago'17)

Segundo muestreo: (2°M-dic'17)

Tercer muestreo: (3°M-feb'18)

Cuarto muestreo: (4°M-may'18)

Muestreos accesorios: (Ma-12 dic'17), (Ma-14 dic'17) y (Ma-15 dic'17)

4.1. Distribución de los sitios de muestreo (E)



E1	En proximidades de la desembocadura cloacal BB	(CLO)
E2	En proximidades de Ingeniero White	(IW)
E3	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	En 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. Muestreos accesorios

Se realizaron muestreos para analizar la ecotoxicidad del sedimento en proximidades del Canal Galván, Canal Maldonado y Canal Vieja-La Ballena. En cada sector se definió una transecta, hacia el interior de los canales donde vuelcan los efluentes industriales o cloacales, sobre las cuales se seleccionaron tres estaciones de muestreo que fueron coincidentes con aquellos que realizó el equipo de estudio del Bentos correspondiente al Plan de Monitoreo. En cada estación se tomaron con draga tres muestras de sedimentos, las que fueron utilizadas para la preparación del elutriado con que se realizaron los bioensayos.

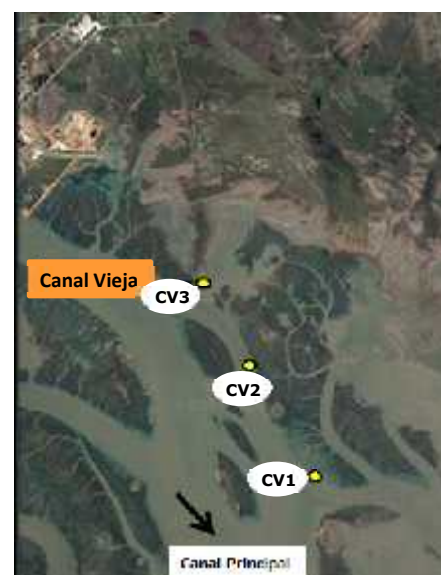
Nomenclatura de las estaciones de muestreo:



TC1	Ma-12dic '17
TC2	Ma-12dic '17
TC3	Ma-12dic '17



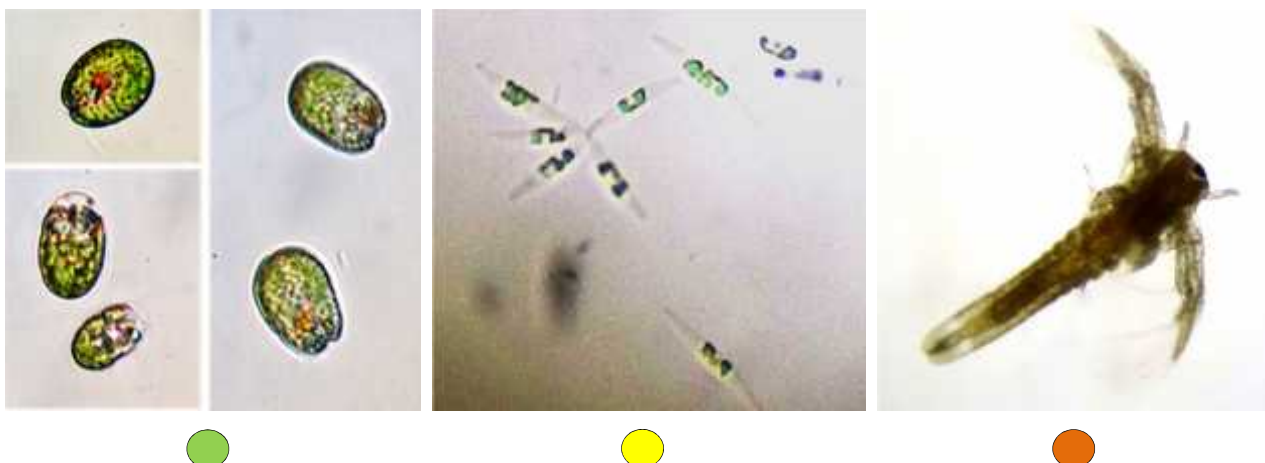
PG1	Ma-15dic '17
PG2	Ma-15dic '17
PG3	Ma-15dic '17



CV1	Ma-14dic '17
CV2	Ma-14dic '17
CV3	Ma-14dic '17

4.3. 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: *Tetraselmis suecica* (Wille) Butcher (Chlorophyta) ● y *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* Hustedt (Bacillariophyta) ●. Además se evaluó la ecotoxicidad en elutriado en *Artemia salina* ● Linnaeus, 1758 (Phylum Arthropoda, Clase Crustacea, Suclase Branchiopoda).



Durante todo el estudio se realizaron procedimientos en el laboratorio que llevaron 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 definieron 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.

4.4. 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.

4.5. Cultivo de las microalgas

4.5.1. *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 LEMFA (Laboratorio de Estudios Multidisciplinarios en Ficología Aplicada) del IADO con su anexo en FUNDASUR, alternando sus cultivos en medio agarizado y líquido tomando las células con un ansa 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).

4.5.2. *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* se tomó, bajo lupa y con una pipeta Pasteur estéril, 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 leds 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 aisladas 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.

4.6. Cultivo de crustáceos

Los cistos de *Artemia salina* fueron adquiridos comercialmente en la empresa BIOSIMA S.R.L. Los mismos fueron conservados en recipientes oscuros sellados al vacío.

Las pruebas de toxicidad se realizaron con larvas nauplii pertenecientes a la misma clase de edad ya que diferentes estadios larvales presentan sensibilidad diferencial.

El estadio larvario de mayor sensibilidad seleccionado fue la etapa Instar II y III.

4.6.1. Activación de cistos

Para generar organismos de prueba, se colocaron 20 mg de quistes en un vaso precipitado conteniendo 100 ml de agua control 48 horas antes de la prueba.

4.6.2. Incubación de cistos

La eclosión de cistos se realizó bajo una intensidad lumínica de 4000 ± 1000 lux y a una temperatura de 25 ± 2 °C en cámaras de cultivo. Después de 24 horas, las larvas incubadas se transfirieron a un nuevo vaso de precipitado conteniendo agua control. La transferencia se realizó utilizando microscopio estereoscópico y una fuente de luz para que las larvas fototrópicas que eclosionaron migren hacia el haz de luz. Se utilizó una pipeta Pasteur de vidrio para realizar la transferencia, lo que garantizó que solo se transfieran las larvas nacientes y no los quistes o las larvas que todavía están en las membranas. Luego las larvas fueron colocadas en una cámara termostática oscura durante 24 horas a 25 ± 2 °C.

4.7. Bioensayos

Para la realización de los bioensayos con microalgas se utilizó la normativa establecida por EPA (United States Environmental Protection Agency): Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 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.

Actualmente no existe un método estandarizado internacionalmente por la Organización Internacional de Normas (ISO), la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) o por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) para la realización de bioensayos con *Artemia*. Los métodos para probar la inmovilización/mortalidad solo están estandarizados en Italia por la Agencia Italiana para la Protección del Medio Ambiente y el Instituto Italiano para la Investigación del Agua (APAT IRSA-CNR) y la Agencia Italiana de Normalización en el sector Químico (Unichim).

La batería de bioensayos fue realizada con muestras colectadas en los seis sitios seleccionados (E1, E2, E3, E4, E5 y E6) durante los cuatro muestreos estacionales (1ºM-ago'17), 2ºM-dic'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18).

Para el muestreo accesorio (Ma-12 dic'17), (Ma-14dic'17) y (Ma-15dic'17), se seleccionaron tres sitios de muestreo (TC, PG y CV) con tres estaciones cada uno de ellos (TC1, TC2 y TC3; PG1, PG2 y PG3; CV1, CV2 y CV3).

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

- a.1. *Tetraselmis suecica*
- a.2. *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*
- a.3. *Artemia salina*

b.- Elutriado del sedimento de los seis sitios muestreados estacionalmente (E1, E2, E3, E4, E5 y E6) y de las tres estaciones de los tres sitios

seleccionados para el muestreo accesorio, CV1, CV2, CV3, TC1, TC2, TC3, PG1, PG2 y PG3) más un control con:

- b.1. *Tetraselmis suecica*
- b.2. *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*
- b.3. *Artemia salina*



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

Los bioensayos con microalgas se iniciaron con una siembra de un inóculo de 15.000 células/ml para *T. suecica* y 20.000 células/ml para *N.* aff.

Kuetzingioides, provenientes de cultivos unialgales en fase de crecimiento exponencial adaptados al medio de cultivo utilizado como control. Cada siembra se realizó en elermeier 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 $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 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.

Los bioensayos con larvas nauplii en estapa II y III fueron iniciados 48 horas después de la activación de los cistos.

El parámetro respuesta aplicado, se estimó cada 24 horas durante toda la duración del bioensayo (24 y 48 horas) y fue:

- determinación de la mortalidad *in vivo* de larvas nauplii estadio II y III.

La transferencia de larvas en estadio II y III a los recipientes de ensayo se realizó bajo microscopio estereoscópico utilizando pipetas Pasteur de vidrio estériles de punta redondeada de diámetro suficientemente ancho para que los organismos no se dañen y una fuente de luz colocada lateralmente que anima a las larvas agregarse.

Los recipientes de bioensayos consistieron de cajas de Petri de vidrio de 55 x 15 mm, las cuales luego fueron sembradas con las larvas, solución control y soluciones de prueba.

En cada caja de Petri fueron colocadas 10 larvas y expuestas a 5 ml de solución control y soluciones provenientes de cada estación de muestreo.

Se prestó especial atención a que el volumen de transferencia de larvas no excediera 1 ml para que no se afecte el volumen total del sistema de prueba. Los ensayos fueron mantenidos a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para la totalidad de duración de la prueba y en oscuridad.

Durante las 24 y 48 horas de comenzado el ensayo, se estimó la tasa de mortalidad de larvas. La misma fue calculada por conteo de organismos vivos en cada caja de Petri. Después de la observación bajo el microscopio y una ligera estimulación mecánica que consistió en tocar las larvas con una pipeta Pasteur de vidrio, los organismos que no mostraron algún movimiento durante aproximadamente 10 segundos fueron considerados muertos.

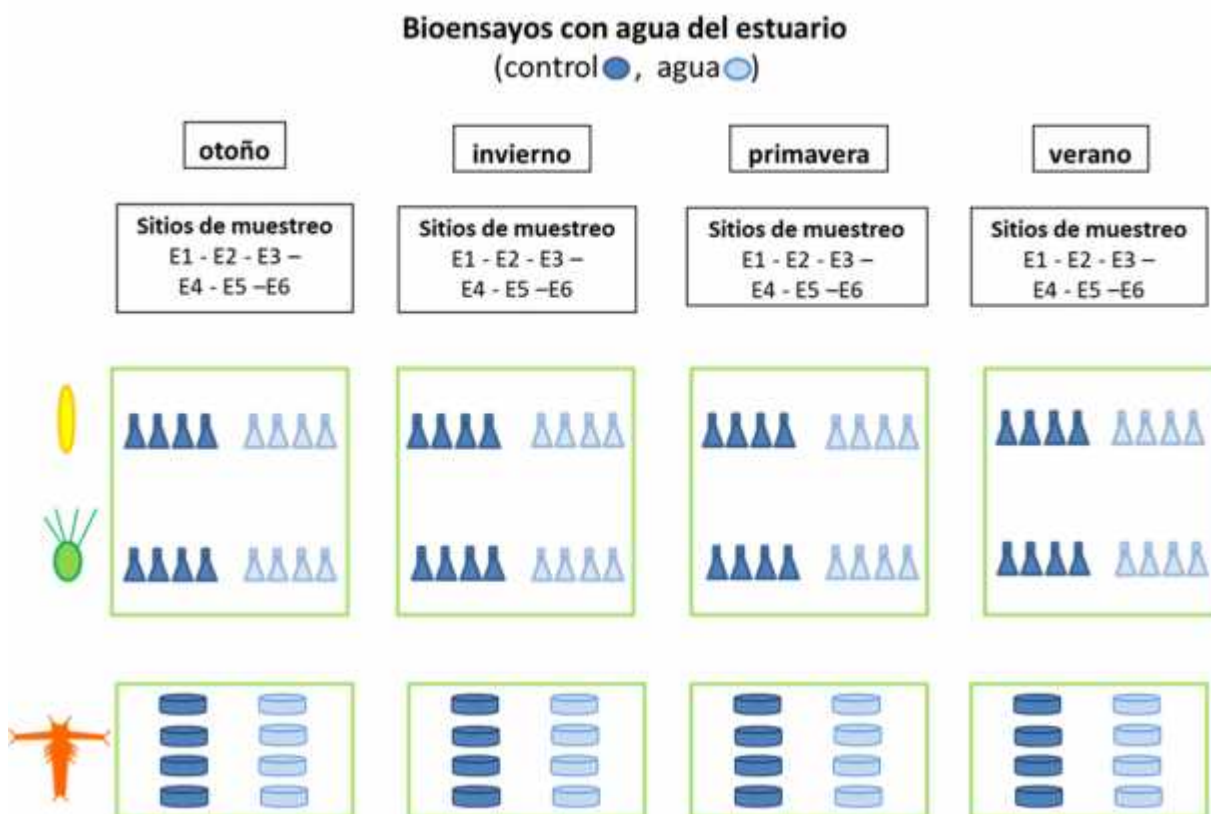
4.8. Bioensayos para evaluar la ecotoxicidad del agua del estuario

4.8.1. 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 $1,2 \mu\text{m}$ 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 utilizó agua de mar identificada como SW-PCo. La selección del agua control fue explicada en el informe final periodo 2015-2016 (Parodi *et al.*, 2017).

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



4.9. 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. La mezcla así obtenida se centrifugó, se filtró o se decantó el sobrenadante para separar el sólido propiamente dicho del líquido (Garmendia *et al.* 2009).

4.9.1. 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 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 selección del método de obtención de elutriado fue explicado en el informe final del periodo 2015-2015 (Parodi *et al.* 2017).

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).

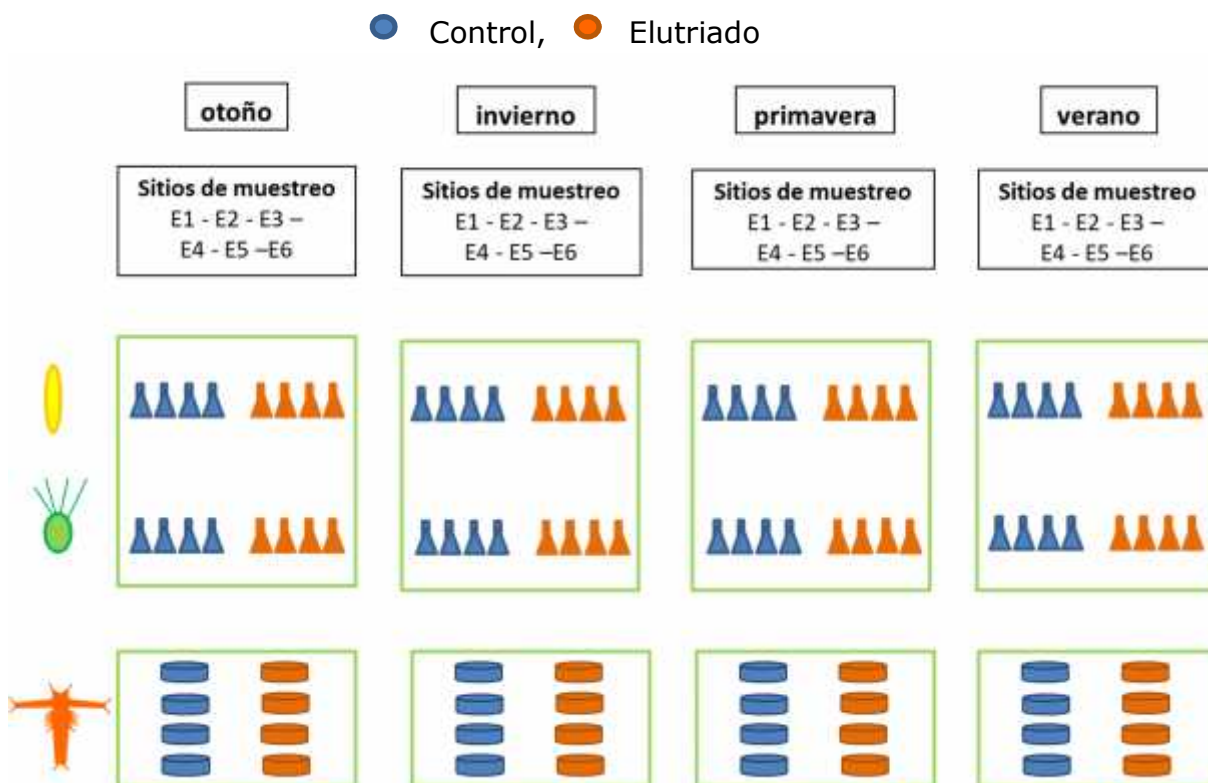
El elutriado del sedimento de cada una de las estaciones muestreadas se preparó de la siguiente manera:

- a) Se pesaron 400 g de sedimento en su estado natural, base húmeda, 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 SK-O330-Pro por 30 minutos a 220 rpm.
- c) Posteriormente la mezcla se dejó 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 centrífuga de 50 ml que previamente fueron enjuagados con la primera porción del sobrenadante obtenido, cuidando de no remover o resuspender el sedimento del fondo, y se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm.
- e) Se extrajo el sobrenadante acuoso (elutriado) succionando el líquido sin resuspender lo sedimentado y se filtró con filtro de fibra de vidrio de $1,2\ \mu\text{m}$.
- f) El elutriado así obtenido fue esterilizado bajo luz UV por 36 horas y posteriormente mantenido en oscuridad y refrigerado a 4°C .

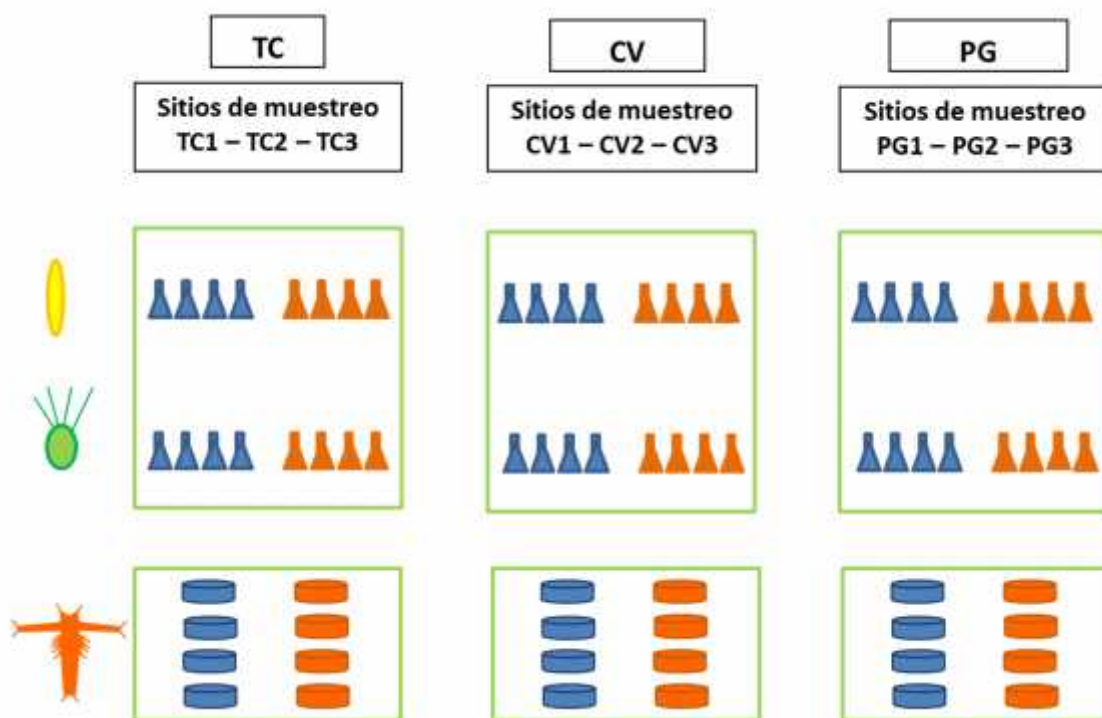
g) Previamente a su uso, el contenido fue aireado suavemente durante 10 minutos y se trasvasaron directamente 60 ml a los erlenmeyers de cultivo previamente esterilizados.

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.

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



TC: Tercera Cuenca (Ma-12dic'17), **CV:** Canal Vieja (Ma-14dic'17), **PG:** Puerto Galván (Ma-15dic'17)



4.10. 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.

4.10.1. 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.

4.10.2. Procedimiento aplicado para el recuento celular 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.

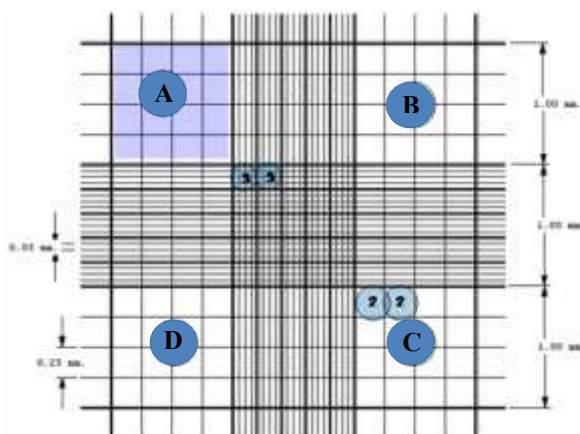
Generalmente una dilución 1:10 fue suficiente, pero fue necesario verificar que la concentración resultante fuera suficiente para obtener una precisión adecuada, la cual dependía del número de células presentes en promedio en 1 mm^2 .

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).

4.11. 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 y 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.

4.12. Sensibilidad de los organismos empleados para los bioensayos

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad de los organismos empleados para los bioensayos (*Tetraselmis suecica*, *Nitzschia aff. kuetzingioides* y *Artemia salina*) se realizaron ensayos con el tóxico de referencia dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

Se ensayaron las siguientes concentraciones de dicromato de potasio: 0,08; 0,13; 0,22; 0,36 y 0,6 mg/ml y un control libre de dicromato de potasio. Todos los ensayos se realizaron por triplicado bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación que los demás bioensayos descritos en secciones anteriores.

Para evaluar el efecto de las distintas concentraciones de tóxico se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al cultivo control empleando la siguiente fórmula:

$$\%I = \frac{T - C}{C} \times 100$$

Donde:

T=número de células en cada tratamiento

C= número de células en el cultivo control

4.13. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Muestras de fitoplacton provenientes de las estaciones de muestreo y de ensayos de *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* fueron procesadas para su observación bajo microscopio electrónico de barrido. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo propuesto por Cáceres (1995).

4.14. 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 vías (ANOVA doble).
- De igual manera se procedió con los bioensayos con *Artemia salina* teniendo como variable la mortalidad.
- 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 $\ln(x+1)$ como transformación.

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

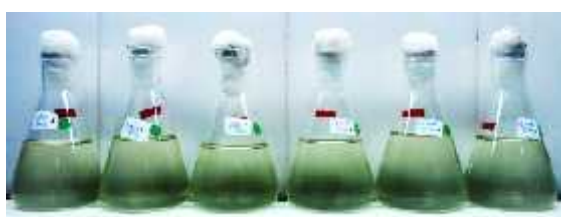
RESULTADOS

**Bioensayos de sensibilidad al Dicromato de Potasio
[K₂Cr₂O₇] en *Tretraselmis suecica*, *Nitzschia* aff.
kuetzingioides y *Artemia salina***

5.1. Bioensayos de sensibilidad al Dicromato de Potasio [$K_2Cr_2O_7$] en dos microalgas: *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*



Tetraselmis suecica



[$K_2Cr_2O_7$]

0,08 mg/ml



0,13 mg/ml



0,22 mg/ml



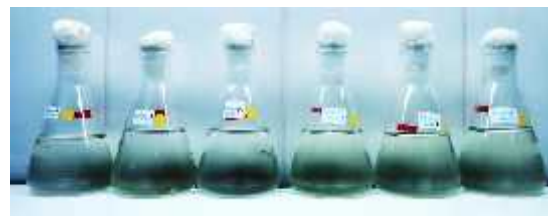
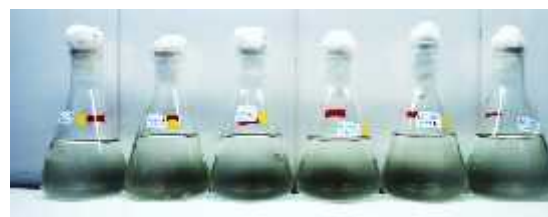
0,36 mg/ml

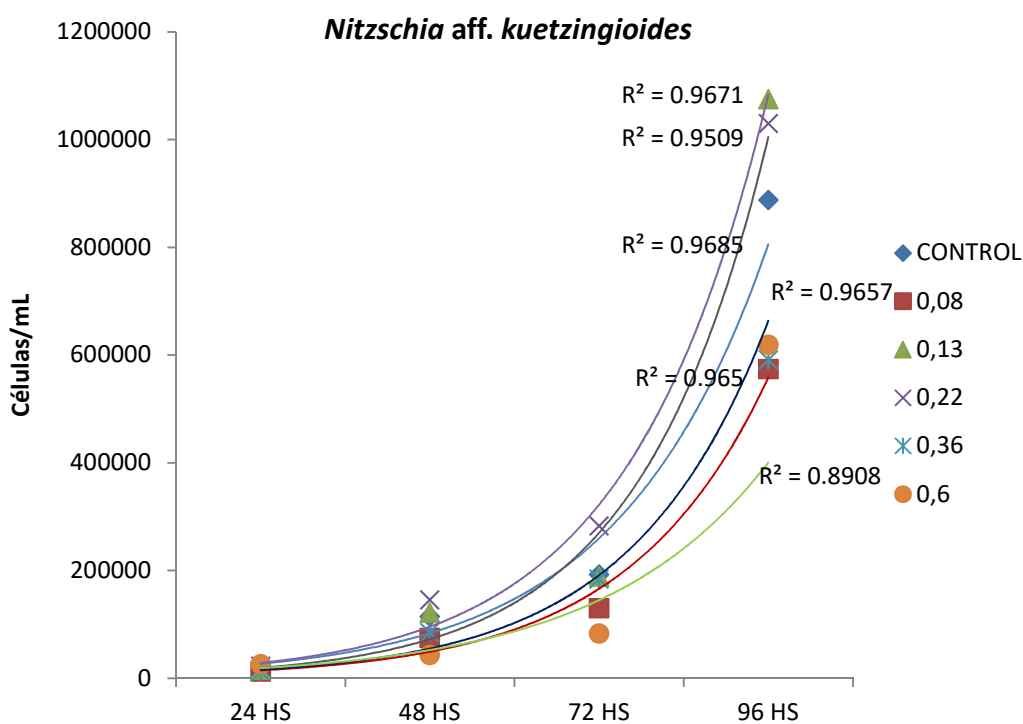
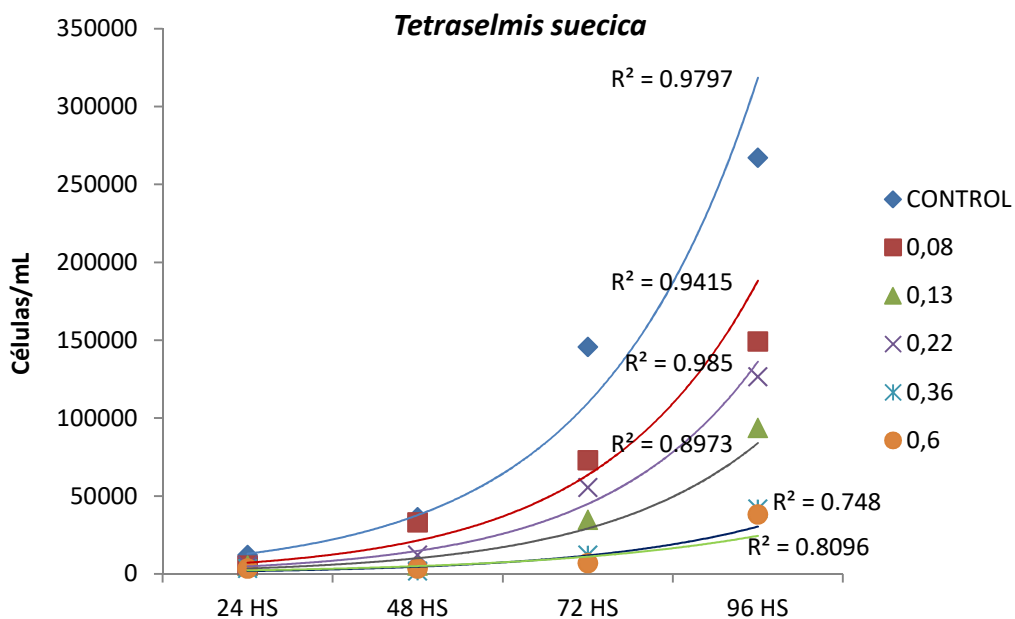


0,60 mg/ml



Nitzschia aff. *kuetzingioides*

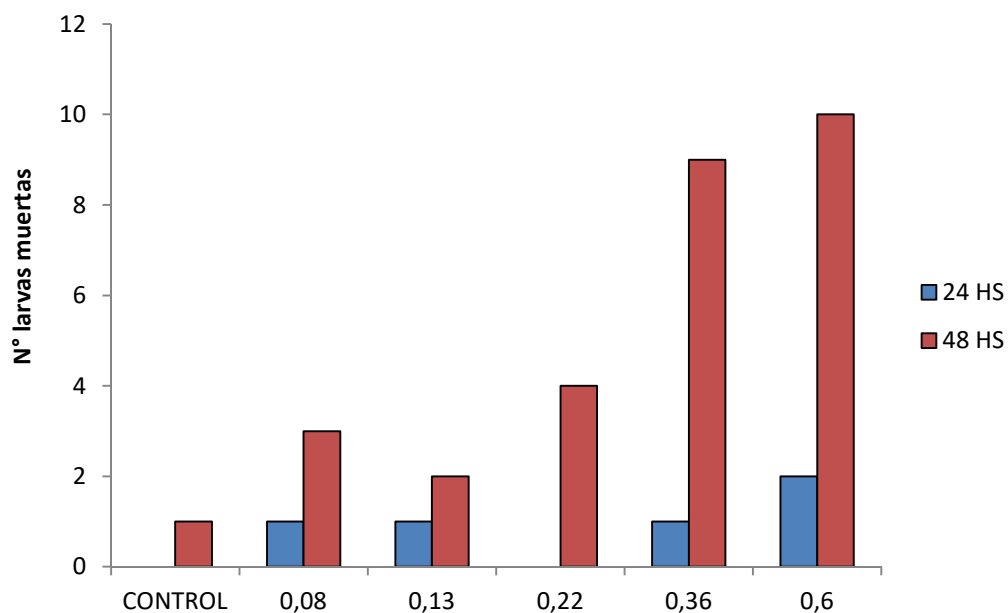




En el ensayo con *Tetraselmis suecica* el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento (95%) fue registrado con las dos mayores concentraciones de dicromato de potasio empleadas (0,36 y 0,6 mg/ml) a las 48 y 72 horas, respectivamente. Así mismo, a esas dos concentraciones de dicromato de potasio siempre se registraron porcentajes de inhibición superiores al 70%.

Para *Nizschia aff. Kuetzingioides*, en cambio, se registraron menores porcentajes de inhibición del crecimiento, registrándose un porcentaje máximo (62%) a la concentración de 0,6 mg/ml a las 48 hs.

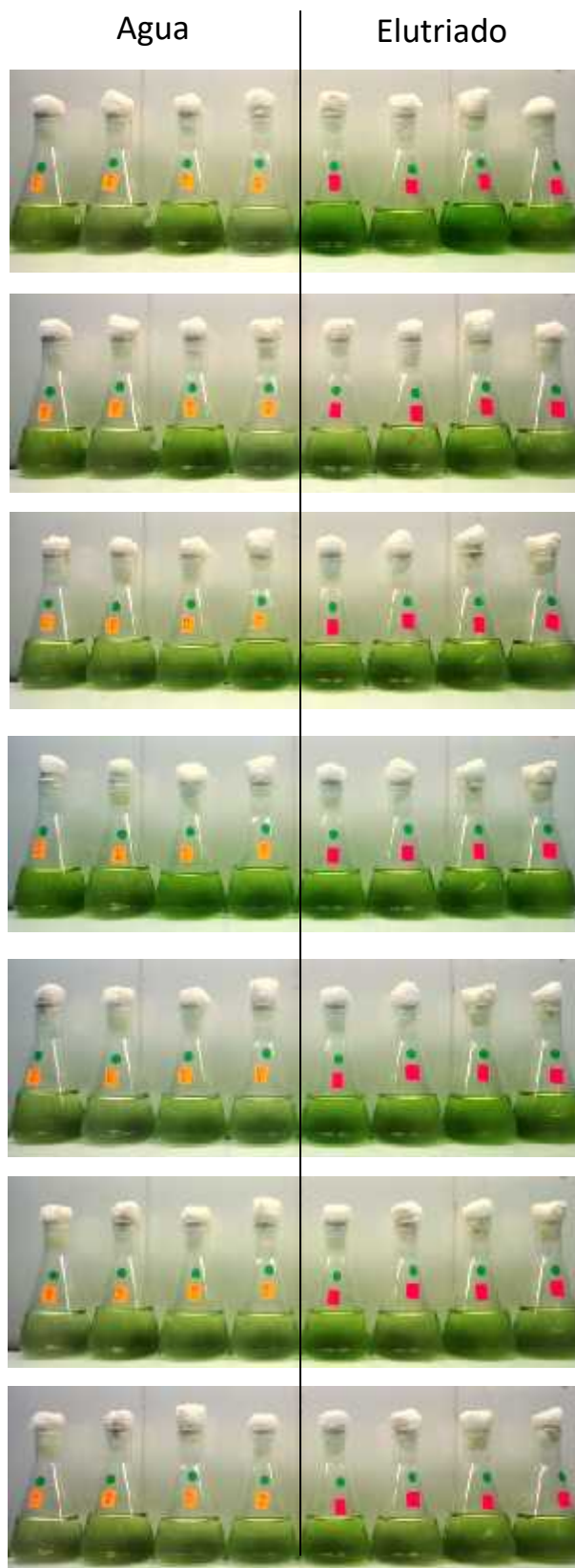
5.2. Bioensayos de sensibilidad al Dicromato de Potasio [$K_2Cr_2O_7$] en *Artemia salina*



En los ensayos con *Artemia salina* se observó un incremento marcado en el número de larvas muertas a las concentraciones de dicromato de potasio de 0,36 y 0,6 mg/ml a las 48 hs de exposición.

5.3. Primer muestreo (1°M-ago'17)

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



5.3.1.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-ago'17)

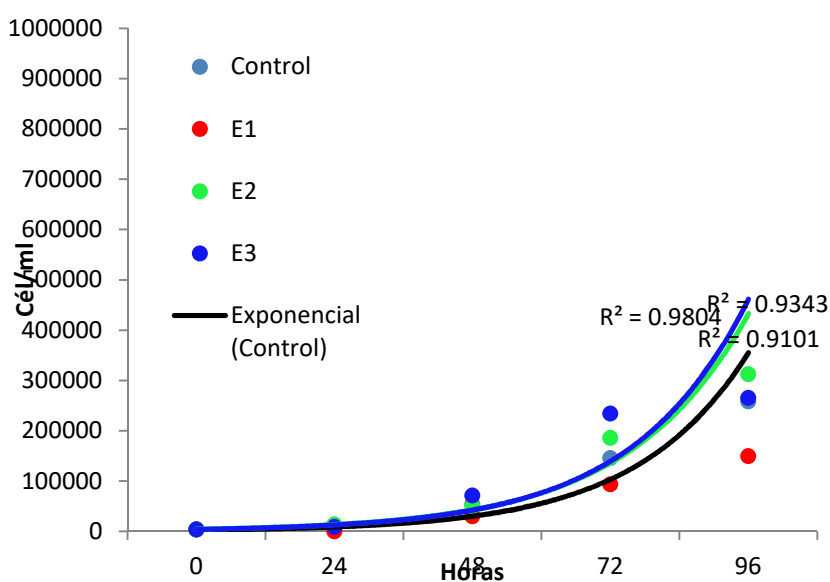
Tetraselmis suecica



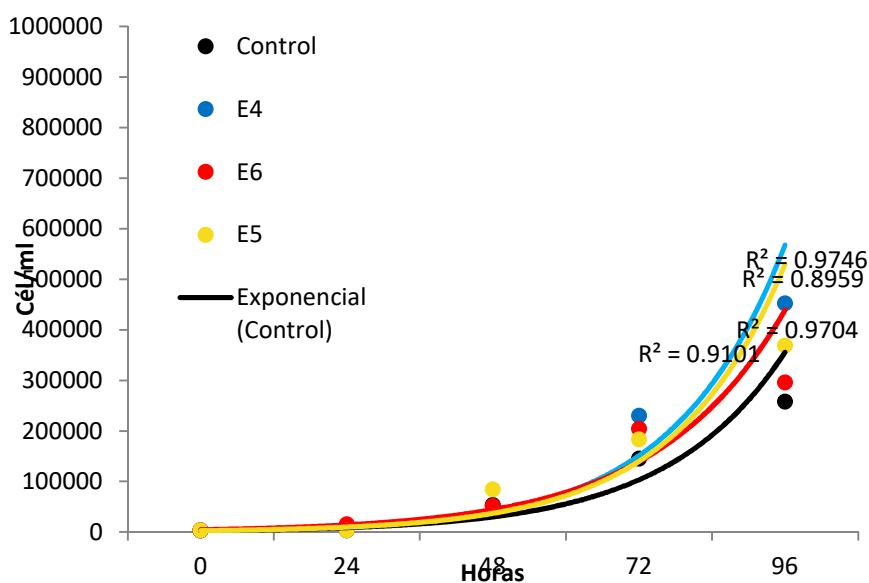
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

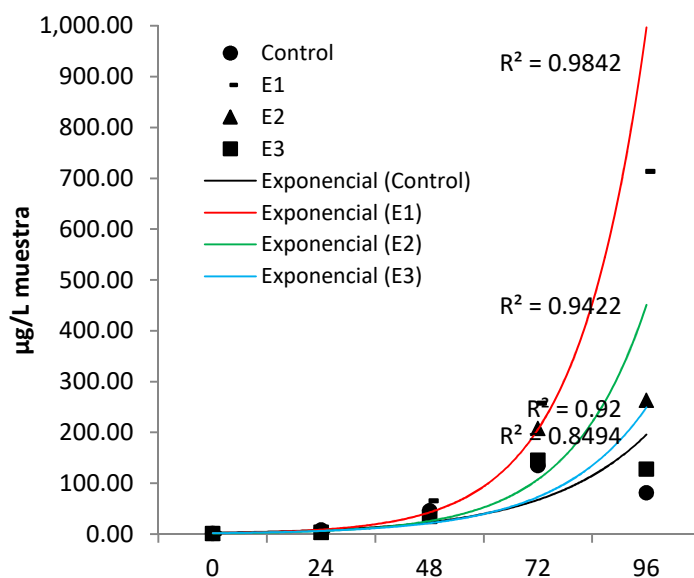


b

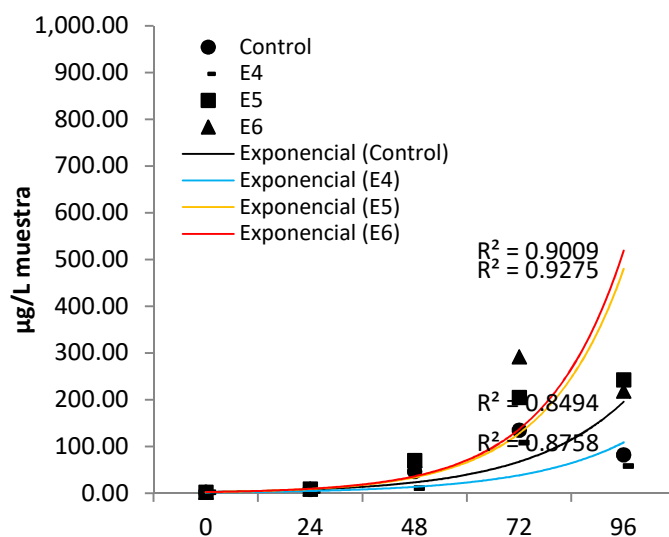
Tetraselmis suecica



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.3.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (1°M-ago'17)

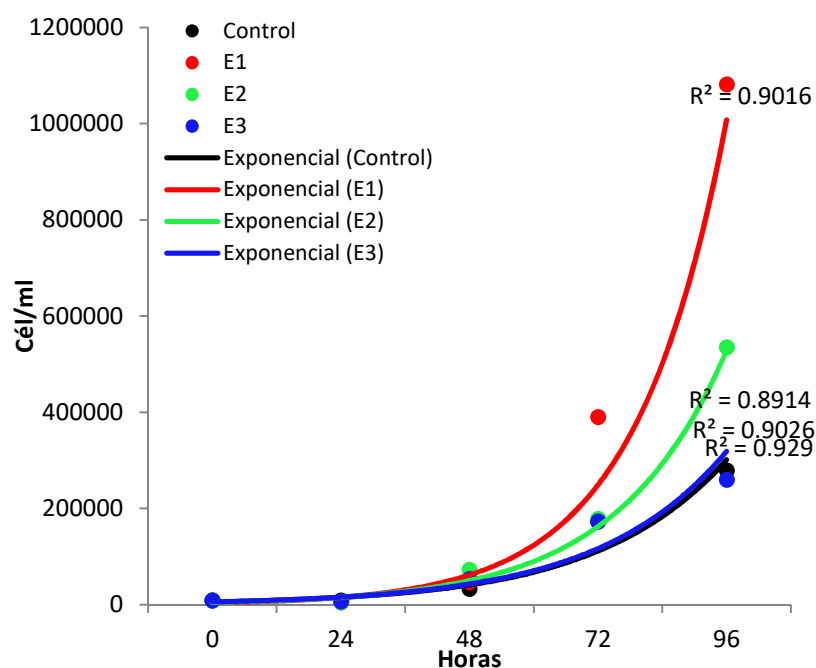
Tetraselmis suecica



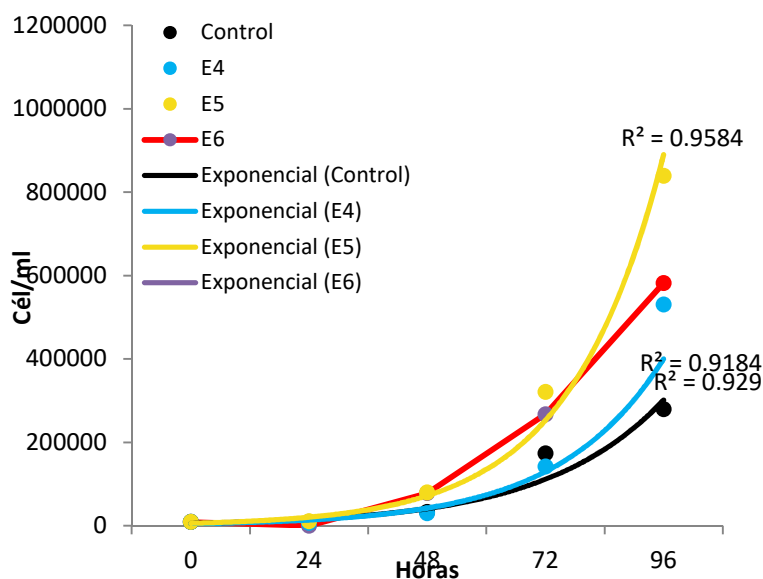
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



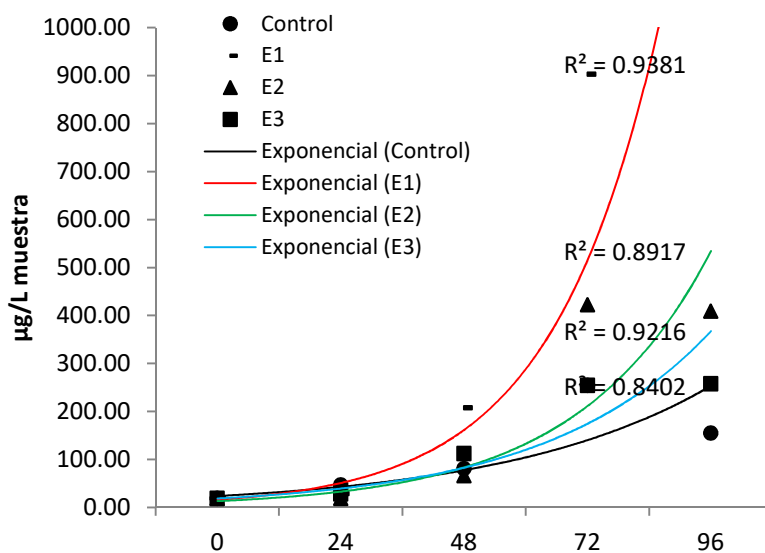
a



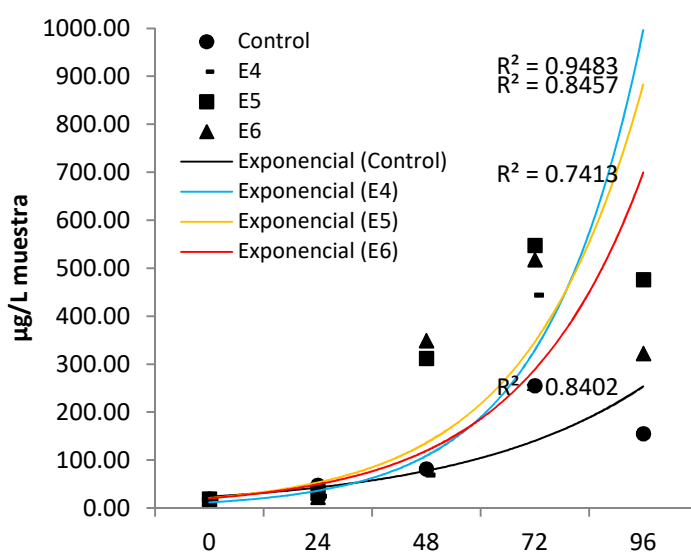
b

Tetraselmis suecica

Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.3.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del primer muestreo (1°M-ago'17)



5.3.2.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-ago'17)

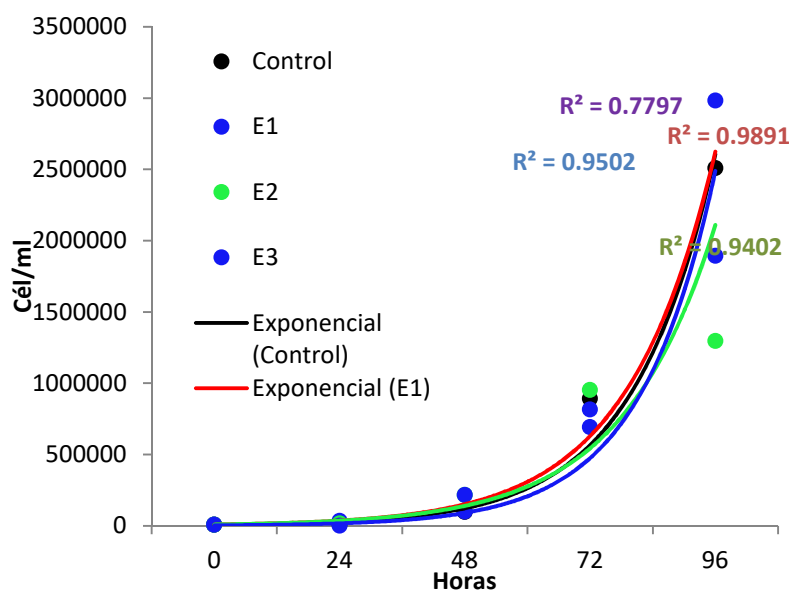
Nitzschia aff. kuetzingioides



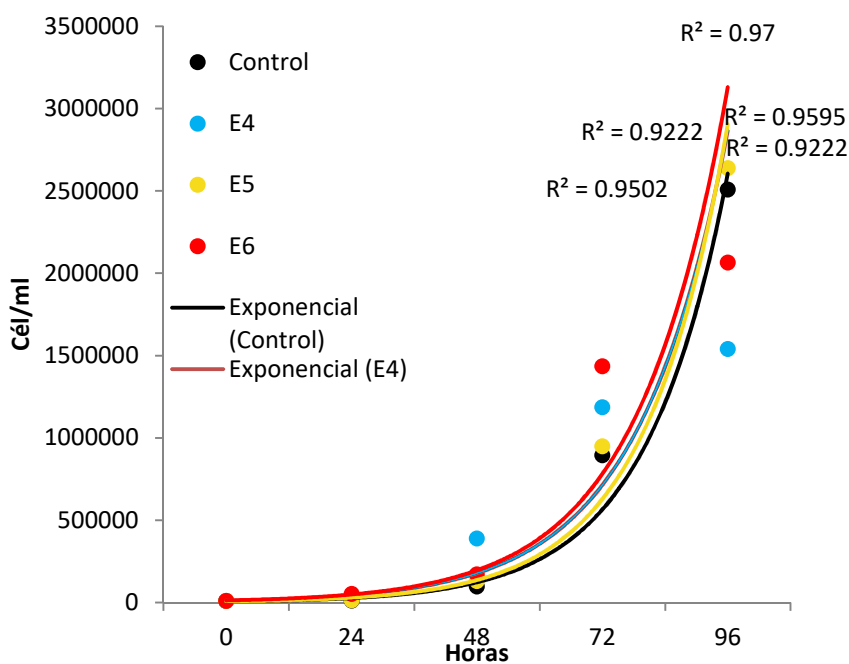
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

- Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a



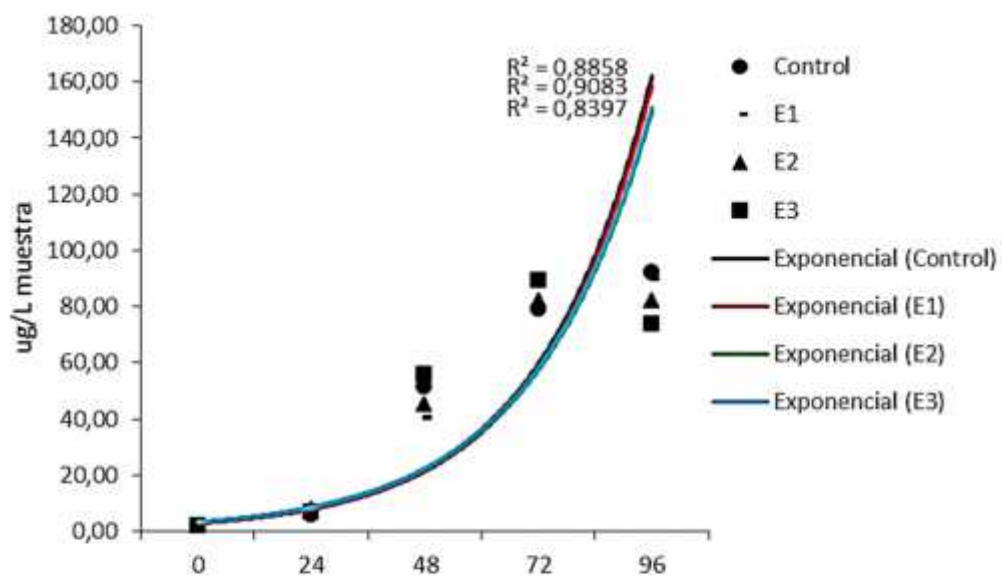
b

Nitzschia aff. kuetzingioides

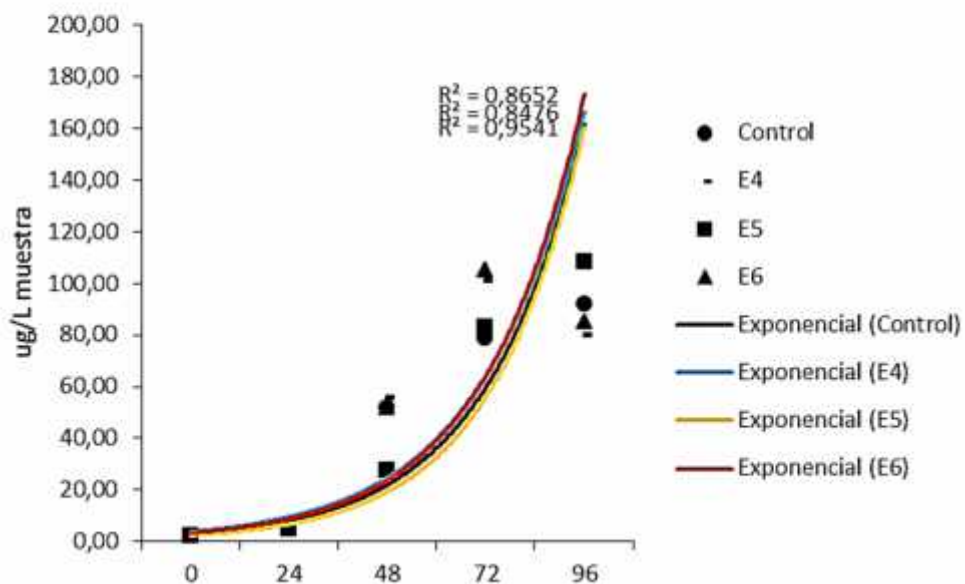


Clorofila "a"

(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.3.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (1°M-ago'17)

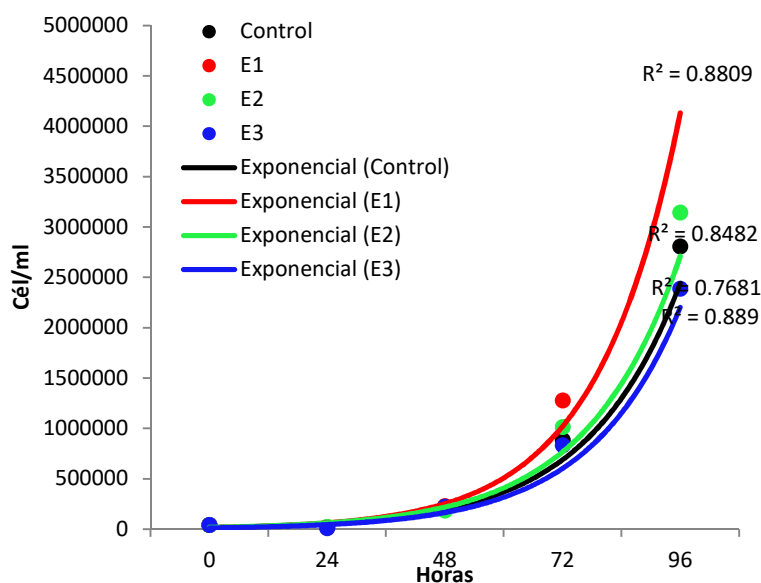
Nitzschia aff. kuetzingioides



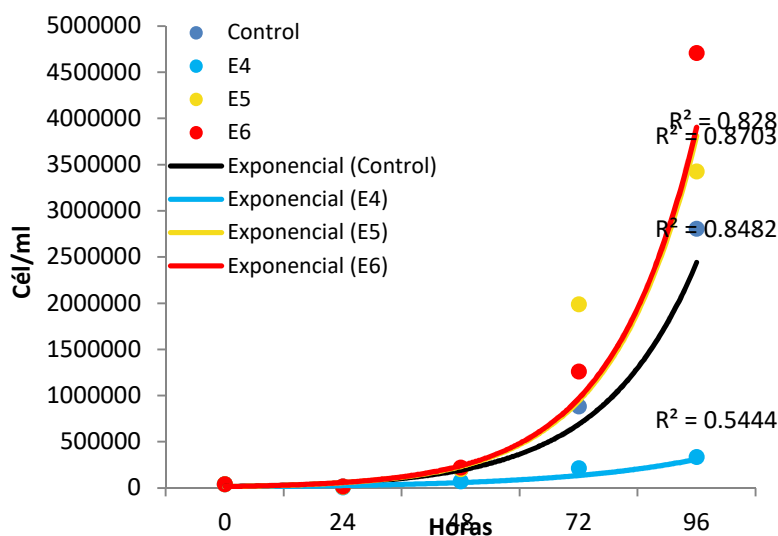
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

- Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

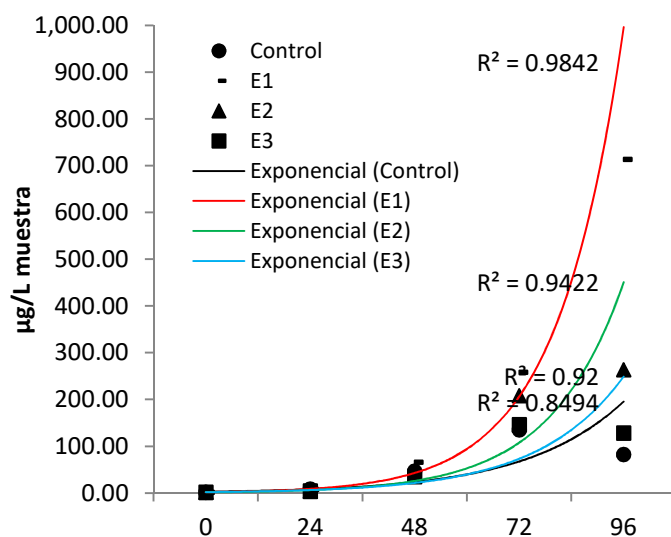


b

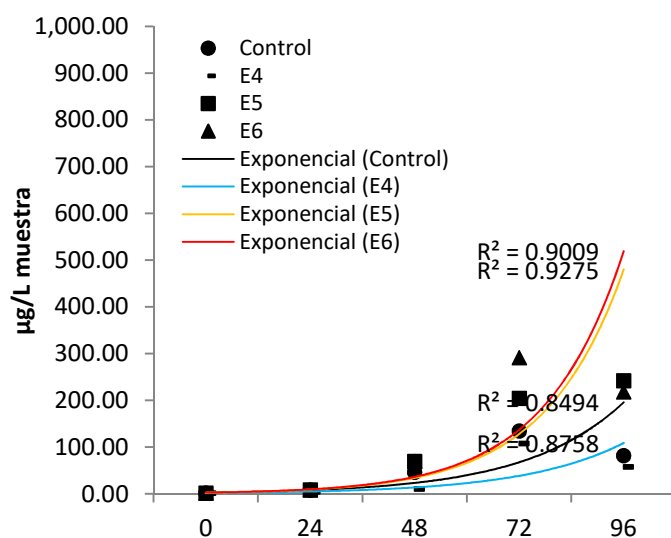
Nitzschia aff. kuetzingioides



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



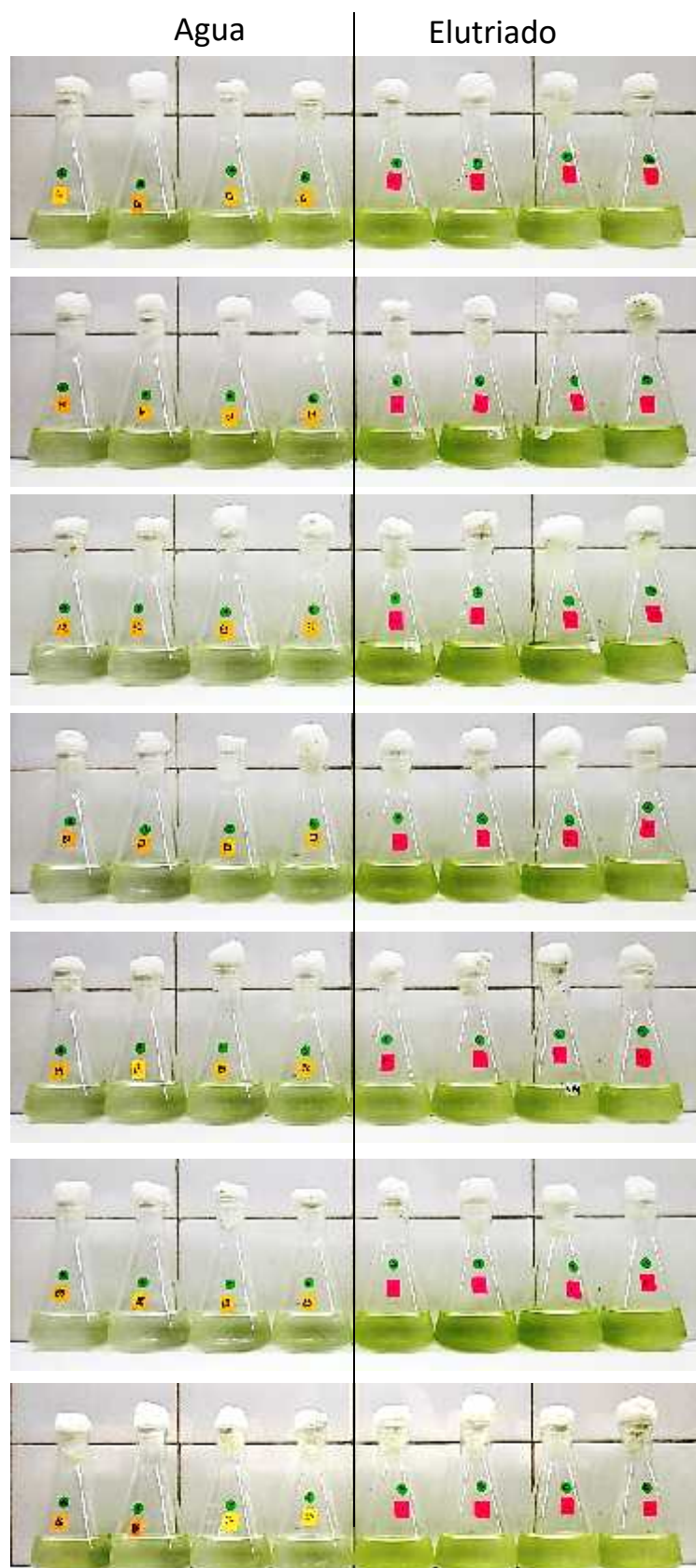
a



b

5.4. Segundo muestreo (2°M-dic'17)

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



5.4.1.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-dic'17)

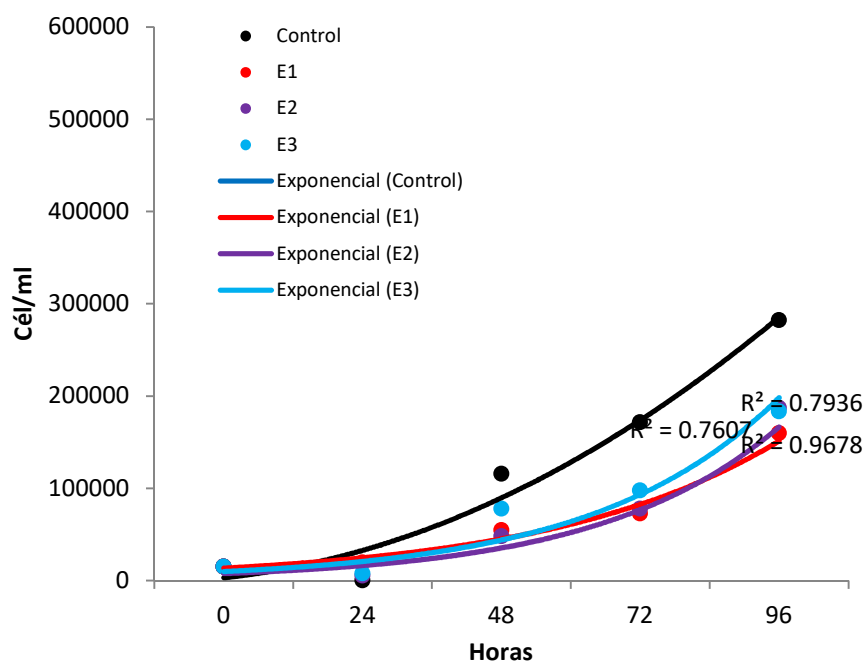
Tetraselmis suecica



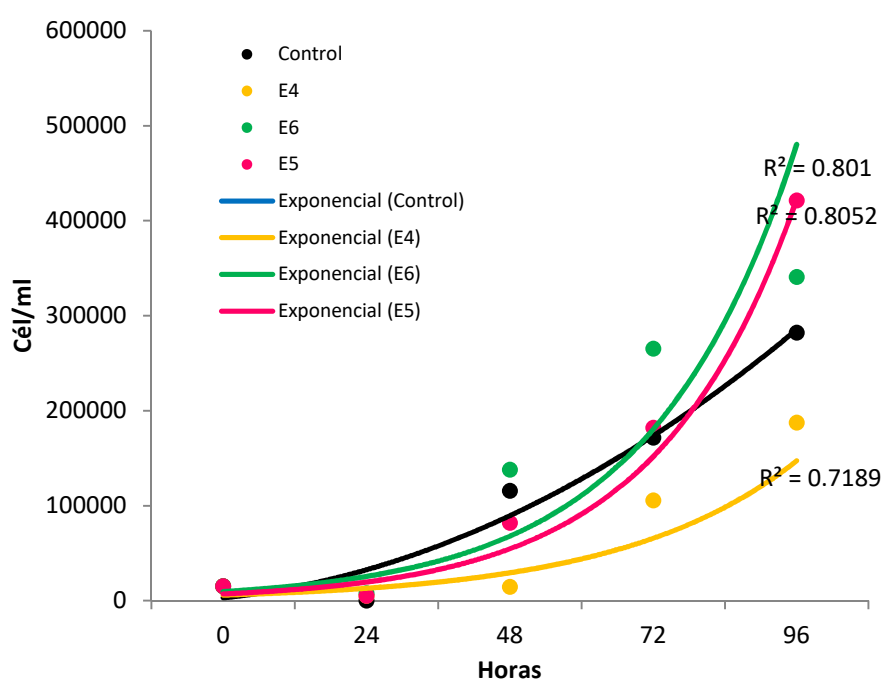
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6

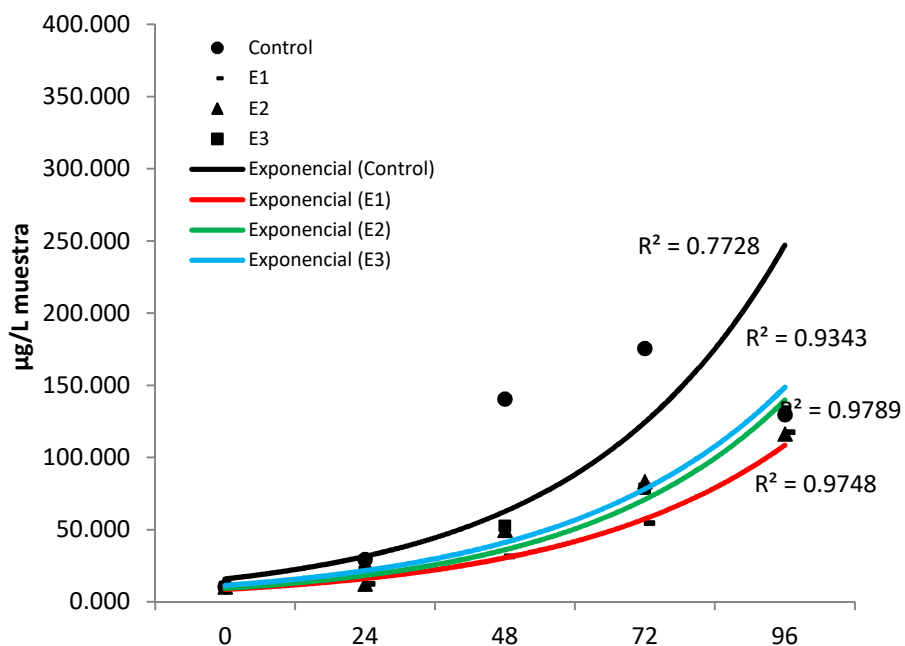


a

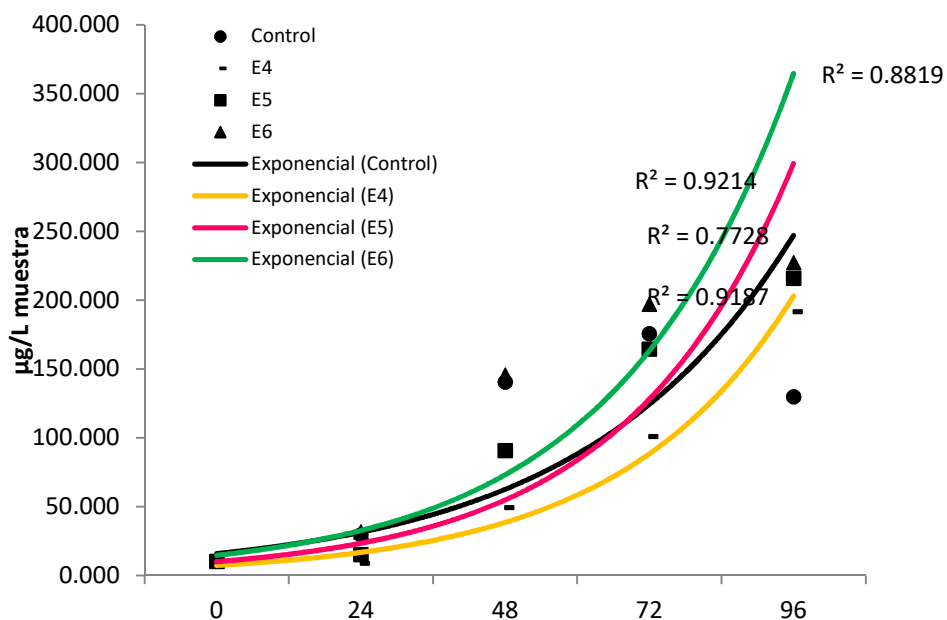


b

Tetraselmis suecica
Clorofila "a"
 (promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.4.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (2°M- dic'17)

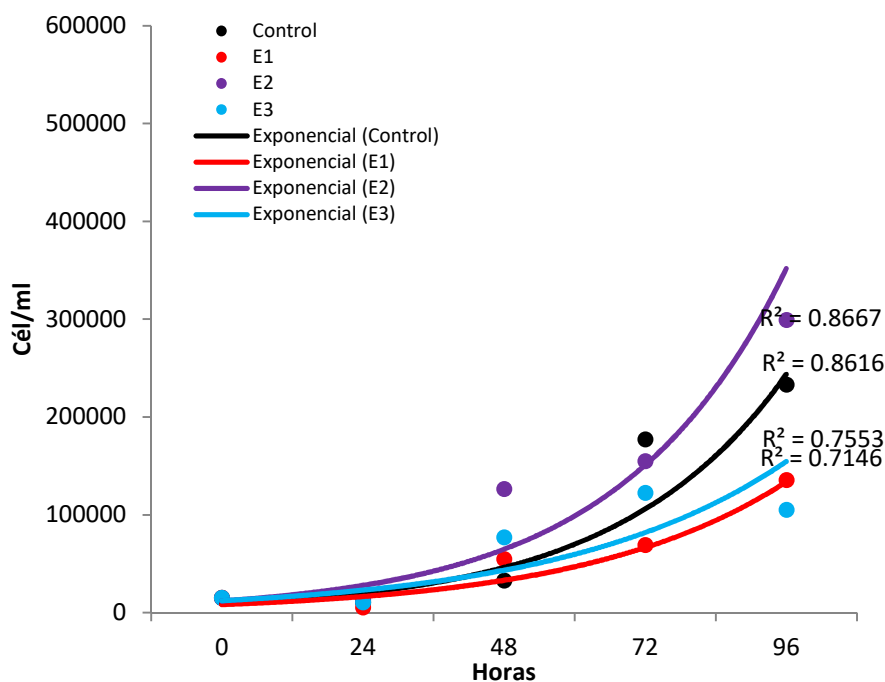
Tetraselmis suecica



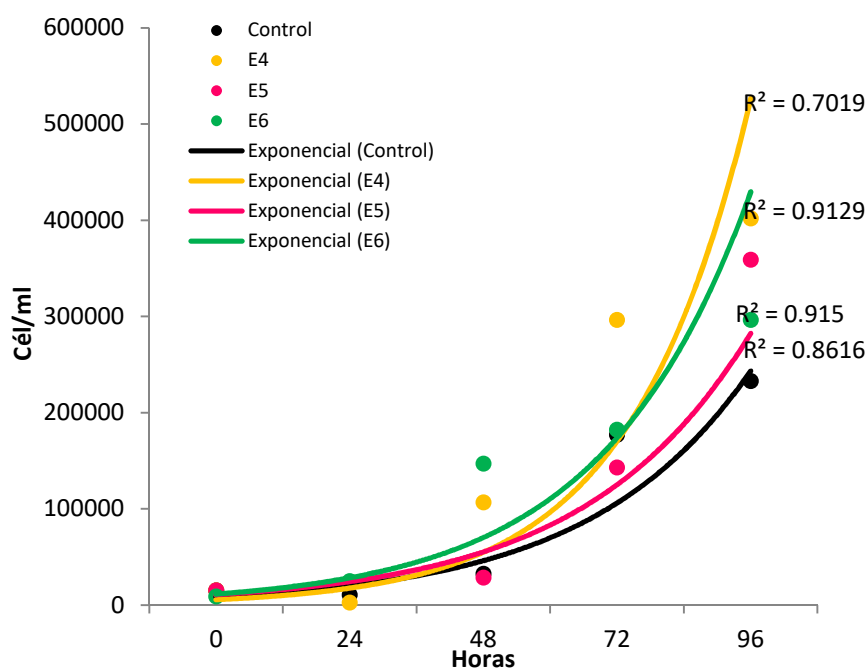
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6

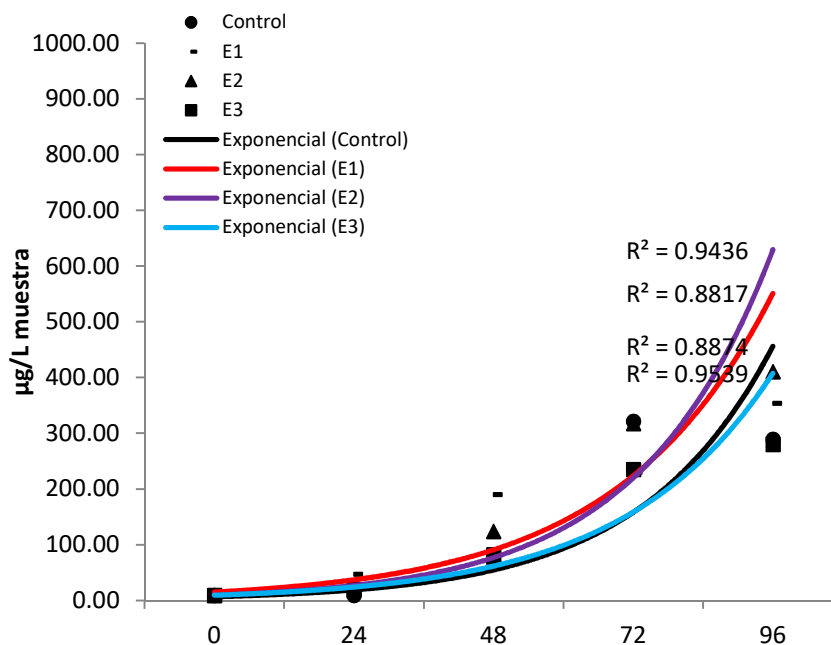


a

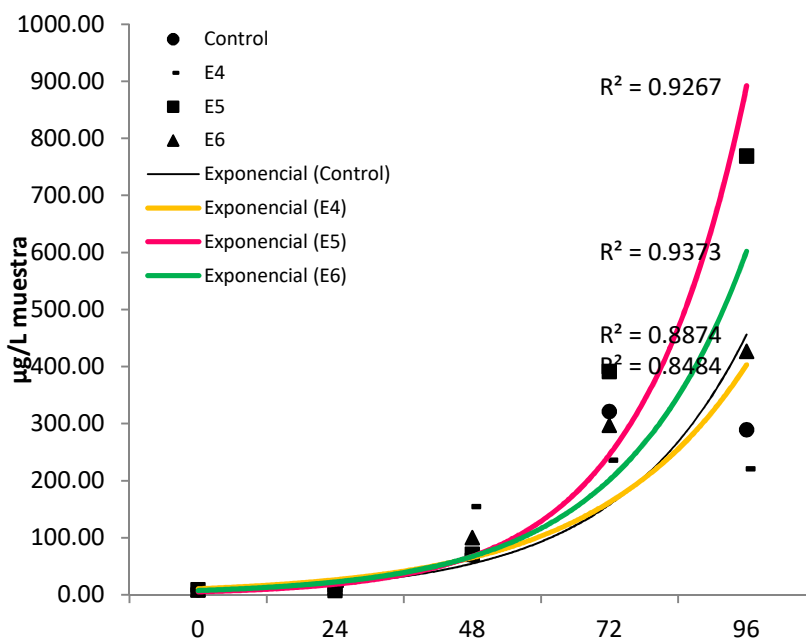


b

Tetraselmis suecica
Clorofila "a"
 (promedio de las 4 réplicas)

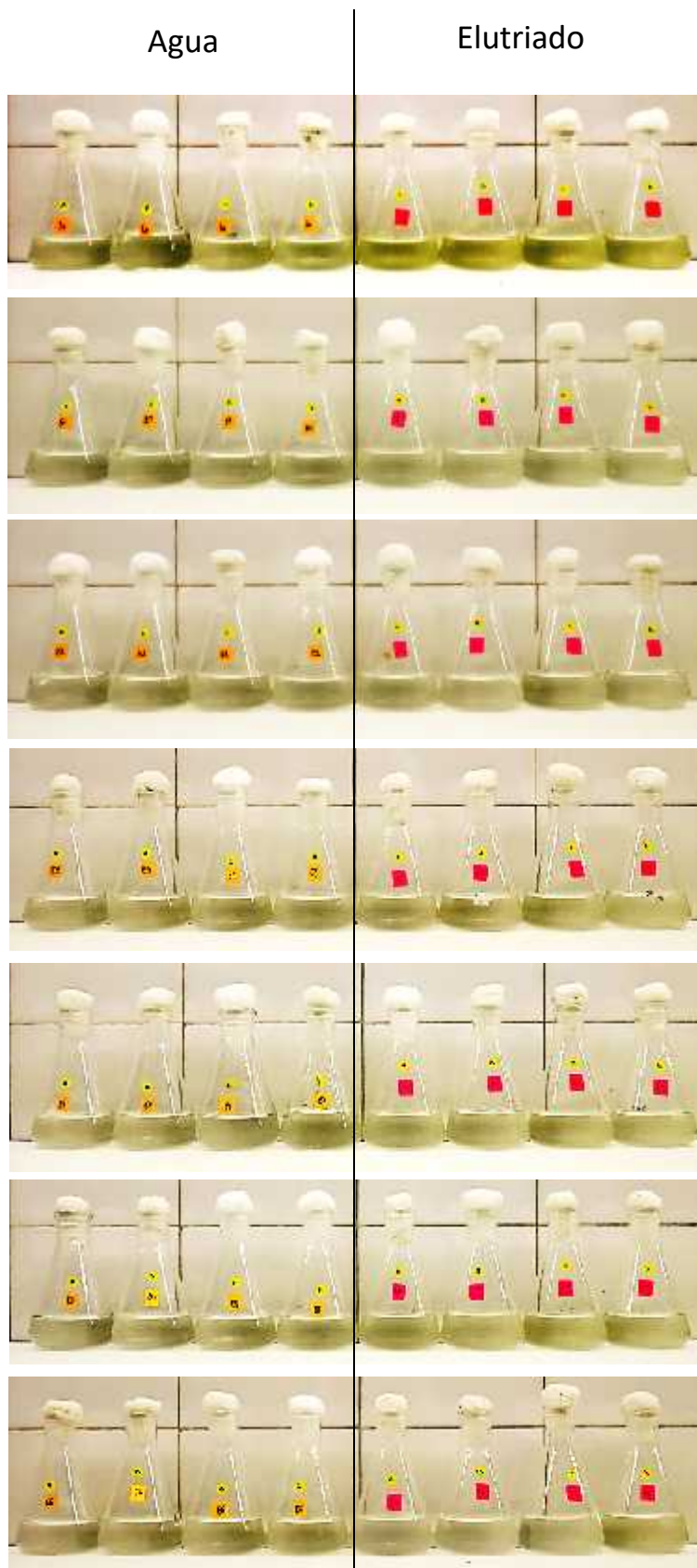


a



b

5.4.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del primer muestreo (2°M- dic'17)



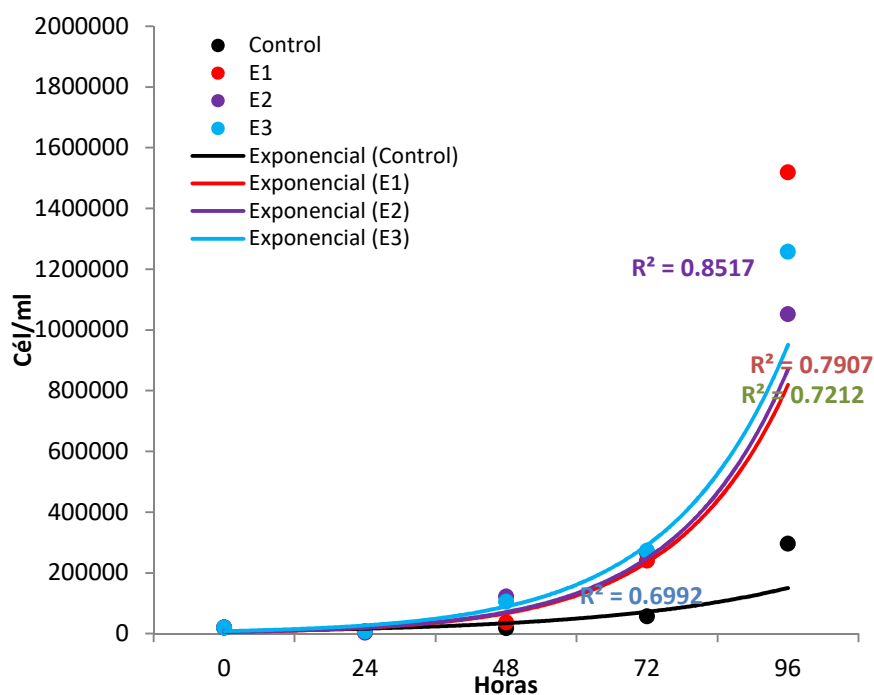
5.4.2.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M- dic'17)

Nitzschia aff. kuetzingioides

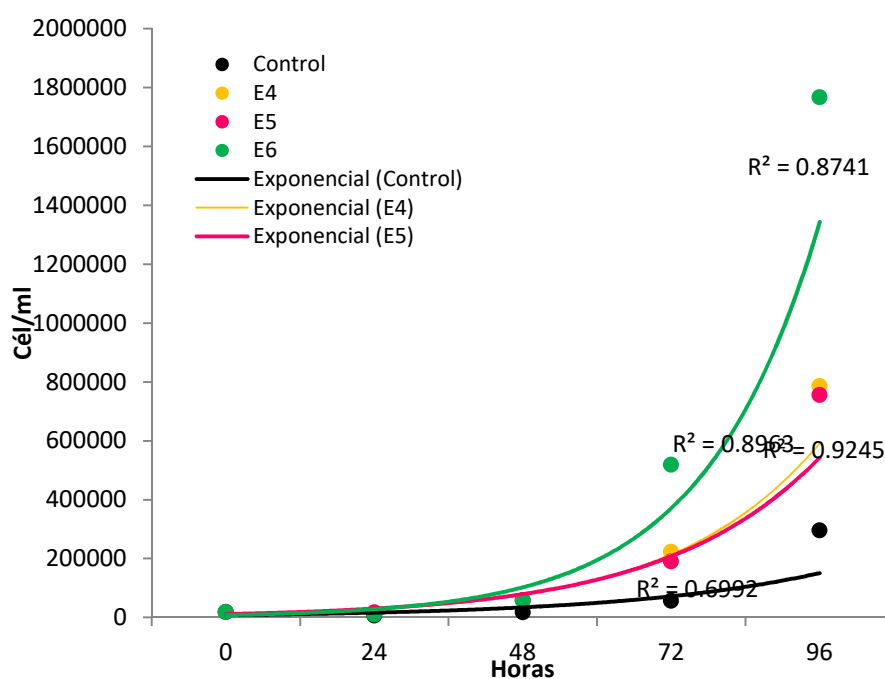


Densidad celular
(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a



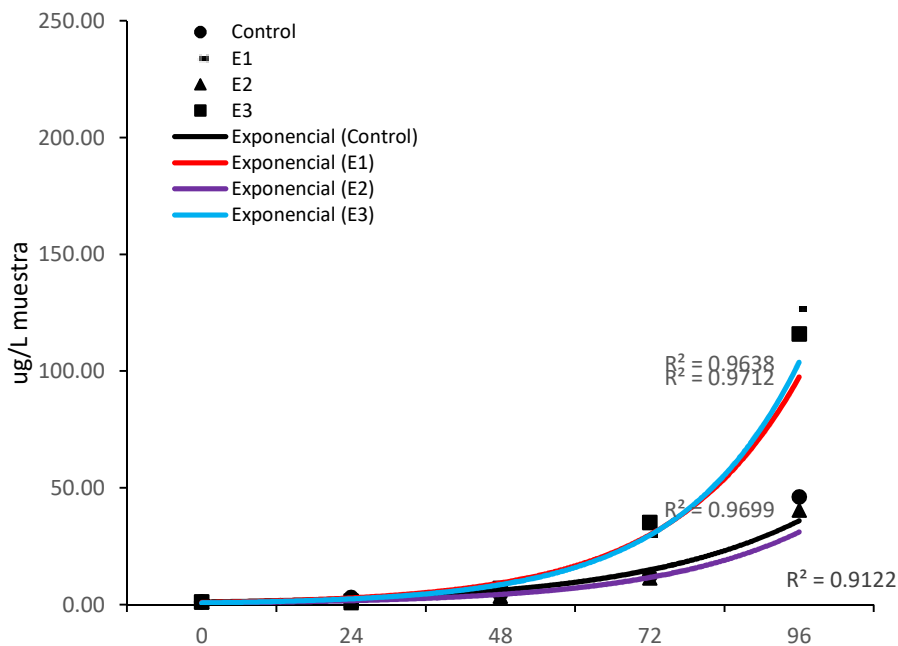
b

Nitzschia aff. kuetzingioides

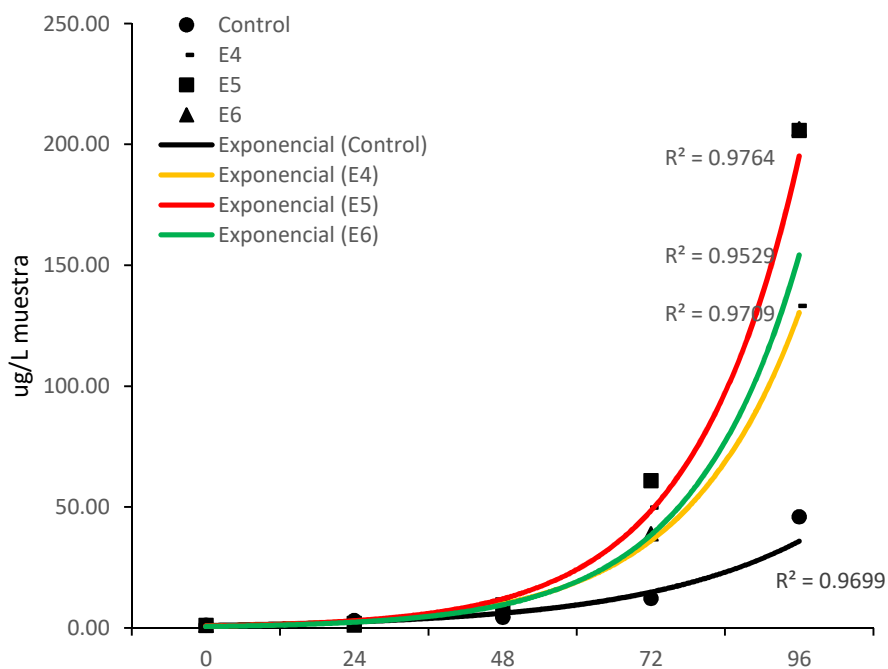


Clorofila "a"

(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.4.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (2°M- dic'17)

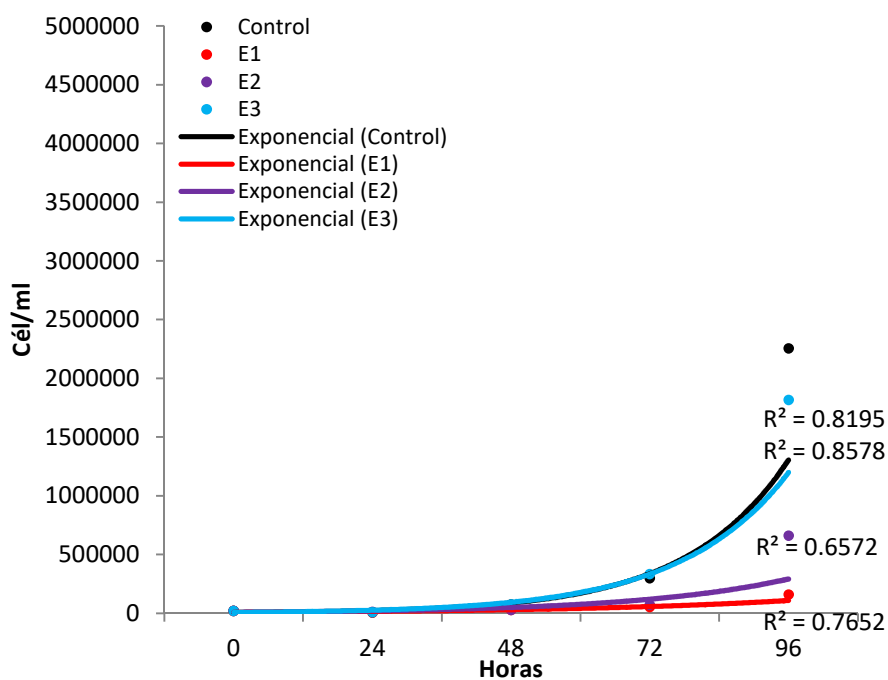
Nitzschia aff. kuetzingioides



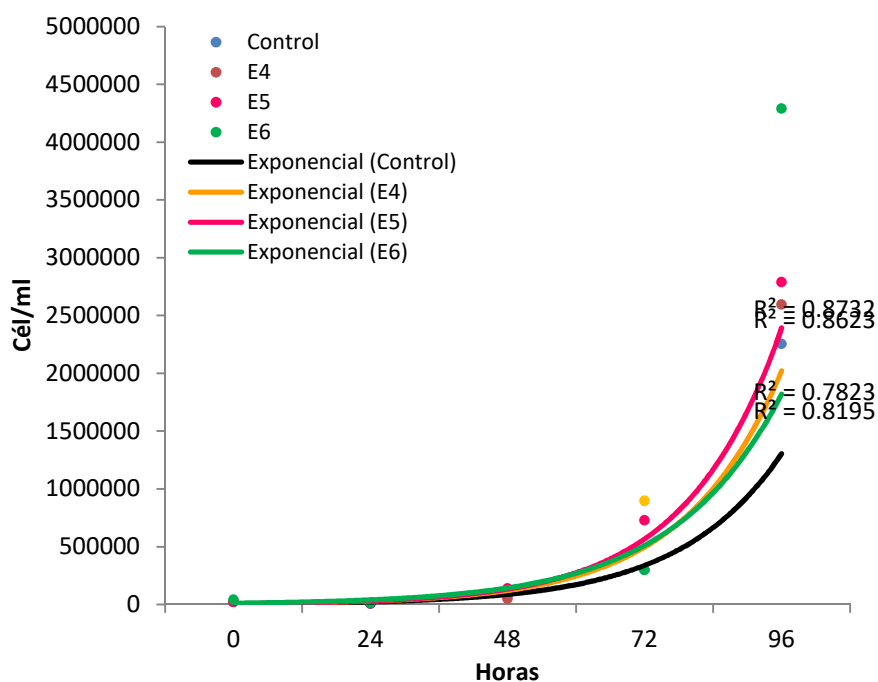
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a



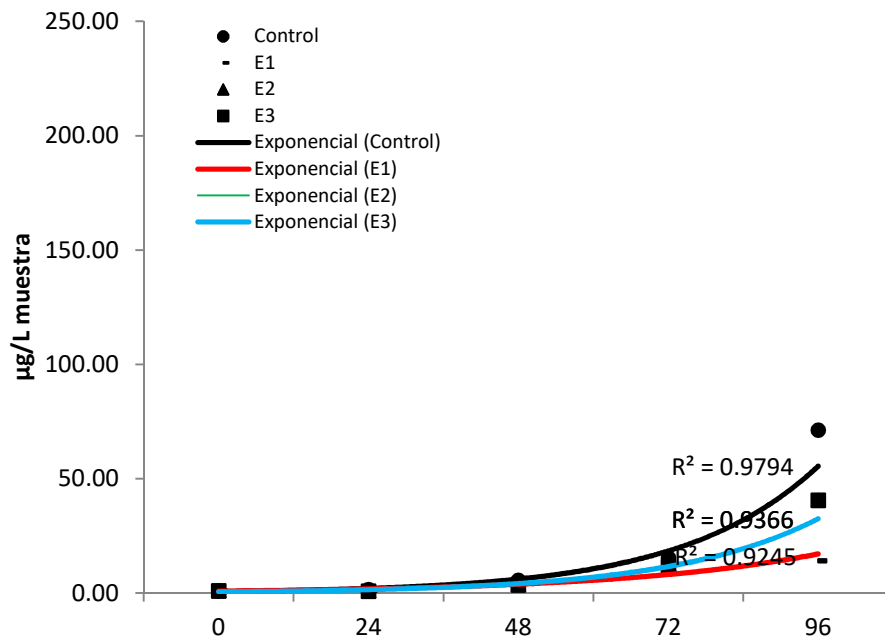
b

Nitzschia aff. kuetzingioides

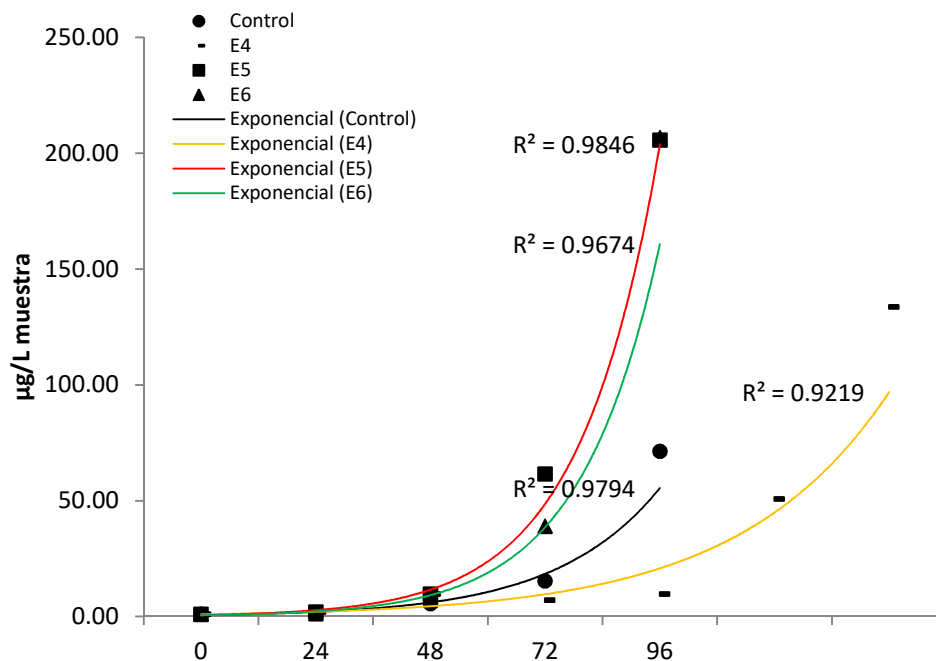


Clorofila "a"

(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.5. Tercer muestreo (3°M-feb'18)

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



5.5.1.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-feb'18)

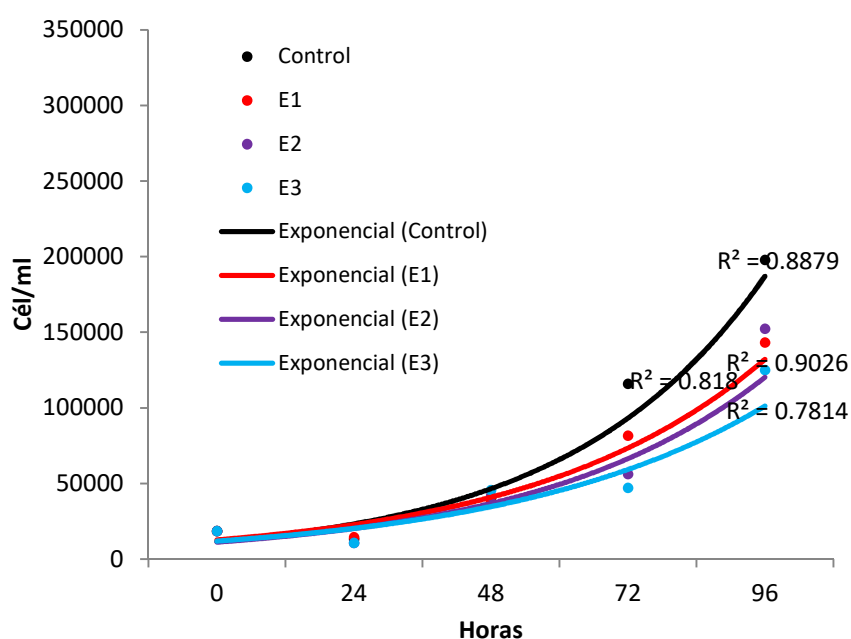
Tetraselmis suecica



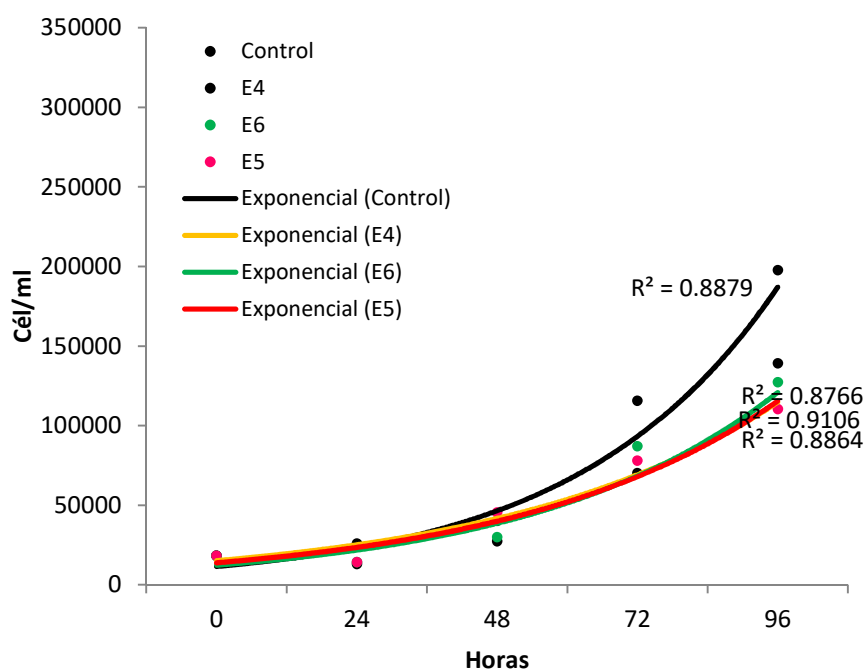
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

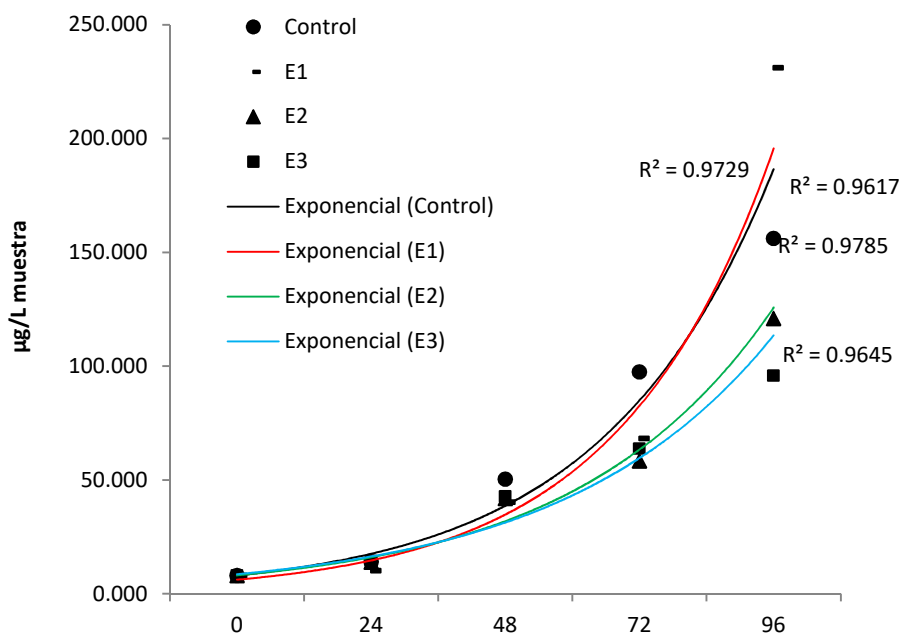


b

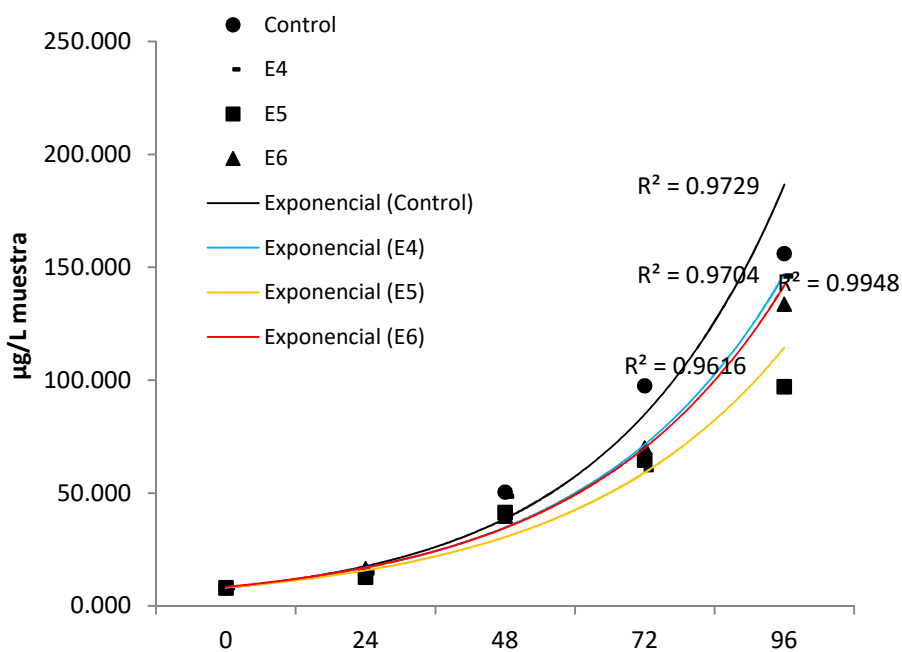
Tetraselmis suecica



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.5.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (3°M-feb'18)

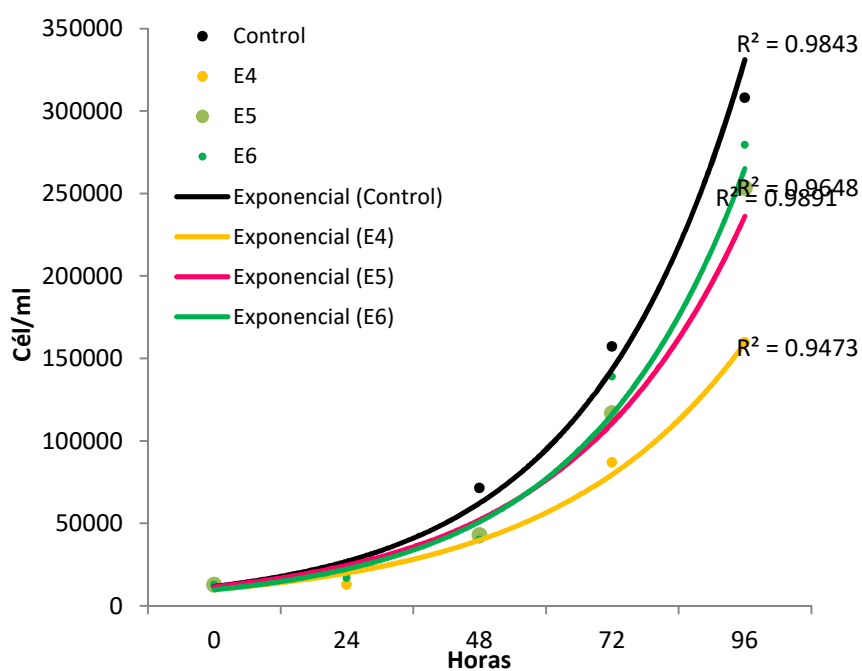
Tetraselmis suecica



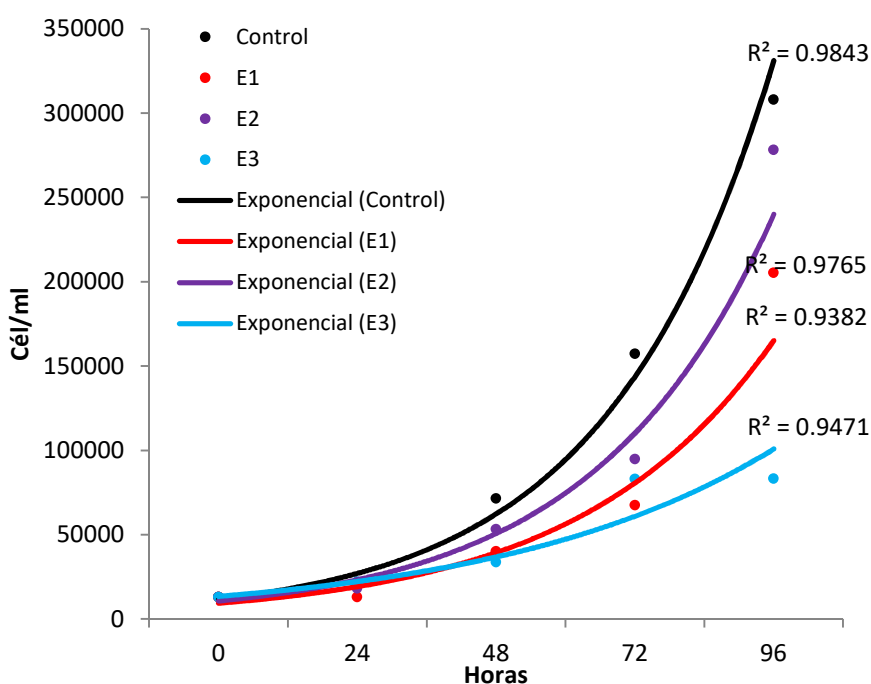
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6

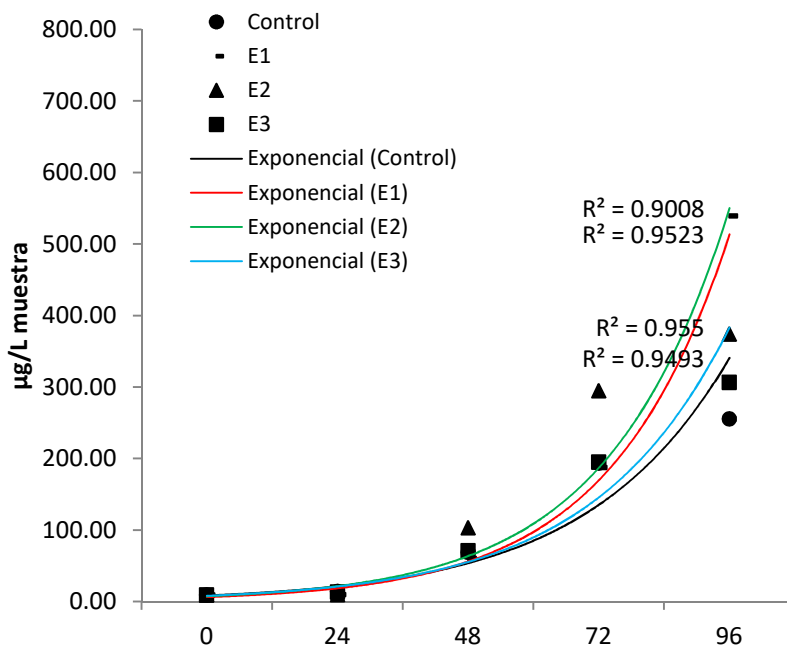


a

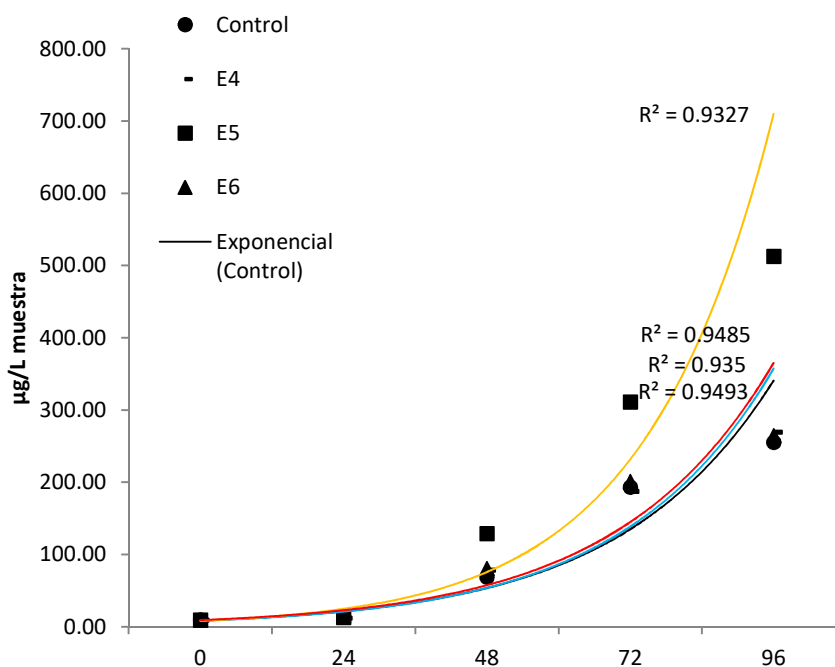


b

Tetraselmis suecica
Clorofila "a"
 (promedio de las 4 réplicas)

