



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

Tesis Doctoral

“Evaluación de la contaminación en la zona costera próxima a
Ushuaia (Tierra del Fuego) mediante el uso del mejillón *Mytilus
edulis chilensis* como especie indicadora”

Lic. ERICA GIARRATANO

Director: Dr. Oscar A. Amin (23/03/07 – 8/10/09)

Directora: Dra. Gabriela F. Malanga (9/10/09 – 8/09/10)

Codirector: Dr. José L. Esteves (9/10/09 – 8/09/10)

SAN CARLOS DE BARILOCHE, RÍO NEGRO, ARGENTINA
SEPTIEMBRE 2010

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Comahue - Centro Regional Universitario Bariloche - y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Marina perteneciente al Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Las investigaciones se realizaron entre los meses de septiembre de 2004 y marzo de 2009 bajo la dirección inicial del Dr. Oscar A. Amin (CADIC-CONICET). A partir del 9 de octubre de 2009 asumió la dirección de la misma la Dra. Gabriela F. Malanga (PRALIB-CONICET) y la codirección el Dr. José L. Esteves (CENPAT-CONICET), según Resolución CRUB N° 504/09.



Lic. Erica Giarratano

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a los Dres. Oscar A. Amin y Laura I. Comoglio por haberme iniciado en la Ecotoxicología y por el aporte financiero a través de los proyectos GEF/PNUD ARG 02/018, ANPCyT PICTR 0090 y PICT06 1261 para poder realizar la tesis.

Un eterno agradecimiento a los Dres. Gabriela F. Malanga y José L. Esteves por haber confiado en mí y haber sido incondicionales en la etapa más crítica de mi doctorado. Por compartir sus conocimientos. Sin ellos, esta tesis no se podría haber concluido.

A los directivos del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC) por haberme permitido formar parte de ese instituto y hacer uso de las instalaciones. Quisiera destacar el apoyo brindado por el Dr. Adrián Schiavini, su confianza y esfuerzo para ayudarme a finalizar con éxito mi tesis.

A mis compañeros y amigos, Claudia A. Duarte, Alicia M. Nizovoy y Ricardo Sáenz Samaniego por la gran ayuda brindada durante los muestreos. Más importante aún, quiero agradecerles por haber estado incondicionalmente, por haberme ayudado a atravesar las situaciones más críticas y haberme dado siempre palabras de aliento. Sin su presencia y apoyo, este sueño de doctorarme no se hubiera concretado.

A mis amigos Cecilia Avalos, Natasha Schvezov, Natalia Dellabianca, Marcela Liljestrom, Verónica Duarte Bodelón y Alejandro Valenzuela por todas las experiencias compartidas, las alegrías y las tristezas, los consejos, la paciencia. En definitiva, por haberme acompañado siempre, por haber hecho más ameno mi paso por Ushuaia y por permitirme ser parte de sus vidas.

A mis colegas y amigos, Dra. Florencia Biancalana, Dr. Américo Torres y Dra. Mónica Gil por su constante apoyo.

Al timonel Marcelo Pérez, por su apoyo técnico en todas las campañas y su buena predisposición para ayudarme.

A los Dres. Jorge E. Marcovecchio, Sandra E. Botté y Nedda Chiarello del laboratorio de Química Marina del IADO por la ayuda brindada para la determinación de los metales pesados.

A la Fundación Patagonia Natural por la ayuda económica a través del Proyecto ARG 02/G31 PNUD-GEF "Consolidación e Implementación del Plan de Manejo de la Zona Costera Patagónica para la preservación de la biodiversidad".

A los Dres. María del Carmen Ríos de Molina, Enrique Morsan y Enrique M. Rodríguez, por aceptar ser jurados de la tesis y sus valiosas sugerencias para mejorar el manuscrito.

Un agradecimiento especial a mi esposo Berna, por ser parte de mi vida, por su amor, su comprensión, su contención e infinita paciencia. Por haberme dado palabras de aliento en los momentos más difíciles y por no dejar de creer en mí. Entiendo que fue quien se llevó la peor parte de este difícil proceso, así que para él solo tengo palabras de agradecimiento.

Por último, quisiera agradecer enormemente a mis padres y a mis hermanos por haberme acompañado en cada paso que diera, por apoyarme en este gran desafío que emprendí y por haberme hecho sentir acompañada aún a la distancia.

RESUMEN

El gran incremento poblacional sufrido por la ciudad de Ushuaia en las últimas décadas y la escasa planificación acompañante trajo aparejado, entre otras cosas, que gran número de hogares no estén conectados a la red cloacal. Esto favoreció el vertido de desechos urbanos que, por escurrimiento directo o a través de arroyos y chorrillos, finalmente descargan en la zona costera de la bahía Ushuaia. A ello se suma la actividad industrial que durante varios años descartó sus desechos en esa Bahía sin tratamiento previo alguno y los potenciales efectos de la creciente actividad portuaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de los biomarcadores: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-S-transferasa y peroxidación lipídica, en el mejillón *Mytilus edulis chilensis* transplantado desde la bahía Brown a la bahía Ushuaia y poder relacionar esa respuesta con parámetros ambientales, con la finalidad de evaluar el potencial uso de los biomarcadores seleccionados en dicha área de estudio.

El análisis de la calidad de agua evidenció que el sitio denominado club Náutico mostró características propias de un ambiente eutroficado, producto del fuerte impacto antrópico por el agua proveniente de la bahía Encerrada y del pluvial que descarga en ese punto costero. Allí se registraron las máximas concentraciones de amonio (4947 μM), nitrato (240 μM), silicato (89 μM), fosfato (48 μM) y materia orgánica particulada (2266 mg C/m³). Sin embargo, el oxígeno disuelto se mantuvo cercano al nivel de saturación (8,6 - 11,8 mg/L), probablemente debido a la mezcla que producen los intensos vientos en la columna de agua y a la relación inversa con las bajas temperaturas reinantes que retrasan el desarrollo de los descomponedores. En menor medida, la zona industrial fue afectada por el arroyo Grande y algunos pluviales que descargan allí; ya que se encontraron valores mínimos de salinidad (24 g/L) y altos valores de amonio (565 μM), nitrato (238 μM), silicato (17 μM) y materia orgánica particulada (1573 mg C/m³).

Bahía Brown presentó las mayores concentraciones de Cu (36 - 101 $\mu\text{g/g}$ peso seco), Zn (106 - 198 $\mu\text{