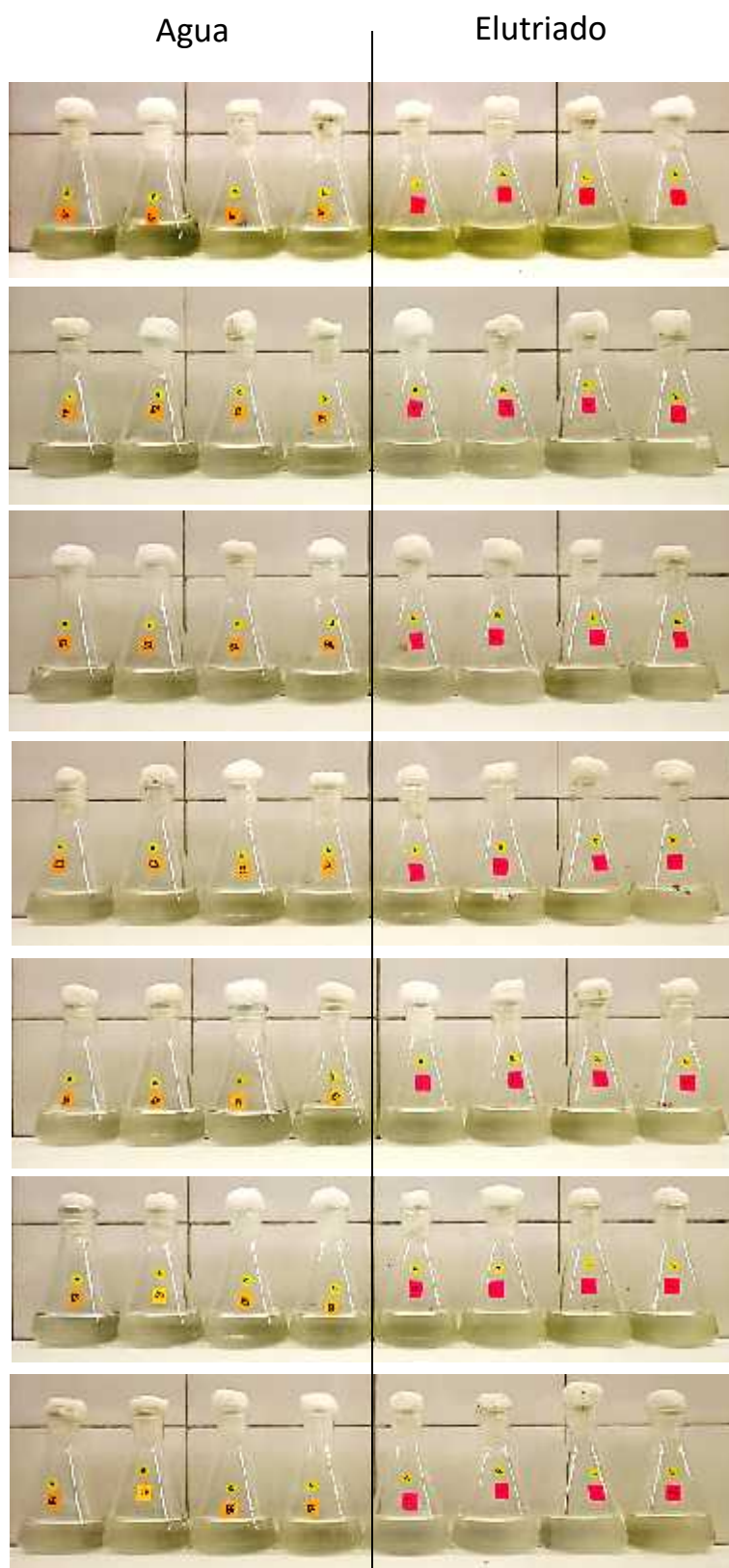


a



b

5.5.2. Bioensayos con *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del tercer muestreo (3°M-feb'18)



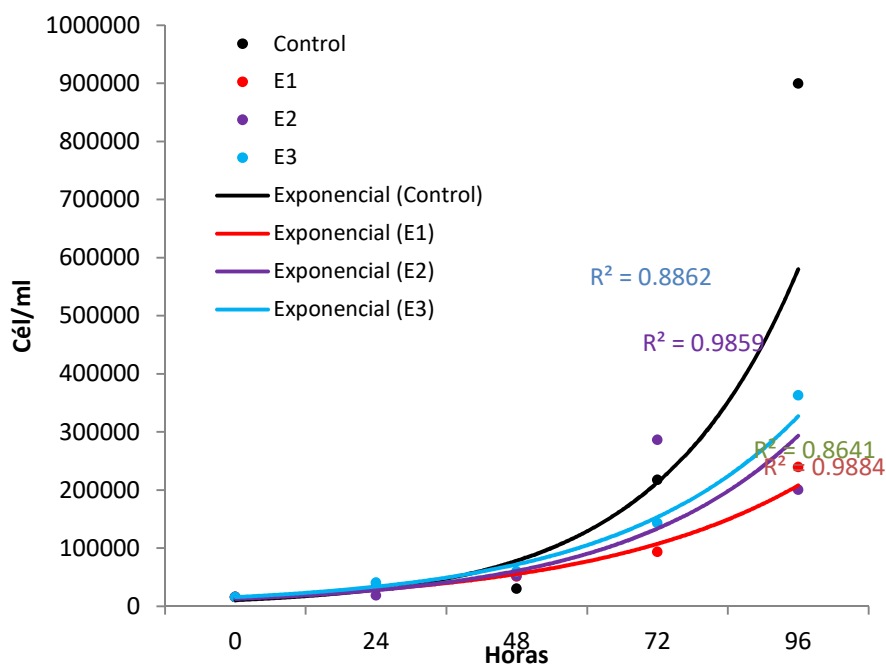
5.5.2.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-feb'18)

Nitzschia aff. kuetzingioides

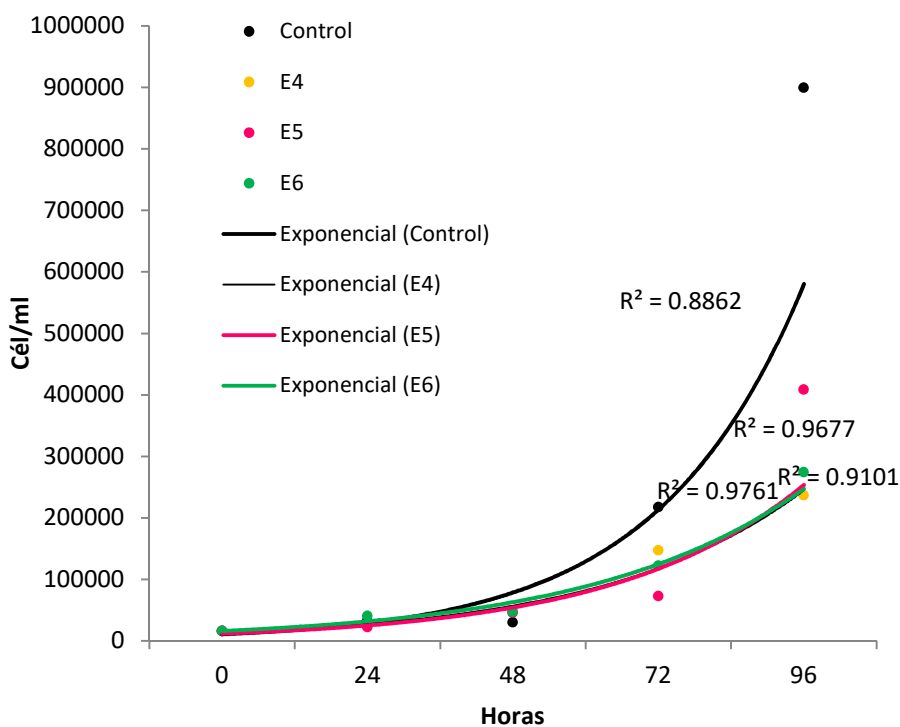


Densidad celular
(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

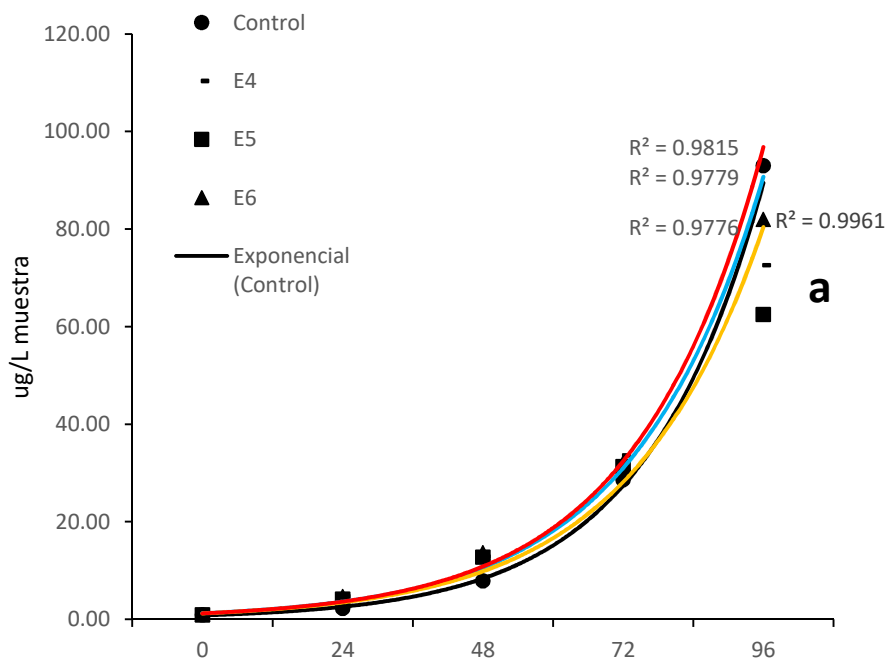
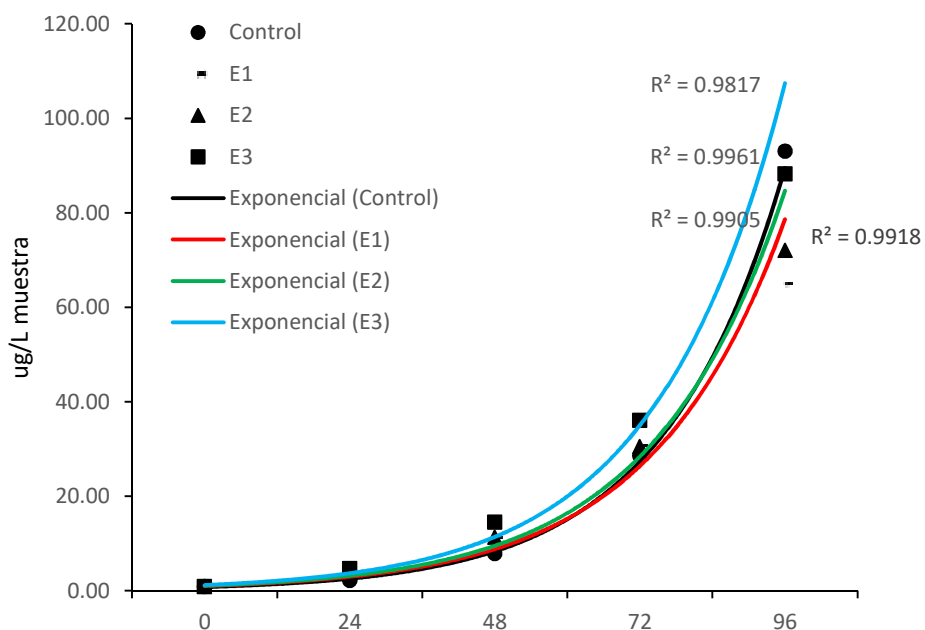


b

Nitzschia aff. kuetzingioides



Clorofila "a" (promedio de las 4 réplicas)



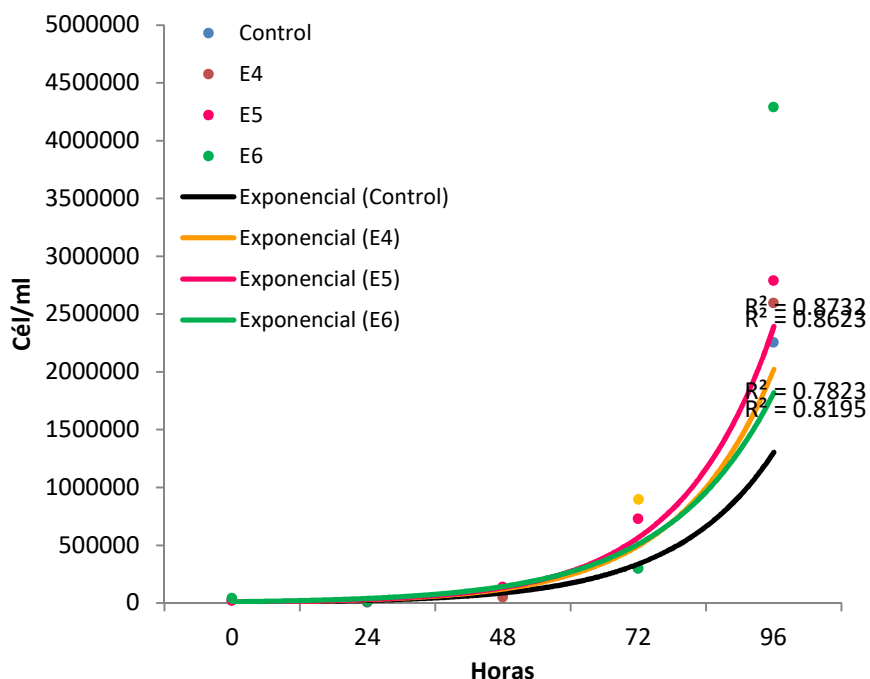
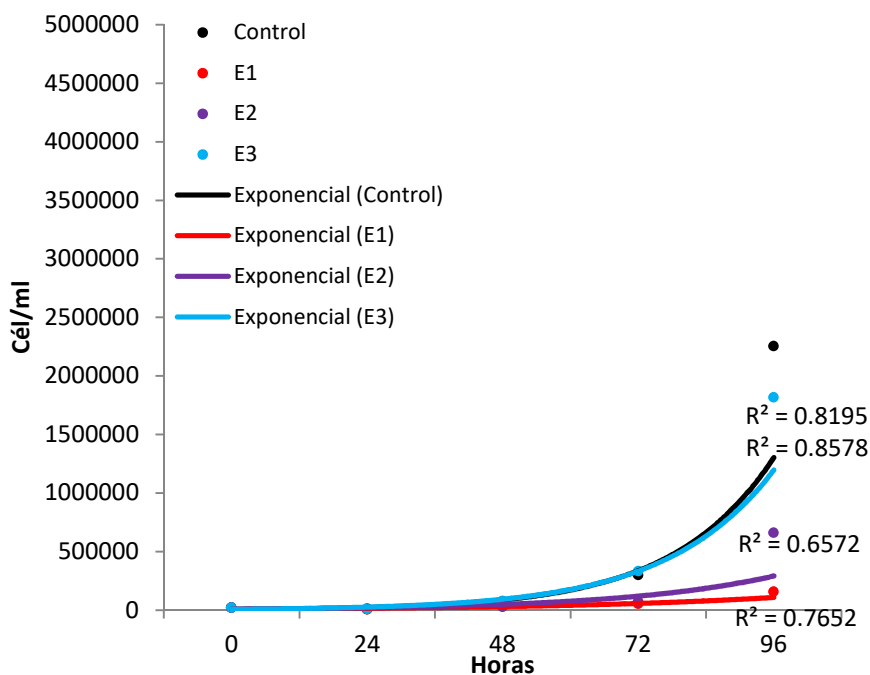
5.5.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (3°M-feb'18)

Nitzschia aff. kuetzingioides



Densidad celular
(promedio de las 4 réplicas)

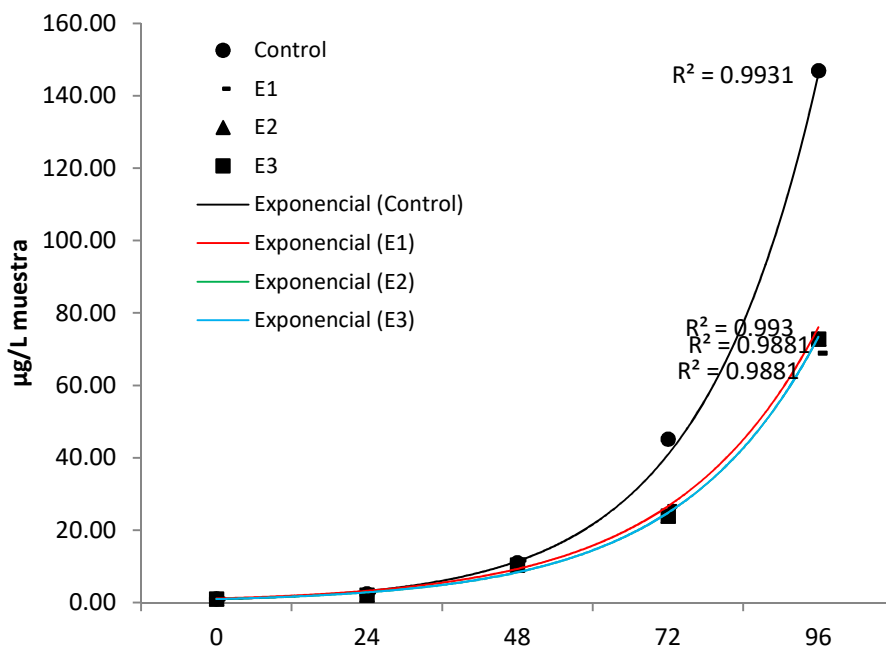
Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



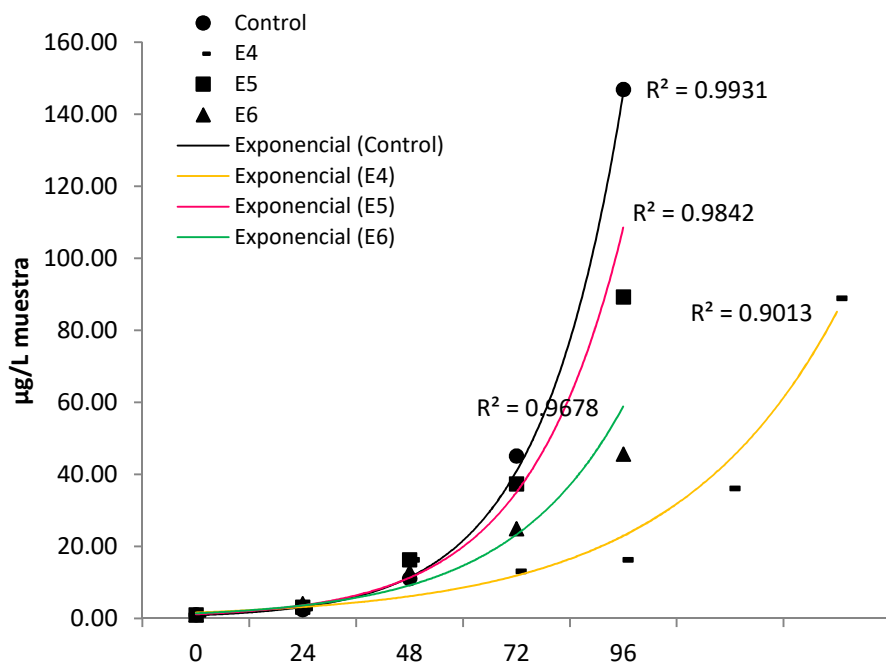
Nitzschia aff. kuetzingioides



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.6. Cuarto muestreo (4°M-may´18)

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



5.6.1.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-may´18)

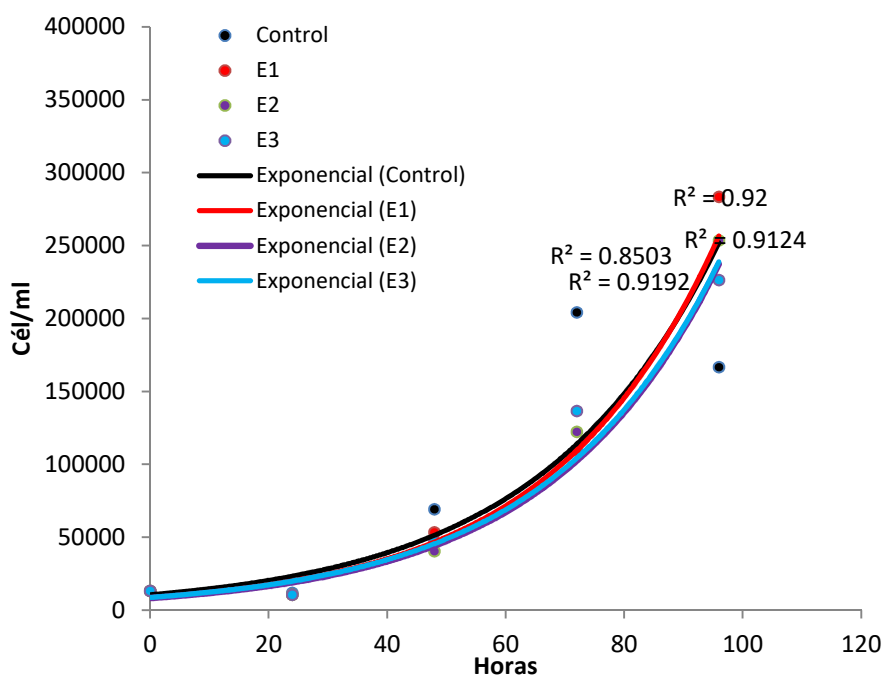
Tetraselmis suecica



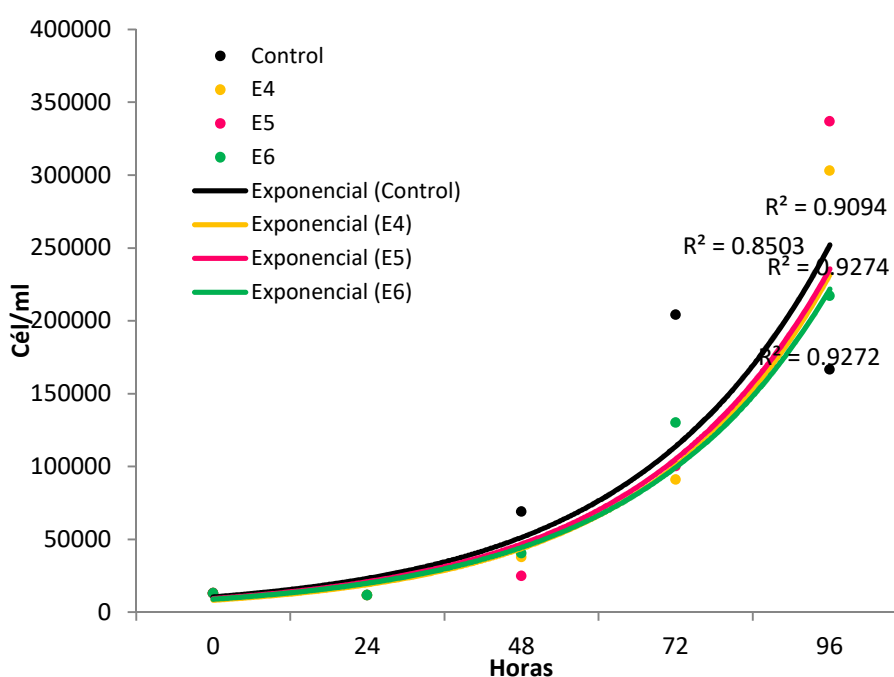
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

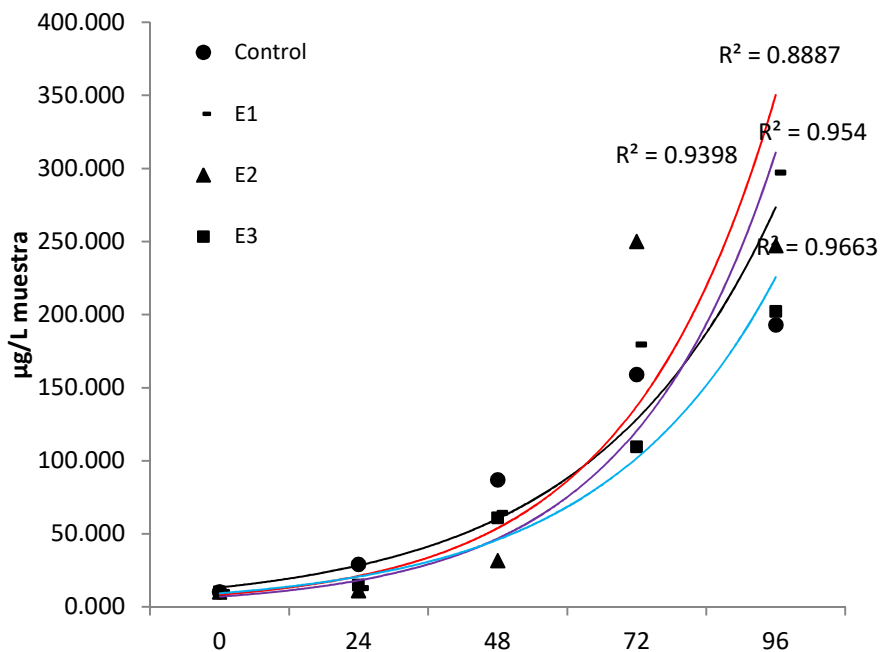


b

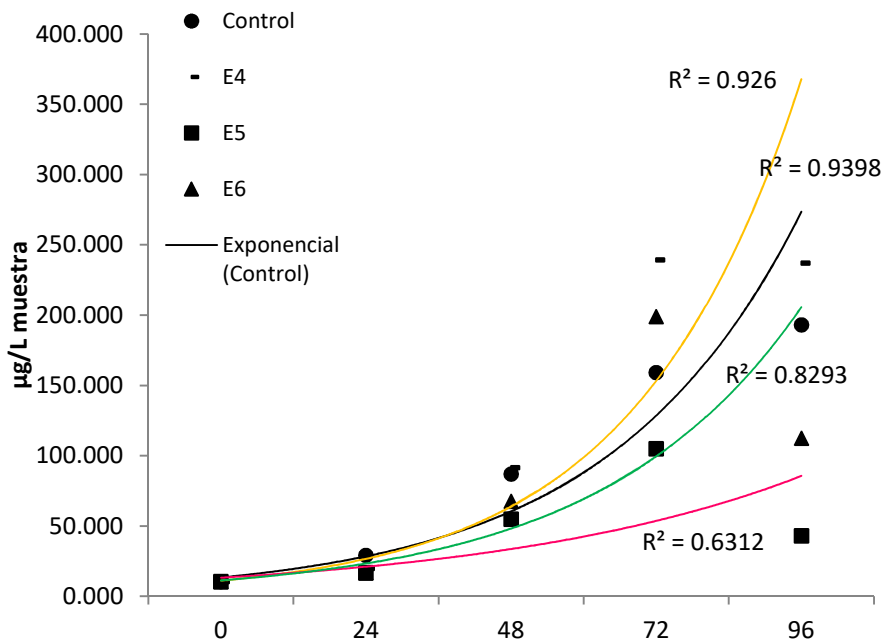
Tetraselmis suecica



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.6.1.2 Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (4°M-may´18)

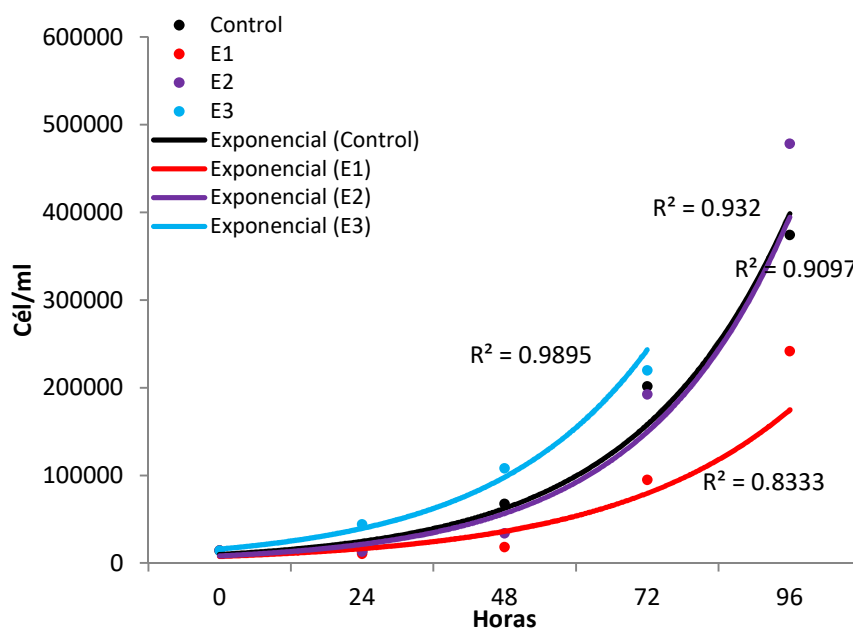
Tetraselmis suecica



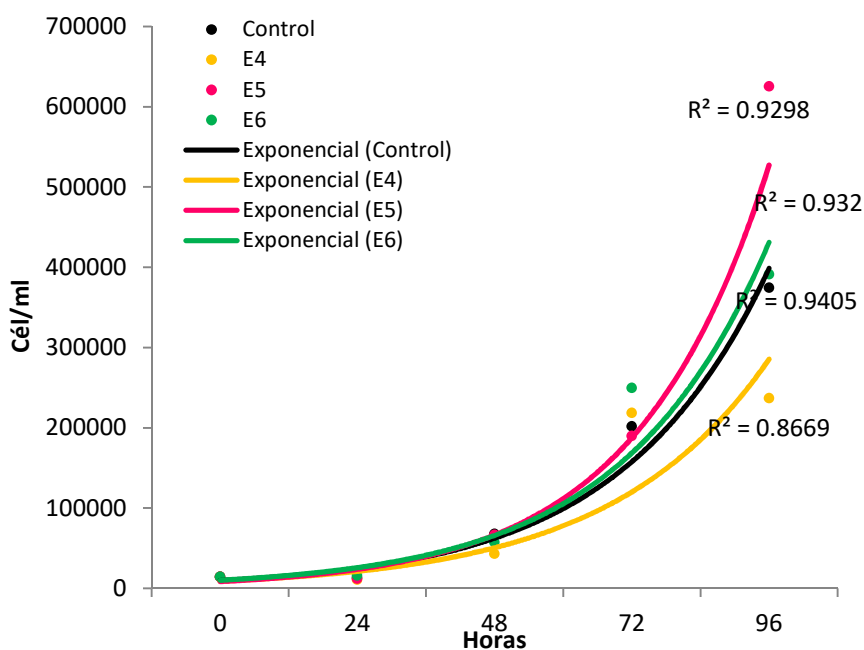
Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

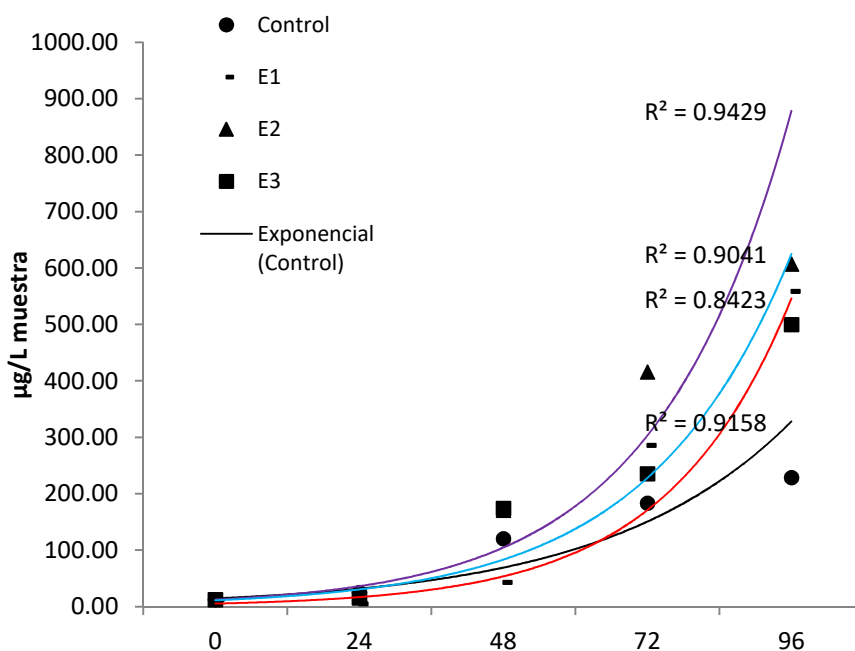


b

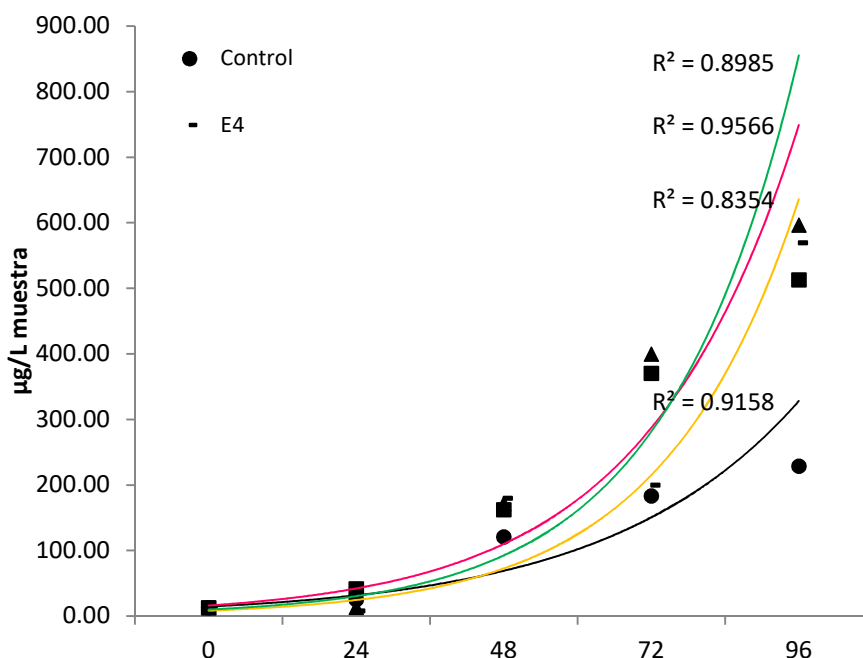
Tetraselmis suecica



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.6.2. Bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente del cuarto muestreo (4°M-may´18)



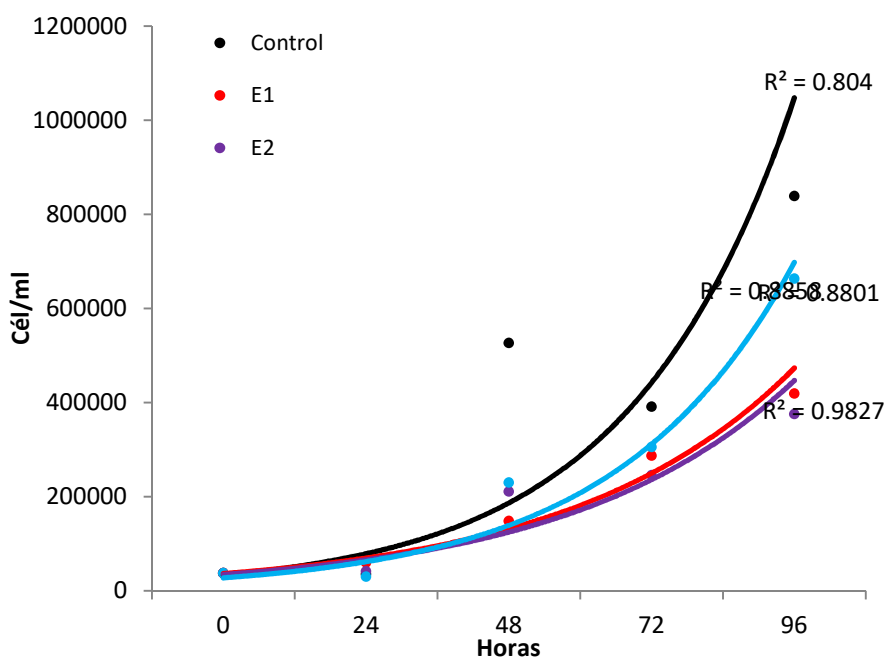
5.6.2.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-may´18)

Nitzschia aff. kuetzingioides

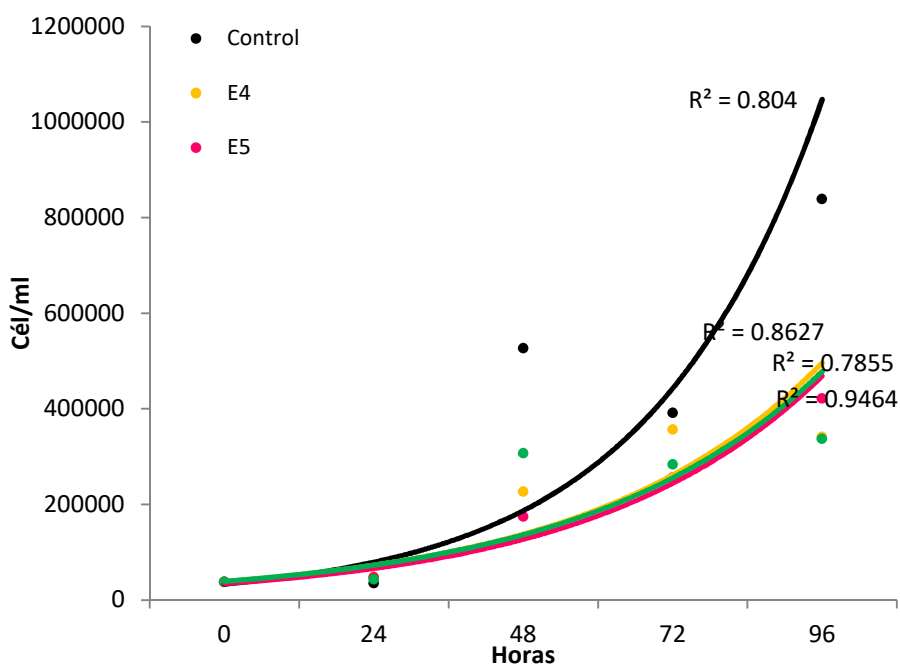


Densidad celular
(promedio de las 4 réplicas)

Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6



a

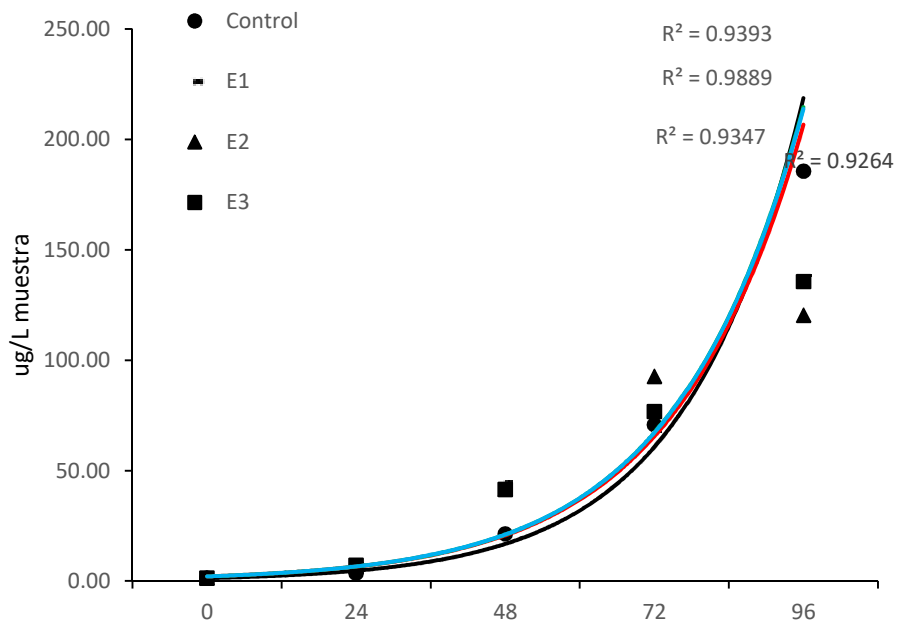


b

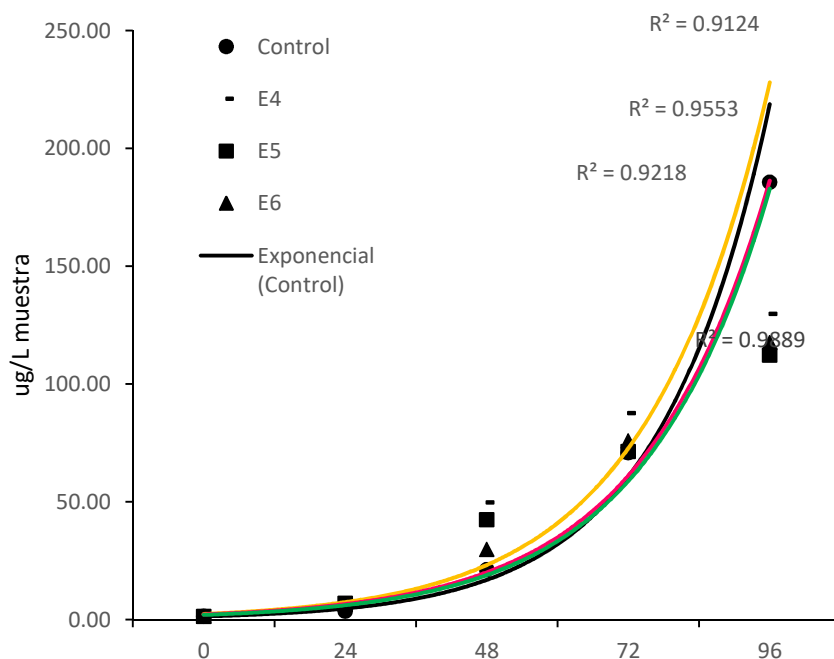
Nitzschia aff. kuetzingioides



Clorofila "a"
(promedio de las 4 réplicas)



a



b

5.6.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo (4°M-may´18)

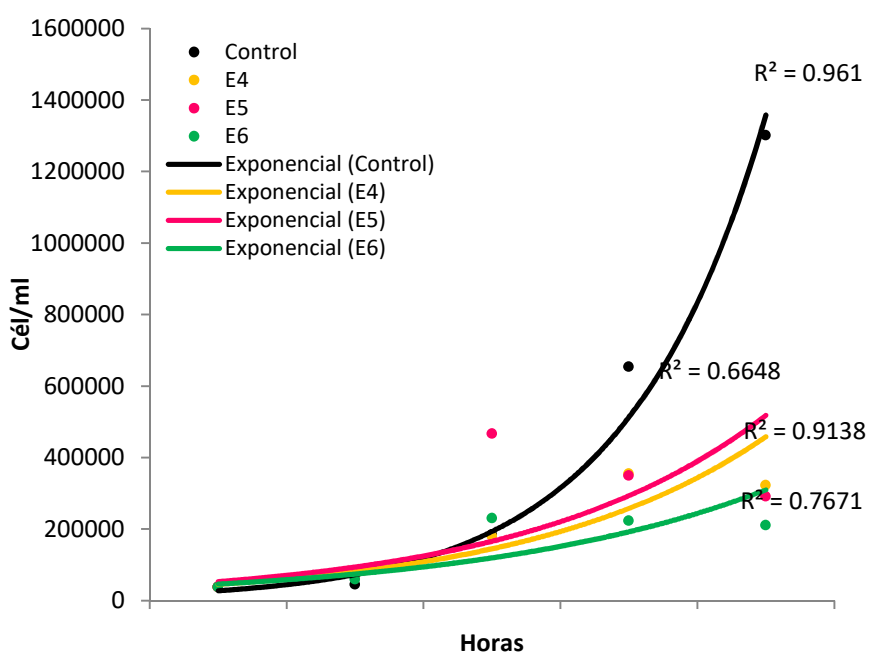
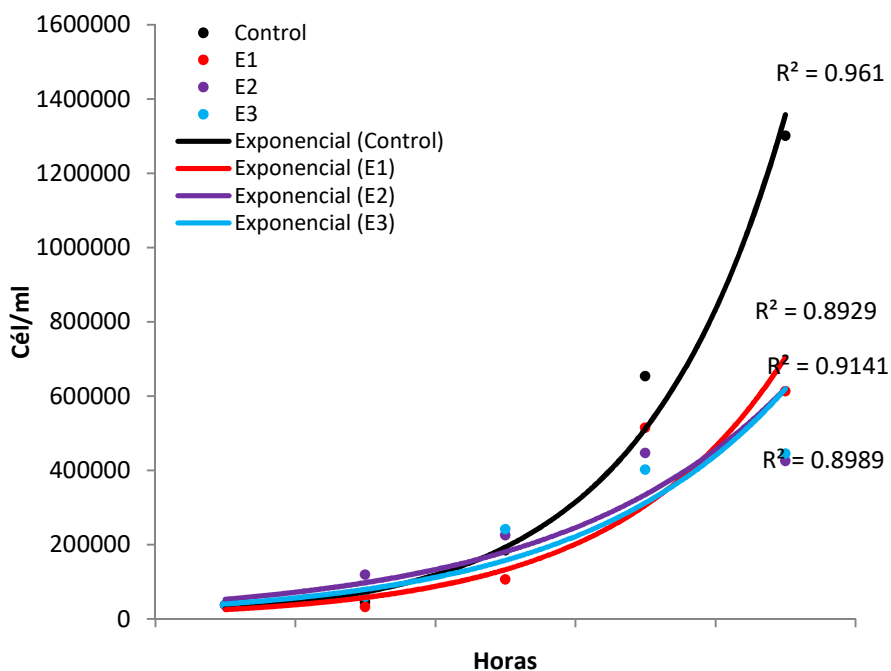
Nitzschia aff. kuetzingioides



Densidad celular

(promedio de las 4 réplicas)

- Líneas de tendencia: a) Control, E1, E2, E3
b) Control, E4, E5, E6

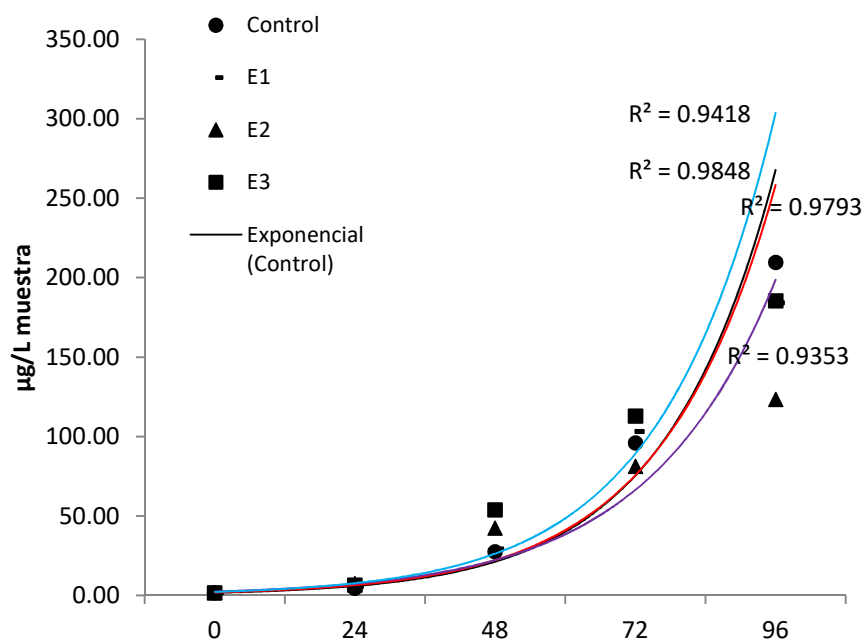


Nitzschia aff. kuetzingioides

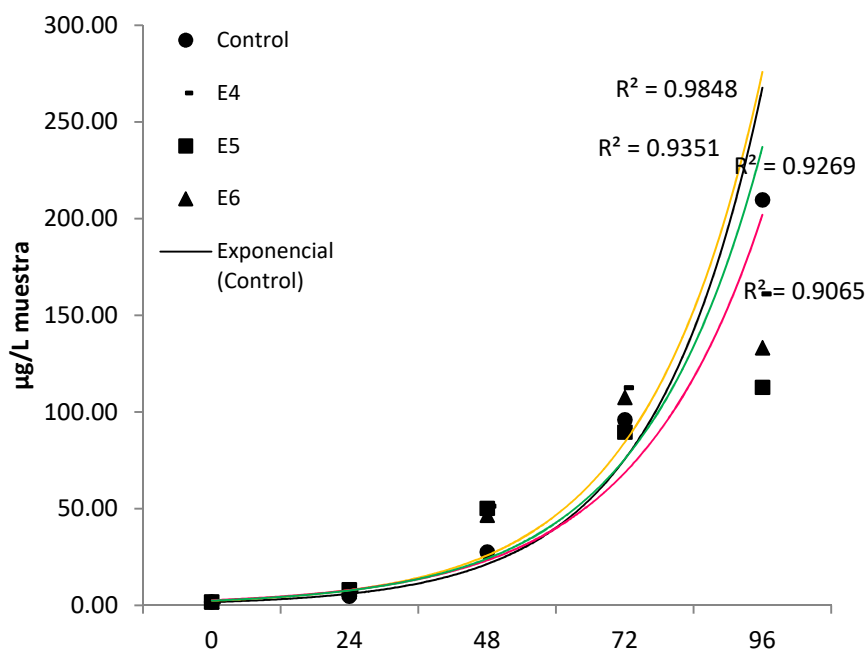


Clorofila "a"

(promedio de las 4 réplicas)



a



b

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Comparación entre muestreos

6. Análisis de los resultados entre los cuatro muestreos (1°M-ago'17), (2°M-dic'17), (3°M-feb'18) y (4°M-may'18)

Durante los bioensayos se analizaron:

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

6.1. 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=0,69	0,412	n.s.	
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=19,40 Elutriado: F=32,11	0,001 <0,0001	** **	
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=23,47	<0,001	**	
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=13,13 Elutriado: F=10,47	0,0006 0,0015	** *	
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=4,83	0,0367	*		
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=0,57 Elutriado: F=32,11	0,647 <0,0001	n.s. *	
	<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,03	0,8754	n.s.
			Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=10,74 Elutriado: F=18,69	0,001 0,0001	** **
Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,36	0,135	n.s.		
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=4,86 Elutriado: F=149,64	0,0217 <0,0001	* **	
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,85	0,363	n.s.	
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=38,58 Elutriado: F=85,38	<0,0001 <0,0001	** **	

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 *T. suecica* tanto en **agua** como en **elutriado** en muestras provenientes de la Estación **E1**, no presentaron diferencias significativas al evaluar densidad de individuos. Sin embargo, la concentración de clorofila y la tasa de crecimiento fueron diferentes al comparar los tratamientos: **agua** y **elutriado** del sedimento (Tabla 1). La concentración de clorofila y la tasa de crecimiento de *T. suecica* durante el bioensayo en **agua** fueron considerablemente menores (Fig. 1).

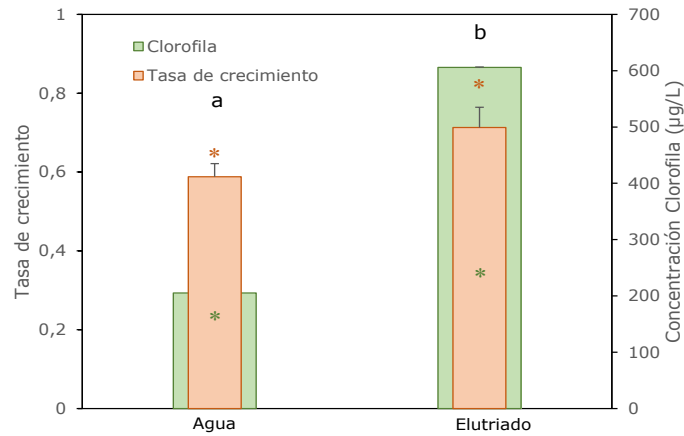


Figura 1: Bioensayos realizados con *T. suecica* en agua y elutriado de sedimento de E1. Variación de la concentración de clorofila y tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Al comparar entre muestreos los resultados de los bioensayos con *T. suecica* realizados en **agua** y en **elutriado** del sedimento se pudieron observar diferencias significativas para densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Ambas variables, fueron menores en los bioensayos con agua de los tres primeros muestreos (1ºM-ago'17), (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18), sin embargo en los bioensayos realizados en el **elutriado** del sedimento, los menores valores se observaron en (2ºM-dic'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Figs. 2 y 3). Esta última observación también fue notada para la variable tasa de crecimiento en muestras de **elutriado** de sedimento (Fig. 4).

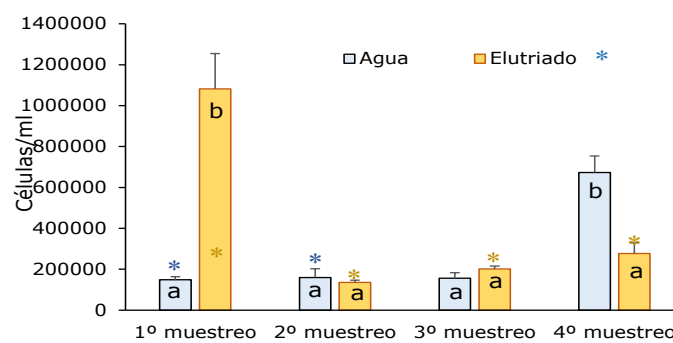


Figura 2: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E1, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

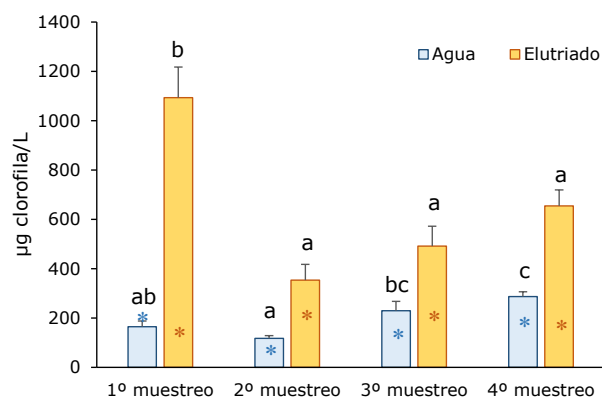


Figura 3: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E1, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos los valores promedios medidos en los controles.

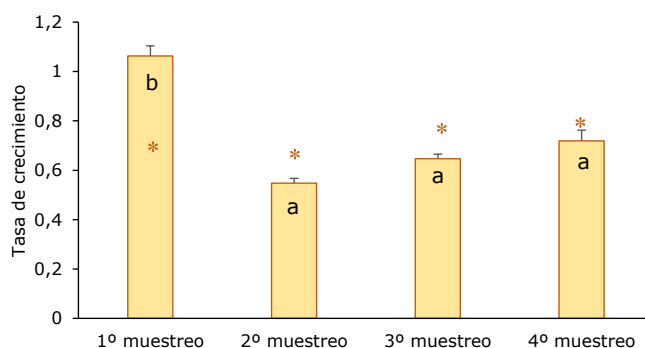


Figura 4: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E1, en elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Nitzschia* aff. *kuetzingioides

En la estación **E1**, la densidad, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* no presentaron diferencias significativas en los dos tratamientos considerados: **agua** y **elutriado** de sedimento. Sin embargo, 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 bastante similar en la variación de estas variables a lo largo de las fechas muestreadas. La densidad de individuos fue considerablemente menor tanto en **agua** como **elutriado** de sedimento en los muestreos (2ºM-dic'17) (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 5).

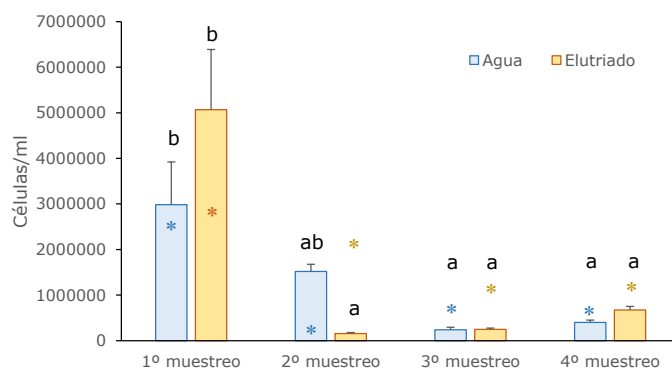


Figura 5: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E1, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedio medidos en los controles.

La concentración de clorofila "a" registrada en los bioensayos en **elutriado** de sedimento también fue baja en los muestreos mencionados anteriormente y considerablemente mayor en el (1ºM-Ago'17). Sin embargo en ensayos en **agua** no varió considerablemente entre los 4 muestreos, aunque los menores valores se observaron los muestreos (1ºM-ago'17) (2ºM-dic'18) y (3ºM-feb'18) (Fig. 6).

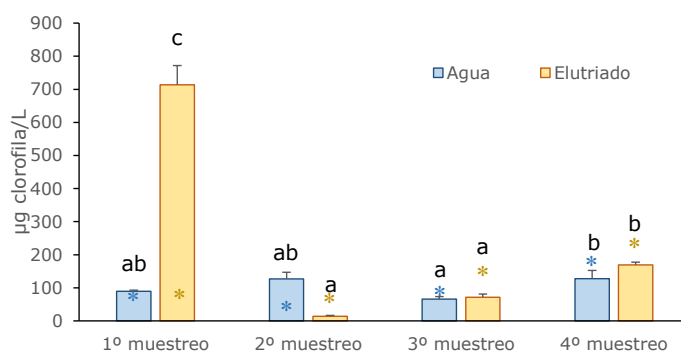


Figura 6: Bioensayos realizados con *N. aff. Kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E1, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Como fue esperable, la tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* reflejó valores bajos en **elutriado** del sedimento en (2ºM-dic'17) (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18), sin embargo en tratamiento **agua** solo en los 2 últimos muestreos se observaron valores bajos (Fig. 7).

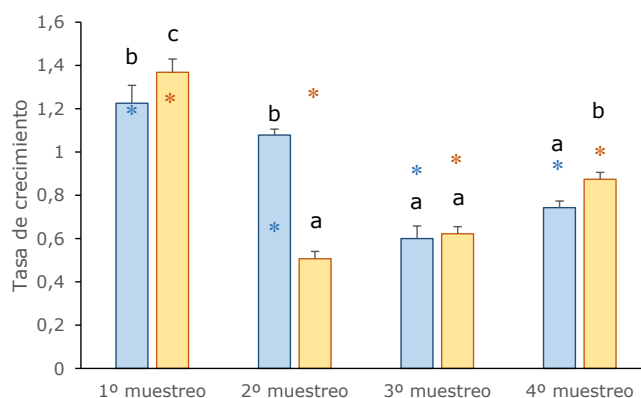


Figura 7: Bioensayos realizados con *N. aff. Kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E1, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

INTERPRETACIÓN (E1)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Los altos valores en densidad celular y concentración de clorofila "a" en *T. suecica* registrados durante los bioensayos en el **agua** de **E1** correspondientes al muestreo 4ºM-may'18 podrían explicarse como una respuesta a las mayores concentraciones de amonio registradas (95,4 $\mu\text{mol/L}$).

Por otro lado, la más baja densidad celular, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento en la diatomea *N. aff. kuetzingioides* durante los bioensayos en el **agua** de **E1** correspondieron al muestreo 3ºM-feb'18, coincidentemente con los más altos valores de amonio (662,9 $\mu\text{mol/L}$) nunca antes registrados en el estuario durante los Programas de Monitoreo previos. Este valor es cercano a los valores de inhibición del crecimiento para diatomeas (Valor de inhibición de crecimiento: 750 $\mu\text{mol/L}$) (Collos y Harrison 2014).

Durante los bioensayos realizados con el **elutriado** de los sedimentos se registró la mayor tasa de crecimiento de *T. suecica* en el muestreo 1ºM-ago'17, mientras que los menores valores se dieron en el 2ºM-dic'17, 3ºM-feb'18 y 4ºM-may'18. Lo mismo ocurrió en los bioensayos realizados con la diatomea *N. aff. kuetzingioides*.

Sin embargo, no pudo apreciarse una coincidencia con la sumatoria de policíclicos aromáticos (PAHs) (9927,05 ppb.p.s.) y organoclorados (3124,33 ppb.p.s.) en el muestreo 1ºM-ago'17, ya que los máximos obtenidos no mostraron efectos adversos que influyeran en la alta tasa de crecimiento de ambas microalgas.

6.2. 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=2,93	0,0984	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=8,53 Elutriado: F=1,22	0,0033 0,3531	* n.s.
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=62,63	0,0001	**
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=11,03 Elutriado: F=6,83	0,0012 0,0073	** *
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=9,15	0,0055	**	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=4,85 Elutriado: F=1,38	0,0247 0,3042	* n.s.	
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,60	0,4439	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=23,26 Elutriado: F=98,26	0,001 <0,001	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,53	0,1228	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=24,84 Elutriado: F=69,03	<0,0001 <0,0001	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,10	0,7575	n.s.
Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=33,89 Elutriado: F=35,64	<0,0001 <0,0001	** **		

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 *T. suecica* en **agua** y **elutriado** del sedimento de la **E2** no se pudieron detectar diferencias significativas en la densidad de individuos (Tabla 2), pero si en la concentración de clorofila "a" y en la tasa de crecimiento. Ambas variables presentaron valores menores en los bioensayos en **agua** (Fig. 8).

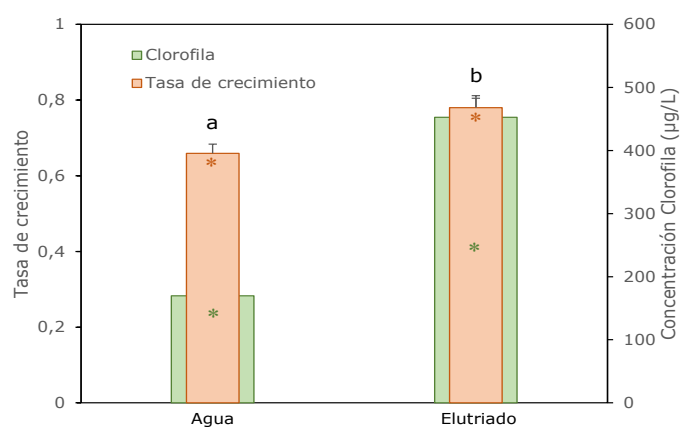


Figura 8: Bioensayos realizados con *T. suecica*. En agua y elutriado de sedimento. Variación en concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

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" y en la tasa de crecimiento de *T. suecica* (Tabla 2). Ambas variables fueron menores en el (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18) (Fig. 9).

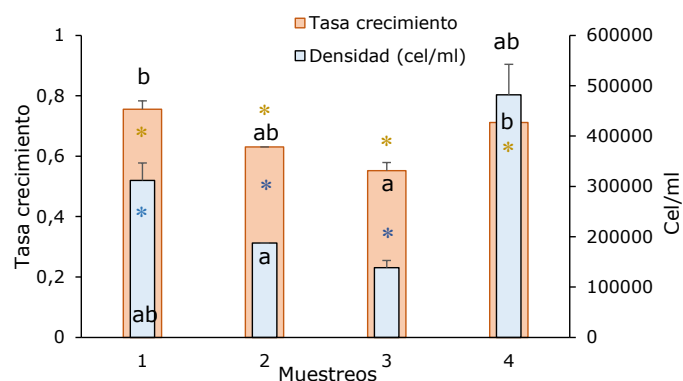


Figura 9: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E2, en agua. Variación de la densidad de individuos y la tasa de crecimiento. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

En los bioensayos realizados en **elutriado** sólo la variable concentración de clorofila "a" presento diferencias significativas entre los 4 muestreos (Tabla 2). La concentración de pigmento para los ensayos en **agua** fue baja en los muestreos (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18) y en **elutriado** de sedimento en los tres primeros muestreos (1ºM-ago'17), (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18) (Fig. 10).

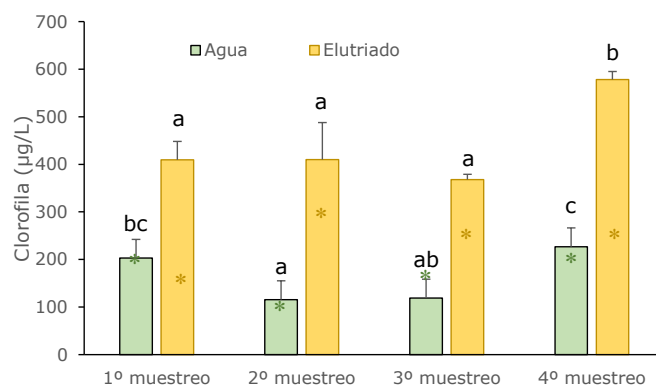


Figura 10: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E2, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Nitzschia aff. kuetzingioides

La variación de la densidad de individuos, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* en los bioensayos en **agua** y **elutriado** de sedimento de **E2** no presentaron diferencias significativas (Tabla 2). Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para ambos tratamientos, se pudieron observar diferencias significativas para las tres variables (Tabla 2). Se pudo evidenciar un patrón bastante homogéneo en la distribución de estas variables. En ensayos realizados en **agua**, la densidad de diatomeas fue considerablemente menor en los muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18), mientras que en ensayos en **elutriado** de sedimento fue también baja en el muestreo (2ºM-dic'17) (Fig. 11).

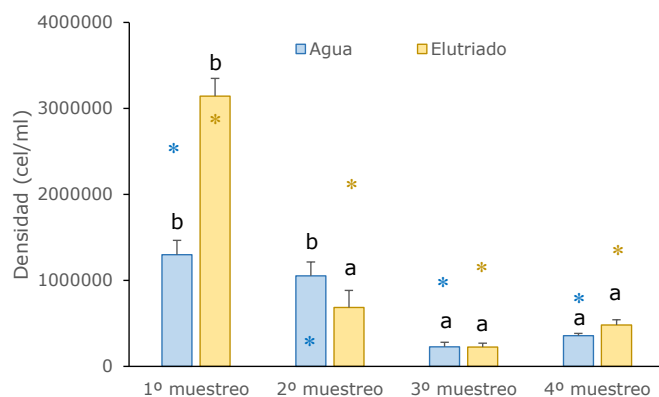


Figura 11: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre los muestreos en E2, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de la densidad de individuos. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Los menores valores de concentración de clorofila "a" fueron observados en **agua** como en **elutriado** de sedimento en el muestreo (2ºM-dic'17), sin embargo en los nuestros (1ºM-ago'17) y (3ºM-feb'18), los valores permanecieron bajos (Fig. 12).

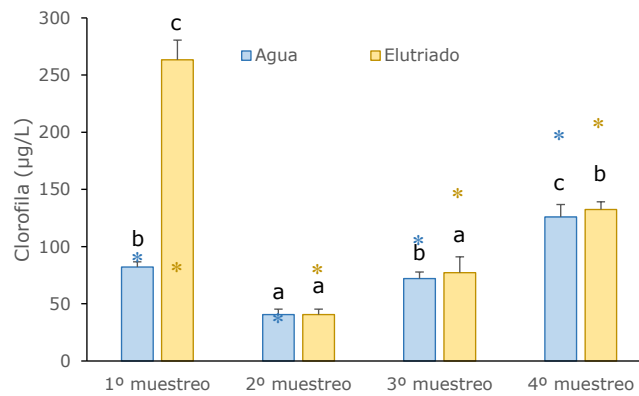


Figura 12: Bioensayos realizados con *N. aff. Kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E2, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Las menores tasas de crecimiento fueron observadas en los muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) tanto en **agua** como en **elutriado** de sedimento (Fig. 13).

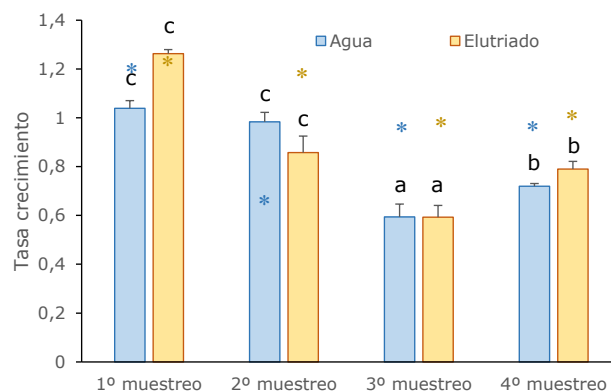


Figura 13: Bioensayos realizados con *N. aff. Kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E2, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

INTERPRETACIÓN (E2)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Los resultados de los bioensayos realizados con *T. suecica* en **agua** de **E2** mostraron que la mayor concentración de clorofila "a" se obtuvieron en el muestreo 4ºM-may'18, mientras que la tasa de crecimiento alcanzó sus

mayores valores en los muestreos 1°M-ago'17 y 4°M-may'18, coincidentemente con el registro de los mayores valores de nitratos (14,57 µmol/L) y FRS (2,26 µmol/L) en el muestreo 4°M-may'18 presentados en el Programa de Monitoreo.

Por el contrario, la mayor concentración de clorofila "a" en *N. aff. kuetzingioides*, ocurrió en los bioensayos con **elutriado** de sedimentos del muestreo 1°M-ago'17 , aunque la menor tasa de crecimiento se dio en el muestreo 3°M-feb'18 coincidentemente con valores de organoclorados Aldrin (29,5 ppb,p.s.) y α endosulfan (2,1 ppb.p.s.), valores que excedieron a los establecidos por la Dutch Target and Intervention Values, 2000.

6.3. 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=0,01	0,9215	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=2,59 Elutriado: F=2,47	0,1111 0,1163	n.s. n.s.
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=19,61	0,0001	**
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=4,24 Elutriado: F=2,74	0,0320 0,0936	* n.s.
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,31	0,0795	n.s.	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=2,30 Elutriado: F=2,27	0,1341 0,1375	<n.s. n.s.	
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,45	0,5106	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=8,06 Elutriado: F=23,75	0,0040 0,0005	* *
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,90	0,0583	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=6,54 Elutriado: F=54,73	0,0084 <0,0001	* **
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,02	0,8850	n.s.	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=8,28 Elutriado: F=11,78	0,0037 0,0040	* *	

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 *T. suecica* en los bioensayos realizados en **agua** y **elutriado** de sedimento, no se pudieron detectar diferencias significativas en cuanto a densidad y tasa de crecimiento (Tabla 3). La concentración de clorofila "a" fue diferencial entre los tratamientos, fue considerablemente menor en los bioensayos realizados en **agua** (Fig. 14).

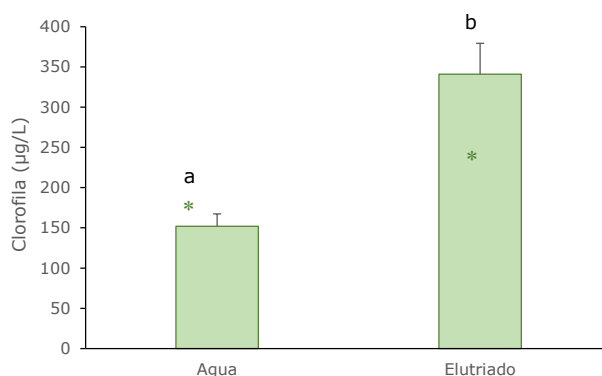


Figura 14: Bioensayos realizados con *T. suecica* En agua y elutriado de sedimento en E3. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05 Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para el tratamiento realizado en **agua** se pudo observar diferencias estadísticamente significativas sólo para la concentración de clorofila (Tabla 3). Durante los tres primeros muestreos (1ºM-ago'17), (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18), se observaron los menores valores de la variable (Fig. 15).

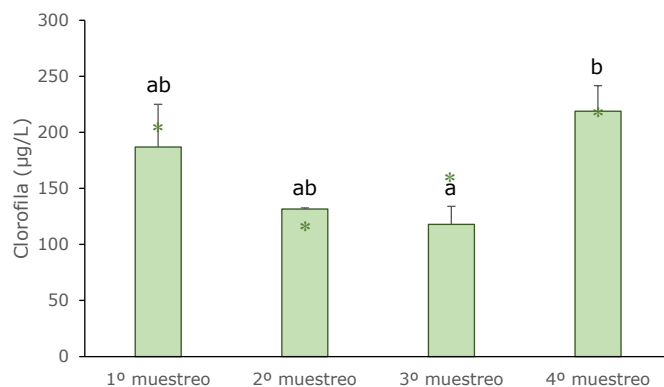


Figura 15: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E3, en agua. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación **E3**, la densidad, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *N. 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). Tanto para ambas muestras, las menores densidades de *N. aff. kuetzingioides* se registraron en (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 16).

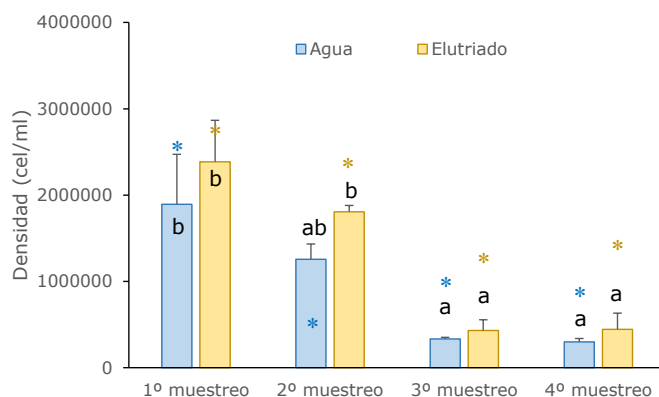


Figura 16: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E3, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes

indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Un diferente panorama se observó en la variable concentración de clorofila "a", observándose menores valores en los muestreos (1ºM-ago'17), (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18) (Fig. 17).

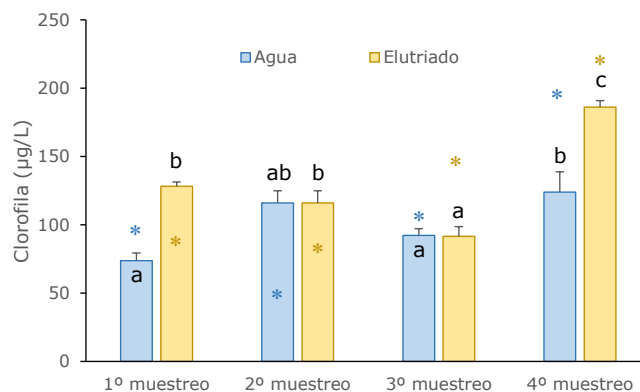


Figura 17: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E3, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* presentó un patrón similar a la variable densidad de individuos. Las menores tasas de crecimiento se registraron durante los dos últimos muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 18).

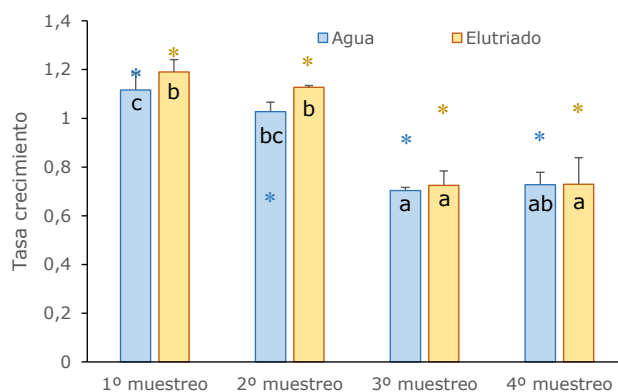


Figura 18: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E3, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

INTERPRETACIÓN (E3)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Los resultados de los bioensayos realizados en *T. suecica* en **agua** del estuario proveniente del muestreo 4°M-may'18 indicaron que hubo una favorable respuesta en cuanto concentración de clorofila "a", coincidentemente esto con los mayores valores de nitratos (18,76 µmol/L), en el Programa de Monitoreo 2017-2018.

En los bioensayos realizados con la diatomea *N. aff. kuetzingioides* en **agua** del estuario se registraron aumentos en la densidad celular y tasa de crecimiento en el muestreo 1°M-ago'17 y altas concentraciones de clorofila "a" en el muestreo 4°M-may, coincidentemente con el registro de alto valor de nitratos (18,76 µmol/L).

6.4. 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=0,60	0,4449	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=12,28 Elutriado: F=18,03	0,0008 0,0002	* *
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=8,44	0,0072	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=3,23 Elutriado: F=34,84	0,048 <0,0001	* **
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,69	0,4135	n.s.	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=3,67 Elutriado: F=25,48	<0,047 0,0001	* **	
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,08	0,3084	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=15,58 Elutriado: F=51,88	0,0003 <0,0001	* **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,30	0,5859	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=6,67 Elutriado: F=9,24	0,0079 0,0024	*
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,43	0,5157	n.s.	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=22,82 Elutriado: F=31,37	0,0001 <0,0001	** **	

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 *T. suecica* en **agua** y en **elutriado** de sedimento, 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** y en **elutriado** de sedimento se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas para las tres variables (Tabla 4). En bioensayos realizados en **agua**, la densidad de individuos fue menor en los muestreos (2°M-dic'17) y (3°M-feb'18), mientras que en **elutriado** de sedimento en (3°M-feb'18) y (4°M-may'18) (Fig. 19).

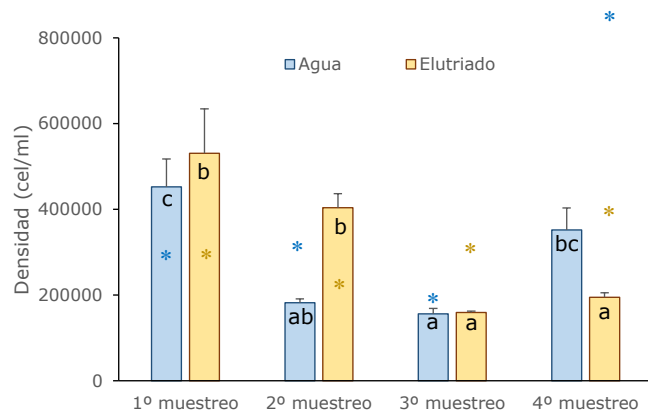


Figura 19: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E4, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Respecto a la concentración de clorofila "a" de *T. suecica* se observaron valores menores durante los tres últimos muestreos (2ºM-dic'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18), tanto en los bioensayos realizados en **agua** como en **elutriado** de sedimento (Fig. 20).

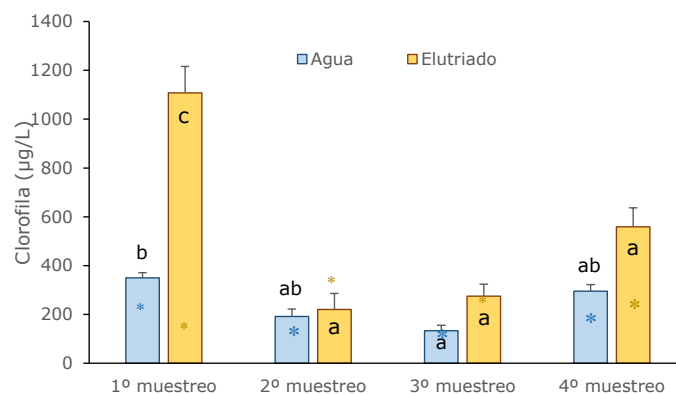


Figura 20: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E4, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

En muestras de **agua**, la tasa de crecimiento de *T. suecica* fue baja en el (3ºM-feb'18), y valores intermedios en (2ºM-dic'17) y (3ºM-feb'18), en cambio en muestras de **elutriado** de sedimento, presentaron valores bajos durante los últimos muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 21).

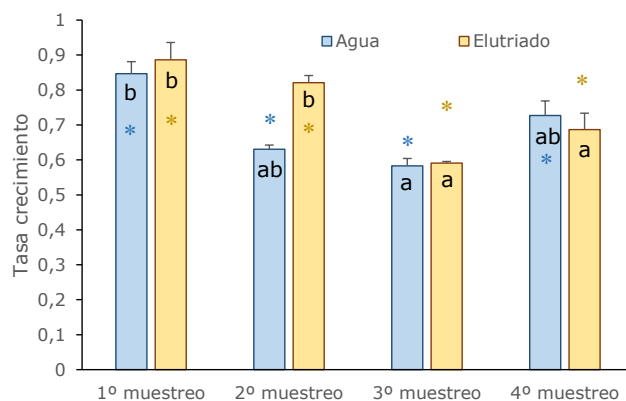


Figura 21: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E4, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación E4, la densidad, ni la concentración de clorofila "a" ni la tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* 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 la densidad de individuos en muestras de **agua** se registraron valores menores durante el (2ºM-dic'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18), y en las muestras de **elutriado** de sedimento en (1ºM-ago'17) y en los dos últimos muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 22).

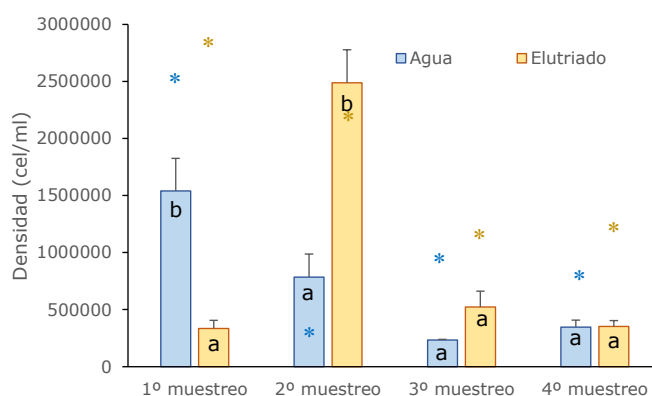


Figura 22: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E4, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La concentración de clorofila "a" de *N. aff. kuetzingioides* en ensayos realizados en **agua** y en **elutriado** de sedimento fue baja en el (1ºM-ago'17) y (3ºM-feb'18) (Fig. 23).

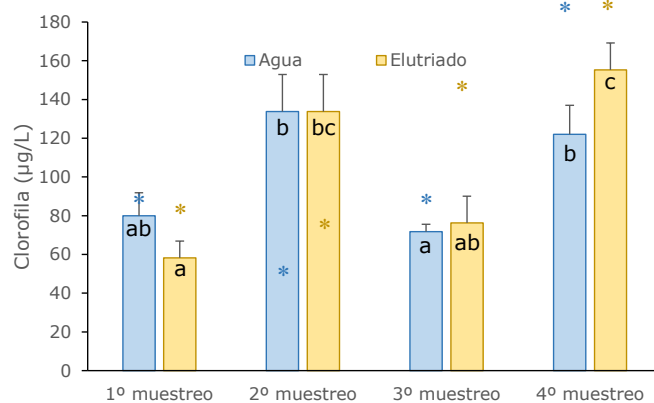


Figura 23: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E4, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Las menores tasas de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* se observaron conjuntamente en (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) en ensayos realizados en **agua**. Para muestras de **elutriado**, también la menor tasa de crecimiento fueron registradas en estas fechas de muestreo, pero además en el (1ºM-ago'17) (Fig. 24).

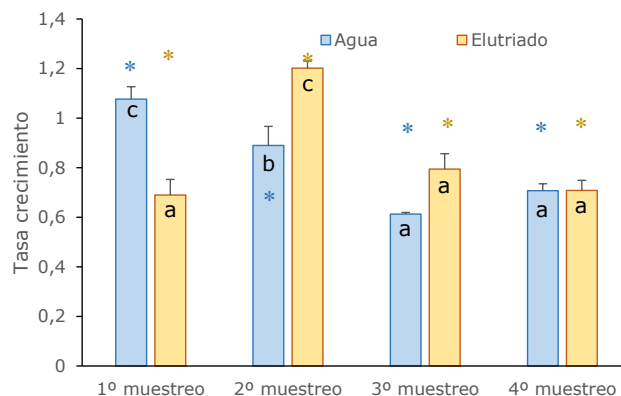


Figura 24: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E4, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

INTERPRETACIÓN (E4)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

En los bioensayos realizados en *T. suecica* con el **elutriado** de los sedimentos de **E4**, en general, se observaron valores más bajos en cuanto a

densidad celular y crecimiento en los muestreos 3°M-feb'18 y 4°M-may'18, mientras que la concentración de clorofila "a" alcanzó su mínimo en los bioensayos de los muestreos 2°M-dic'17 y 3°M-feb'18 coincidentemente con un aumento de los organoclorados Aldrin (38,6 ppb; p.s.) α endosulfan (5,3 ppb.p.s.) y β endosulfan (2,7 ppb.p.s.) en el muestreo 3°M-feb'18 detectados por el Programa de Monitoreo.

N. aff kuetzingioides presentó los menores valores en densidad celular y tasa de crecimiento en el muestreo 1°M-ago'17 coincidentemente con altos valores de Hg (0,249 $\mu\text{g/g}$) en la fracción total y de (0,33 $\mu\text{g/g}$) en la fracción fina y de los organoclorados como Heptaclor (13,2 ppb.p.s.) y α -endosulfan (30,8 ppb.p.s.) y en el aromático policíclico Fluoreno (53,7 ppb.p.s.), que superaron los valores establecidos por la Dutch Target and Intervention Values, 2000 y la EPA.

6.5. 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=2,20	0,1547	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=7,29 Elutriado: F=1,37	0,0058 0,3018	** n.s.
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=101,59	<0,0001	**
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=16,29 Elutriado: F=6,68	0,0002 0,0078	** **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,15	0,0866	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=15,47 Elutriado: F=1,73	0,0003 0,2184	** n.s.
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,94	0,0983	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=221,60 Elutriado: F=58,80	<0,0001 <0,0001	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,61	0,2151	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=20,80 Elutriado: F=4,99	0,0001 0,0200	** n.s.
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,18	0,2877	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=58,06 Elutriado: F=72,65	<0,0001 <0,0001	** **

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 *T. suecica* con **agua** y **elutriado** de sedimento no se pudieron detectar diferencias significativas en cuanto a densidad de individuos y a la tasa de crecimiento (Tabla 5). La concentración de clorofila "a" fue diferencial entre los tratamientos, siendo la concentración considerablemente menor en ensayos en **agua** (Fig. 25).

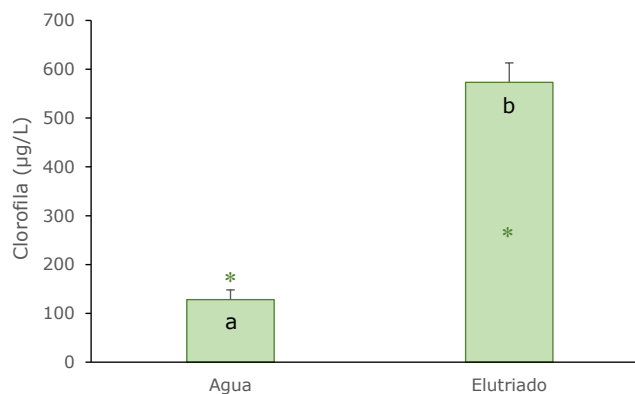


Figura 25: Bioensayos realizados con *T. suecica*. En agua y elutriado de sedimento en E5. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Al comparar las variables analizadas entre fechas de muestreo y para los tratamientos realizados en **agua** y en **elutriado** de sedimento se pudieron observar diferencias significativas para las tres variables, aunque la densidad de individuos y la tasa de crecimiento no variaron en los ensayos realizados en **elutriado** de sedimento (Tabla 5).

En muestras de **agua**, la densidad de *T. suecica* fue menor en los muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 26).

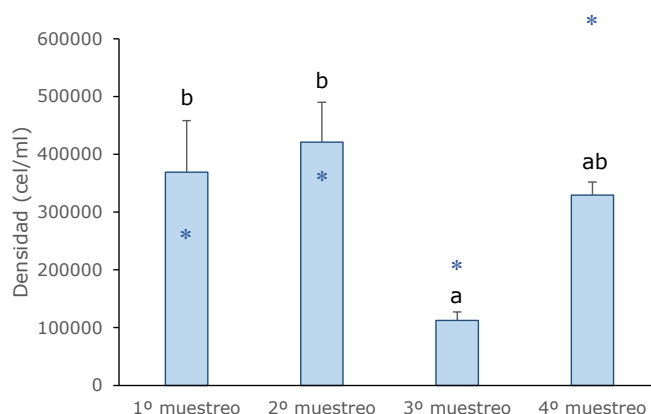


Figura 26: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E5, en agua. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Respecto a la concentración de clorofila "a" *T. suecica* se registraron menores valores durante (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) en ensayos en **agua** y durante (1ºM-ago'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) en ensayos en **elutriado** de sedimento (Fig. 27).

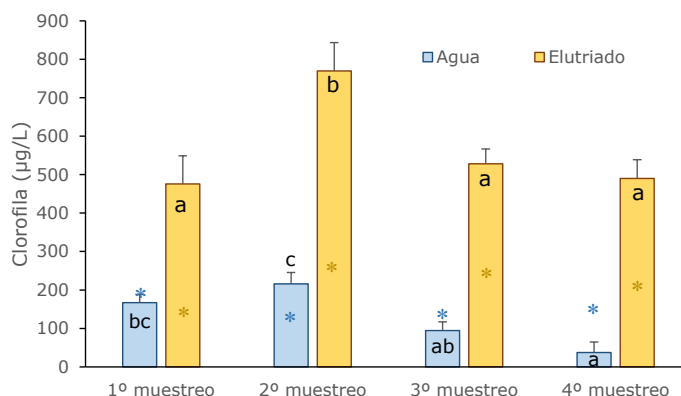


Figura 27: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E5, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La tasa de crecimiento de *T. suecica* en ensayos realizados en **agua** de la estación **E5** fue menor en el muestreo (3ºM-feb'18) (Fig. 28).

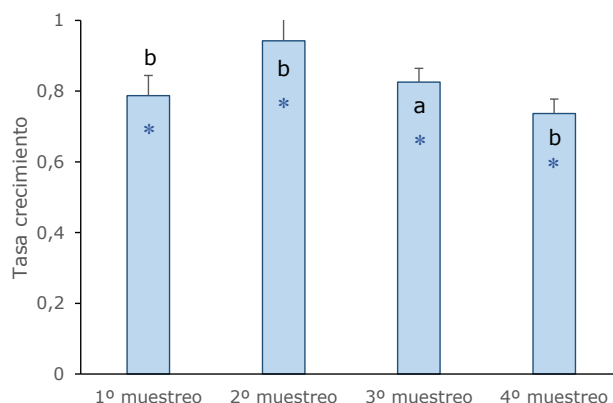


Figura 28: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E5, en agua. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Nitzschia aff. kuetzingioides

En la estación **E5**, la densidad, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* no fueron estadísticamente diferentes al evaluar las muestras de **agua** y **elutriado** de sedimento (Tabla 5). Al considerar las diferentes fechas de muestreo, se pudieron evidenciar diferencias significativas entre las tres variables evaluadas para ambos tratamientos (Tabla 5). Para muestras de **agua**, las menores densidades de *N. aff. kuetzingioides* se registraron en las muestras de (2ºM-dic'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18), mientras que en **elutriado** de sedimento solo fueron registrados valores bajos durante los dos últimos muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 29).

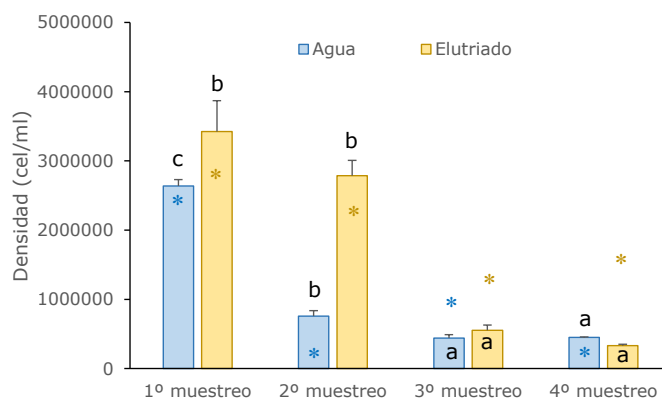


Figura 29: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E5, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La concentración de clorofila "a" de *N. aff. kuetzingioides* en bioensayos realizados en **agua** por lo general mantuvo valores bajos y estos fueron registrados en 3 muestreos (1ºM-ago'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18). La concentración de clorofila "a" medida en las diatomeas en **elutriado** de sedimento fue más alta que en **agua** pero siguieron siendo bajos en tres muestreos (2ºM-dic'17), (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 30).

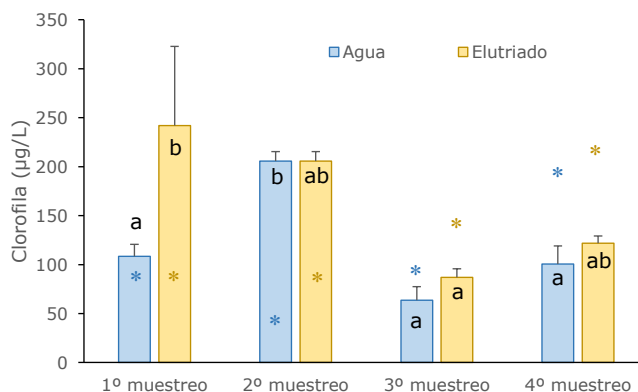


Figura 30: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E5, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* presentó un patrón similar al detallado para las variable concentración de clorofila "a". Tanto en ensayos en **agua** como en **elutriado** de sedimento, los menores valores de crecimiento se observaron en los últimos dos muestreos (3ºM-feb'18) y (4ºM-may'18) (Fig. 31).

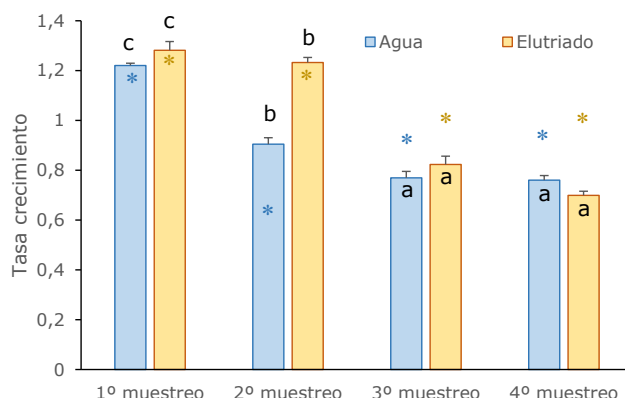


Figura 31: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E5, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

INTERPRETACIÓN (E5)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Los resultados de los bioensayos en **agua** del estuario obtenida en el muestreo 2ºM-dic'17 con la microalga *T. suecica* mostraron que densidad celular, tasa de crecimiento y concentración de clorofila "a" fueron altos.

Aunque en los bioensayos del muestreo 3ºM-feb'18, los valores de las variables biológicas, densidad celular y tasa de crecimiento fueron las más bajas. Además la concentración de clorofila "a" obtenida en los bioensayos correspondientes al muestreo 4ºM-may'18 resultó ser la más baja a pesar de que esto coincidió con alta concentración de amonio (205,7 µmol/L) y si podría relacionarse con concentración registrada de Pb (46,740 µg/g).

En los bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides* en **agua** proveniente del muestreo 1ºM-ago'17 se registró la mayor densidad celular y tasa de crecimiento coincidentemente con altísimas concentraciones de DSi (140,8 µmol/L), mientras que en el muestreo 4ºM-may'18 se le sumó un aumento en la concentración de amonio (205,7 µmol/L).

Por otro lado, en los bioensayos con **elutriado** del sedimento del estuario, de los muestreos 1ºM-ago'17, 3ºM-feb'18 y 4ºM-may'18 con *T. suecica*, la concentración de clorofila más baja coincidentemente con altos valores de Antraceno (121 ppb.p.s) y el Fluoranteno (1683 ppb.p.s), excediendo valores de ERL y PEL de la EPA, respectivamente En el 1ºM-ago'17, el α endosulfan (6 ppb.p.s) y δ HCB (564,4 ppb.p.s) se notaron valores excedentes, en el 3ºM-feb'18 excedió en α -endosulfan (4.9 ppb.p.s), β -endosulfan (3.1 ppb.p.s) y en el en el 4ºM-may'18 el α -endosulfan (1617,5 ppb.p.s), Dieldrin (8 ppb.p.s) según lo establecido por la Dutch Target and Intervention Values, 2000 y la EPA. También la diatomea *N. aff. kuetzingioides* tuvo la mayor disminución en las variables poblacionales en los bioensayos con el elutriado proveniente de los muestreos 3ºM-feb'18 y 4ºM-may'18.

6.6. 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=5,22	0,0301	*
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=15,86 Elutriado: F=1,73	0,0003 0,2177	** n.s.
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=32,41	<0,0001	**
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=5,02 Elutriado: F=16,45	0,0197 0,0002	* **
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=5,2793	0,0215	*	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=4,74 Elutriado: F=1,65	0,0234 0,2346	* n.s.	
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,87	0,1022	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=21,49 Elutriado: F=21,33	0,0001 0,0002	** **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,00	0,3259	n.s.
		Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=66,84 Elutriado: F=13,44	<0,0001 0,0008	** **
Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,23	0,6356	n.s.	
	Muestreo	1°, 2°, 3°, 4°	Agua: F=2,54 Elutriado: F=110,2	0,0672 <0,0001	n.s. **	

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 *T. 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. 32 y 33).

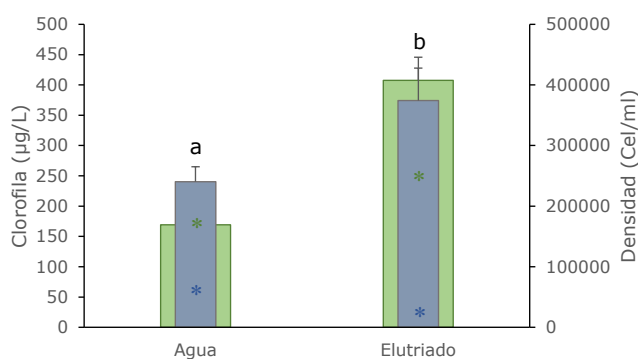


Figura 32: Bioensayos realizados con *T. suecica* en agua y elutriado de sedimento de E6. Comparación entre tratamientos. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

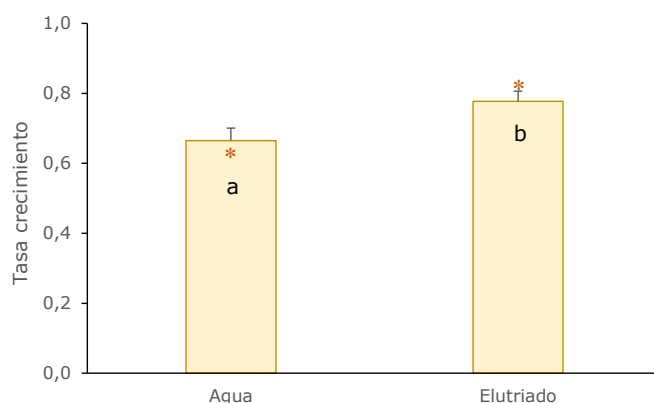


Figura 33: Bioensayos realizados con *T. suecica* en agua y elutriado de sedimento de E6. Comparación entre tratamientos. Variación de la densidad de individuos y concentración de clorofila "a". Variación de la tasa de crecimiento. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

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 analizadas, densidad celular, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento de *T. suecica* (Tabla 6). La densidad celular fue considerablemente menor en los últimos dos muestreos (3°M-feb'18) y (4°M-may'18) (Fig. 34). Esta variable en ensayos realizados en **elutriado** de sedimento no varió entre las 4 fechas muestreadas.

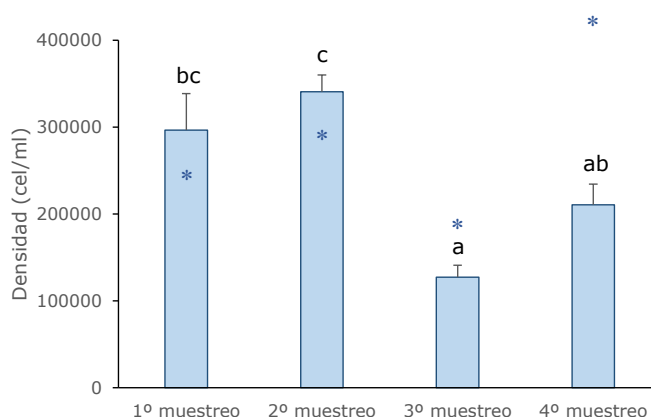


Figura 34: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E6, en agua. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La concentración de clorofila en ensayos realizados en **agua** también presentó los menores valores en los muestreos (3°M-feb'18) y (4°M-

may'18), mientras que en **elutriado** de sedimento en el muestreo último (4ºM-may'18) fue considerablemente mayor y observándose bajos valores de clorofila en los muestreos (1ºM-ago'17) y (3ºM-feb'18) (Fig. 35).

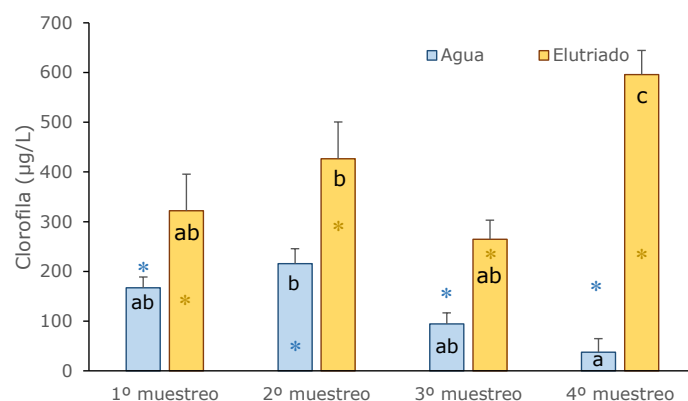


Figura 35: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E6, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La tasa de crecimiento de *T. suecica* solo varió en los ensayos realizados en **agua**, observándose menores valores durante el muestreo tercero (3ºM-feb'18) (Fig. 36).

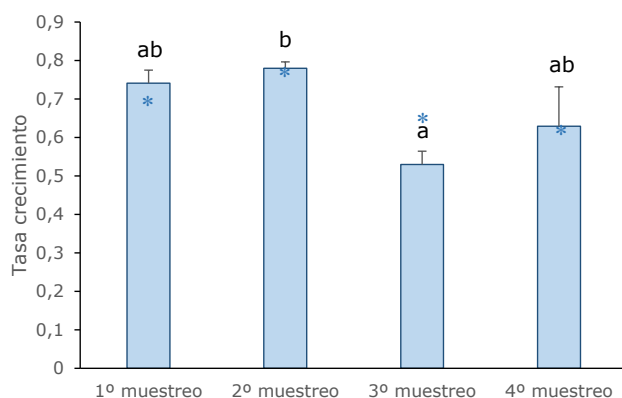


Figura 36: Bioensayos realizados con *T. suecica*. Comparación entre muestreos en E6, en agua. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Nitzschia* aff. *kuetzingioides

En la estación 6 (E6), la densidad, la concentración de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* no fueron estadísticamente diferente al evaluar las muestras de **agua** y **elutriado** de sedimento (Tabla 6). Al considerar las diferentes fechas de muestreo, se pudieron evidenciar diferencias significativas entre las tres variables evaluadas para ambos

tratamientos, excepto para la variable tasa de crecimiento analizado en muestras de **agua** (Tabla 6).

Para la variable densidad de *N. aff. kuetzingioides* tanto en muestras de **agua** como de **elutriado** de sedimento, la menor densidad de células se registraron en los primeros muestreos (1°M-ago'17) y (2°M-dic'17) (Fig. 37).

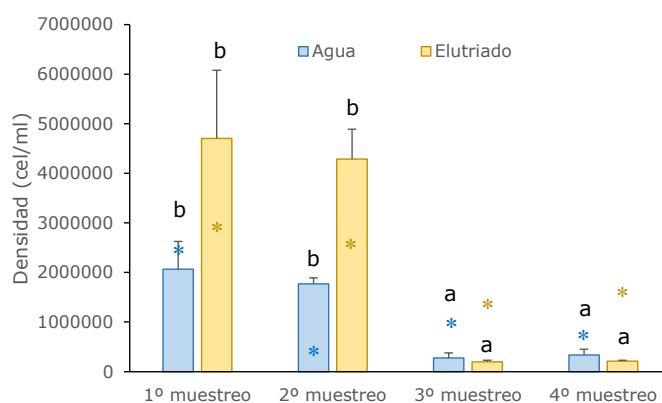


Figura 37: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E6, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la densidad de individuos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

Para la concentración de clorofila "a" de *N. aff. kuetzingioides* en ensayos realizados en **agua**, los menores valores de pigmento fueron observados en los muestreos (1°M-ago'17) y (3°M-feb'18), mientras que en **elutriado** de sedimento, la menor concentración de clorofila fueron registradas en los últimos dos muestreos (3°M-feb'18) y (4°M-may'18) (Fig. 38).

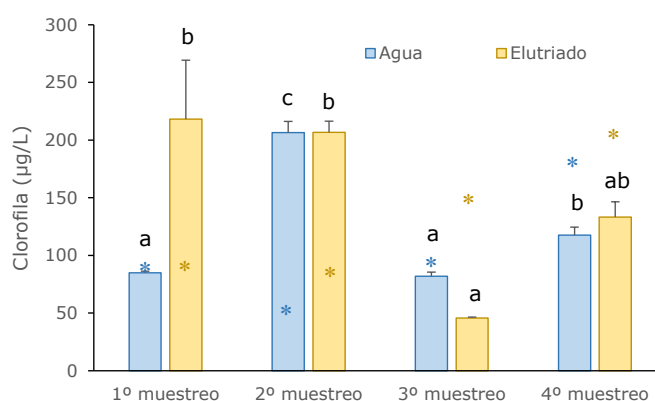


Figura 38: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E6, en agua y elutriado de sedimento. Variación de la concentración de clorofila "a". Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

La tasa de crecimiento de *N. aff. kuetzingioides* en muestras de **elutriado** de sedimento fue considerablemente mayor en los muestreos tercero y cuarto (3°M-feb'18) y (4°M-may'18) (Fig. 39).

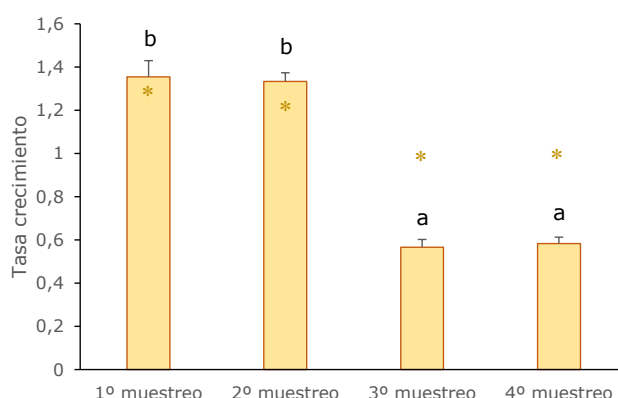


Figura 39: Bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*. Comparación entre muestreos en E6, en elutriado de sedimento. Variación de la tasa de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey) y los asteriscos valores promedios medidos en los controles.

INTERPRETACIÓN (E6)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Las dos especies de microalgas *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* analizadas en los bioensayos realizados en **agua** de **E6** proveniente de los muestreos 3°M-feb'18 y 4°M-may'18 tuvieron una respuesta muy baja en cuanto a densidad celular y tasa de crecimiento en el muestreo 3°M-feb'18 y baja concentración de clorofila "a" en 3°M-feb'18 y 4°M-may'18 coincidentemente con baja concentración de nitratos (23,47 $\mu\text{mol/L}$) y la elevada concentración de Pb (54,060 $\mu\text{g/g}$) en el muestreo 4°M-may'18. Los resultados de los bioensayos con la diatomea *N. aff. kuetzingioides* también mostraron una disminución grande de la concentración de clorofila "a" durante el muestreo 1°M-ago'17 cuando se registraron valores altos de Fe (16,34 $\mu\text{g/g}$).

Contrariamente, *N. aff. kuetzingioides* en los bioensayos con el **agua** de los muestreos 1°M-ago'17 y 2°M-dic'17 se registró un aumento de las tres

variables biológicas analizadas, coincidentemente con el aumento del Dsi (84,97 $\mu\text{mol/L}$ y 70,45 $\mu\text{mol/L}$) respectivamente.

Durante los bioensayos con el **elutriado** del sedimento obtenido en los muestreos 3°M-feb´18 se registraron bajos valores en la densidad celular, tasa de crecimiento y clorofila "a", coincidentemente con que los valores más altos de β -enosulfan (5,6 ppb.p.s) de los registrados en los muestreos del Programa de Monitoreo en ese sitio **E6**.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Comparación entre sitios de muestreo

7. Análisis de resultados: Comparación entre sitios de muestreo

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

7.1. Resultados de los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 1er. muestreo (1°M-dic'17)

Se analizaron:

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

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=9,34	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=3,09 Elutriado: F=1,91	<0,05 * 0,1547 ns
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=14,91	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=3,67 Elutriado: F=26,98	<0,05 * <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=11,93	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=4,25 Elutriado: F=3,26	<0,05 * <0,05 *
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=4,43	<0,05 *
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,29 Elutriado: F=4,63	0,3268 ns <0,05 *
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=10,04	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=2,9 Elutriado: F=26,84	0,1116 ns <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,56	0,4572 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,38 Elutriado: F=24	0,2942 ns <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 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. 40 a y b).

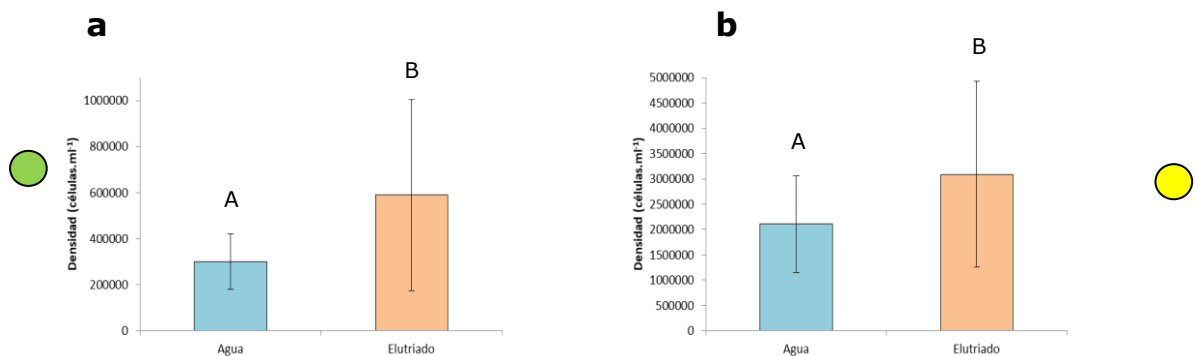


Figura 40: Variación en la densidad celular promedio en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

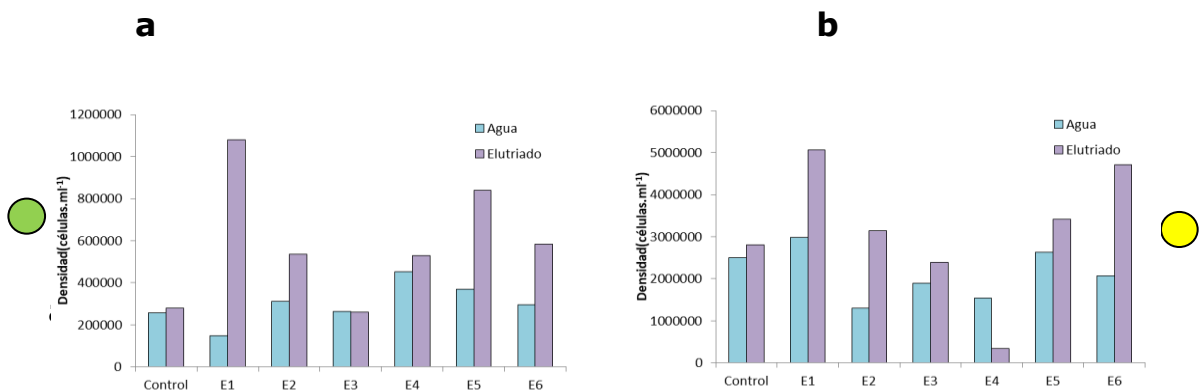


Figura 41: Detalle de la Variación de la densidad celular en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Con respecto a las estaciones de muestreo, para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** se hallaron diferencias significativas entre E1 y E4, con valores de densidad celular mayores en E4, mientras que para los bioensayos con **elutriado** no se hallaron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo (Figs. 41 a y 42 a y b).

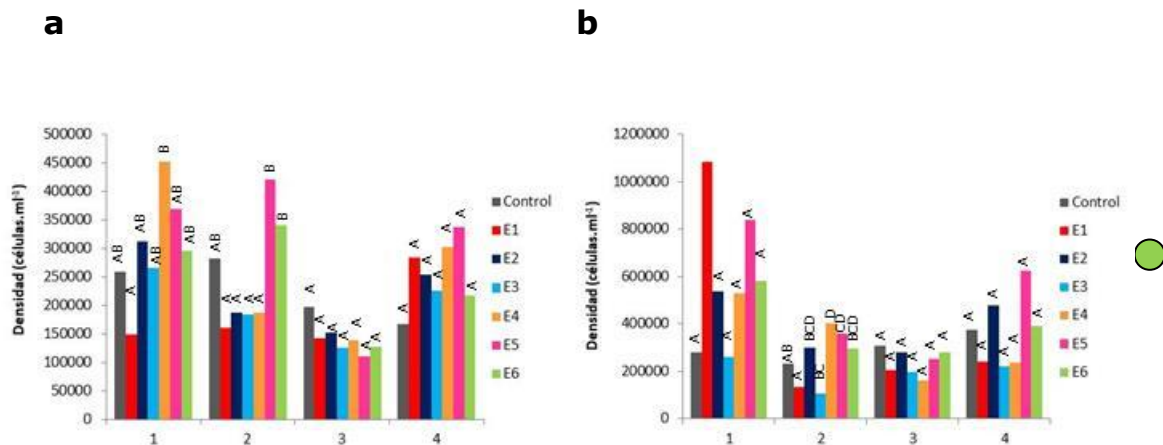


Figura 42: Variación de la densidad celular de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de los 4 muestreos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Por otro lado, para los bioensayos con la diatomea *N. aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo en **agua** mientras que en **elutriado** se halló una densidad celular mayor en E1 y E6 con respecto a E4 (Figs. 41 b y 43 a y b).

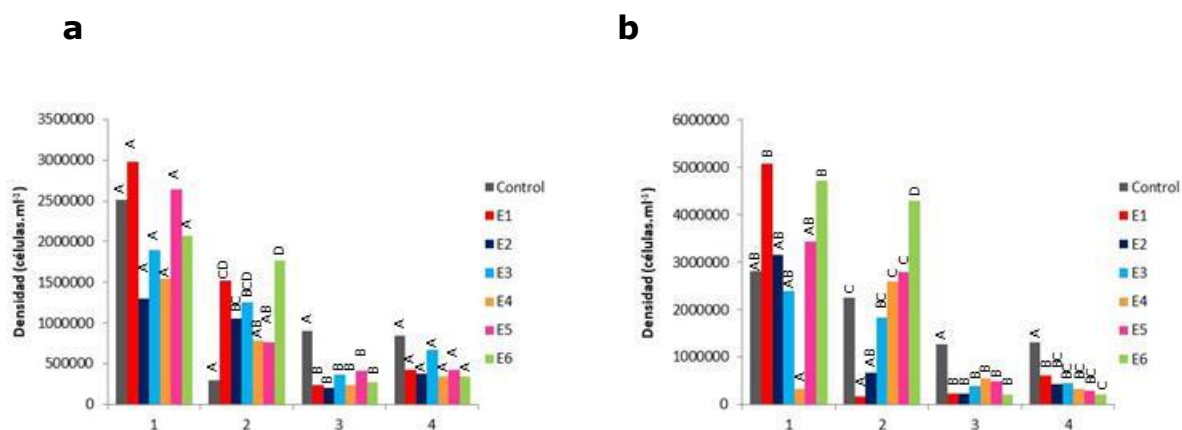


Figura 43: Variación de la densidad celular de *Nitzschia aff. kuetzingioides* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de 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. 44 a y b).

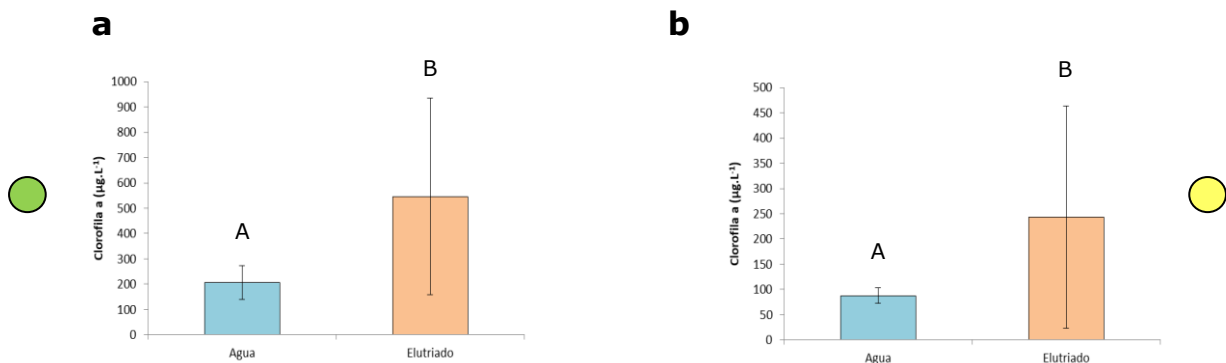


Figura 44: Variación en la concentración de clorofila a en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

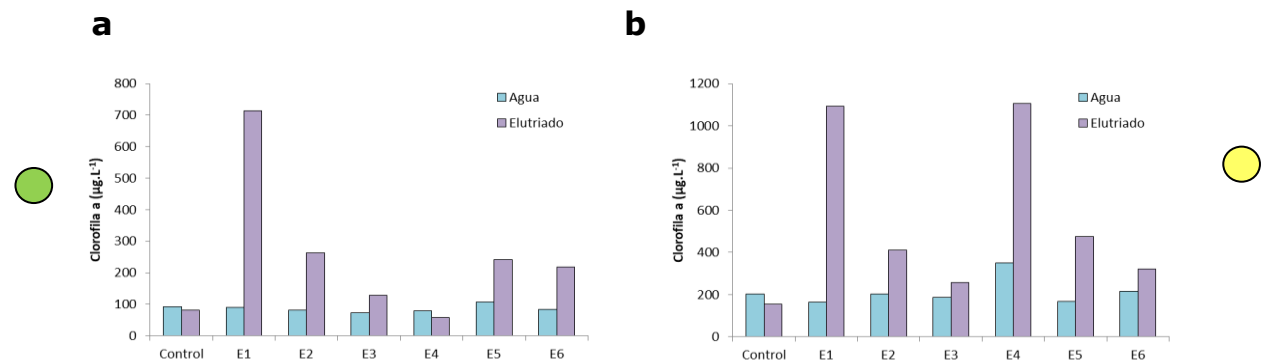


Figura 45: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Durante los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** se hallaron valores estadísticamente mayores en **E4**, mientras que en los ensayos realizados

con **elutriado** se hallaron valores mayores en **E1** y **E4** (Figs. 45 a y 46 a y b).

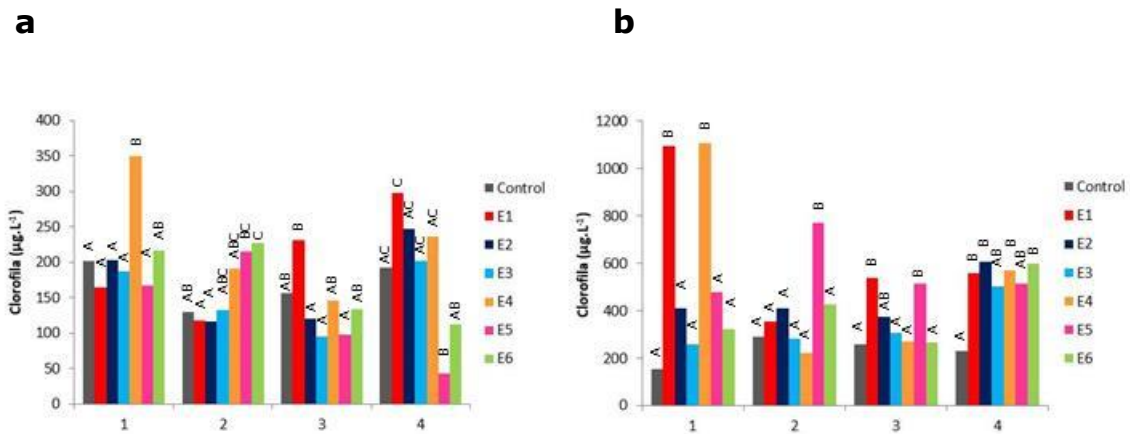


Figura 46: Variación de la clorofila "a" de *Tetraselmis suecica* a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Para *N. aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas entre las distintas estaciones de muestreo para los bioensayos con **agua**, mientras que para los ensayos con **elutriado** se hallaron concentraciones de clorofila a estadísticamente mayores en **E1** (Figs. 45 b y 47 a y b).

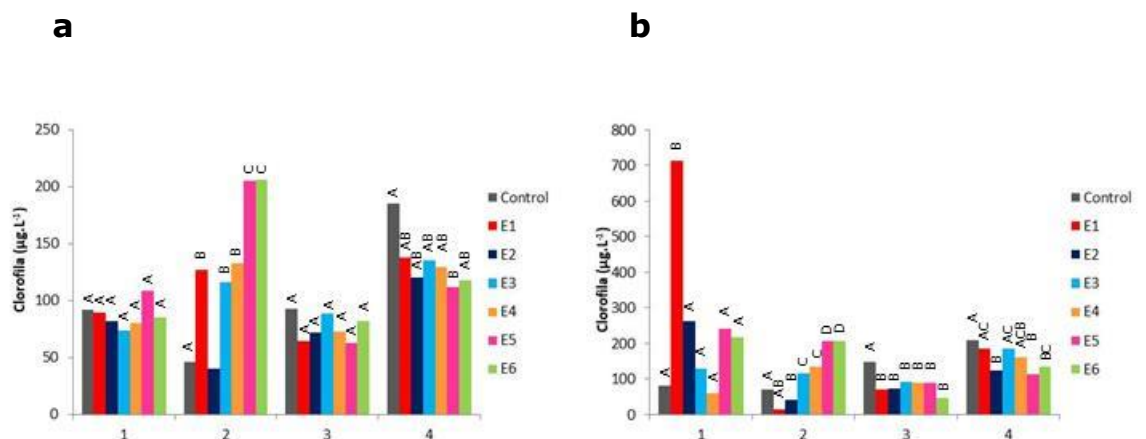


Figura 47: Variación de la clorofila "a" de *Nitzschia aff. kuetzingioides* a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Se hallaron diferencias significativas en la tasas de crecimiento a las 96 horas para *T. suecica* al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado**, con valores estadísticamente mayores para el elutriado. En los bioensayos con *N. aff. Kuetzingioides*, en cambio, no se hallaron diferencias significativas (Figs. 48 a y b).

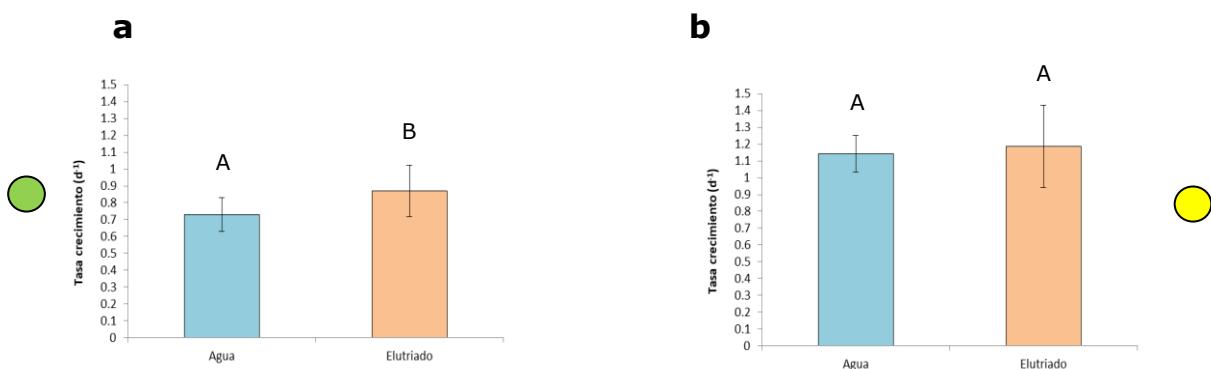


Figura 48: Variación en la tasa de crecimiento en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

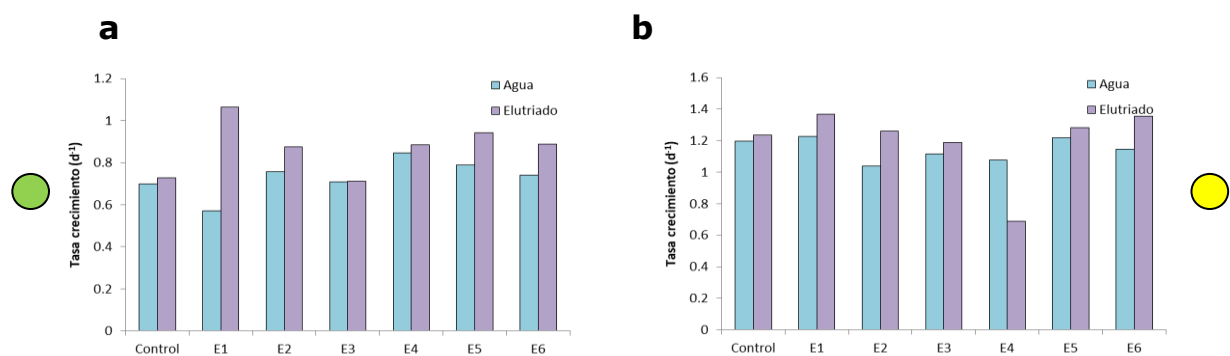


Figura 49: Detalle de la variación en la tasa de crecimiento en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 1er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Al comparar los resultados entre estaciones de muestreo de bioensayos con *T. suecica* en **agua** se hallaron diferencias significativas entre estaciones,

con E1 presentando menores tasas de crecimiento con respecto a E4 y E5, mientras que para los bioensayos con **elutriado** del sedimento E3 presentó valores estadísticamente menores que E1. (Figs. 49 a y 50 a y b).

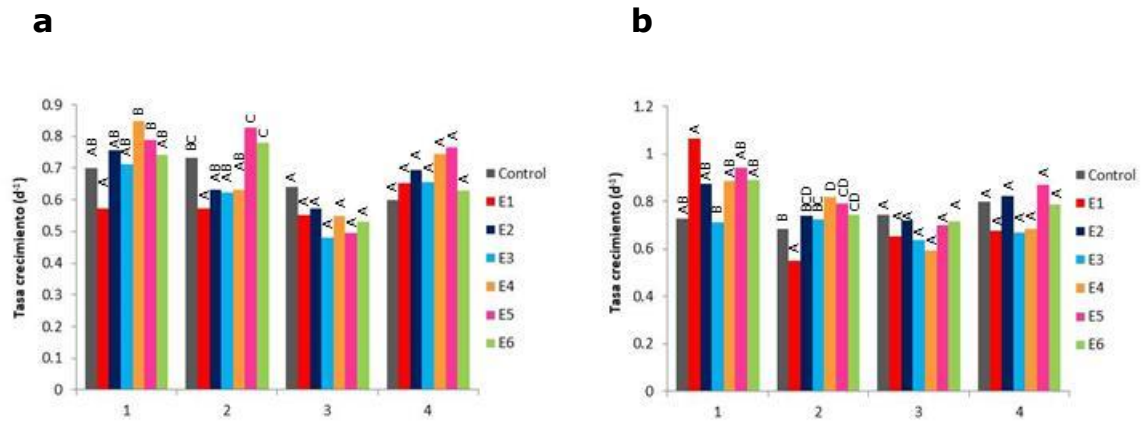


Figura 50: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado de sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo en **agua**, mientras que en los ensayos con **elutriado** E4 presentó la menor tasa de crecimiento (Figs. 49 b y 51 a y b).

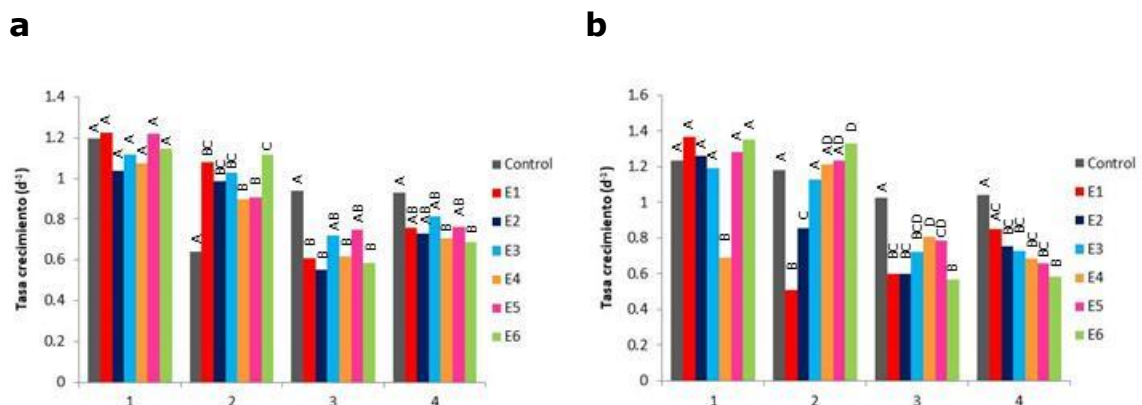


Figura 51: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

INTERPRETACIÓN (muestreo 1°M-ago'17)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Los resultados de los bioensayos realizados en **agua** con *T. suecica* presentaron valores bajos de densidad celular, clorofila "a" y tasa crecimiento en **E1**, coincidentemente con una concentración alta de nitrito (1,04 $\mu\text{mol/l}$) y amonio (295,2 $\mu\text{mol/l}$), mientras que en **E4** se registraron alta densidad celular, clorofila "a" y tasa de crecimiento, coincidentemente con los valores más elevados de Fe (20,58 $\mu\text{g/l}$).

En **E2** hubo menor tasa de crecimiento y densidad coincidentemente con una leve disminución de amonio (6,2 $\mu\text{mol/l}$) y DSi (50,5 $\mu\text{mol/l}$).

En los bioensayos realizados con **elutriados** de sedimento provenientes de la estación **E1** ocurrieron llamativas altas tanto en la densidad celular como en la concentración de clorofila "a" y en la tasa de crecimiento de ambas especies de microalgas, este comportamiento fue llamativo ya que coincidió con valores muy altos de organoclorados (δ HCB 2945,3 ppb,p.s.) y de aromáticos (suma total 9927,05 ppb,p.s., fluoranteno 8786 ppb,p.s.). Por otra parte, en los bioensayos con **elutriados** provenientes de **E4** *N. aff. kuetzingioides* presentó valores de densidad celular, clorofila "a" y tasa de crecimiento muy bajos, coincidiendo con un valor muy alto de Hg (0,249 $\mu\text{g/g}$) en la fracción total y de (0,335 $\mu\text{g/g}$) en la fina y valores que superan los límites de organoclorados como Heptaclor (13,2 ppb.p.s.) y α -endosulfan (30,8 ppb.p.s.) y de Fluoreno (53,7 ppb,p.s.) mientras que *T. suecica* presentó los menores valores en **E3**, coincidiendo con altas concentraciones de Heptaclor (15,8 ppb,p.s.) y α -endosulfan (47,1 ppb,p.s.) y de Fluoreno (31,3 ppb,p.s.) y de Hg (0,426 $\mu\text{g/g}$) en la fracción total y de (0,435 $\mu\text{g/g}$) en la fina.

7.2. Resultados de los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 2do. muestreo (2°M-dic'17)

Se analizaron:

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

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,06	0,3073 ns	
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=10,66 Elutriado: F=10,23	<0,01 ** <0,01 **	
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=36,7	<0,01 **	
	Clorofila "a"	Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=5,4 Elutriado: F=12,68	<0,01 ** <0,01 **	
		Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,47	0,2315 ns
		Tasa de crecimiento	Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=10 Elutriado: F=17,65	<0,01 ** <0,01 **
<i>N. aff. kuetzingioides</i>			Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=13,02
		Densidad celular	Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=15,98 Elutriado: F=25,44	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"		Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,44	0,5093 ns
	Clorofila "a"	Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=32,02 Elutriado: F=79,66	<0,01 ** <0,01 **	
		Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,21	0,0788 ns
		Tasa de crecimiento	Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=14,01 Elutriado: F=82,39	<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 *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado**, con valores de densidad celular mayores en **elutriado** (Fig. 52 b), mientras que para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* no se hallaron diferencias significativas (Fig. 52 a).

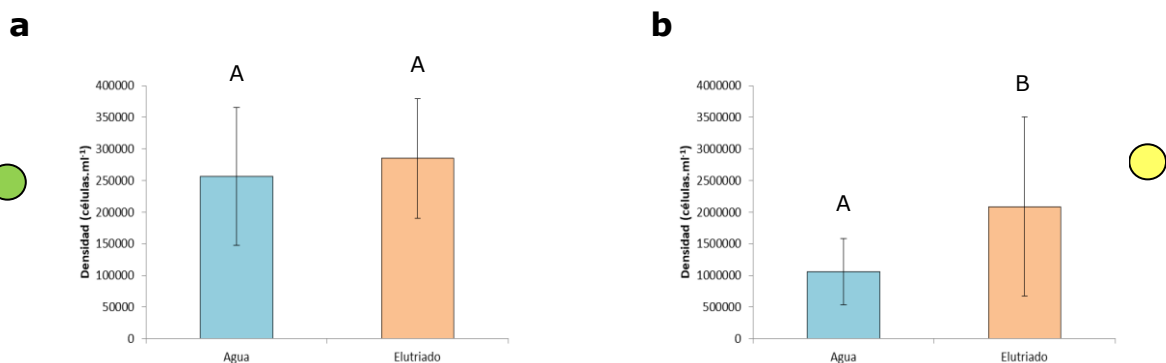


Figura 52: Variación en la densidad celular en bioensayos realizados con agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

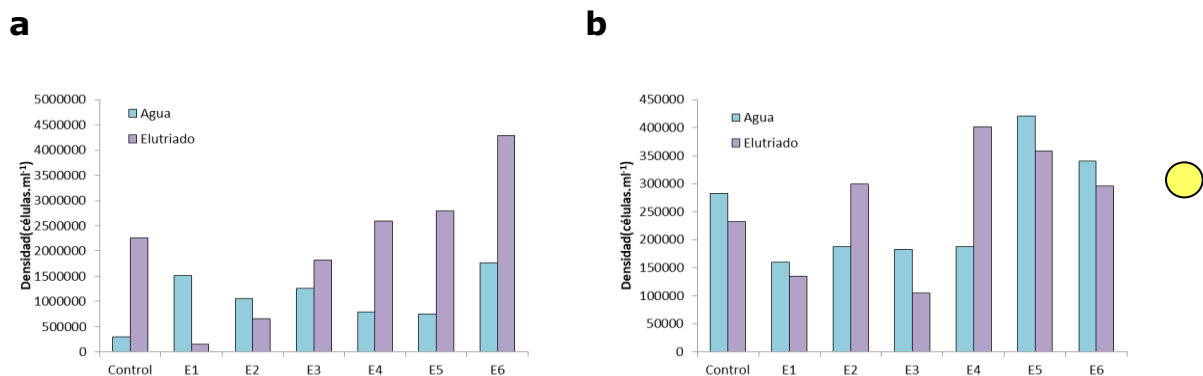


Figura 53: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo.. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. Kuetzingioides*.

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. 53 a y b, 54 a y b, 55 a y b).

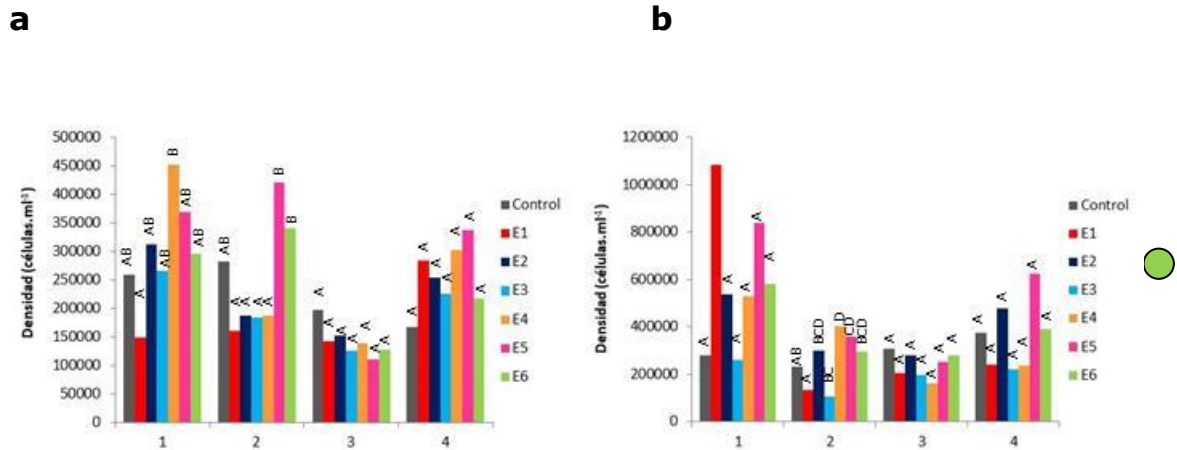


Figura 54: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. **a)** En agua. **b)** En elutriado de sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

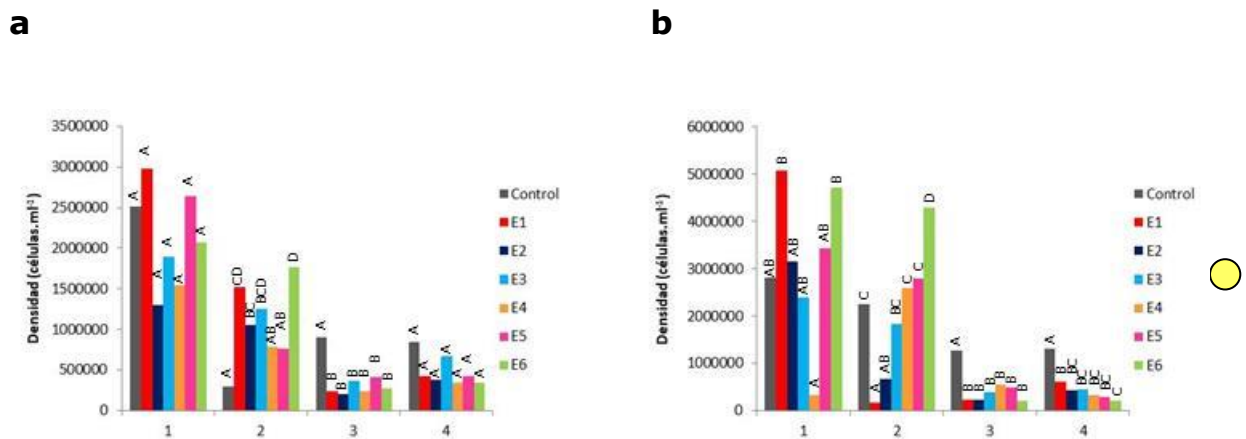


Figura 55: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. **a)** En agua. **b)** En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Clorofila "a"

Para *Tetraselmis suecica* se hallaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado**, con concentraciones de clorofila "a" mayores en **elutriado** (Fig. 56 a), mientras que para los bioensayos con

Nitzschia aff. *kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas (Fig. 56 b).

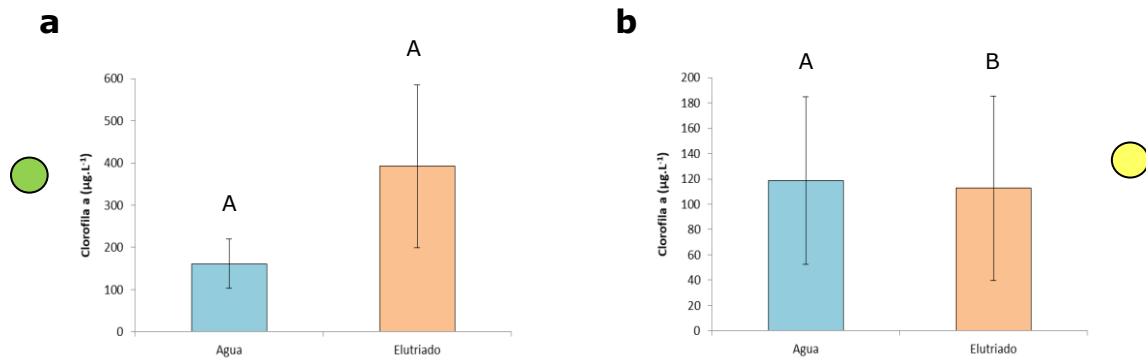


Figura 56: Variación en la concentración de clorofila a en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

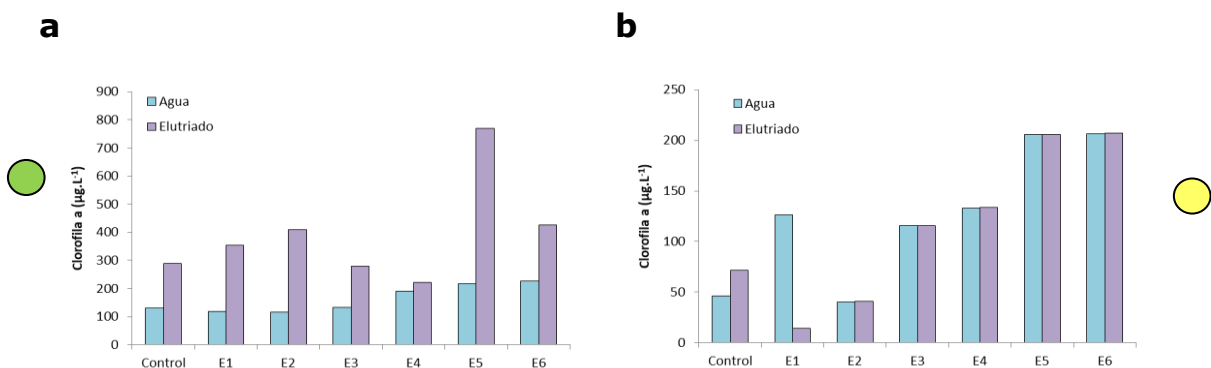


Figura 57: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*.

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. 57 a y b, 58 a y b, 59 a y b).

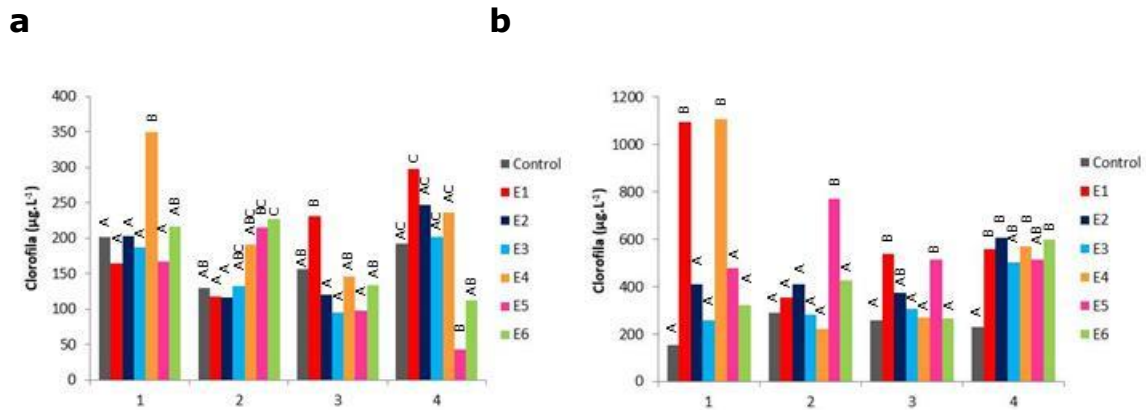


Figura 58: Variación de la clorofila "a" de *Tetraselmis suecica* a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

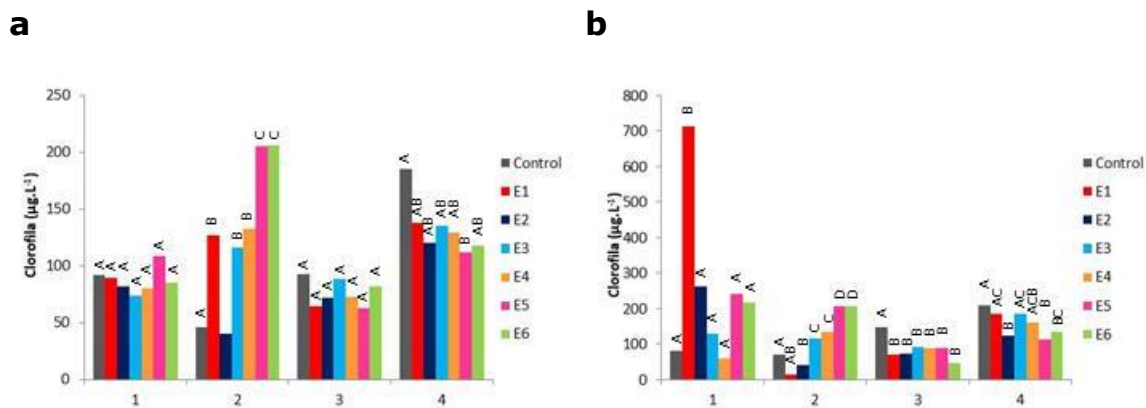


Figura 59: Variación de la clorofila "a" de *Nitzschia aff. kuetzingioides* a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Al comparar los bioensayos tanto de *Tetraselmis suecica* como de *N. aff. kuetzingioides* en **agua** y **elutriado** del sedimento no se hallaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento (Fig. 60 a y b).

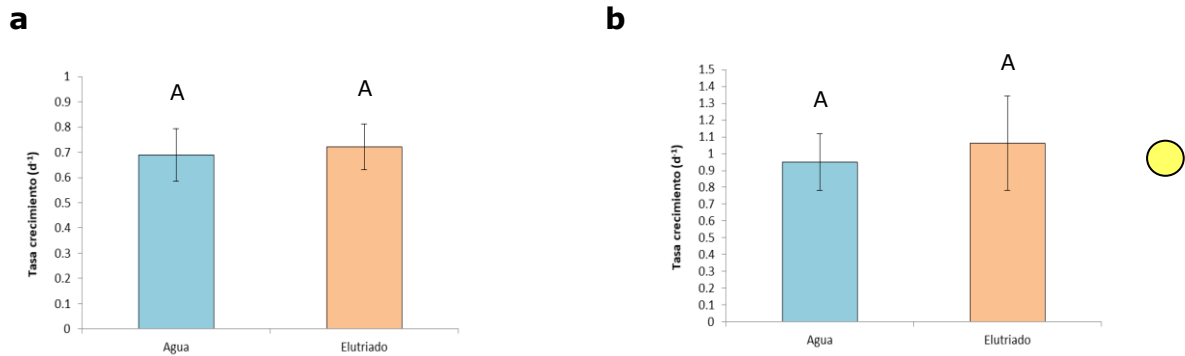


Figura 60: Variación en la tasa de crecimiento en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

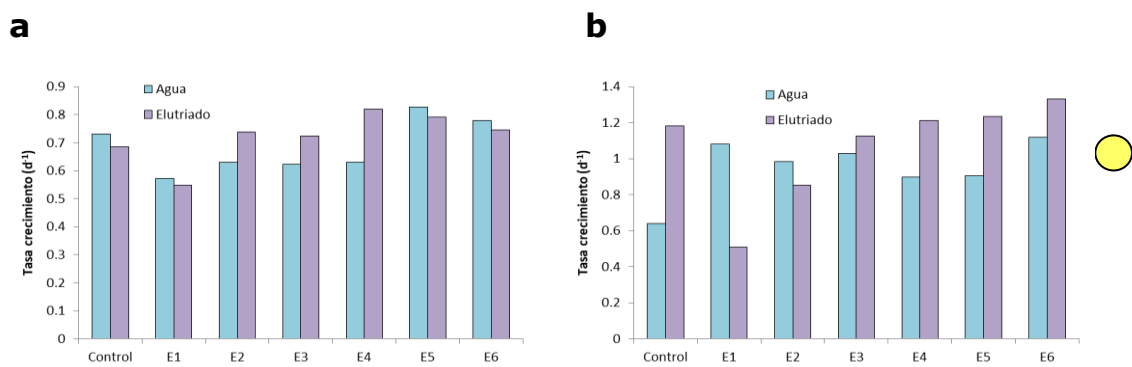


Figura 61: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 2do. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

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. 61 a y b, 62 a y b, 63 a y b).

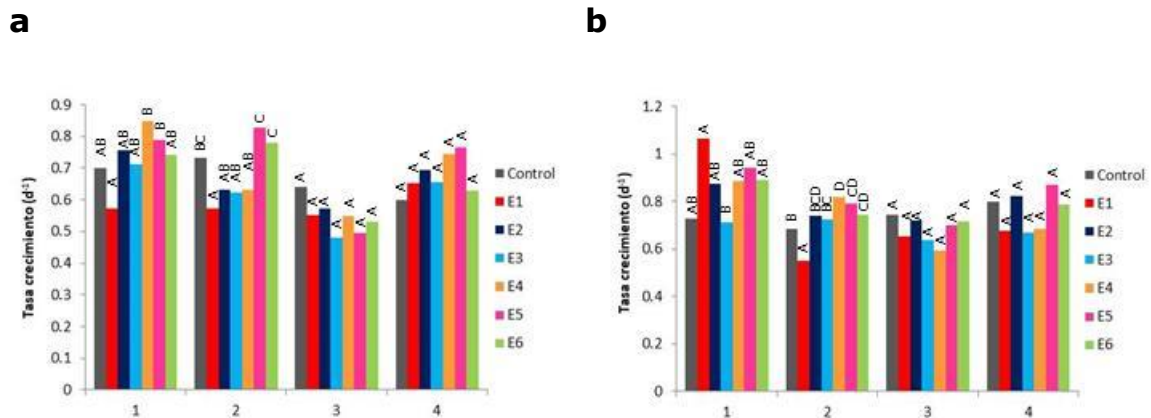


Figura 62: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado de sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

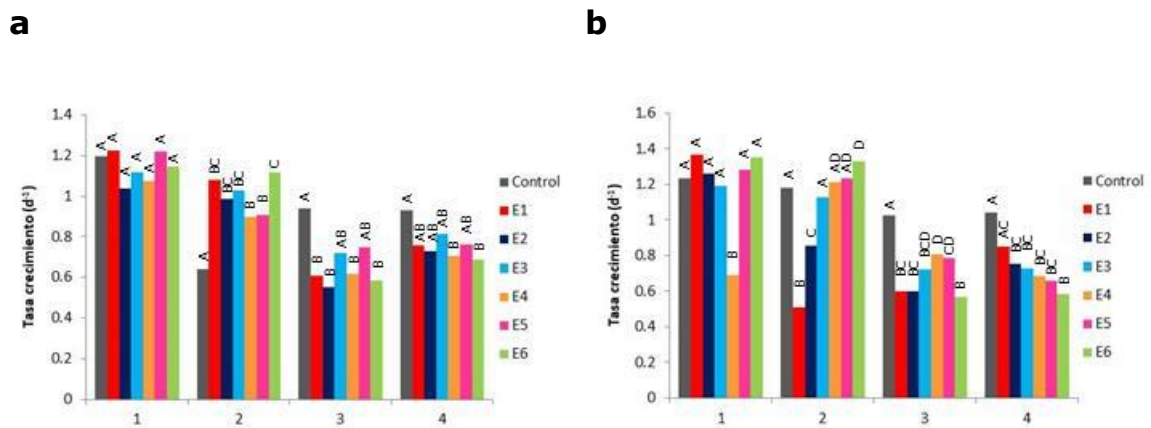


Figura 63: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

INTERPRETACIÓN (muestreo 2°M-dic'17)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Durante los bioensayos realizados con **agua** de la estación **E1** se vio afectada la tasa de crecimiento de *T. suecica* ya que ocurrió una

disminución en la densidad celular comparando con los otros sitios de muestreo.

Para la diatomea *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*, densidad y tasa de crecimiento fueron bajos en **E4** y **E5**, mientras que hubo una muy baja de la concentración de clorofila "a" en **E2**.

Los bajos valores registrados en la densidad celular y tasa de crecimiento de *T. suecica* en los bioensayos con **elutriado** de sedimentos provenientes de **E1** y **E3** podrían explicarse porque en las muestras de sedimento de la estación **E1** se detectaron alta concentración de β -endosulfan (0,7 ppb, p.s.) registrado por la Dutch Target and Intervention Values, 2000. Mientras que en **E3** se registró el mayor valor de Hg (0,069 $\mu\text{g/g}$ y 0,114 $\mu\text{g/g}$, en las fracciones total y fina, respectivamente). Del mismo modo, la diatomea tuvo un muy bajo crecimiento y densidad en **E1** y registró una baja concentración de clorofila "a" en **E2**, coincidiendo con un valor excedido en el límite de 4,4'-DDD (28,1 ppb.p.s.) registrado por la EPA.

7.3. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 3er. muestreo (3°M-feb'18)

Se analizaron:

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

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=27,68	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control°	Agua: F=1,35 Elutriado: F=1,94	0,2811 ns 0,1215 ns
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=63,86	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=4,09 Elutriado: F=9,19	<0,01 ** <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=31,8	<0,01 **
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,27 Elutriado: F=2,35	0,3109 ns 0,0678 ns
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,54	0,2205 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=9,12 Elutriado: F=12,78	<0,01 ** <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=2,46	0,123 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=2,58 Elutriado: F=8,56	0,052 ns <0,01 **
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=1,43	0,2376 ns
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=5,51 Elutriado: F=14,18	<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 se hallaron densidades celulares mayores en elutriado del sedimento (Fig. 64), mientras que para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas (Fig. 64b).

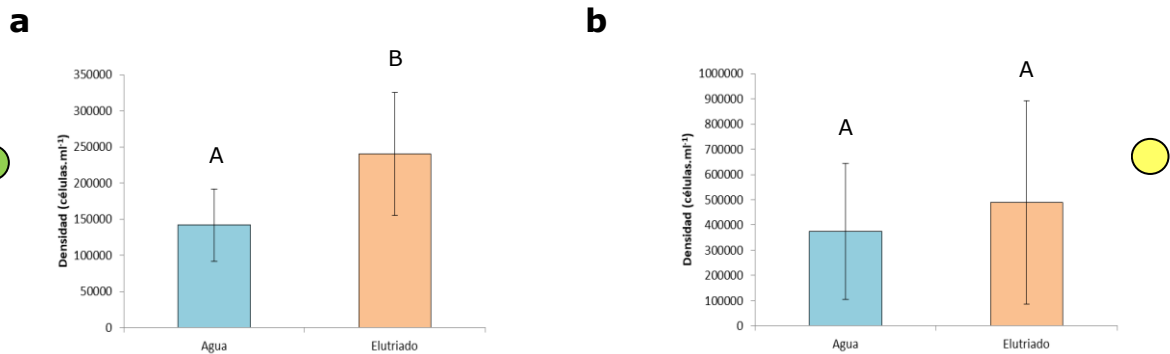


Figura 64: Variación en la densidad celular en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

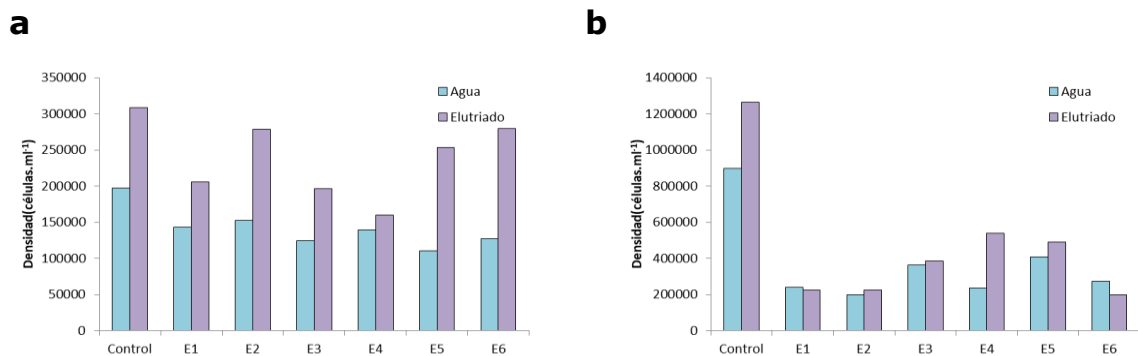


Figura 65: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Con respecto a los sitios de muestreo, para los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** del sedimento no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre sitios, mientras que para los ensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* tanto en **agua** como en

elutriado se hallaron densidades celulares menores en todas las estaciones con respecto al control (Figs. 65 a y b, 66 a y b, 67 a y b).

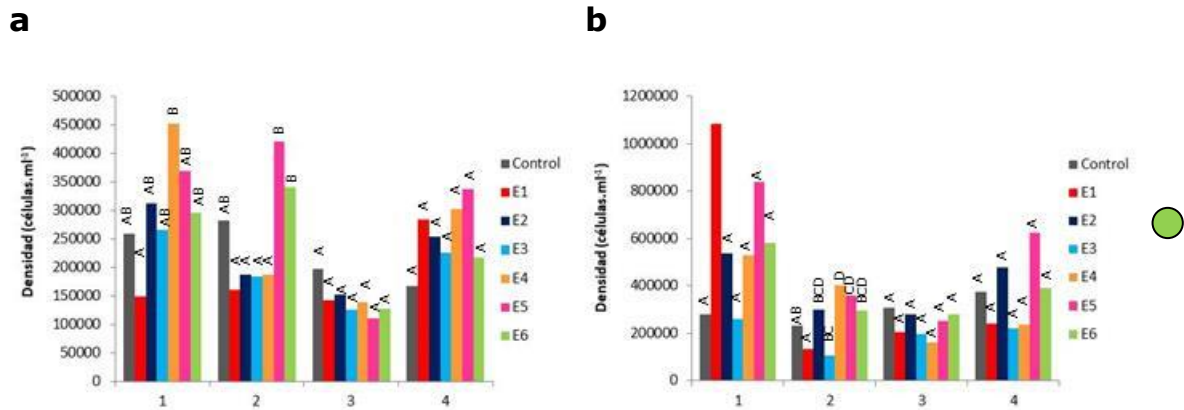


Figura 66: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado de sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

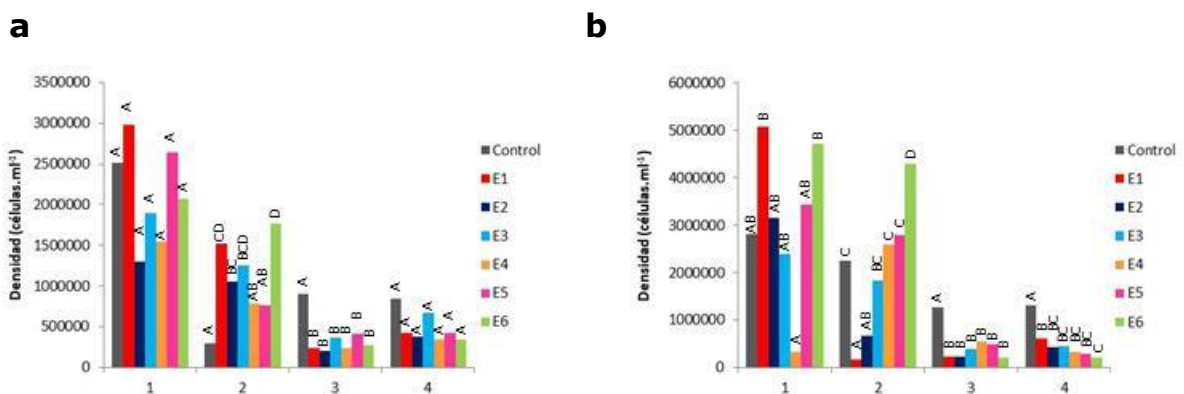


Figura 67: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Clorofila "a"

Al comparar los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** se hallaron concentraciones de clorofila "a" mayores en elutriado

del sedimento, mientras que para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas (Figs. 68 a y b).

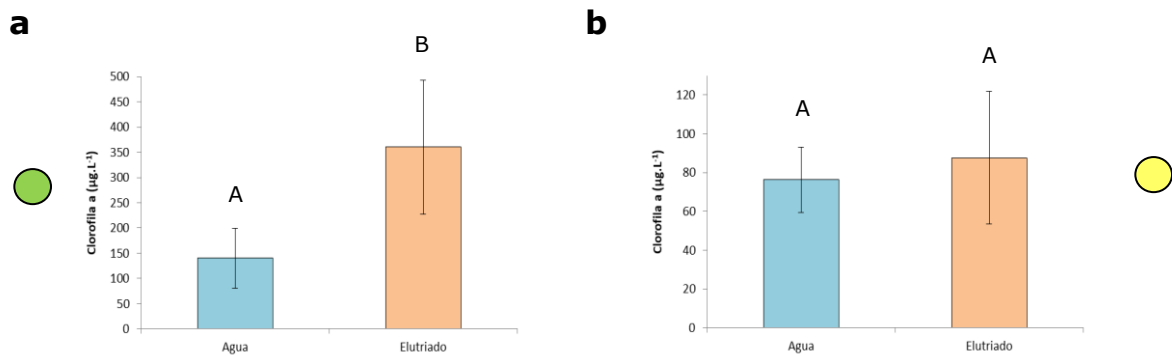


Figura 68: Variación en la concentración de clorofila a en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

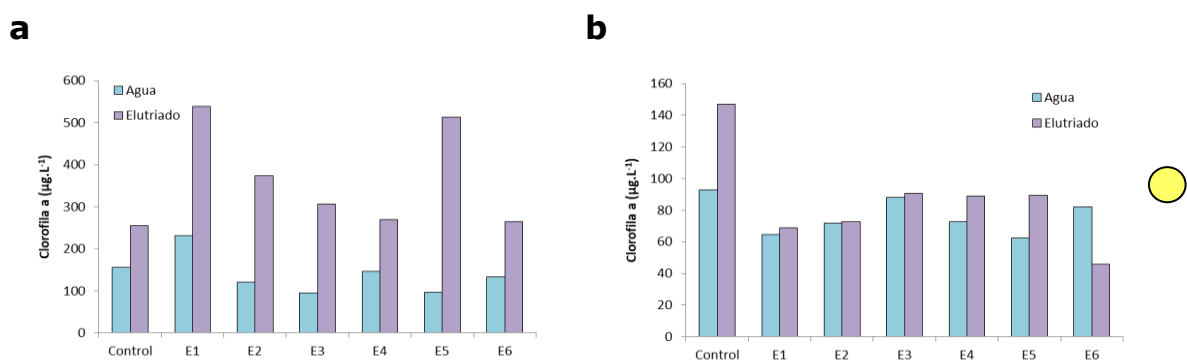
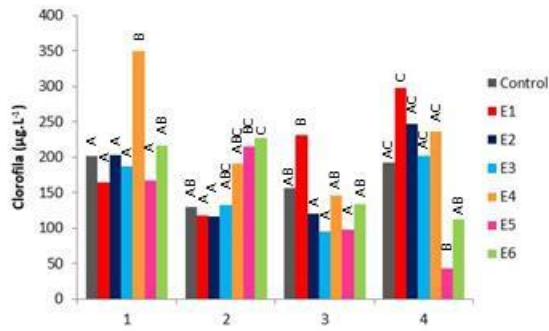


Figura 69: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Con respecto a los sitios de muestreo, para los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** del sedimento se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre sitios, mientras que para los ensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en **agua** no se hallaron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte para los ensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en **elutriado** se hallaron concentraciones de clorofila menores en todos los sitios con respecto al control (Figs. 69 a y b, 70 a y b, 71 a y b).

a



b

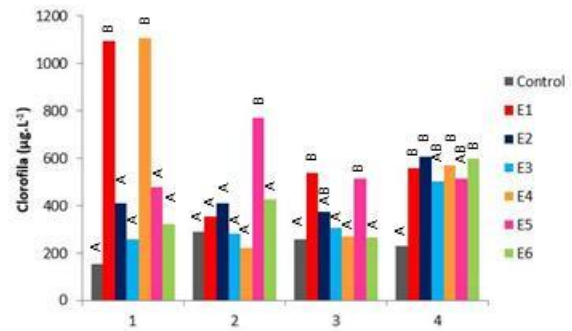
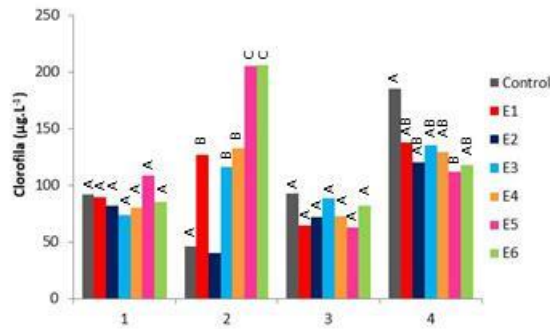


Figura 70: Variación de la clorofila "a" de *Tetraselmis suecica* a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

a



b

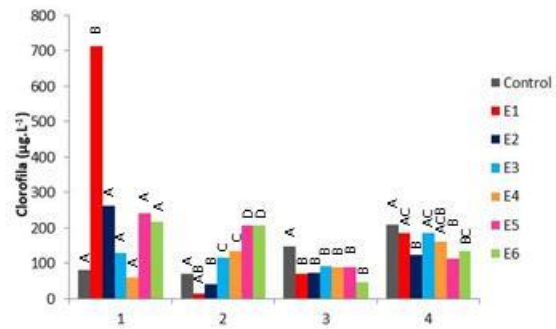


Figura 71: Variación de la clorofila "a" de *Nitzschia aff. kuetzingioides* a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Para *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas al comparar los bioensayos con **agua** y **elutriado** (Fig. 72b), mientras que para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* se hallaron tasas de crecimiento mayores en **elutriado** (Fig. 72a).

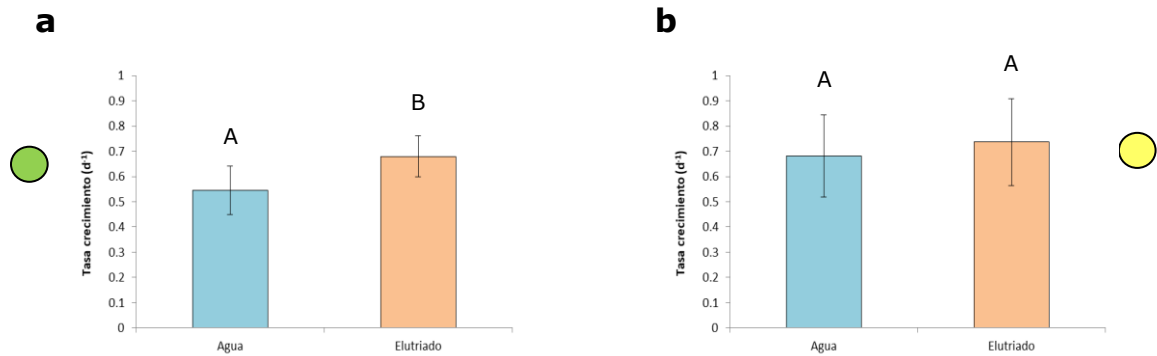


Figura 72: Variación en la tasa de crecimiento en bioensayos realizados con agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey)

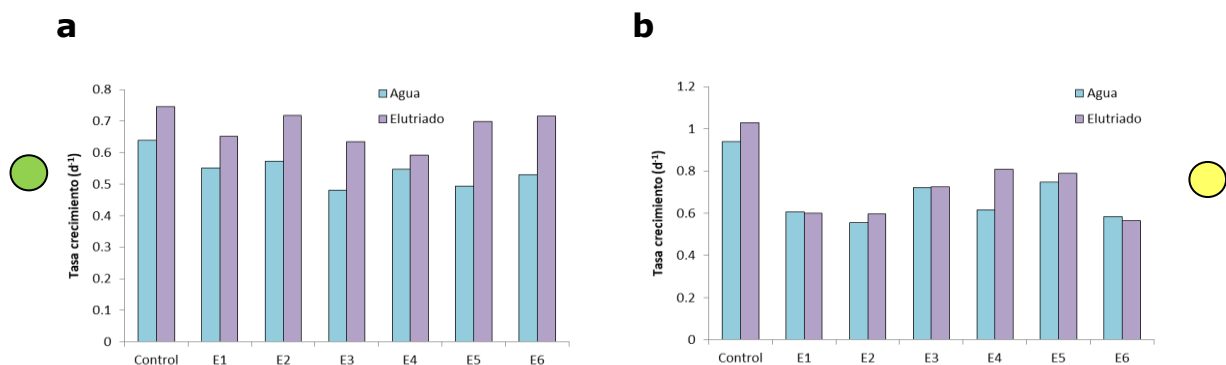


Figura 73: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 3er. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Con respecto a los sitios de muestreo, para los ensayos *Tetraselmis suecica* tanto en **agua** como **elutriado** no se hallaron diferencias significativas entre estaciones de muestreo mientras que para los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* tanto en **agua** como **elutriado** se hallaron tasas de crecimiento significativamente mayores en los ensayos control (Figs. 73a y b, 74a y b, 75a y b).

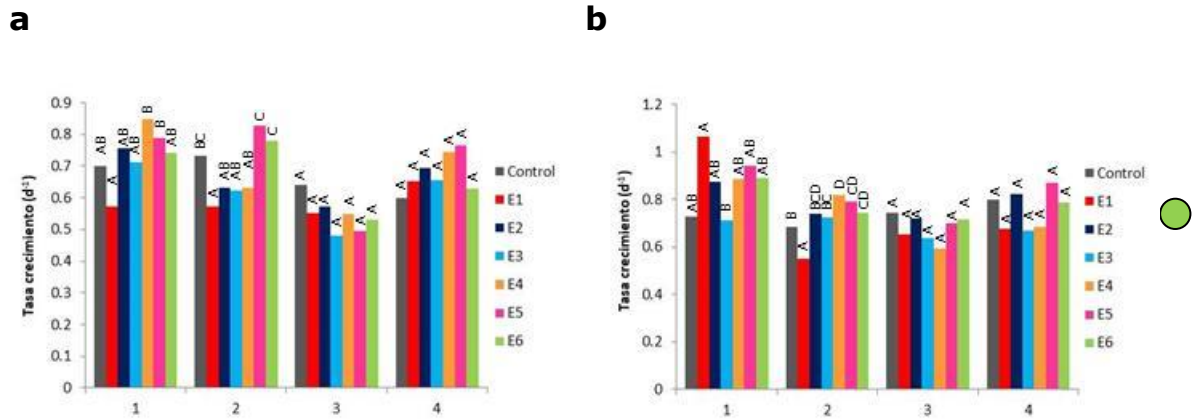


Figura 74: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado de sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

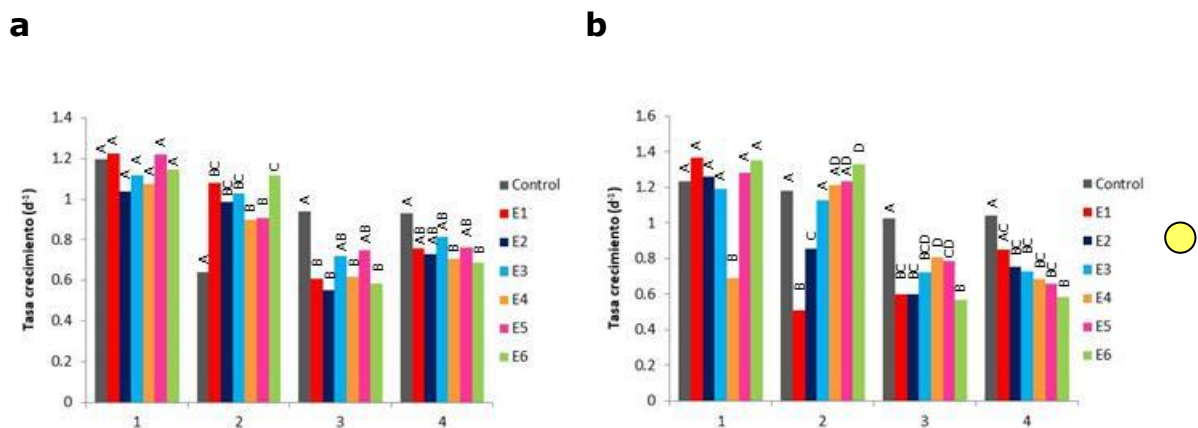


Figura 75: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

INTERPRETACIÓN (muestreo 3ºM-feb'18)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Durante los bioensayos realizados con **agua** proveniente de todas las estaciones de muestreo, el crecimiento de *T. suecica* fue muy inferior al esperado, destacándose el menor crecimiento en **E5** y **E3**.

En los bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides* en **agua**, también se registró un crecimiento bajo en todas las estaciones de muestreo, especialmente en **E1** y **E6**, coincidentemente con registro inauditamente alto de amonio (662,9 $\mu\text{mol/l}$) en **E1**.

En los bioensayos con **elutriado** del sedimento, *T. suecica* presentó la menor densidad celular, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento en **E4**, coincidiendo con altos valores de Aldrin (38,6 ppb, p.s), el α -endosulfan (5,3 ppb, p.s) y el β -endosulfan (2,7 ppb, p.s) según lo determinado por la Dutch Target and Intervention Values, 2000.

Por otra parte, la diatomea *N. aff. kuetzingioides* presentó un menor crecimiento en los bioensayos con **elutriado** de sedimentos provenientes de **E1, E2 y E6**. En **E1** fue coincidente con altas concentraciones de PAHs totales (603,1 ppb, p.s.), especialmente de Benzo-K-fluoranteno (94,7 ppb, p.s), indeno- 123-pireno (72,9 ppb,p.s) y dibenzoantraceno (136,7 ppb, p.s)y con 4,4'-DDE (10,7 ppb,p.s) y el 4,4' DDE (5,6 ppb,p.s) determinados por valores de referencia de la Dutch Target and Intervention Values, 2000 y por la EPA. En la estación **E2**, se registraron valores altos de Aldrin (29,5 ppb,p.s) y el α -endosulfan (2,1 ppb,p.s) y en **E6** de β -endosulfan (5,6 ppb,p.s) comparados con valores de referencia de la Dutch Target and Intervention Values, 2000.

7.4. Resultados de los Bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en agua y elutriado del sedimento del 4to. muestreo (4°M-may'18)

Se analizaron:

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

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p	
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=3,75	0,0581 ns	
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control°	Agua: F=0,66 Elutriado: F=1,43	0,6803 ns 0,2521 ns	
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=71,69	<0,01 **	
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=8,64 Elutriado: F=3,41	<0,01 ** <0,05 *	
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=4,8	<0,05 *	
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=1,26 Elutriado: F=1,59	0,2948 ns 0,2024 ns	
	<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,11	0,7369 ns
			Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=2,47 Elutriado: F=18,84	0,0598 ns <0,01 **
	Clorofila "a"	Tratamiento	Agua Elutriado	F=5,64	<0,05 *	
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=2,67 Elutriado: F=7,64	<0,05 * <0,01 **	
	Tasa de crecimiento	Tratamiento	Agua Elutriado	F=0,09	0,7673	
		Estaciones	E1, E2, E3, E4, E5, E6, control	Agua: F=3,03 Elutriado: F=10,54	<0,05 * <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

En los bioensayos realizados con ambas especies, *T. suecica* y *N. aff. Kuetzingioides*, no se hallaron diferencias significativas en la densidad celular de organismos al comparar los tratamientos **agua** y **elutriado** del sedimento a las 96 horas (Figs. 76a y b).

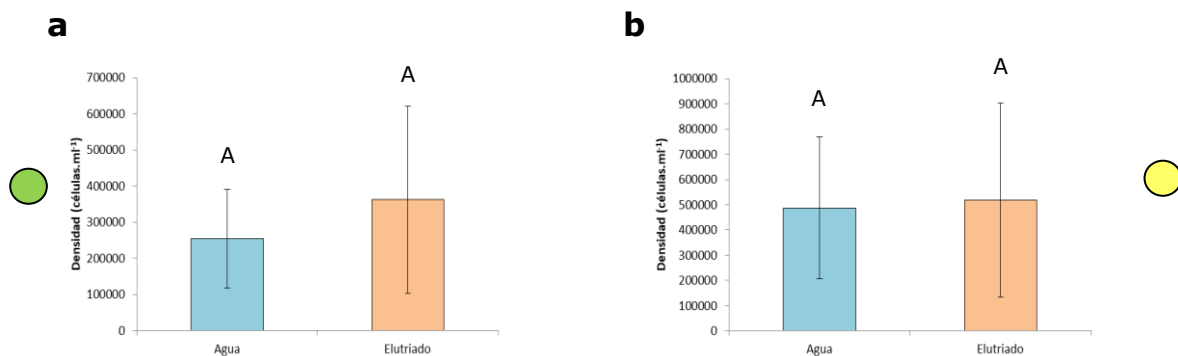


Figura 76: Variación en la densidad celular en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

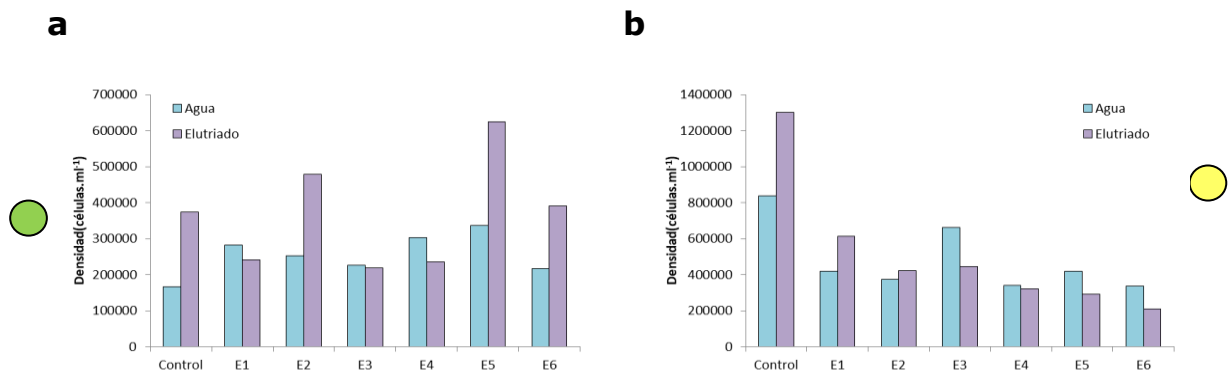
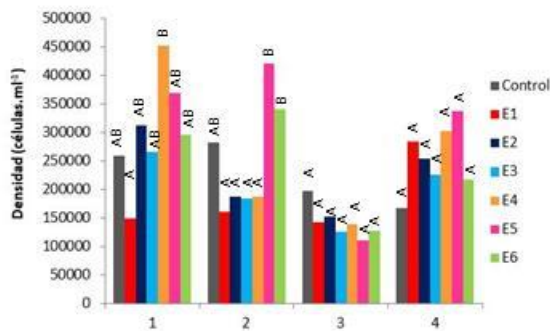


Figura 77: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Con respecto a los sitios de muestreo, para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** y *Nitzschia aff. kuetzingioides* en **agua** no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las estaciones de muestreo, mientras que para los bioensayos con *Nitzschia aff.*

kuetzingioides en **elutriado** se hallaron densidades celulares estadísticamente mayores en el control (Fig. 77 a y b, 78 a y b, 79 a y b).

a



b

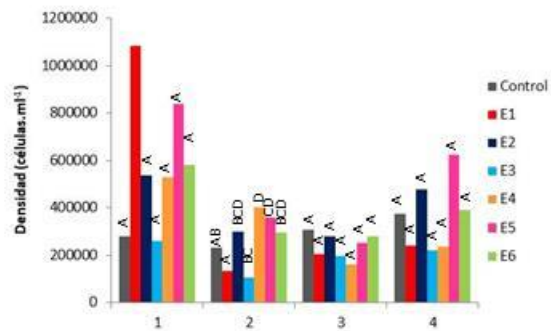
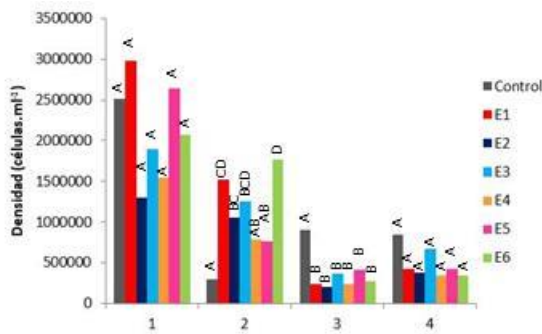


Figura 78: Variación de la densidad celular durante los bioensayos con agua a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

a



b

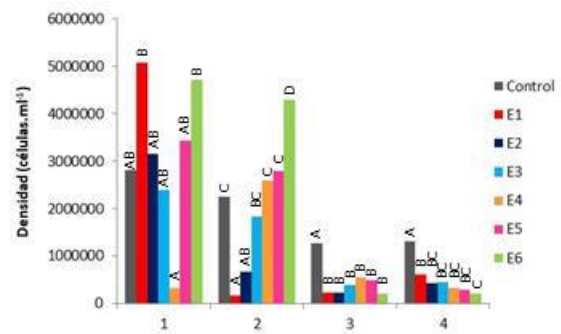


Figura 79: Variación de la densidad celular a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos con agua. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

Clorofila "a"

Para ambas especies *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia aff. kuetzingioides* al comparar los tratamientos **agua** y **elutriado** del sedimento a las 96 horas,

se hallaron diferencias significativas en la concentración de clorofila a, con valores mayores para los bioensayos con **elutriado** (Figs. 80 a y b).

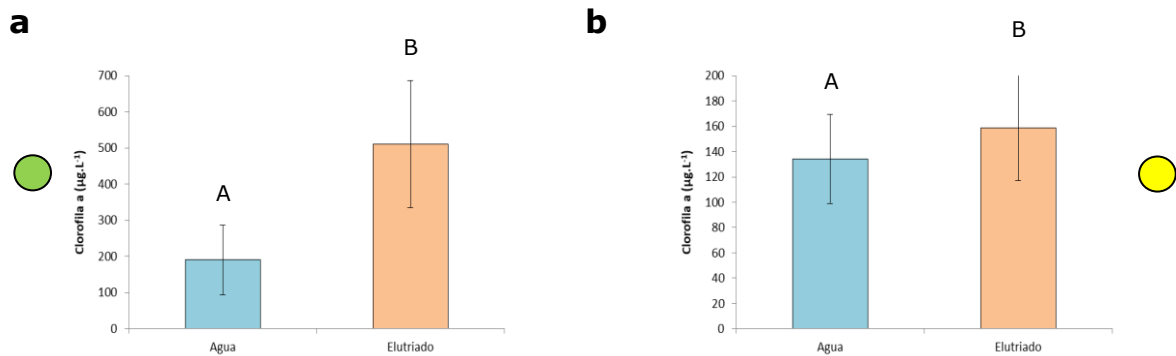


Figura 80: Variación de la concentración de clorofila "a" durante bioensayos realizados con agua y elutriado de sedimento en el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

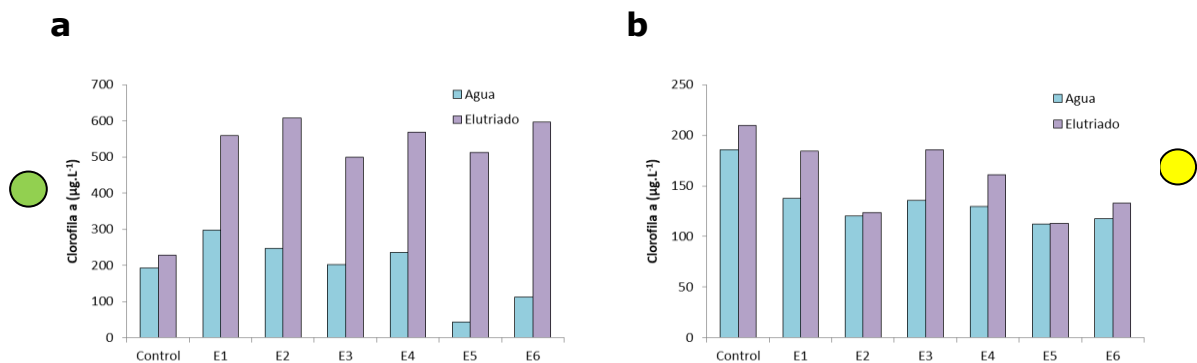


Figura 81: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

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. 81 a y b, 82 a y b, 83 a y b).

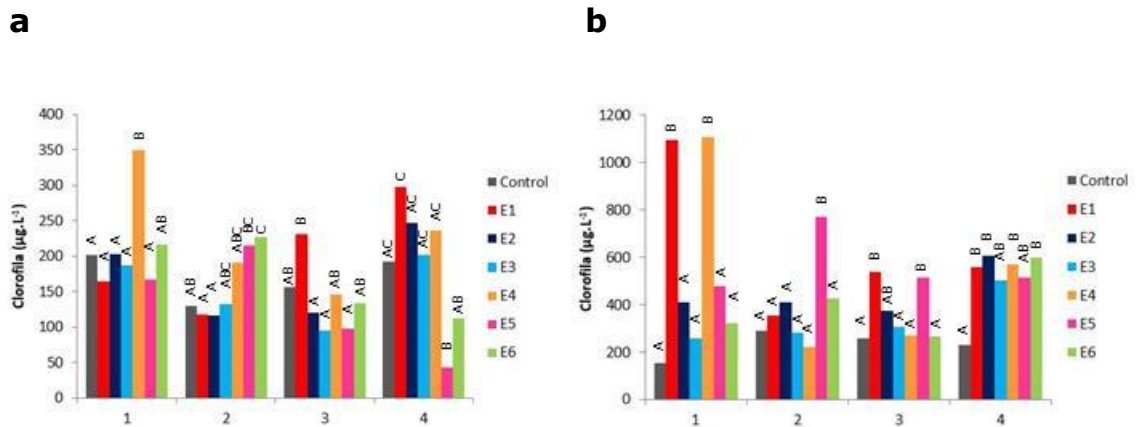


Figura 82: Variación de la clorofila "a" de *Tetraselmis suecica* a lo largo de las 4 fechas de muestreo durante los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

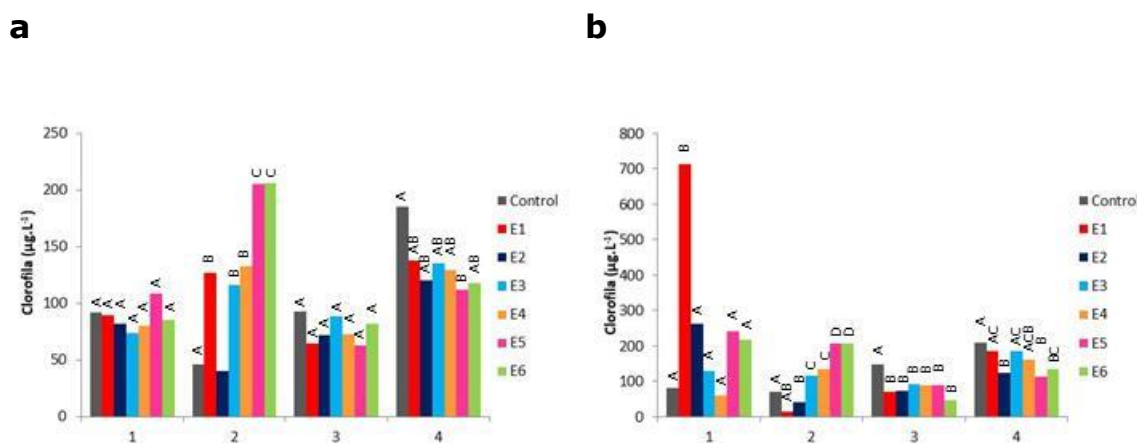


Figura 83: Variación de la clorofila "a" de *Nitzschia aff. kuetzingioides* a lo largo de las 4 fechas de muestreo en los bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Para los bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* se hallaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, con valores más altos para **elutriado**, mientras que para los bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* no se hallaron diferencias significativas (Figs. 84a y b).

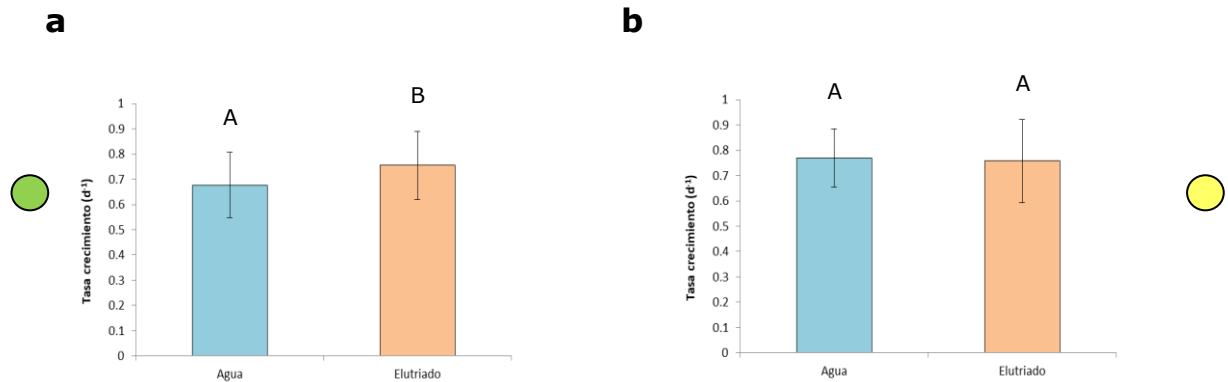


Figura 84: Variación de la tasa de crecimiento en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

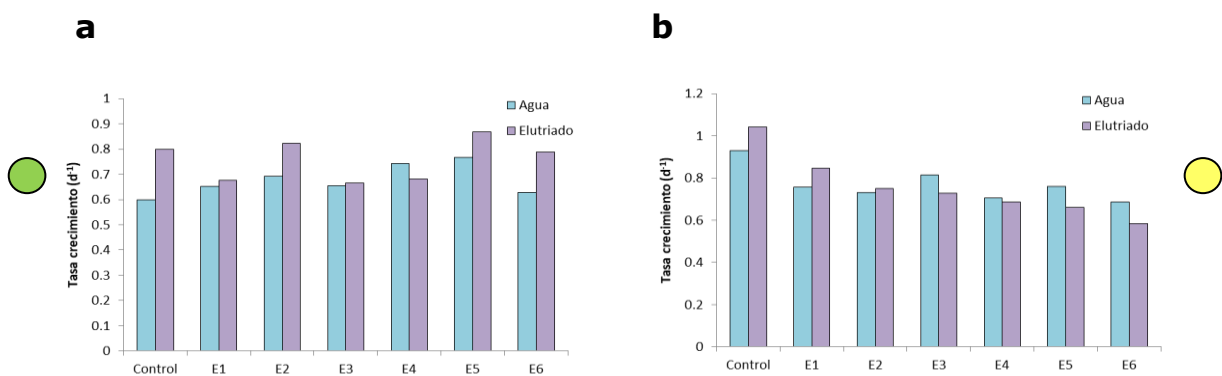


Figura 85: Detalle de la variación en la concentración de clorofila a en cada estación de monitoreo en bioensayos realizados en agua y elutriado de sedimento durante el 4to. muestreo. a) *Tetraselmis suecica*. b) *Nitzschia aff. kuetzingioides*.

Con respecto a los sitios de muestreo, para los bioensayos con *Tetraselmis suecica* en **agua** y **elutriado** del sedimento no se hallaron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo (Figs. 85a y 86 a y b), mientras que en los bioensayos con *Nitzschia aff. kuetzingioides* se hallaron tasas de crecimiento estadísticamente mayores en el control tanto en **agua** como **elutriado** (Figs. 85 b y 86 a y b)

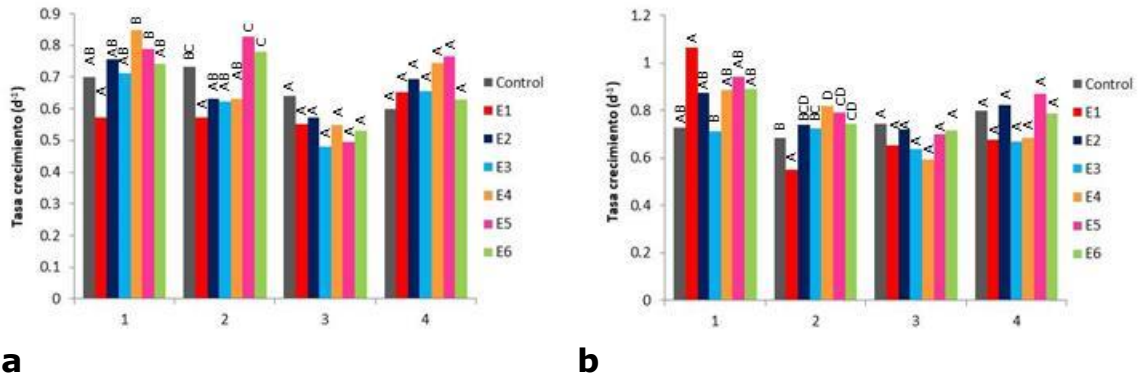


Figura 86: Variación en la tasa de crecimiento de *Tetraselmis suecica* durante los bioensayos a lo largo de las 4 fechas de muestreo. a). En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

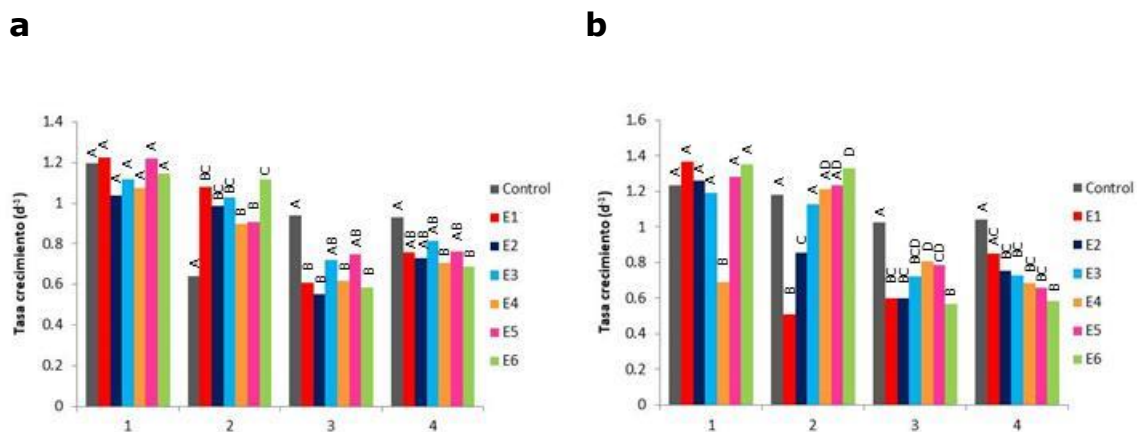


Figura 87: Variación en la tasa de crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides* a lo largo de las 4 fechas de muestreo en bioensayos. a) En agua. b) En elutriado del sedimento. Letras diferentes dentro del mismo muestreo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de Tukey).

INTERPRETACIÓN (muestreo 4°M-may'18)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

La baja densidad celular y tasas de crecimiento de *T. suecica* registrada durante los bioensayos realizados con **agua** proveniente de la estación de muestreo **E6** podría haber sido causada por los altos valores de los metales pesados Pb (54,060 µg/l), registrado por el Programa de Monitoreo.

Por otro lado, en **E5**, se registró la máxima concentración de amonio (205,7 µmol/l), coincidentemente con la menor concentración de clorofila "a" tanto en *T. suecica* como en *N. aff. kuetzingioides*.

Los resultados de los bioensayos realizados con el **elutriado** del sedimento muestran una marcada disminución en la densidad celular y la tasa de crecimiento de *T. suecica* en las estaciones **E1**, **E3** y **E4**, mientras que las más bajas concentraciones de clorofila "a" se registraron en los bioensayos con **elutriados** de **E3** y **E5**. En **E1** estos resultados fueron coincidentes con valores altos de 4,4 DDE (11,3 ppb,p.s.) y de Dieldrin (12,4 ppb,p.s.) según valores de referencia determinados por la EPA. En **E5** coincidió con los valores más elevados de organoclorados en sedimento como el α -endosulfan (1617,5 ppb.p.s) y de Dieldrin (8 ppb.p.s) y en la estación **E3**, se registraron altos valores de 4,4' DDE (7,9 ppb.p.s) según lo determina la Dutch Target and Intervention Values, 2000 y la EPA.

La diatomea *N. aff. kuetzingioides* presentó una densidad celular y tasa de crecimiento muy baja en **E6** y **E5** y la concentración de clorofila "a" más baja en **E2** y **E5**, coincidentemente con la alta concentración de organoclorados anteriormente mencionada para esta última estación y altas concentraciones de α -endosulfan (17 ppb.p.s) y 4,4' DDE (81,8 ppb.p.s), según lo determina la Dutch Target and Intervention Values, 2000 y la EPA.

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

El análisis se basó en la regresión entre las dos variables evaluadas durante los bioensayos: densidad celular – clorofila “a”, para ello se empleó la transformación $\ln(\text{dato} + 1)$ a fin de cumplir con los supuestos y poder aplicar un análisis de regresión lineal simple. 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.

No se observaron regresiones no significativas en ningún caso entre la densidad de microalgas y el contenido de clorofila “a”, lo cual resulta esperable ya que el contenido de clorofila es un estimador de la biomasa celular. Pero hubo marcadas variaciones en los valores del coeficiente de determinación (R^2).

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 un mal estado fisiológico de las microalgas provocado por la presencia de sustancias tóxicas específicas o por la mezcla de las mismas en el medio evaluado.

El coeficiente de determinación (R^2) representa la proporción de la variabilidad en la concentración de clorofila “a” que puede atribuirse a una relación lineal con la densidad celular. Cuando los resultados del análisis de regresión son significativos ($p < 0,05$) valores bajos de dicho valor indican que, si bien existe una relación lineal entre el contenido de clorofila “a” y el recuento celular existe una gran dispersión de los datos alrededor de la recta de regresión.

8.1. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos (1°M-ago'17) y (2°M-dic'17)

Estado fisiológico: Regresión entre densidad celular - clorofila "a"

(1°M-ago'17)

	● <i>T. suecica</i>			● <i>N. aff. kuetzingioides</i>	
	agua	elutriado		agua	elutriado
E1	0,93	0,89		0,79	0,88
E2	0,83	0,77		0,9	0,87
E3	0,86	0,95		0,79	0,77
E4	0,76	0,87		0,89	0,44
E5	0,83	0,89		0,92	0,57
E6	0,83	0,79		0,83	0,7

Se observaron valores del coeficiente de determinación bajos en las estaciones **E4** y **E5** para los bioensayos con *N. aff. kuetzingioides* en elutriado.

(2°M-dic'17)

	● <i>T. suecica</i>			● <i>N. aff. kuetzingioides</i>	
	agua	elutriado		agua	elutriado
E1	0,88	0,59		0,9	0,69
E2	0,8	0,89		0,89	0,89
E3	0,76	0,92		0,94	0,94
E4	0,6	0,5		0,85	0,92
E5	0,89	0,85		0,96	0,93
E6	0,87	0,92		0,94	0,94

Se observaron valores de R^2 bajos en la estación **E4** en los bioensayos con *T. suecica* tanto en agua como en elutriado y en elutriado de **E1** para ambas especies.

8.2. Bioensayos con agua y elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos (3°M-feb'18) y (4°M-may'18)

Estado fisiológico: Regresión entre densidad celular - clorofila "a"

(3°M-feb'18)

	● <i>T. suecica</i>			● <i>N. aff. kuetzingioides</i>	
	agua	elutriado		agua	elutriado
E1	0,79	0,92		0,77	0,85
E2	0,76	0,83		0,73	0,86
E3	0,51	0,75		0,83	0,68
E4	0,49	0,9		0,89	0,83
E5	0,72	0,81		0,73	0,88
E6	0,69	0,86		0,69	0,83

Se observaron valores de R^2 bajos en los sitios de muestreo **E3** y **E4** en los bioensayos con *T. suecica* en agua y elutriado.

(4°M-may'18)

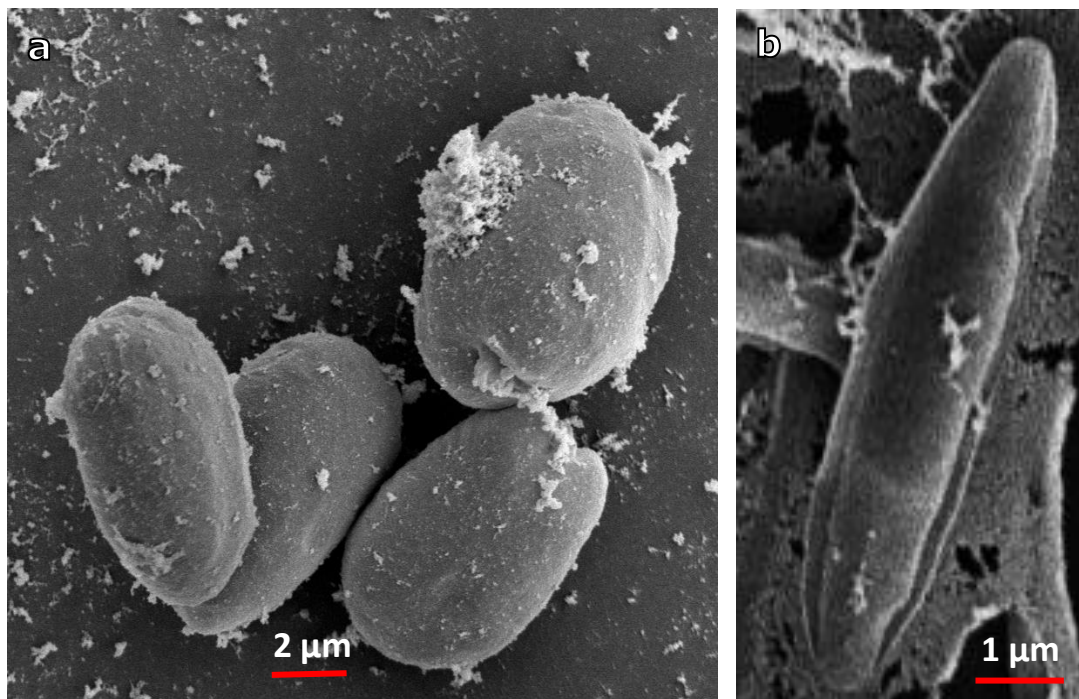
	● <i>T. suecica</i>			● <i>N. aff. kuetzingioides</i>	
	agua	elutriado		agua	elutriado
E1	0,88	0,88		0,87	0,79
E2	0,88	0,8		0,87	0,67
E3	0,83	0,81		0,8	0,77
E4	0,72	0,73		0,72	0,78
E5	0,33	0,75		0,79	0,76
E6	0,76	0,88		0,72	0,75

Se observaron valores de R^2 bajos en la estación **E5** en los bioensayos con *T. suecica* en agua.

RESULTADOS

Alteraciones morfológicas del fitoplacton

Los estudios de la ecotoxicidad del agua y sedimento del estuario de Bahía Blanca se realizaron mediante bioensayos con dos especies de microalgas: *Tetraselmis suecica* y la diatomea *Nitzschia* aff. *kuetzingioides*.



Estado normal de las dos microalgas fitoplanctónicas utilizadas en los bioensayos (MEB). **a:** *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). **b:** *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* (Bacillariophyceae).

Como es sabido, las diatomeas son organismos con una pared celular compuesta por compuestos silíceos: el frústulo. Cada especie posee una morfología general y ornamentación del frústulo propias.

La característica más importante de una diatomea es la ornamentación específica de cada especie de la pared celular de silicio, que se conserva y reproduce fielmente a través de las generaciones. Si se exponen a diferentes tipos de estrés durante los procesos reproductivos, el perfil de la célula de diatomeas y el patrón de estriación pueden cambiar de diferentes maneras, produciendo formas teratológicas.

Las formas teratológicas aparecen como un efecto accidental del estrés ambiental, que puede ser tanto físico como químico. Las condiciones artificiales también conducen a menudo al desarrollo de formas teratológicas. Con mayor frecuencia, las diatomeas presentan un perfil anormal de la valva (Falasco et al 2009).

Esta característica ha permitido a muchos autores identificar casos de anomalías morfológicas en algunos individuos (Fisher et al. 1981, Yang et al. 1993, McFarland et al. 1997, Dickman 1998; Gómez et al. 2003, Cattaneo et al. 2004).

Se han planteado hipótesis sobre el origen de estas deformaciones.

- Entre todas las posibles causas que pueden conducir a la inducción de anomalías del frústulo, los metales pesados son más a menudo citados en la literatura científica. Los estudios *in situ* tienen, de hecho evidencia de formas anormales en ambientes impactados por fuerte contaminación metálica (Dickman 1998, De Filippis & Pallaghy 1994). En el caso de experimentos más específicas, se han observado formas anormales en comunidades expuestas a cadmio, cobre, mercurio y zinc (Fisher et al. 1981; Gold et al. 2003; Gómez et al. 2003; Cattaneo et al. 2004, da Costa Santos 2010).
- Por otro lado, la responsabilidad de los productos químicos, y especialmente de los pesticidas, en la aparición de las anomalías en la pared silíceo de las diatomeas han sido poco estudiadas. Aunque en los últimos años, Schmitt-Jansen y Altenburger (2005) han observado formas anormales en las diatomeas expuestas a altas concentraciones (máximo 312 µg/L) de isoproturón, un herbicida agrícola ampliamente utilizado, aunque en comunidades expuestas a herbicidas diferentes (atrazina y nicosulfuron), no se han observado anomalías de este tipo. No obstante los resultados obtenidos con los productos químicos con modos de acción similares a los pesticidas pueden sugerir que este tipo de compuestos es responsable de la inducción de estas anomalías. Varios autores han informado que moléculas como la colchicina o los medicamentos anti-microtúbulos pueden interrumpir la formación del frústulo (Parkinson et al. 1999).

Se han presentado muchas explicaciones para describir la formación de anomalías del frústulo. En el caso de diatomeas expuestas a diversos compuestos químicos (colchicina y aldehído), se han demostrado las

dispersiones de ADN en la célula y las inducciones poliploides (células multinucleares) (Masmoudi et al. 2018). También se han observado frústulos anormales en diatomeas expuestas a colchicina y un herbicida: isoproturon (Coombs et al., 1968, Schmitt-Jansen et al. 2005). Estos resultados, junto con el vínculo establecido por algunos autores entre las deformaciones del frústulo y las alteraciones en el ADN de otros organismos acuáticos (larvas de ostras) expuestas a un pesticida (endosulfán), llevan a sospechar una posible responsabilidad de genotoxicidad en la inducción de frústulos anormales. Wessel et al. (2007) expusieron cultivos de diatomeas bentónicas a un herbicida genotóxico conocido, la hidrazida maleica (HM) identificando varias alteraciones nucleares después de la exposición. También se han enumerado diatomeas con morfología u ornamentación anormal de su pared celular. Estas alteraciones y anomalías aparecieron significativamente más abundantes en las muestras expuestas a las concentraciones más altas (10^{-6} y $5 \cdot 10^{-6}$ M). En ambos casos, los resultados se relacionaron con una respuesta dosis-respuesta.

Por ello se pueden plantear dos hipótesis para explicar la génesis de estas alteraciones (Debenest et al. 2008, 2010):

- El herbicida podría haber interrumpido la expresión de los genes y, por lo tanto, la síntesis de proteínas necesarias para el suministro del frústulo de sílice durante su formación.
- Esta misma molécula puede afectar a la organización y orientación del citoesqueleto que conduce en paralelo, sin vínculos causales, a la formación de alteraciones nucleares y anomalías del frústulo. La división del núcleo y el transporte de las vesículas de sílice para la síntesis del frústulo son proporcionados por las proteínas del citoesqueleto.

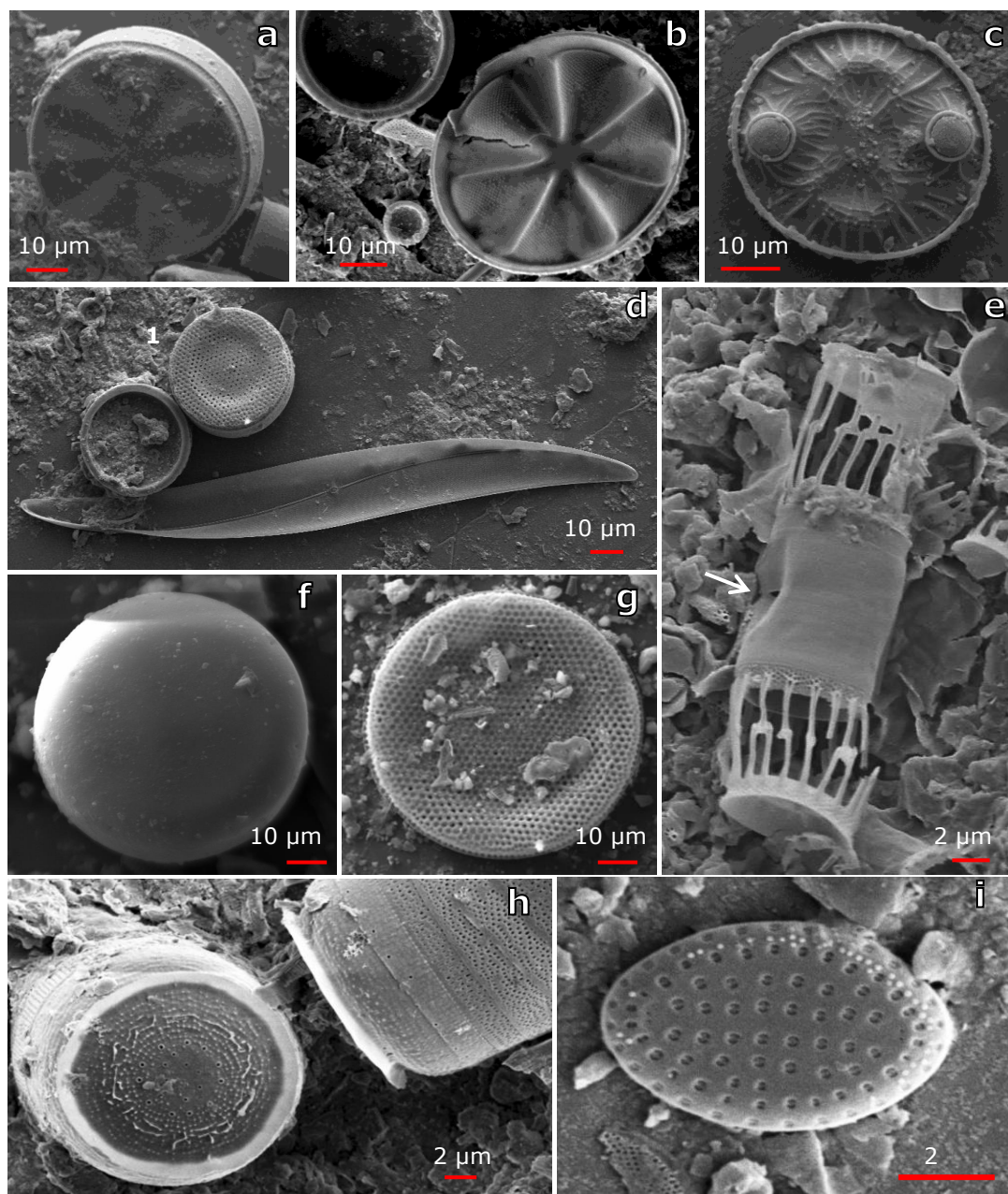
Es difícil explicar una alta frecuencia de deformidad cuando la contaminación por metales no parece grave. Sin embargo, para Morin et al. (2012) es posible que múltiples factores de estrés ejerzan una presión que lleva a una mayor sensibilidad de las células de diatomeas. Los estresores de acción diferencial pueden tener efectos perjudiciales acumulativos (sinérgicos o aditivos) en los individuos: cualquiera de los factores estresantes puede apuntar a ciertas

funciones celulares (por ejemplo, desintoxicación), mientras que el otro factor estresante reduciría otra vía metabólica involucrada en la formación de los frústulos, con el efecto de reducir la capacidad general de la célula para hacer frente a los factores de estrés combinados y producir células normales (Bertrand et al. 2001)

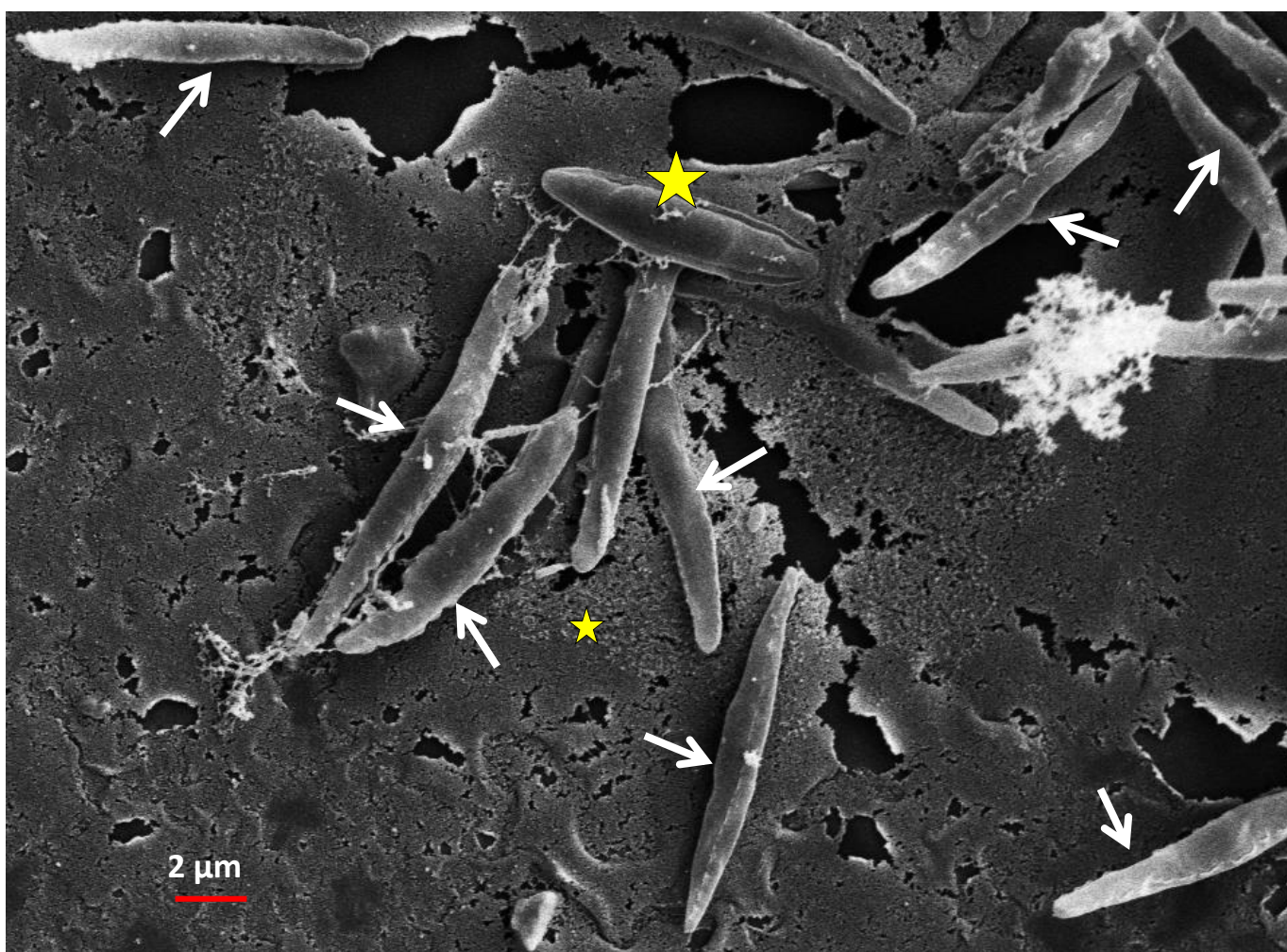
Durante el primer estudio de ecotoxicidad realizado en el estuario (2015-2016) fueron observadas, al microscopio óptico, alteraciones morfológicas de los frústulos de algunas diatomeas al final de los bioensayos (96 hs. de cultivo).

Esto llevó a realizar en este nuevo estudio 2017-2018 el análisis intensivo de los frústulos normales y con alteraciones morfológicas o teratológicas con microscopía electrónica de barrido (MEB).

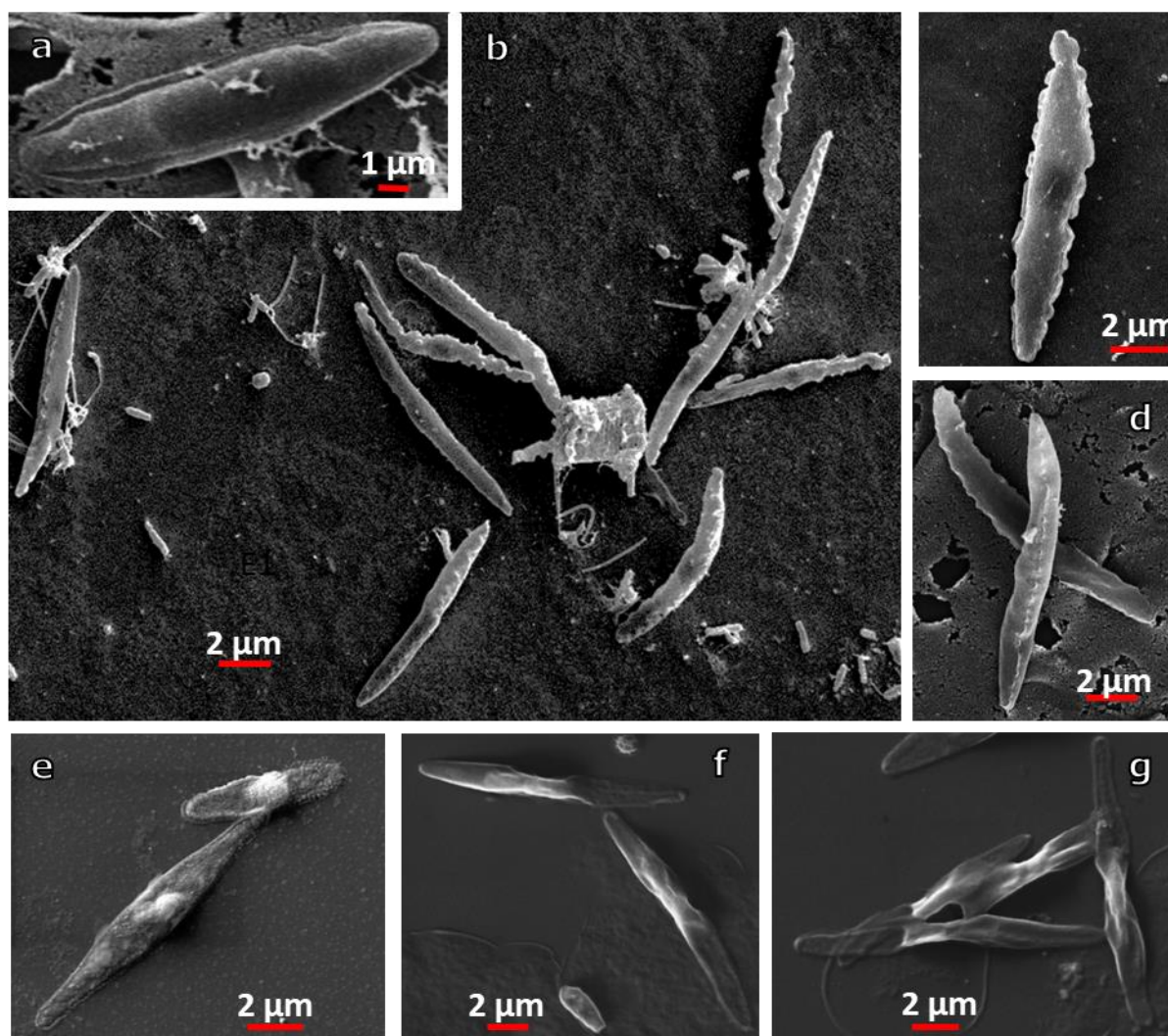
En las muestras de fitoplancton obtenidas directamente del agua del estuario, las diatomeas presentaron aspecto normal, aunque en una muestra de *Skeletonema costatum* se detectaron deformidades en el frústulo.



Microalgas fitoplanctónicas del estuario de Bahía Blanca. a: *Actynoptychus* sp. **b y c:** *Auliscus* sp. **d: 1.** *Thalassiosira* sp.1. **2.** *Pleurosigma* sp. **e:** *Skeletonema costatum* mostrando alteraciones morfológicas (flecha). **f y g.** *Thalassiosira* sp.1. **h:** *Melosira nummuloides*. **i:** *Delphineis minnutisima*.



***N. aff. kuetzingioides* (MEB).** Diferentes morfologías anómalas generadas durante los bioensayos (flechas). ★ célula normal.



***N. aff. kuetzingioides* (MEB).** Distintas morfologías anómalas generadas en los bioensayos con agua o elutriado del sedimento del estuario. **a:** célula normal del cultivo control. En **d, e, f** y **g** se observa la falta de silificación del frústulo que impidió que la diatomea adquiriera su forma tridimensional característica.

Bioensayos realizados con *Artemia salina*

10. Bioensayos con *Artemia salina* Linnaeus 1758 en agua y elutriado del sedimento del estuario

10.1. Primer muestreo (1°M-ago'17)

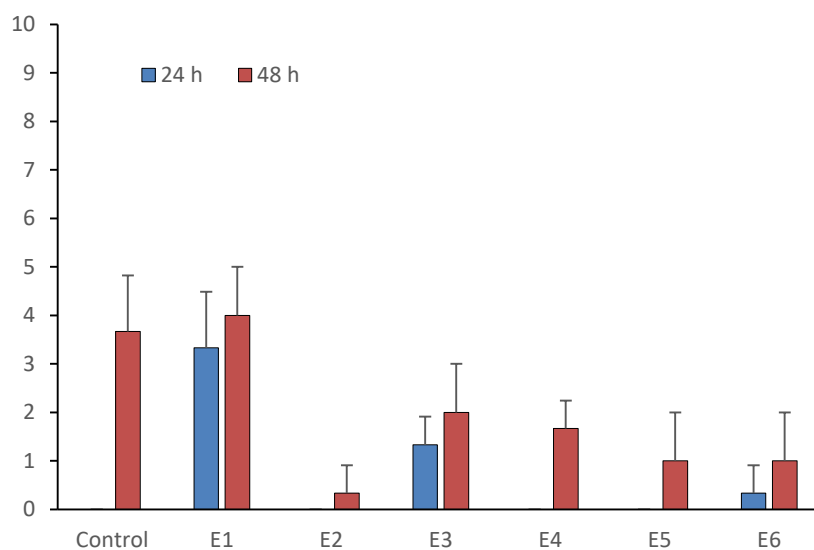


10.1.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (1°M-ago'17)

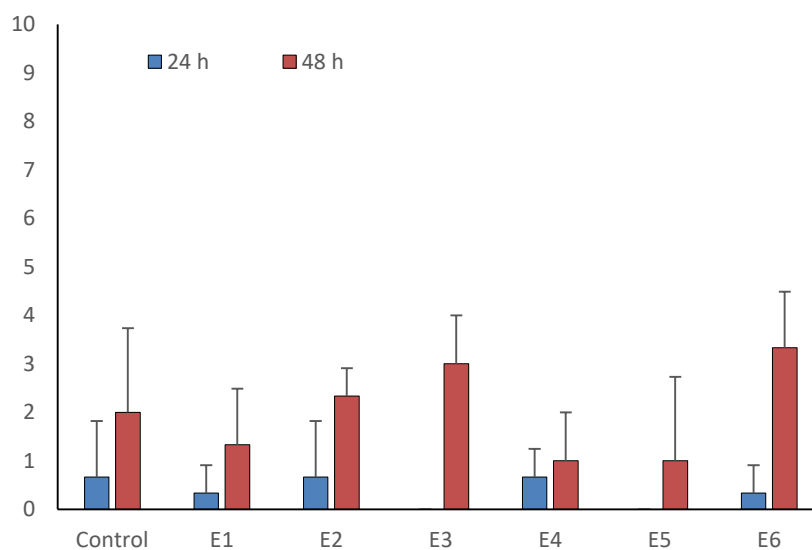


Larvas metanauplio de *Artemia salina*

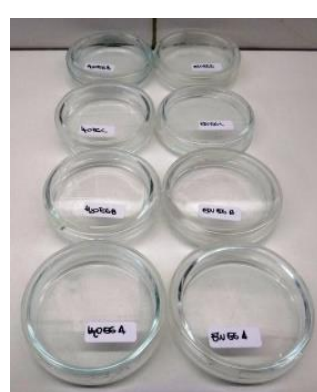
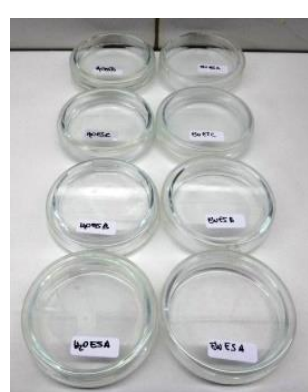
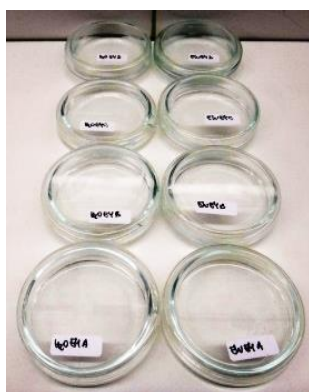
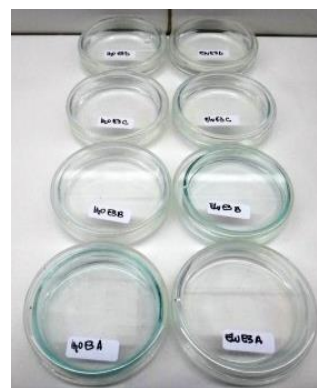
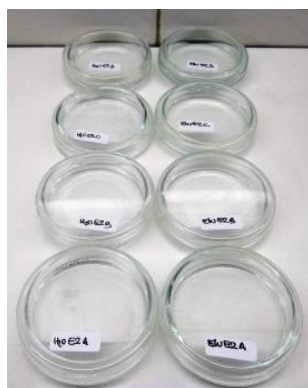
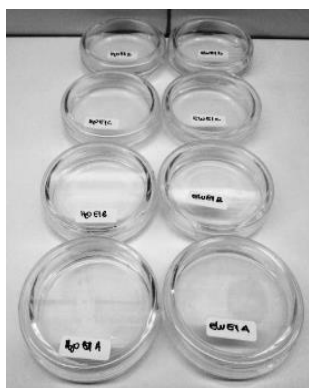
Mortalidad



10.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (1°M-ago'17)



10.2. Segundo muestreo (2°M-dic'17)

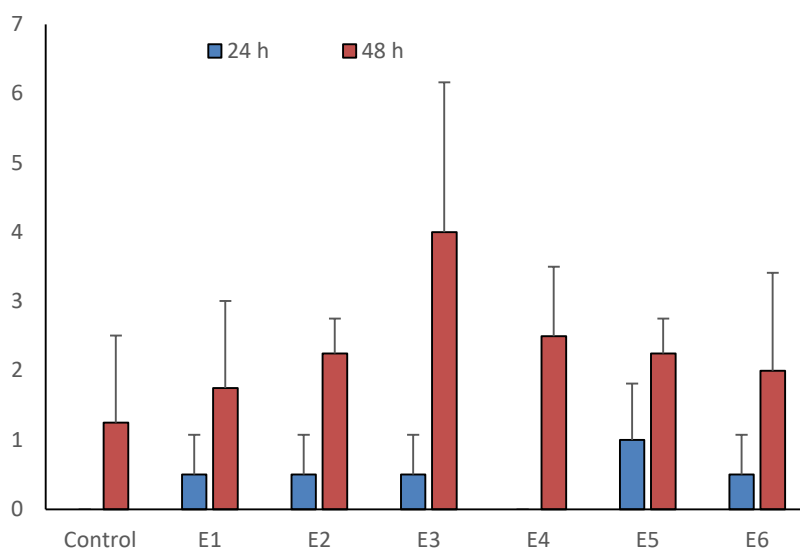


10.2.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (2°M-dic'17)

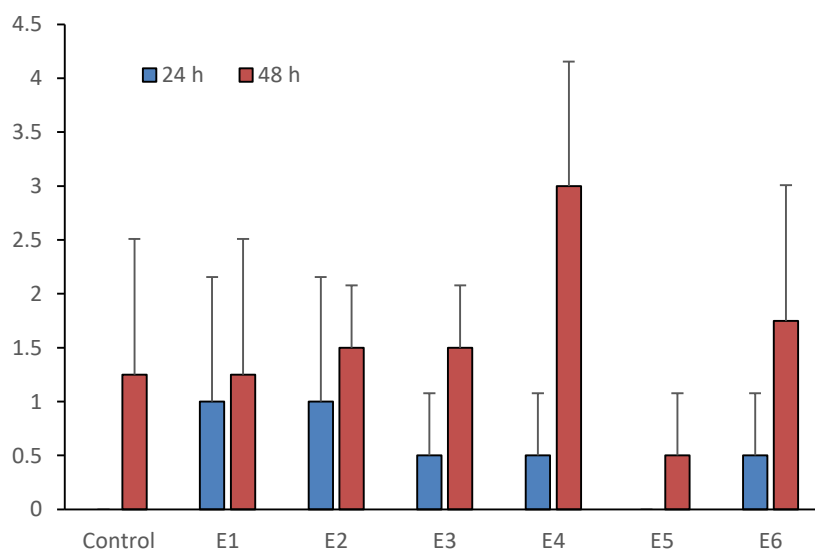


Larvas metanauplio de *Artemia salina*

Mortalidad

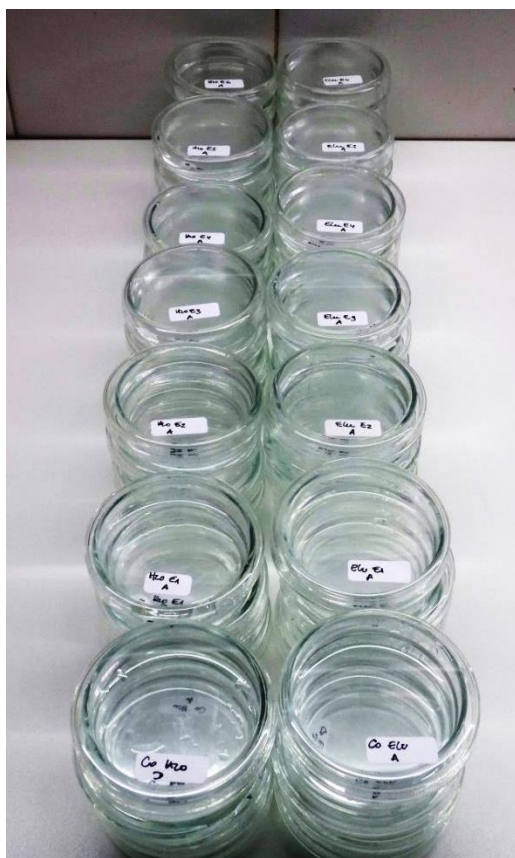


10.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (2°M-dic'17)



Bioensayos con *Artemia salina* Linnaeus 1758 en agua y elutriado del sedimento del estuario

10.3. Tercer muestreo (3°M-feb'18)

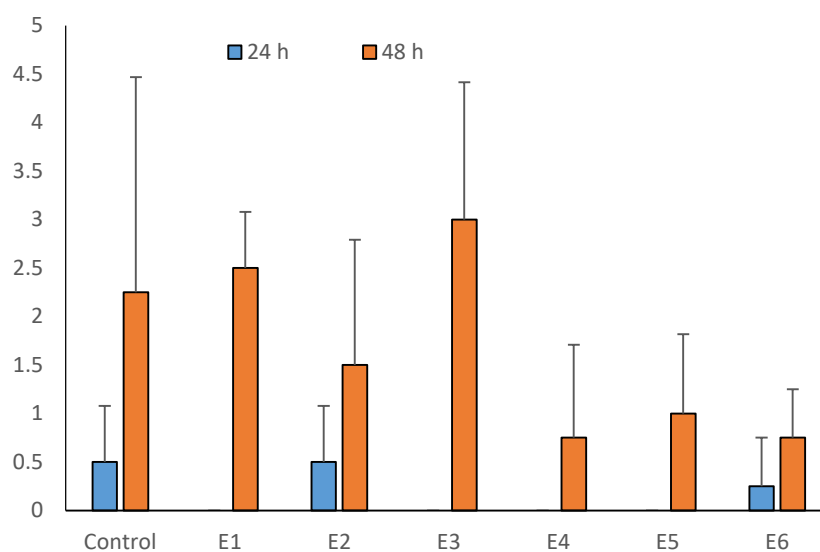


10.3.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (3°M-Feb'18)

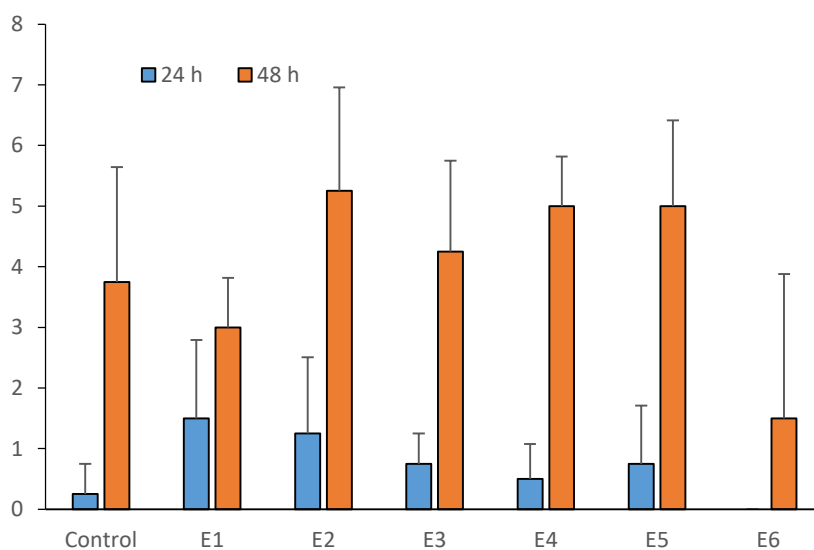


Larvas metanauplio de *Artemia salina*

Mortalidad

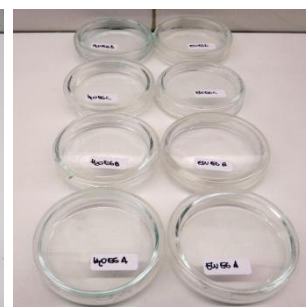
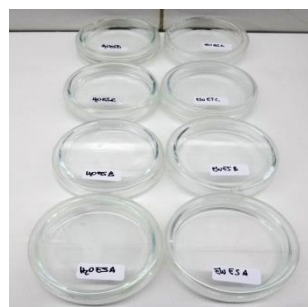
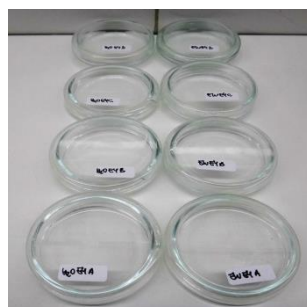
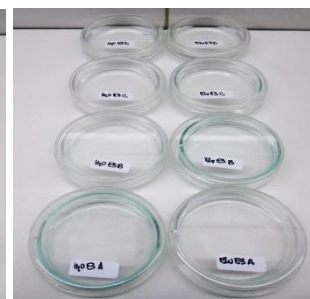
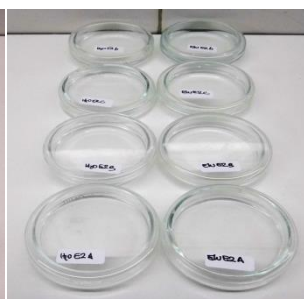
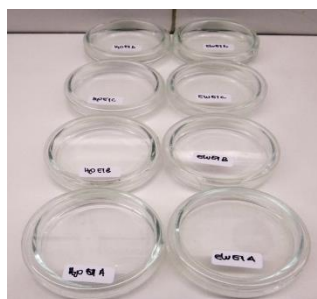
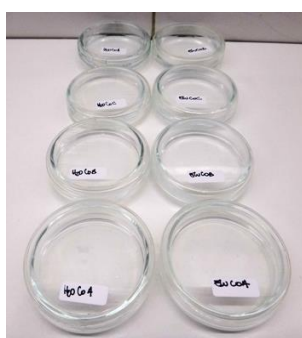


10.3.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (3°M-feb'18)



Bioensayos con *Artemia salina* Linnaeus 1758 en agua y elutriado del sedimento del estuario

10.4. Cuarto muestreo (4°M-may'18)

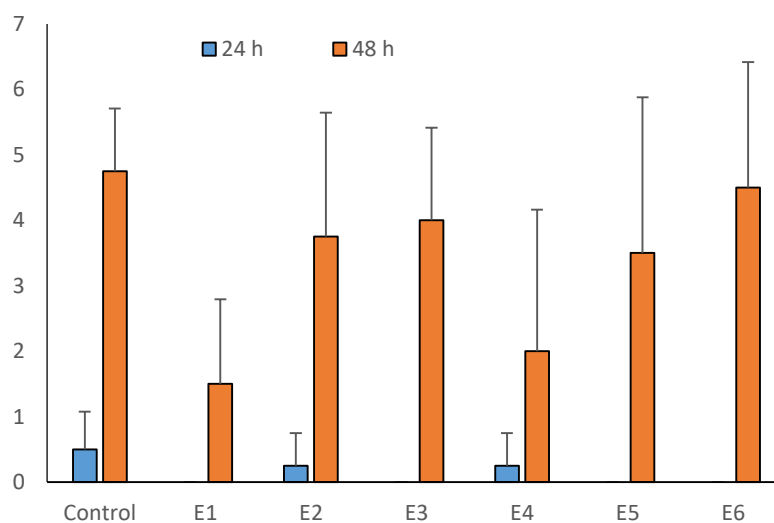


10.4.1. Bioensayos con agua del estuario proveniente del muestreo (4°M-may'18)

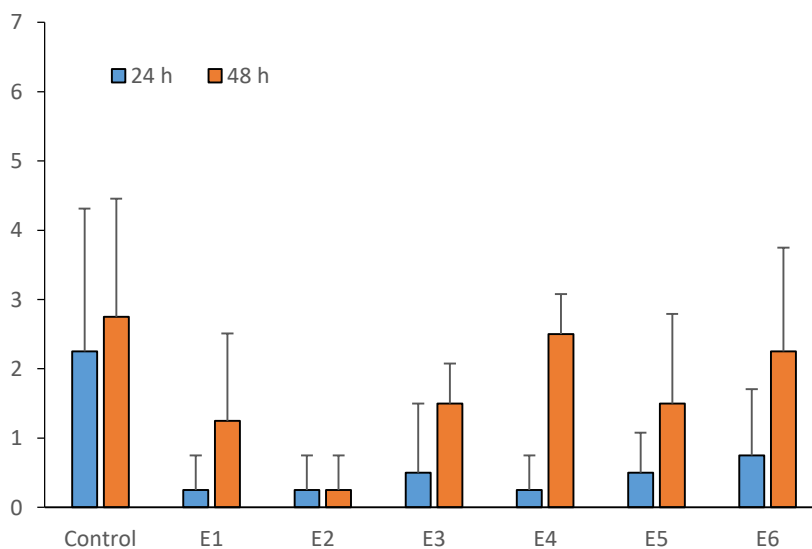


Larvas metanauplio de *Artemia salina*

Mortalidad



10.4.2. Bioensayos con elutriado del sedimento proveniente del muestreo (4°M-may'18)



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Bioensayos realizados con *Artemia salina*

11. Bioensayos realizados con *Artemia salina*

11.1. Comparación de ensayos de mortalidad de *Artemia salina* entre muestreos

Muestreos	Tratamiento	F	p
1º	Agua	1,70	0,1943 n.s.
2º		1,82	0,1429 n.s.
3º		2,16	0,0893 n.s.
4º		1,91	0,1257 n.s.
1º	Elutriado	6,80	0,0015 *
2º		2,26	0,0772 *
3º		2,87	0,0333 *
4º		2,21	0,0822 n.s.
Estaciones	Tratamiento	F	p
E1	Agua	0,82	0,5118 n.s.
E2		2,47	0,1168 n.s.
E3		0,49	0,6970 n.s.
E4		1,32	0,3163 n.s.
E5		2,31	0,1324 n.s.
E6		5,60	0,0140 *
E1	Elutriado	5,28	0,0169 *
E2		20,94	0,0001 **
E3		7,02	0,0066 *
E4		10,55	0,0014 *
E5		12,82	0,0007 **
E6		0,34	0,7965 n.s.
Muestreos accesorios	Elutriado	5,99	0,0001 **

Tabla 11: Resumen de resultados de ANOVA para mortalidad de individuos de *A. salina* comparando los bioensayos con agua y elutriado del sedimento, en los diferentes muestreos. F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

En los ensayos realizados en **agua** de las diferentes estaciones de muestreos, no se evidenciaron diferencias significativas en la variable mortalidad de los individuos a la hora 48 (Tabla 11).

En cambio en los ensayos realizados en elutriado de sedimento si se pudieron observar diferencias entre las estaciones de muestreo, excepto para el muestreo (4ºM-may'18) (Tabla 11).

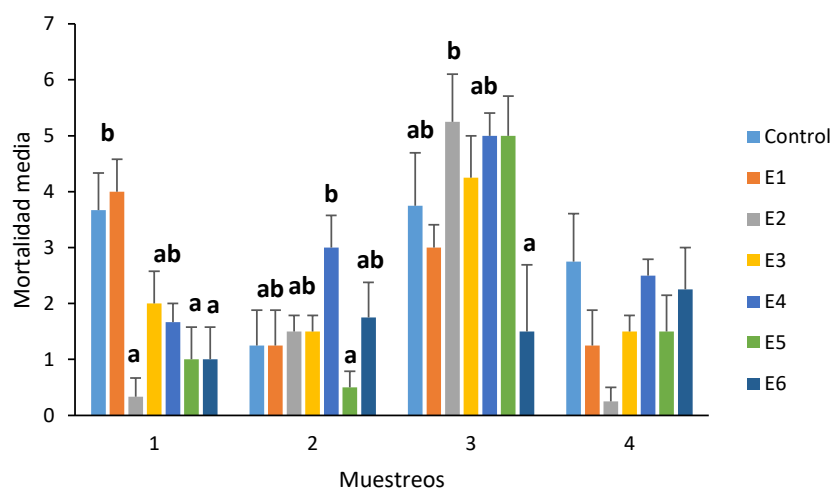


Figura 94: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en elutriado de sedimento. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

Durante el (1ºM-ago'17) se observó la mayor tasa de mortalidad de *A. salina* en **E1**, no siendo significativamente diferente del control (Fig. 94).

Durante (2ºM-dic'17) individuos de *A. salina* presentaron mayores mortalidades en ensayos con **elutriado** de sedimento de **E4** (Fig. 94).

Durante el (3ºM-feb'18) la mayor tasa de mortalidad media se observó en **E2** (Fig. 94).

Durante el (4ºM-may'18), las diferencias estadísticas entre las mortalidad, comparando las estaciones de muestreos, no fueron significativas (Tabla 11).

La alta mortalidad presentada en el muestreo (2ºM-dic'17) en **E4** coincidió con altos valores de Heptaclor (17,7 ppb.p.s) y en el (3ºM-feb'18) en **E2** de Aldrin (29,5 ppb.p.s.) y α endosulfan (2,1 ppb.p.s.), según valores standards de referencia determinados por la Dutch Target and Intervention Values, 2000.

En los muestreos accesorios (Ma-12dic'17), (Ma-14dic'17) y (Ma-15dic'17) se observaron diferencias significativas entre los sitios de

muestreo (Tabla 11). La mayor tasa de mortalidad se observó en **TC1**, **PG2** y **PG3** (Fig. 95).

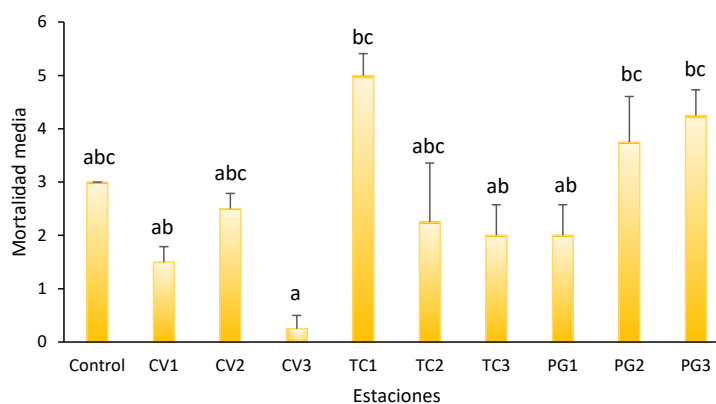


Figura 95: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre sitios de muestreo en elutriado de sedimento en la campaña de bentos. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

La mayor mortalidad de metanauplio de *A. salina* fue registrada en **TC1**. Sin embargo, en ese sitio de muestreo tanto los metales pesados como de hidrocarburos aromáticos policíclicos registrados en sedimento presentaron valores por debajo del valor medio. Una alta mortalidad también fue registrada en **PG2** y **PG3**. En la primera estación de muestro, la alta mortalidad coincidió con valores altos de acenafteno (19, 2 ppb.p.s.) y fluoreno (24 ppb.p.s.) según valores de referencia la EPA.

11.2. Comparación de ensayos con *Artemia salina* entre las diferentes estaciones y fechas de muestreo

En **E1** en ensayos realizados en **agua**, la mortalidad media de *A. salina* no se diferenció entre las fechas de muestreo (Tabla 11). En cambio, en ensayos realizados en **elutriado** de sedimento, la mayor tasa de mortalidad media de *A. salina* se registró en el (1^oM-ago'17) (Fig. 96). Las posibles causas fueron indicadas anteriormente cuando se analizó esta fecha de muestreo.

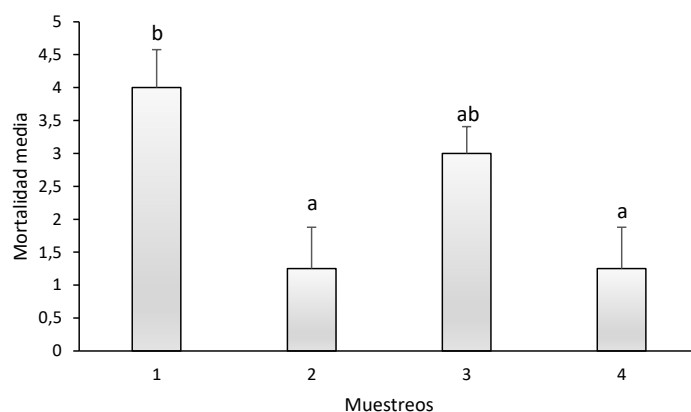


Figura 96: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en elutriado de sedimento en la estación E1. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

En **E2, E3, E4** y **E5** en ensayos realizados en **agua**, la tasa de mortalidad de *A. salina* no se diferencio entre fechas de muestreo (Tabla 11).

En **E2, E3, E4** y **E5** en ensayos realizados en **elutriado** de sedimento, la mayor tasa de mortalidad media se observó durante el (3°M-feb'18) (Figs. 97, 98, 99 y 100).

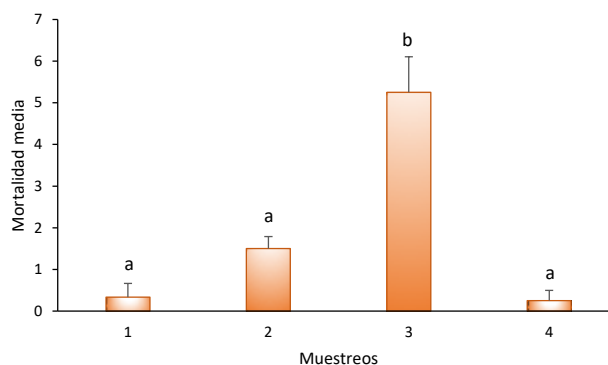


Figura 97: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en elutriado de sedimento en la estación E2. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

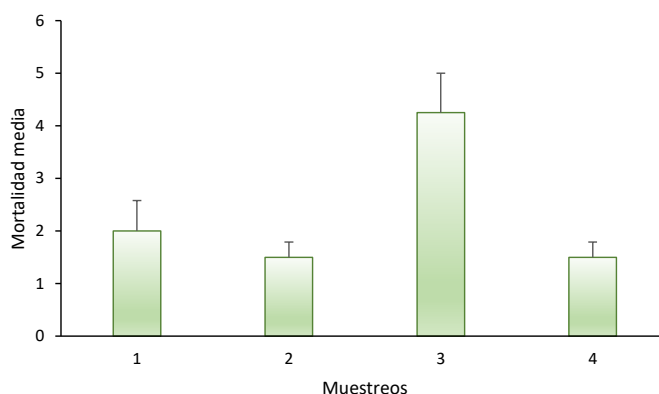


Figura 98: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en elutriado de sedimento en la estación E3. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

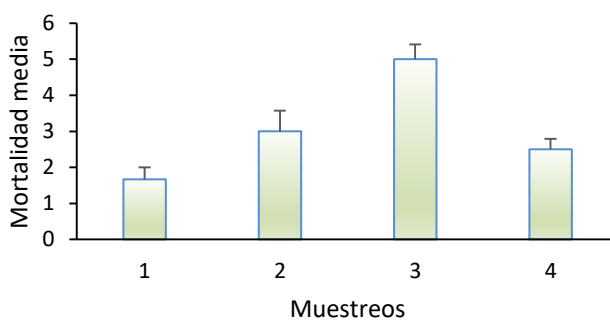


Figura 99: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en elutriado de sedimento en la estación E4. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

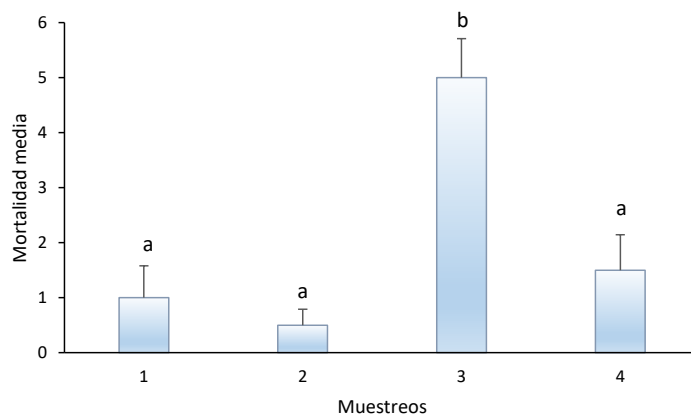


Figura 100: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en elutriado de sedimento en la estación E5. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

Las altas tasas de mortalidad de *A. salina* registrada en **E2** en **elutriado** coincidió con altos valores de Aldrin (29,5 ppb.p.s.) y a endosulfan (2,1 ppb.p.s.) registrado en el (3°M-feb'18). En **E5**, la alta mortalidad de los crustáceos coincidió con los más altos valores de

organoclorados como el α -endosulfan (4,9 ppb.p.s.) y β -endosulfan (3,1 ppb.p.s.) durante el (3°M-feb'18), según comparaciones con valores de referencia de la Dutch Target and Intervention Values, 2000.

En **E6** en ensayos en **elutriado** de sedimento, las tasas de mortalidad registradas en los 4 muestreos no se diferenciaron estadísticamente. Sin embargo, en ensayos en **agua**, las diferencias estadísticas fueron evidentes (Tabla 11). La tasa de mortalidad de *A. salina*, fue considerablemente mayor durante el (4°M-may'18) (Fig. 101).

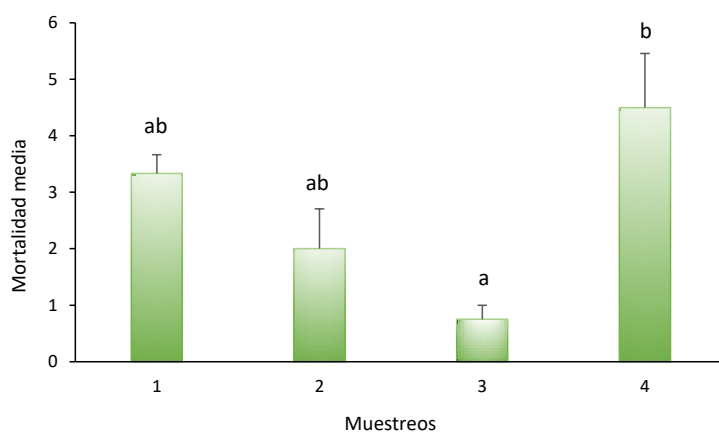


Figura 101: Bioensayos realizados con *A. salina*. Comparación entre muestreos en agua de sedimento en la estación E6. Variación de la mortalidad media. Letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$ Test de Tukey).

La alta mortalidad señalada anteriormente en ensayos en **agua** registrado en el (4°M-may'18) coincidió con los mayores valores de Pb (54,060 $\mu\text{g/g}$) registrados en esa fecha de muestreo.

**Bioensayos con microalgas y *Artemia salina* en
elutriado del sedimento del estuario en Puerto Galván,
Tercera Cuenca y Canal Vieja**

12. Bioensayos con microalgas y *Artemia salina* en elutriado del sedimento del estuario en Puerto Galván, Tercera Cuenca y Canal Vieja

12.1. Bioensayos con *Tetraselmis suecica* en elutriado del sedimento del estuario

Muestras accesorias (Ma-12dic'17), (Ma-14dic'17) y (Ma-15dic'17)

Canal Vieja (CV) Tercera Cuenca (TC) Puerto Galván (PG)



Control



CV E1



CV E2



CV E3



PG E1



PG E2



PG E3



TC E1



TC E2



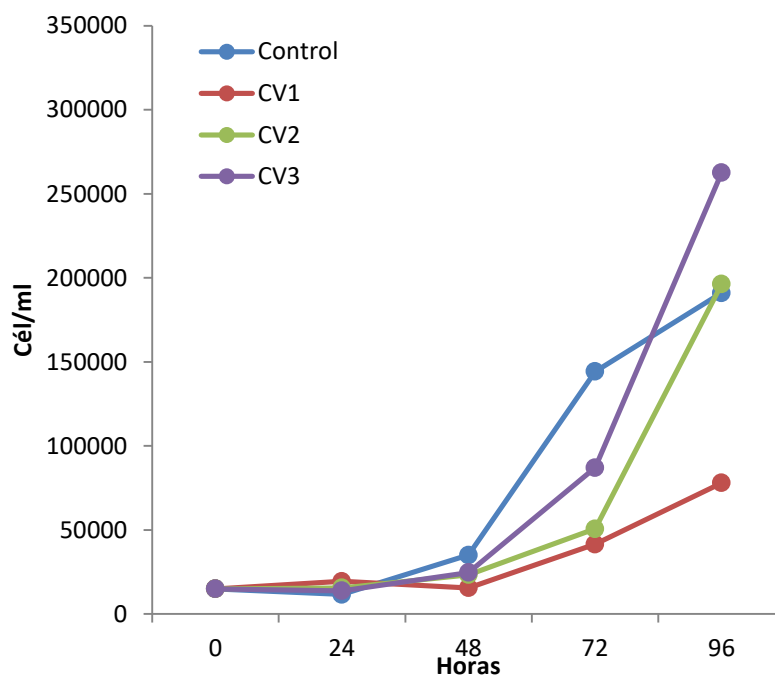
TC E3

12.1.1. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Canal Vieja (CV) (Ma-14dic'17)

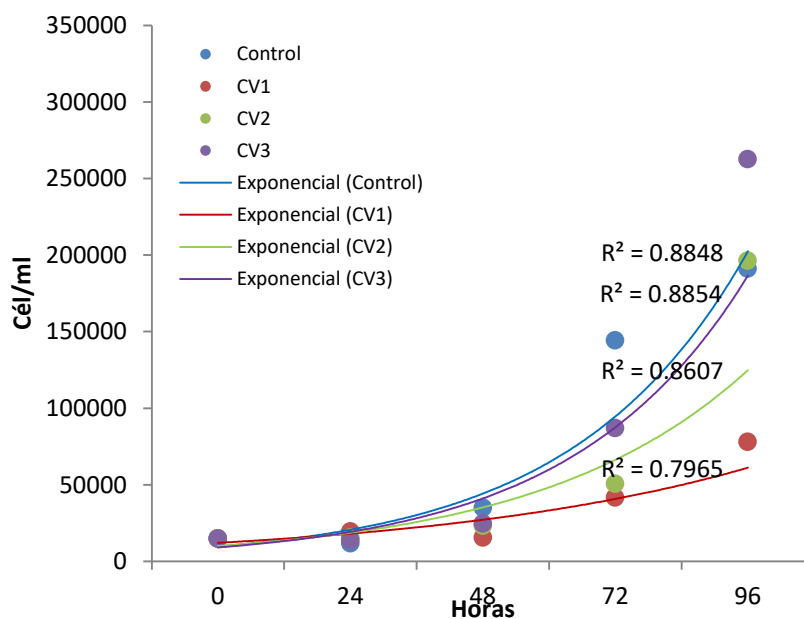
Tetraselmis suecica

Densidad celular

Curvas de crecimiento: a) Control, CV1, CV2, CV3
 Líneas de tendencia: b) Control, CV1, CV2, CV3



a



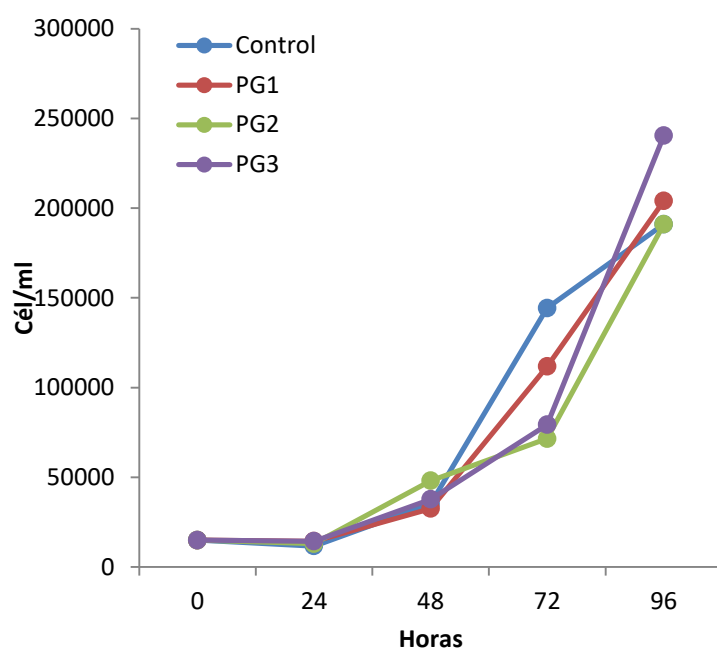
b

12.1.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Puerto Galván (PG) (Ma-15dic'17)

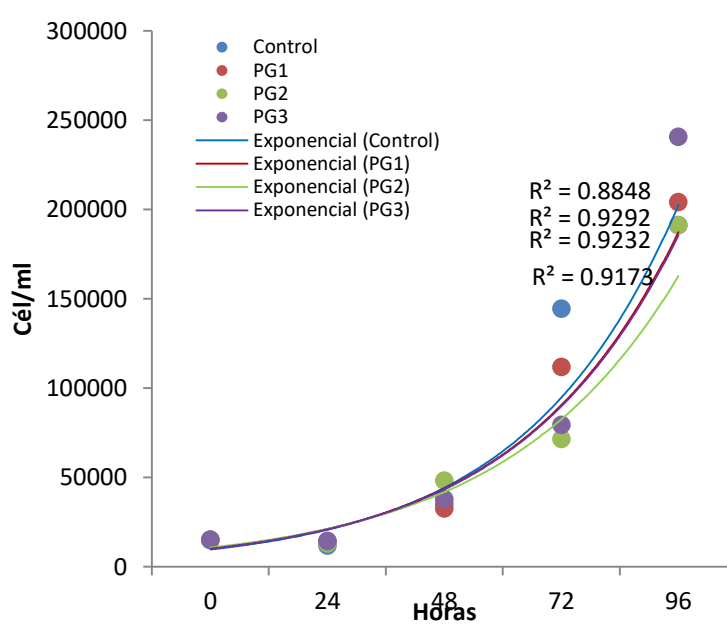
Tetraselmis suecica

Densidad celular

Curvas de crecimiento: a) Control, PG1, PG2, PG3
 Líneas de tendencia: b) Control, PG1, PG2, PG3



a



b

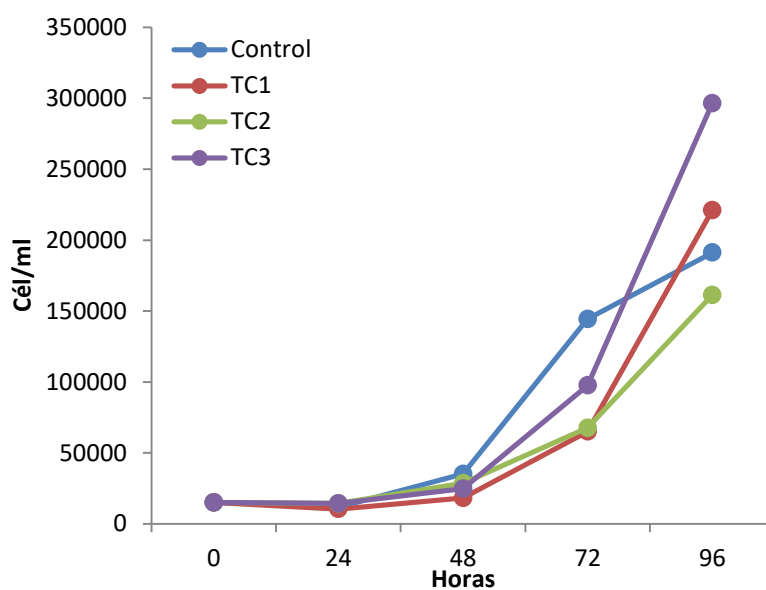
12.1.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Tercera Cuenca (TC) (Ma-12dic'17)

Tetraselmis suecica

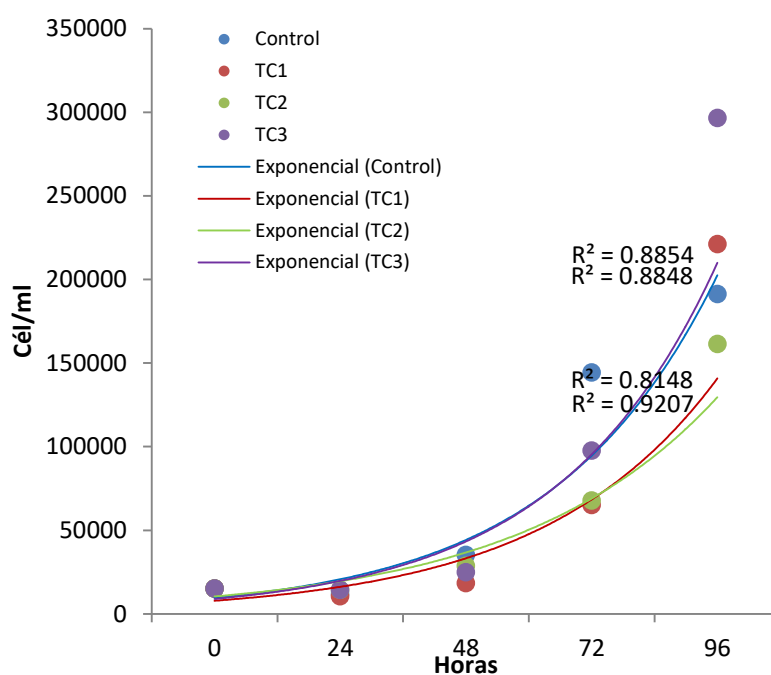
Densidad celular

Curvas de crecimiento: a) Control, TC1, TC2, TC3

Líneas de tendencia: b) Control, TC1, TC2, TC3



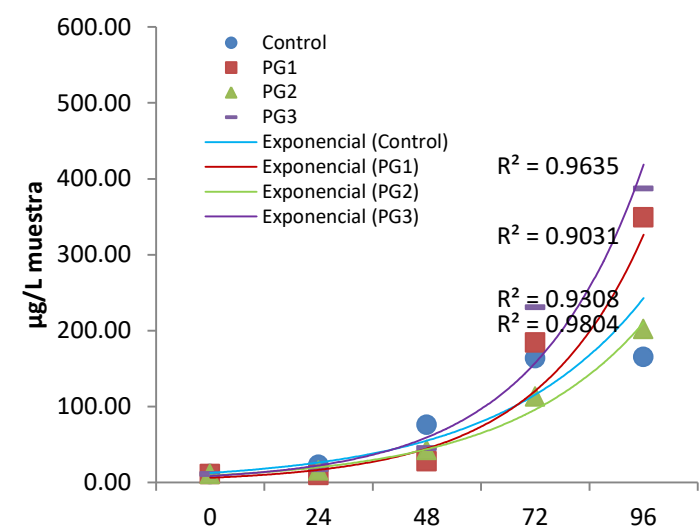
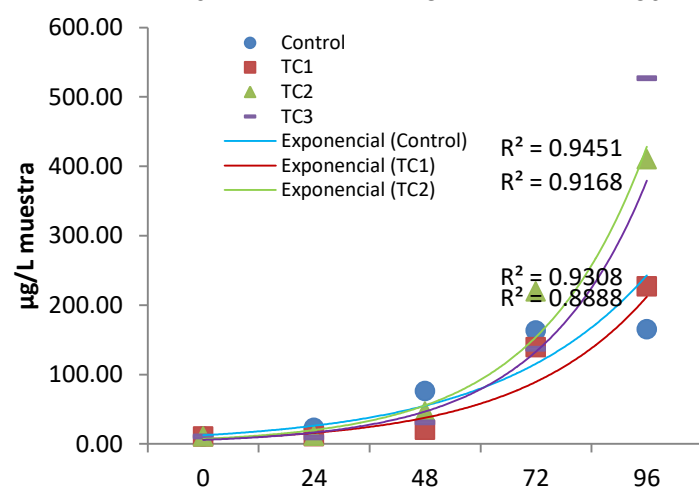
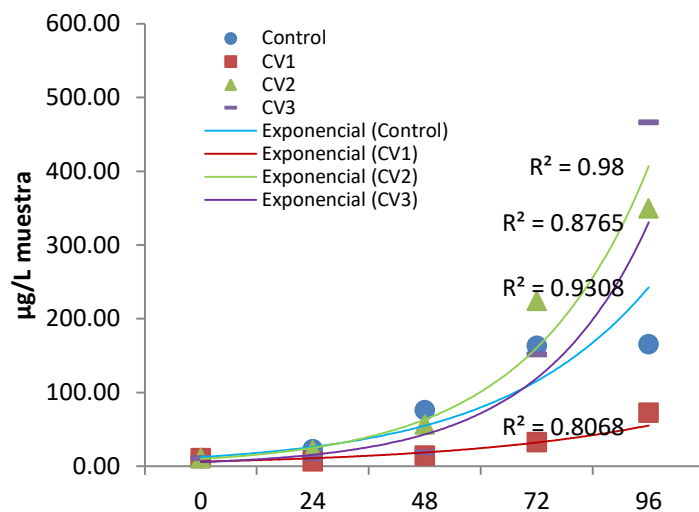
a



b

Tetraselmis suecica

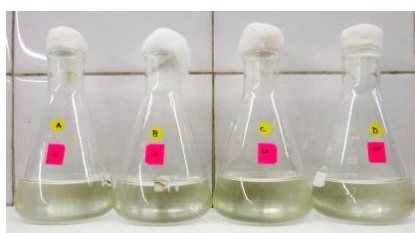
Clorofila "a"



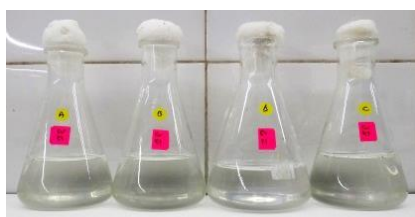
12.2. Bioensayos con *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* en elutriado del sedimento del estuario

Muestras accesorias (Ma-12dic'17), (Ma-14dic'17) y (Ma-15dic'17)

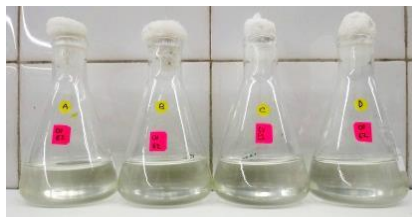
Canal Vieja (CV) Tercera Cuenca (TC) Puerto Galván (PG)



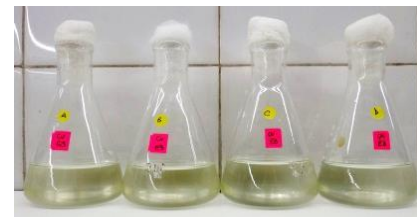
Control



CV E1



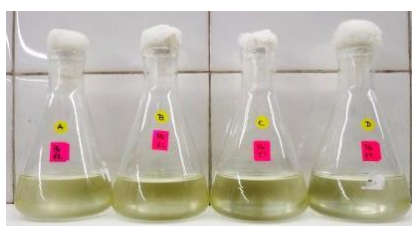
CV E2



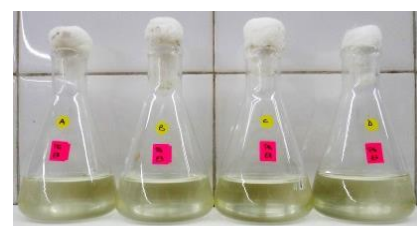
CV E3



PG E1



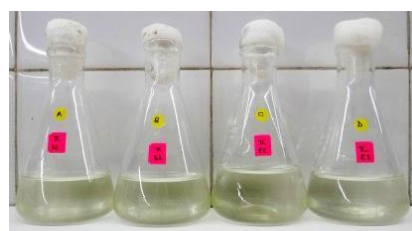
PG E2



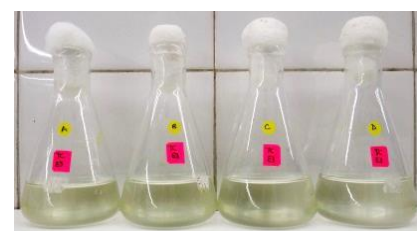
PG E3



TC E1



TC E2



TC E3

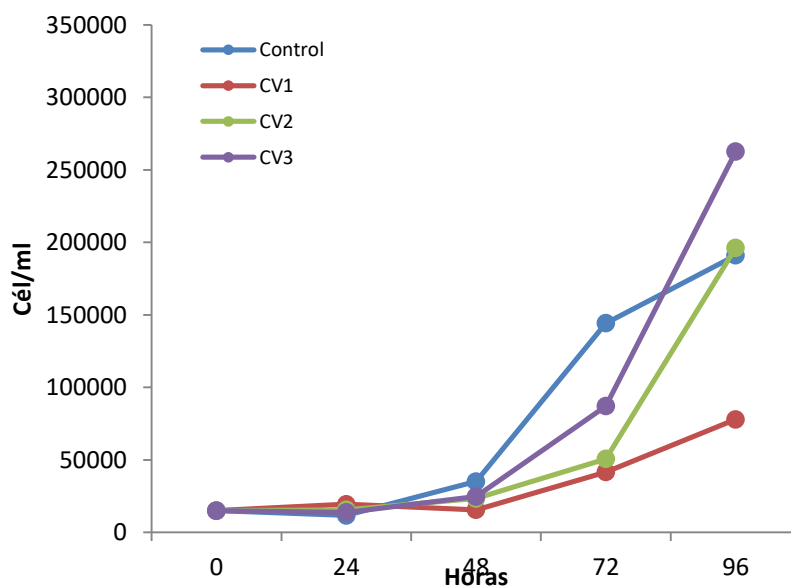
12.2.1. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Canal Vieja (CV) (Ma-14dic'17)

Nitzschia aff. kuetzingioides

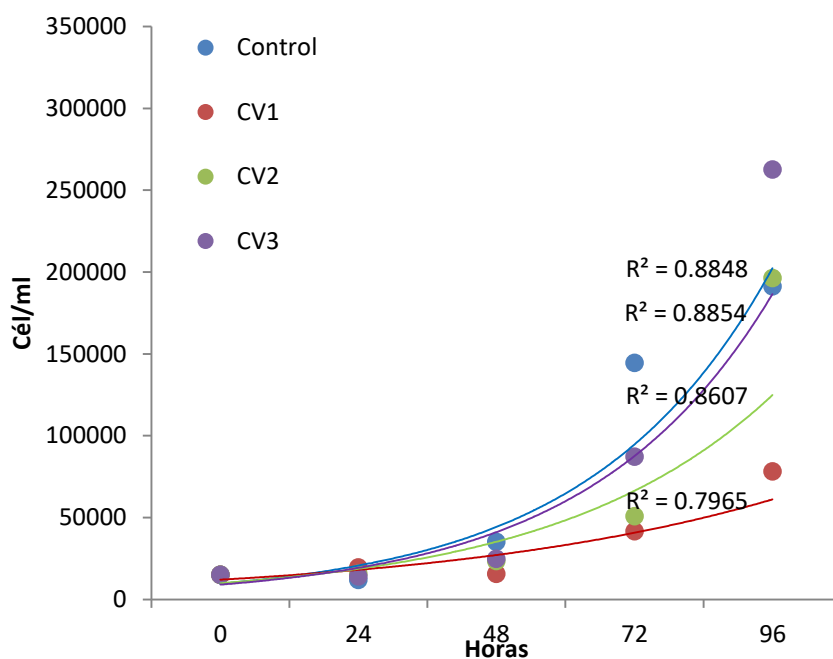
Densidad celular

Curvas de crecimiento: a) Control, CV1, CV2, CV3

Líneas de tendencia: b) Control, CV4, CV5, CV6



a



b

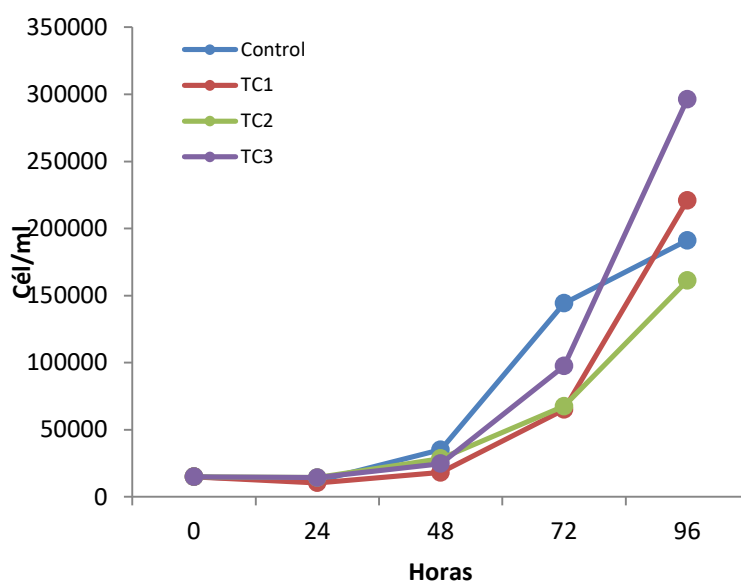
12.2.2. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Tercera Cuenca (TC) (Ma-12dic'17)

Nitzschia aff. kuetzingioides

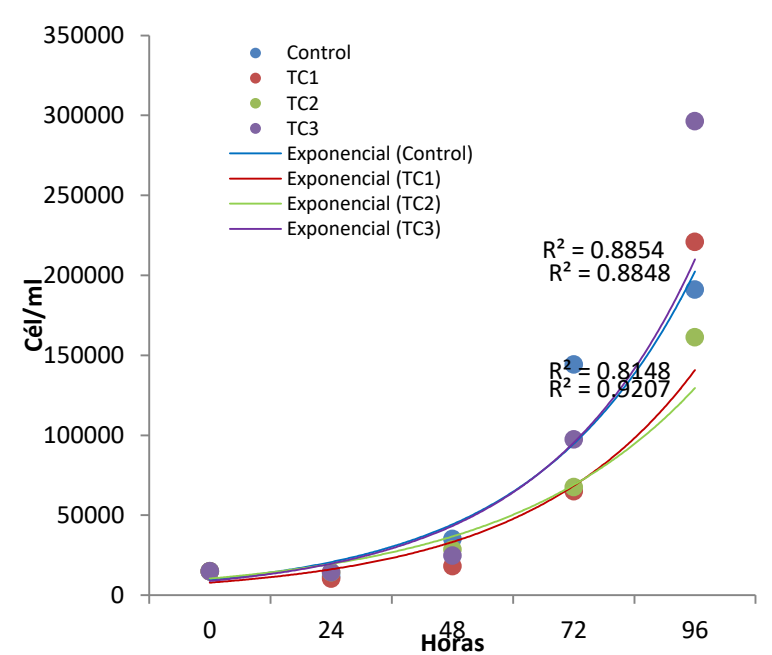
Densidad celular

Curvas de crecimiento: a) Control, TC1, TC2, TC3

Líneas de tendencia: b) Control, TC1, TC2, TC3



a



b

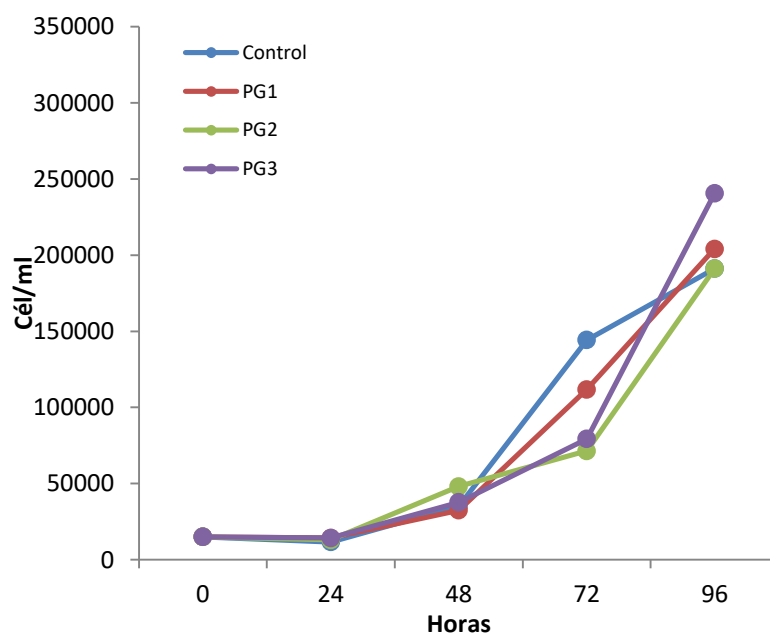
12.2.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente del muestreo accesorio en Puerto Galván (PG) (Ma-15dic'17)

Nitzschia aff. kuetzingioides

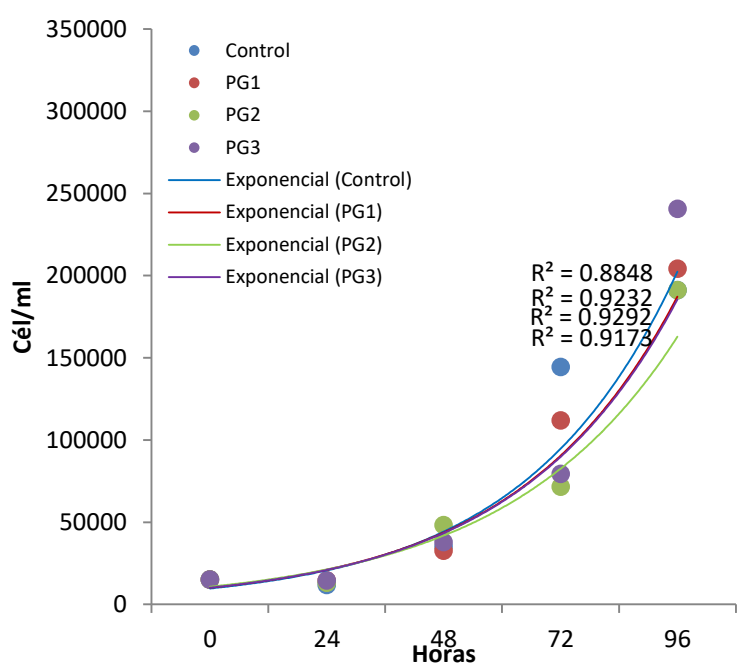
Densidad celular

Curvas de crecimiento: a) Control, PG1, PG2, PG3

Líneas de tendencia: b) Control, PG4, PG5, PG



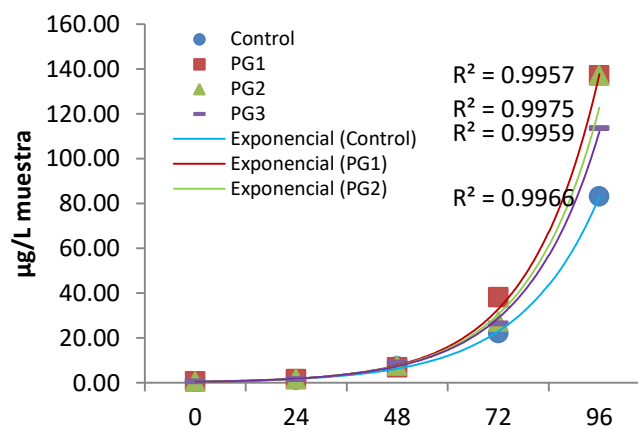
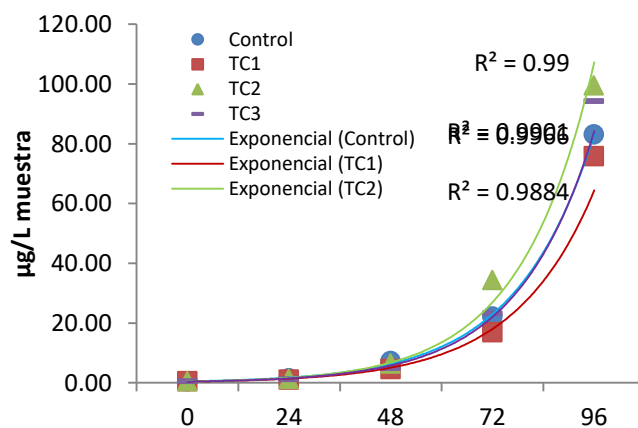
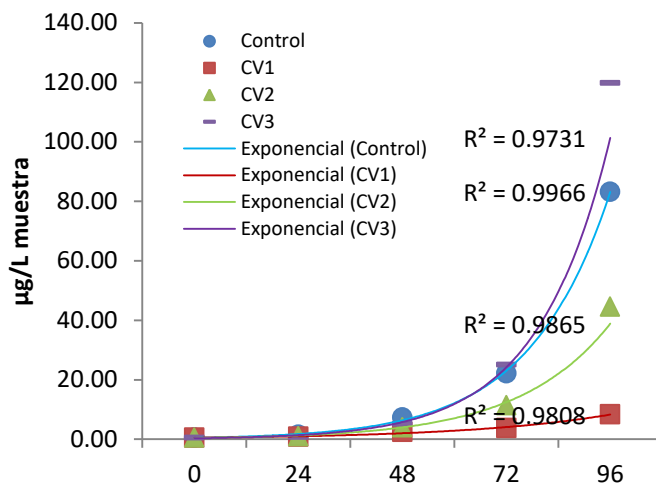
a



b

Nitzschia aff. kuetzingioides

Clorofila "a"

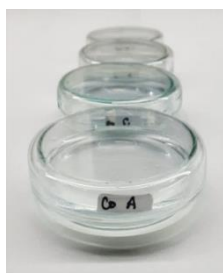


12.3. Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos accesorios (Ma-12dic'17), (Ma-14dic'17) y (Ma-15dic'17)

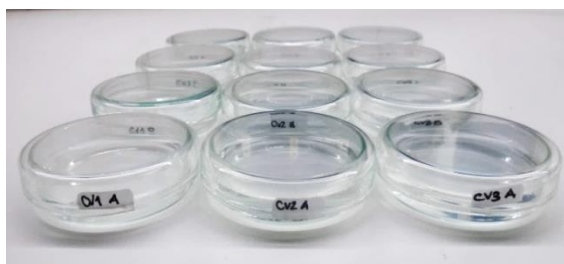
Larvas metanauplio de *Artemia salina* Linnaeus 1758



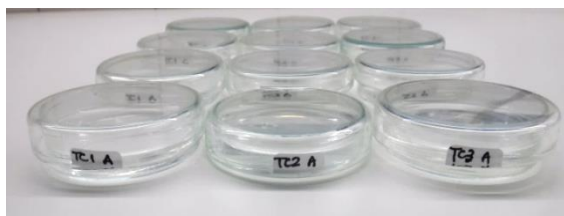
Canal Vieja (CV) Tercera Cuenca (TC) Puerto Galván (PG)



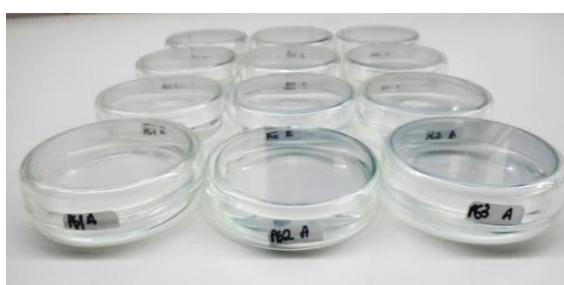
Control



CV



TC

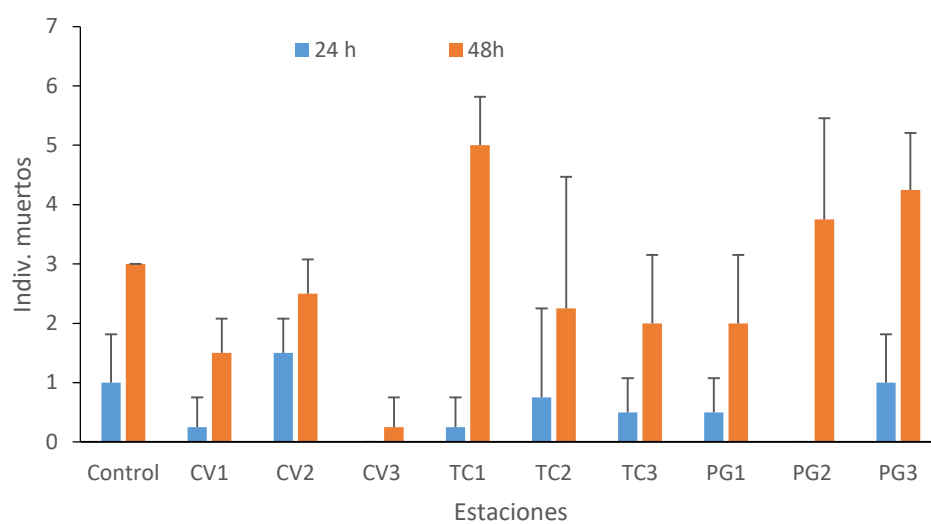


PG

Larvas metanauplio de *Artemia salina* Linnaeus 1758

Elutriado

Mortalidad



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

**Bioensayos realizados en elutriado de sedimentos del
estuario provenientes de Puerto Galván, Tercera
Cuenca y Canal Vieja**

13. Bioensayos realizados en elutriado de sedimentos del estuario provenientes de Puerto Galván, Tercera Cuenca y Canal Vieja

13.1. Bioensayos realizados con *T. suecica* y *N. aff. kuetzingioides* en elutriado del sedimento en muestras provenientes de Canal Vieja, Puerto Galván y Tercera Cuenca

Se analizaron:

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

Especie	Variable	Factor	Grupos	F	p
<i>T. suecica</i>	Densidad celular	canales	CV, TC, PG, control	F=0,64	0,5938 ns
		CV	CV1, CV2, CV3, control	F=2,92	0,0776 ns
		TC	TC1, TC2, TC3, control	F=10,28	<0,01 **
		PG	PG1, PG2, PG3, control	F=0,45	0,7191 ns
	Clorofila "a"	canales	CV, TC, PG, control	F=3,55	<0,05 *
		CV	CV1, CV2, CV3, control	F=30,07	<0,01 **
		TC	TC1, TC2, TC3, control	F=10,7	<0,01 **
		PG	PG1, PG2, PG3, control	F=6,6	<0,01 **
	Tasa de crecimiento	canales	CV, TC, PG, control	F=1,54	0,2204 ns
		CV	CV1, CV2, CV3, control	F=7,64	<0,01 **
		TC	TC1, TC2, TC3, control	F=11,59	<0,01 **
		PG	PG1, PG2, PG3, control	F=0,22	0,8772 ns
<i>N. aff. kuetzingioides</i>	Densidad celular	canales	CV, TC, PG, control	F=4,48	0,009
		CV	CV1, CV2, CV3, control	F=5,34	<0,05 *
		TC	TC1, TC2, TC3, control	F=4,91	<0,05 *
		PG	PG1, PG2, PG3, control	F=0,56	0,6511 ns
	Clorofila "a"	canales	CV, TC, PG, control	F=8,13	<0,01 **
		CV	CV1, CV2, CV3, control	F=23,41	<0,01 **
		TC	TC1, TC2, TC3, control	F=1,35	0,3046 ns
		PG	PG1, PG2, PG3, control	F=2,72	0,0914 ns
	Tasa de crecimiento	canales	CV, TC, PG, control	F=7,48	<0,01 **
		CV	CV1, CV2, CV3, control	F=21,85	<0,01 **
		TC	TC1, TC2, TC3, control	F=6,63	<0,01 **
		PG	PG1, PG2, PG3, control	F=0,48	0,704 ns

Tabla 12: 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 elutriado del

sedimento provenientes de tres canales diferentes (CV, TC y PG). F= estadístico del ANOVA y p=valor de probabilidad estadística.

Densidad celular

Los bioensayos realizados tanto con *T. suecica* como con *N. aff. kuetzingioides* no mostraron diferencias significativas en la densidad celular promedio entre canales a las 96 horas (Figs. 102a, 103a). Al considerar sitios dentro de cada canal, en los bioensayos con *T. suecica* en **TC1** se registró una densidad celular significativamente mayor, en cambio en los ensayos con *N. aff. kuetzingioides* tanto **CV3** como **TC3** presentaron una densidad celular significativamente menor al control (Figs. 102b, 103b).

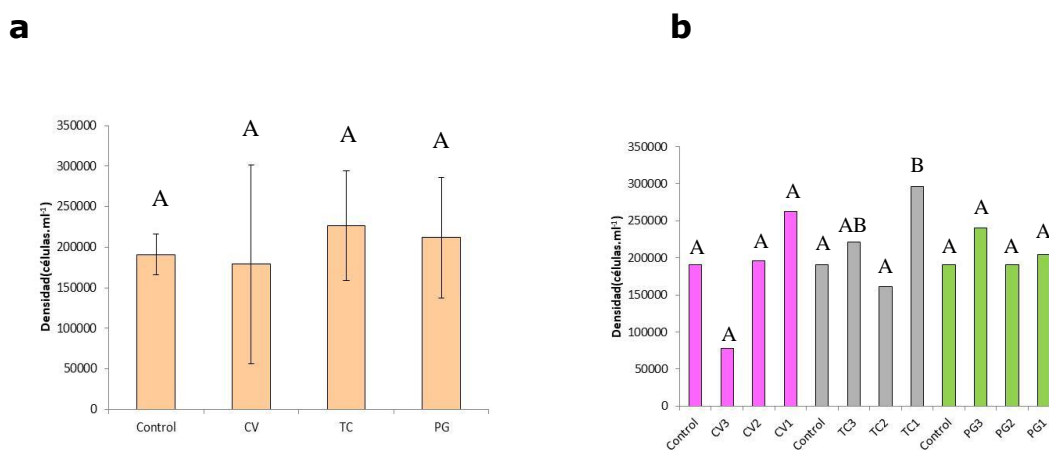


Figura 102: Variación en la densidad celular promedio en bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en elutriado de sedimento. a) comparación entre canales y con el control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

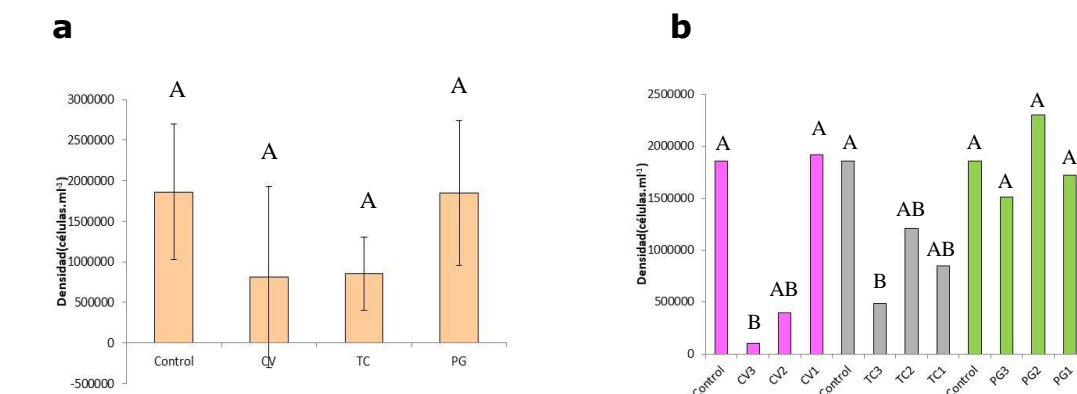


Figura 103: Variación en la densidad celular promedio en bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en elutriado de sedimento. a) comparación entre canales y con el control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

Clorofila "a"

Los bioensayos realizados con *T. suecica* mostraron una concentración de clorofila "a" promedio estadísticamente mayor en los ensayos realizados con elutriado provenientes de **TC** (Fig. 104a). Al considerar sitios dentro de cada canal, los sitios **CV1** y **CV2**, **TC1** y **PG1** y **PG3** presentaron las concentraciones de clorofila estadísticamente mayores (Fig. 104b).

Los bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides* mostraron una concentración de clorofila "a" promedio estadísticamente mayor en el canal PG (Fig. 105a). Al considerar sitios dentro de cada canal, **CV3** presentó una concentración de clorofila "a" estadísticamente mientras que **CV1** presentó una concentración estadísticamente mayor (Fig 105b).

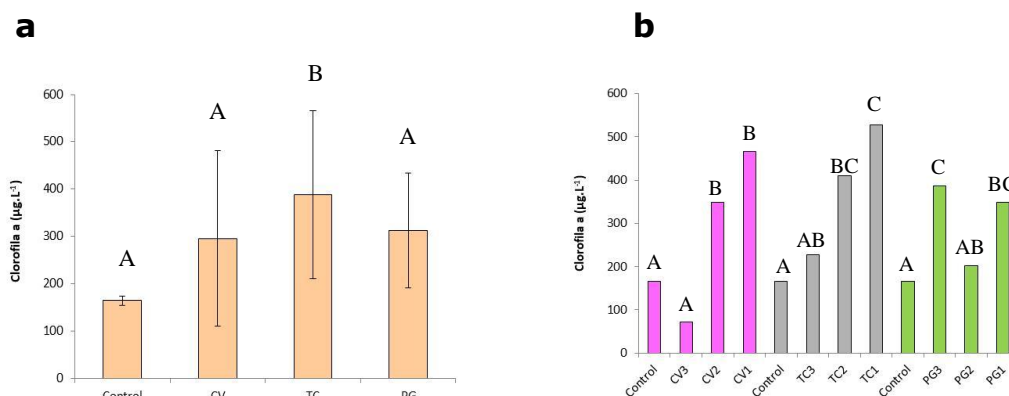


Figura 104: Variación en la concentración de clorofila a promedio en bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en elutriado de sedimento. a) comparación entre canales y con el control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

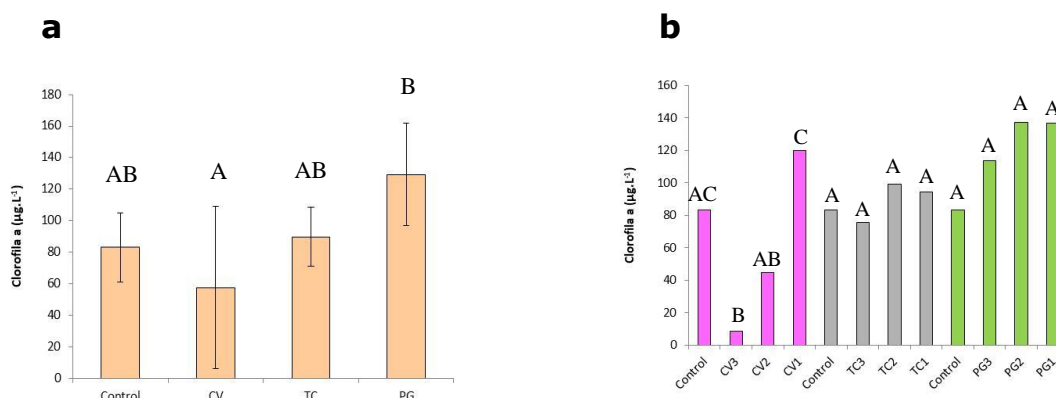


Figura 105: Variación en la concentración de clorofila a promedio en bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en elutriado de sedimento. a) comparación entre canales y con el control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

Tasa de crecimiento

Los bioensayos realizados tanto con *T. suecica* como con *N. aff. kuetzingioides* no mostraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento promedio entre canales muestreados (**PG, CV y TC**) a las 96 horas (Figs. 106a, 107a). Al considerar sitios dentro de cada canal, en los bioensayos con *T. suecica* en **CV3** se registró una tasa de crecimiento significativamente menor y en **TC1** mayor. En los ensayos con *N. aff. kuetzingioides*, en cambio, en **CV2, CV3 y TC3** se registraron las tasas de crecimiento menores (Fig. 107b).

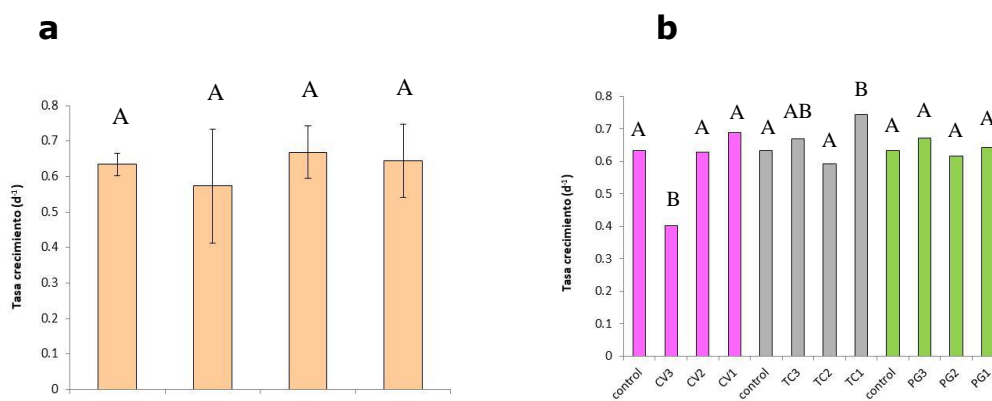


Figura 106: Variación en la tasa de crecimiento promedio en bioensayos realizados con *Tetraselmis suecica* en elutriado de sedimento. a) comparación entre canales y con el control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

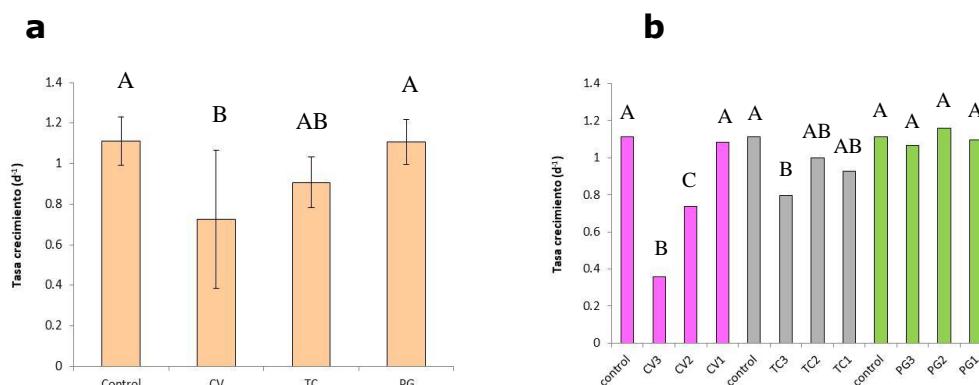


Figura 107: Variación en la tasa de crecimiento promedio en bioensayos realizados con *Nitzschia aff. kuetzingioides* en elutriado de sedimento. a) comparación entre canales y con el control. b) comparación entre sitios dentro de cada canal y con el control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Tukey).

INTERPRETACIÓN (muestreo accesorio)

Está basada en los resultados de los bioensayos realizados y los datos entregados por el CTE, correspondientes a los informes parciales del Programa de Monitoreo.

Durante los bioensayos realizados con **elutriado** del sedimento proveniente de la estación **CV3** se vio afectada la densidad celular, el contenido de clorofila "a" y la tasa de crecimiento de ambas microalgas, esto podría deberse a los valores más elevados de Cu (51,30 mg/kg), de fluoreno (23,21 ppb, p.s.) y de antraceno (861,82 ppb, p.s.) registrados en ese sitio de muestreo y comparados por los estándares de la EPA.

Por otra parte, en los bioensayos con **elutriados** provenientes de **PG2** también se registró una baja densidad celular, contenido de clorofila y tasa de crecimiento en *Tetraselmis suecica*, coincidentemente con el valor más elevado de PAHs totales (736,4 ppb, p.s.), excediendo acenafteno (19,2 ppb, p.s.) y fluoreno (24 ppb, p.s.); sin embargo esta alta concentración de PAHs no afectó el crecimiento de *Nitzschia aff. kuetzingioides*, ya que presentó el mayor crecimiento en dicha estación.



13.2. Estado fisiológico: Regresión entre densidad celular-clorofila "a"

Bioensayos con elutriado del sedimento del estuario proveniente de los muestreos accesorio en Canal Vieja (CV) (Ma-12dic'17), Tercera cuenca (TC) (Ma-14dic'17) y Puerto Galván (PG) (Ma-15dic'17)

Estado fisiológico: Regresión entre densidad celular - clorofila "a"

Tetraselmis suecica 

Nitzschia aff. kuetzingioides 

	 elutriado	 elutriado
control	0,51	0,93
(Ma-12dic'17)		
CV1	0,3	0,78
CV2	0,4	0,9
CV3	0,67	0,89
(Ma-14dic'17)		
TC1	0,23	0,8
TC2	0,53	0,94
TC3	0,69	0,91
(Ma-15dic'17)		
PG1	0,7	0,93
PG2	0,49	0,92
PG3	0,55	0,88

Se observaron valores de R^2 muy bajos en los bioensayos con *T. suecica* en elutriado de sedimento de los sitios **CV1**, **CV2**, **TC1**, **TC2**, **PG2** y **PG3**

En términos generales en ningún ensayo se observó un desacople entre la clorofila "a" y la densidad celular. Sin embargo, en la estación **E4** se observaron con mayor frecuencia valores bajos de R^2 .

INTERPRETACIÓN

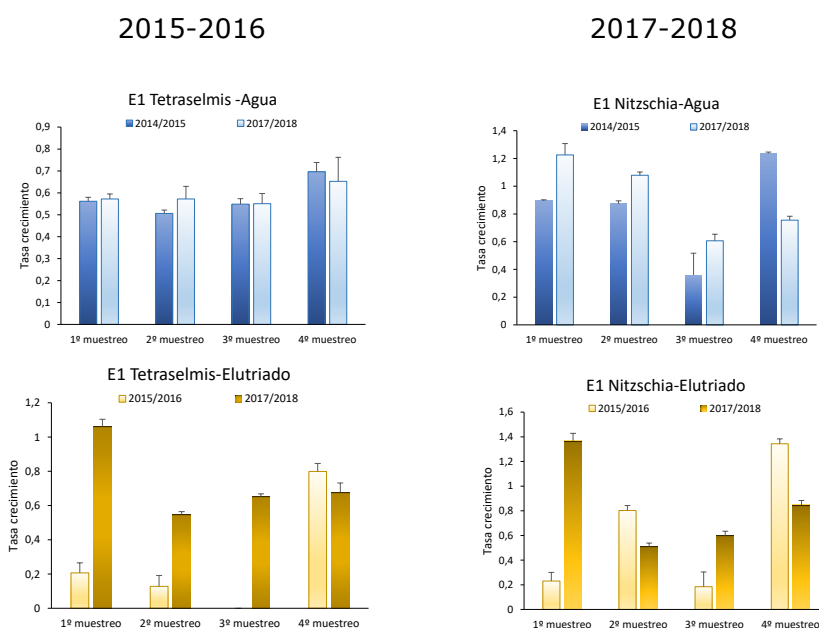
En los ensayos control con ambas especies siempre se hallaron regresiones significativas positivas entre la densidad de microalgas y el contenido de clorofila "a", lo cual resulta esperable ya que el contenido de clorofila es un estimador de la biomasa celular.

Sin embargo, en algunas oportunidades durante el desarrollo de los bioensayos con *T. suecica* se observó una falta de regresión entre estas dos variables presentando valores de R^2 bajos en todos los bioensayos con elutriado de sedimento de los sitios de muestreo y especialmente bajos en **CV1, CV2 y TC1**. Este desacople podría indicar un mal estado fisiológico de las microalgas provocado por la presencia de sustancias tóxicas específicas o por la mezcla de las mismas en el elutriado del sedimento evaluado.

En los ensayos con *N. aff. kuetzingioides*, en cambio, no se observó tal desacople entre los valores de densidad celular y la concentración de clorofila "a" en el ensayo control ni en los ensayos con elutriado de los distintos sitios de muestreo.

14. Comparación de tasas de crecimiento estimadas en cada estación de muestreo en el estudio realizado en 2015-2016 con este estudio actual 2017-2018

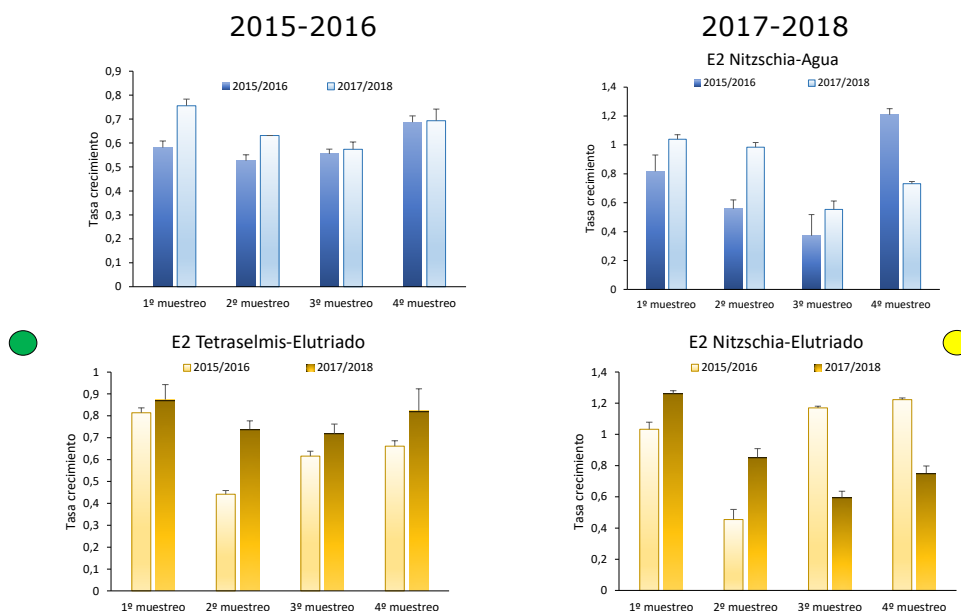
14.1. Estación de muestreo E1



Un patrón similar entre ambos estudios fue observado solo en ensayos con *T. suecica* en **agua**. En ambos sets de bioensayos 2015-2016 y 2017-2018, los periodos con bajos valores de crecimiento coincidieron en las fechas de muestreo.

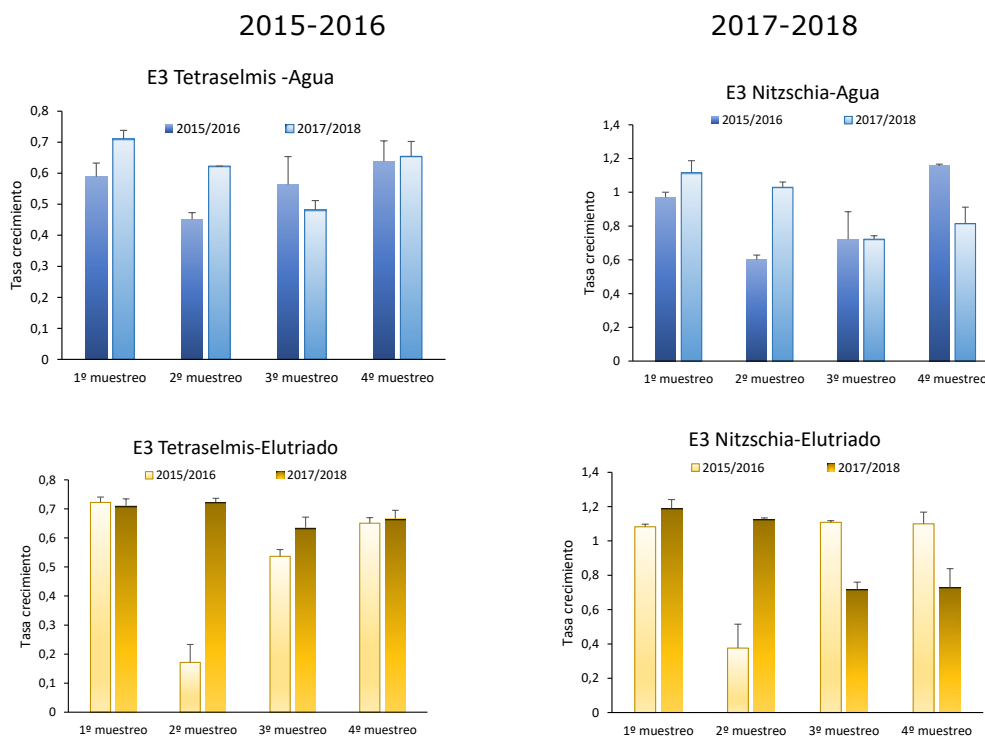
En cambio, en los bioensayos realizados con *N. aff. kuetzingioides*, la comparación entre ambos estudios difiere de lo mencionado para *T. suecica*. En los tratamientos realizados con el **elutriado** del sedimento del estuario, las tasas de crecimiento más bajas no coincidieron con las estaciones del año comparando ambos estudios. Como se observa en los gráficos de *T. suecica* y *Nitzschia*-**elutriado**, en el primer muestreo, los valores menores de tasa de crecimiento medidos en 2015-2016 coinciden con valores máximos medidos en 2017-2018.

14.2. Estación de muestreo E2



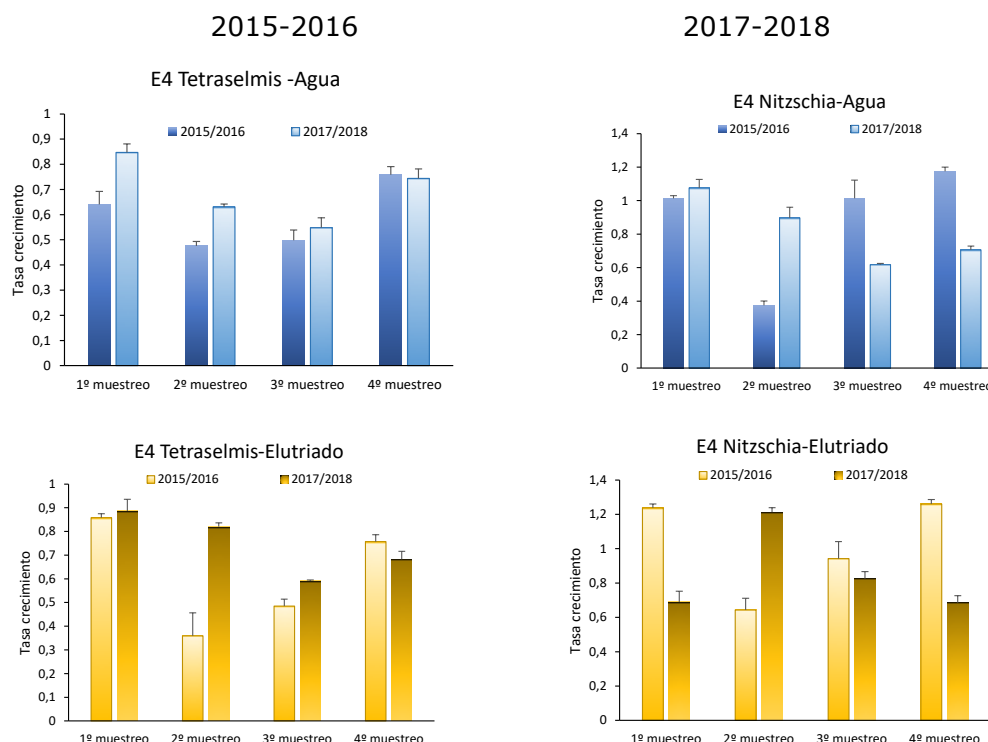
Un patrón similar fue observado solo en ensayos con *T. suecica* tanto en **agua** como **elutriado** de sedimento. En ambos sets de bioensayos (2015-2016) y (2017-2018), los valores más bajos de crecimiento coincidieron con las fechas de muestreo. Este mismo patrón también fue notado para la especie *T. suecica* ensayada con elutriado de sedimento. Una situación diferente fue notada con la especie *N. aff. kuetzingioides*, donde las menores tasas de crecimiento no coinciden en momentos muestreados en ambos periodos.

14.3. Estación de muestreo E3



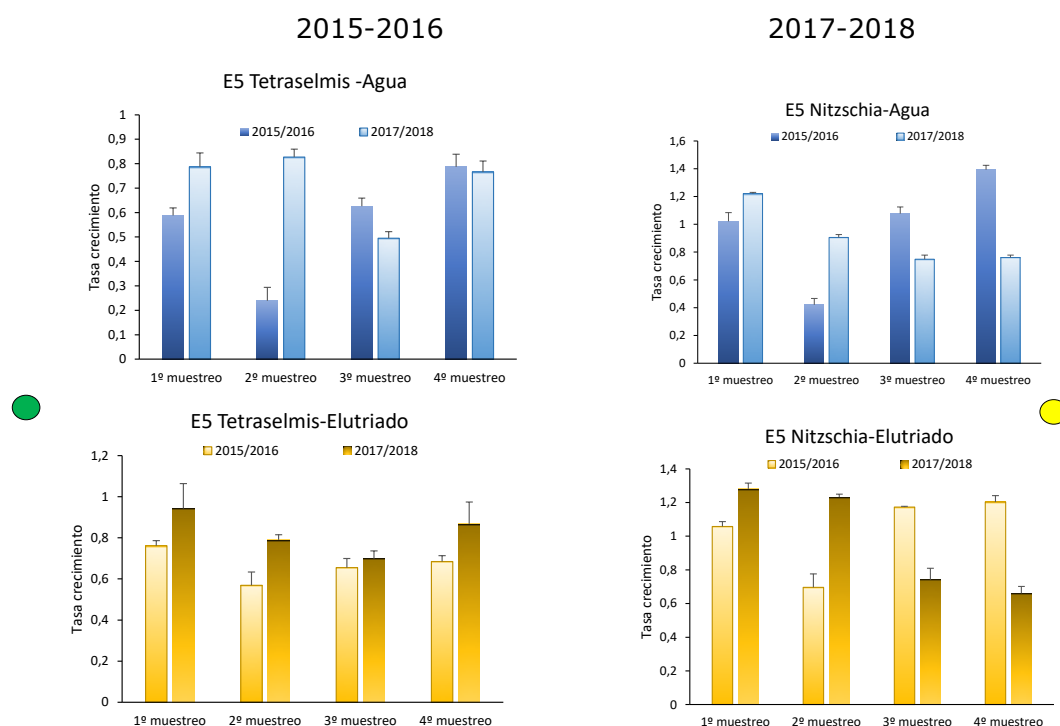
En ensayos realizados en **agua** las tasas de crecimiento más bajas de ambas especies se observaron entre el segundo y tercer muestreo para ambos periodos estudiados. Un patrón diferente fue observado en **elutriado** de sedimento en ambas especies ensayadas, aquí las menores tasas de crecimiento medidas en el periodo (2015-2016) no coinciden con las menores del periodo (2017-2018), por el contrario coinciden con los valores más altos tomados en este último estudio.

14.4. Estación de muestreo E4



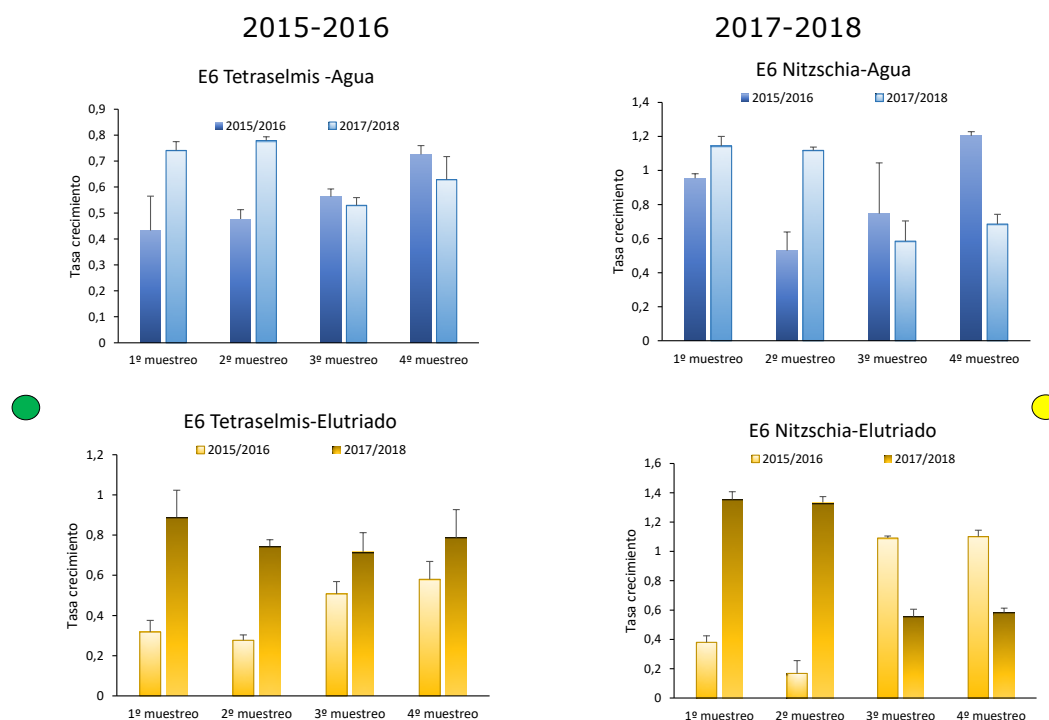
En ensayos realizados en **agua**, las tasas de crecimiento más bajas de *T. suecica* se observaron entre el segundo y tercer muestreo de ambos estudios (2015-2016) y (2017-2018). En cambio, para *N. aff. kuetzingioides* esta coincidencia no ocurrió. En el estudio anterior en el tercer muestreo se observaron las menores tasas de crecimiento, coincidiendo en este estudio (2017-2018) con un muestreo en la cual se determinó alta tasa de crecimiento. Esta última observación se notó en el tratamiento **elutriado** para ambas especies ensayadas.

14.5. Estación de muestreo E5



En ensayos realizados en **agua** y **elutriado** de sedimento las tasas de crecimiento más bajas de *T. suecica* y de *N. aff. kuetzingioides* registradas en el estudio anterior 2015-2016 coincidieron con tasas de crecimiento altas e intermedias del estudio actual (2017-2018).

14.6. Estación de muestreo E6



Como también se observó en otras estaciones de muestreo, en E6, en ensayos realizados en **agua** y **elutriado** de sedimento las tasas de crecimiento más bajas de *T. suecica* y de *N. aff. kuetzingioides* registradas en el estudio del periodo anterior 2015-2016 coincidieron con tasas de crecimientos altas e intermedias del estudio actual.

Interpretación

Al comparar los estudios realizados en (2015-2016) no pudo establecerse un patrón temporal de ecotoxicidad del **agua**, ni tampoco en el **elutriado** del sedimento del estuario.

CONCLUSIONES

En este segundo 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 dinámica de crecimiento y estado fisiológico y también de un organismo consumidor *Artemia salina* (Crustaceae) donde se estimó su tasa de mortalidad. Se probó la significación estadística de los resultados y se elaboraron síntesis gráficas interpretativas.

ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS MICROALGAS		1°M-ago'17		2°M-dic'17		3°M-feb'18		4°M-may'18	
		Agua		Agua		Agua		Agua	
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>	○		●		○		○	

A

●	○	○	○	●
Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno

ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS MICROALGAS		1°M-ago'17		2°M-dic'17		3°M-feb'18		4°M-may'18	
			Elut.		Elut.		Elut.		Elut.
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>		○		●		○		○

B

Representación gráfica del estado fisiológico (densidad celular:clorofila "a") de los dos organismos fitoplanctónicos evaluados, al final de los bioensayos. **A:** agua, **B:** elutriado.

2015
2016

ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS MICROALGAS		1ºM- may'15		2ºM- sep'15		3ºM- dic'15		4ºM- mar'16	
		Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.
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>	○	○	○	○	○	○	○	○

●	○	○	○	●
Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno

2017
2018

ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS MICROALGAS		1ºM- ago'17		2ºM- dic'17		3ºM- feb'18		4ºM- may'18	
		Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.	Agua	Elut.
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>	○	○	○	○	○	○	○	○

Comparación gráfica de la ecotoxicidad del agua y sedimento de la zona interna del estuario Bahía Blanca basada en estados fisiológicos (densidad celular:clorofila "a") al final de los bioensayos, de las dos microalgas evaluadas en 2015-2016 y 2017-2018.

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

- La prueba de sensibilidad de dicromato de potasio realizada en las especies de microalgas *Tetraselmis suecica* y *Nitzschia* aff. *kuetzingioides* y del crustáceo *Artemia salina* demostró un comportamiento diferencial de las 3 variables biológicas contempladas para el desarrollo de los bioensayos: crecimiento y concentración de clorofila "a" microalgal y mortalidad de *Artemia*.
- En orden de sensibilidad se puede establecer que *T. suecica* fue el organismo más sensible, seguido de *N. aff. kuetzingioides* y por último *A. salina*.
- La utilización de dos organismos de diferentes niveles tróficos frente al empleo de solo especies productoras primarias en la realización de los bioensayos otorgó una mayor relevancia ecológica a las valoraciones ya que los organismos no presentaron las mismas respuestas al ser expuestos tanto en agua como en elutriado del sedimento de las estaciones de muestreo seleccionadas.
- E2 presentó una situación ecotoxicológica comprometida en febrero de 2018 (3°M-feb'18) reflejada en una muy baja tasa de crecimiento y presencia de malformaciones en los frústulos de la diatomea al final de los bioensayos realizados con elutriado de los sedimentos del estuario, coincidentemente con concentraciones de organoclorados con valores que excedieron a los establecidos por la Dutch Target and Intervention Values, 2000.
- Las condiciones ecotoxicológicas del agua en E3 se mantuvieron aceptables durante las cuatro baterías de bioensayos permitiendo

que las microalgas alcanzaran un buen estado fisiológico debido a una adecuada concentración de nitratos.

- Mientras que en E4 la condición ecotoxicológica estuvo comprometida en todos los muestreos por aumento de la concentración de organoclorados y en el primer muestreo (1°M-ago´17) por aumento de Hg que superó los límites aceptados que causó condiciones adversas para el desarrollo de ambas especies de microalgas que registraron baja tasa de crecimiento y concentración de clorofila "a" y presencia de anomalías en los frústulos de las diatomeas.
- Durante los dos últimos muestreos de febrero (3°M-feb´18) y mayo de 2018 (4°M-may´18) se observó un mayor desacople entre la concentración de clorofila "a" y la densidad de individuos, que representó un buen indicador del estado fisiológico de los organismos ya que coincidió con situaciones de baja densidad de células, lo cual indicaría que los factores que afectan el crecimiento celular estarían también influyendo en la fisiología de las microalgas. Este fenómeno fue más frecuentemente observado en los sitios de muestreo E3 y E4 en febrero y E5 en mayo en bioensayos en agua con *T. suecica*. Sin embargo en el febrero también se observó un desacople de relativa importancia en todos los sitios en esta misma especie, compartiéndolo con *N. aff. kuetzingioides* en ensayos en elutriado del sedimento del mes de mayo.
- Alteración del estado fisiológico y anomalías morfológicas en la diatomea *N. aff. kuetzingioides* fueron registradas fundamentalmente en los bioensayos con elutriado del sedimento en E4 y E5 durante agosto de 2017 (1°M-ago´17), coincidentemente con valores que superan la normativa vigente de Hg tanto en la fracción total como en la fina, compuestos

aromáticos (PAHs) como fenantreno y antraceno y organoclorados como Heptaclor y α -Endosulfan presentes en el sedimento en estos dos sitios de muestreo. Sin embargo, es difícil poder concluir qué compuestos fueron los responsables de los efectos observados sobre el crecimiento de *T. suecica* y crecimiento y malformaciones del frústulo de *N. aff. kuetzingioides* debido a que, por tratarse de un medio de cultivo no sintético, contiene una gran diversidad de compuestos (metales, PAHs, agroquímicos y probablemente muchos otros compuestos no determinados) y es imposible individualizar, mediante los bioensayos realizados, la respuesta de las microalgas a cada uno de estos compuestos.

- Considerando que la ocurrencia en simultáneo de diferentes compuestos generan múltiples factores de estrés que ejercen presión causando una mayor sensibilidad de las células de diatomeas a los efectos perjudiciales acumulativos sinérgicos, aditivos o antagónico entre ellos, ya que cualquiera de los factores estresantes pudo actuar sobre ciertas funciones celulares, por ejemplo, desintoxicación, mientras que el otro factor estresante reduciría otro vía metabólica involucrada en la formación de frústulos, reduciendo la capacidad general de la célula para hacer frente a los factores de estrés combinados impidiéndole producir células normales.
- Los sitios de muestreo E1, E3, E4 y E5 representan los sitios más sensibles que deberían requerir especial atención en futuros programas de gestión ambiental. Sin embargo, en los restantes sitios de muestreo también se observaron situaciones puntuales de efectos tóxicos que podrían estar asociados con situaciones de vertidos puntuales de sustancias contaminantes y por lo tanto se recomienda continuar con la evaluación.

- Por otra parte, pudo evidenciarse un efecto ecotoxicológico inhibitorio de buen estado fisiológico de ambas microalgas en todos los sitios de muestreo en febrero de 2018 (3°M-feb'18), a partir de los resultados de los bioensayos realizados en agua. Esto podría relacionarse con un aumento en la concentración de varios metales como Fe, Hg, Zn, Cu, Cr, Cd y amonio, aún cuando las mismas se encontraron por debajo de los límites permitidos y dado que los bioensayos se realizan bajo condiciones de luz, temperatura controladas que permiten dejar de lado posibles interferencias de parámetros físicos que podrían modificar los resultados.
- Los sedimentos en los sitios de muestreo E3, E4, E5 y E6 también tuvieron un estado ecotoxicológico comprometido, probado mediante los bioensayos con elutriado de sedimento recolectado en agosto de 2017 (1°M-ago'2017), y en mayo de 2018 (4°M-may'18) con la diatomea *N. aff. kuetzingioides* en todos ellos, se observó un evidente deterioro en el estado fisiológico y malformaciones de los frústulos, coincidentemente con altas concentraciones en organoclorados, PHAs y metales pesados como Zn, Cu y Cd.
- Se sugiere una elevada movilidad de compuestos ecotoxicológicos, similar tanto en agua como en sedimentos y, consecuentemente, una alta capacidad autodepurativa integral del sistema. Como por ejemplo, en los bioensayos realizados en elutriado de sedimento provenientes del muestreo de agosto de 2017 (1°M-ago'17) con *N. aff. kuetzingioides* se observó el peor estado fisiológico en E4 y E5, recuperándose ambos sitios y alcanzando óptimos valores en el muestreo siguiente (2°M-dic'17).

- Esta capacidad autodepurativa resultó también válida para amonio del agua del estuario ya que quedó demostrada por el análisis de los resultados de los bioensayos. Una llamativa situación se generó en E1 en febrero de 2018 (3°M-feb'18) cuando la concentración de amonio alcanzó valores nunca antes registrados en el estuario durante los Programas de Monitoreo previos. Este valor fue cercano a los valores de inhibición del crecimiento para diatomeas. Esa ecotoxicidad puntual pudo comprobarse por los resultados de los bioensayos en agua con *N. aff. kuetzingioides* dado que se obtuvo la más baja densidad celular, concentración de clorofila "a" y tasa de crecimiento en la diatomea. Esta situación se revirtió y en el siguiente muestreo, en mayo de 2018 (4°M-may'18) el estado ecotoxicológico del agua del estuario resultó sumamente favorable, debido al descenso de la concentración de amonio que incrementó la densidad celular y concentración de clorofila "a", favoreciendo el estado fisiológico de *T. suecica* durante los bioensayos.
- De los sitios sensibles detectados en este estudio (E1, E3, E4 y E5), sólo E1 coincide con los detectados en el informe 2015-2016 (E1 y E6), remarcando la importancia de un seguimiento exhaustivo para poder realizar eficientes programas de mitigación ambiental.
- Se registró una situación ecotoxicológica comprometida para organismos consumidores del segundo eslabón de la cadena alimenticia en cada uno de los distintos sitios de muestreo en todas las fechas. Los bioensayos con un elutriado de los sedimentos demuestran una alta mortalidad de las larvas del crustáceo *Artemia salina* que pudo estar asociada a los valores de organoclorados presentes en las muestras de sedimento que superaron en varios casos las concentraciones de referencia, dado que a pesar de no ser el organismo target, se trata de animales.

- El estado ecotoxicológico comprometido en los sitios de muestreo Canal Vieja, Tercera Cuenca y Puerto Galván en diciembre de 2017 (Ma-dic´17) durante los muestreos accesorios quedó probado mediante los bioensayos realizados en elutriado con *T. suecica* ya que en los resultados mostraron en los tres sitios un extremo desacople entre crecimiento y concentración de clorofila "a" indicando un mal estado fisiológico. Contrariamente a lo ocurrido con *N. aff. kuetzingioides*, demostrando de este modo la alta sensibilidad de *T. suecica* frente a iguales condiciones coincidentemente con lo observado en los bioensayos con dicromato de K. Aunque no se puede señalar a la diatomea como "poco sensible" ya que no se realizaron en esa oportunidad análisis de los frústulos con microscopía electrónica de barrido (MEB) para detectar anomalías morfológicas en *N. aff. kuetzingioides* como respuesta a agentes contaminantes.
- La presencia de individuos anormales de *N. aff. kuetzingioides* al final de los bioensayos con agua o elutriado del sedimento es uno de los efectos más llamativos de presencia de metales y sproductos organoclorados en el metabolismo de diatomeas como ha sido ampliamente reportado en ambientes contaminados, aún cuando sus concentraciones no hayan alcanzado los valores límites permitidos. Las alteraciones morfológicas observadas en *N. aff. kuetzingioides* durante el primer estudio 2015-2016 al microscopio óptico y reconfirmadas con microscopía electrónica de barrido en este informe, reflejan 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 y ecotoxicología de la masa de agua y la posible mitigación ambiental del estuario.

- Este estudio permitió identificar que ciertos parámetros como densidad celular, concentración de clorofila "a" que determinan el estado fisiológico de las microalgas evaluadas y anomalías de las frústulos de la diatomea *N. aff. kuetzingioides*, son sensibles a la presencia de sustancias contaminantes, aún cuando no se haya identificado la responsabilidad de cada una individualmente y que las mismas se encuentren o no por debajo de los límites permitidos.
- Como era de esperar, tanto en este informe como en el del periodo 2015-2016, no se detectó una respuesta identificatoria válida para una caracterización de la calidad ecotoxicológica estacional del agua o del sedimento, ya que la mayor parte de las actividades antrópicas desarrolladas en el estuario que podrían tener efecto ecotoxicológico no siguen un patrón temporal.
- Es deseable que en el estuario de Bahía Blanca las condiciones de ecotoxicidad fluctuantes ocurran cada vez menos para evitar situaciones ambientales riesgosas. Esto puede lograrse especialmente con el desarrollo de prácticas sostenibles de las industrias de remediación y/o mitigación ambiental de los sitios en riesgo. En todo el mundo, muchos programas de rehabilitación ambiental se están implementando en sitios problemáticos históricamente.
- Se podrían utilizar múltiples criterios abióticos y bióticos para calificar/cuantificar los cambios en la "salud ecotoxicológica del estuario", pero los resultados de los bioensayos realizados con productores primarios y consumidores de bajo orden han demostrado ser la herramienta adecuada para evaluarla como así

también podrían ser aplicados para evaluar el éxito de futuras acciones de mitigación ambiental y la implementación de los programas de remediación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Azam F. (1998). Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *Science* 280 (5364):694-696.
- Bertrand M, Schoefs B, Siffel P, Rohacek K, Molnar I, (2001). Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin to diadinoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *FEBS Lett* 508(1):153-156
- Castillo Morales G (ed.). (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: IMTA, 198 pp.
- Cattaneo A, Couillard Y, Wunsam S, Courcelles M (2004). Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of paleolimnology* 32: 163-175.
- Cordonier A. (2006) Formes tératológicas de diatomées benthiques dans le Nant d'Avril, Geneve, 2005-2006. Rapport d'analyses. Etat de Geneve, Département de l'intérieur, de l'agriculture et de l'environnement, Service de l'écologie de l'eau, p 2.
- da Costa Santos JA (2010) Cadmium effects in *Nitzschia palea* frustule proteins (Efeitos do cádmio nas proteínas da frústula de *Nitzschia palea*). Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, p 35-131.
- De Filippis LF, Pallaghy CK (1994) Heavy metals: sources and biological effects. In: Rai LC, Gaur JP, Soeder CJ (eds) *Algae and water pollution*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, pp 31-77.
- Debenest T, Silvestre J, Coste M, Delmas F, Pinelli E (2008) Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquat Toxicol* 88(1):88-94.
- Debenest T., Silvestre J., Coste M., Pinelli E. (2010). Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol* 203:87-103.

- Dickman MD (1998). Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment International* 24(7): 749-759.
- Falasco E, Bona F, Badino G, Hoffmann L, Ector L. (2009). Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia* 623:1-35.
- Fisher NS, Jones GJ, Nelson DM (1981). Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve) 1. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 51(1): 37-56.
- Gold C, Feurtet-Mazel A, Coste M, Boudou A (2003). Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44(2): 189-197.
- Gomez N, Licursi M (2003). Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina. *Nova Hedwigia* 77(3-4): 389-398.
- Haynes D, Johnson JE. (2000). Organochlorine, Heavy Metal and Polyaromatic Hydrocarbon Pollutant Concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) Environment: a Review. *Marine Pollution Bulletin* 41(7-12): 267-278.
- 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.
- Masmoudi S, Nguyen-Deroche N, Caruso A, Ayadi H, Morant-Manceau A, Tremblin G, Bertrand M, Schoefs (2018). Cadmium, Copper, Sodium and Zinc Effects on Diatoms: from Heaven to Hell — a Review. <https://www.researchgate.net/publication/258099527>
- Morin S, Cordonier A, Lavoie I, Arini A, Blanco S, Duong T, Tornes E, Bonet B., Corcoll N, Faggiano L, Laviale M, Peres F, Becares E, Coste M, Feurtet-Mazel A, Fortin C, Guasch H, Sabater S (2012). Consistency in Diatom Response to Metal-Contaminated Environments. En: H Guasch et al. (eds.), *Emerging and Priority Pollutants in Rivers*, *Hdb Env Chem* (2012) 19: 117-146, DOI 10.1007/978-3-642-25722-3_5, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012
- 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.

- Parkinson J, Brechet Y, Gordon R (1999) Centric diatom morphogenesis: a model based on a DLA algorithm investigating the potential role of microtubules. *Biochim Biophys Acta* 1452(1):89–102
- Parodi ER, Gauna MC, Fernández C Croce ME. (2016). Evaluación de la ecotoxicidad del agua y sedimento en la zona interna del estuario de Bahía Blanca. Convenio (Decreto N° 955/2015) Municipalidad de Bahía Blanca y el Instituto Argentino de Oceanografía (IADO – CONICET / UNS). Pp. 170
- 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, Pierini JO, Pérez DE, Gómez EA. (2001). Suspended Sediment Circulation in Semienclosed Docks, Puerto Galván, Argentina. *Terra et Aqua* 83: 13-20.
- Rand GM, Petrocelli SR. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere Pub. Corp. Washington.
- 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
- Schmitt-Jansen, M. and R. Altenburger (2005). "Toxic effects of isoproturon on periphyton communities - a microcosm study." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62(3): 539-545.
- SECOE (2004) Etude du Nant d'Avril et ses affluents, e ´tat 2003 et ´volution depuis 1997. Rapport d'´etat des cours d'eau. Etat de Geneve, D´epartement de l'int´erieur, de l'agriculture et de l'environnement, p 30.
- Segretin ME. Biomonitoreo ambiental y tratamiento de efluentes. <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/Biomonitoreo%20y%20tratamiento%20de%20efluentes.pdf>
- Stevenson RJ, Bahls L (1999) Periphyton protocols. In: Barbour MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB (eds) *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*, 2nd edn. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water, Washington, DC, pp 1–22.

-
- 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.
- Tadros M, Bulthia P, Smith W. (1990). Diferential response of marine diatoms to trace metal. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 826-831.
- Triantaphyllidis GV, Abatzopoulos TJ, Sorgeloos P. (1998). Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *J. Biogeogr.* 25: 213-226.
- 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.
- Van Steertegem M, Persoone G. (1993). Cyst-based toxicity tests: V. Development and critical evaluation of standardized toxicity tests with the brine shrimp *Artemia* (Anostraca, Crustacea) AMVM Soares, P Calow (Eds.), *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests*, Lewis Publishers (1993), pp. 81-97.
- Vanhaecke P, Tackaert W, Sorgeloos P. (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. En: Sorgeloos, Bengtson, Declair and Jaspers (eds) *Artemia Research and its Applications*, 1. Universa Press, Wetteren, Belgium, 129-155.
- 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.
- Yang, J.-R. and H. C. Duthie (1993). "Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbour (Lake Ontario, Canada)." *Hydrobiologia* 269-270(1): 57-66.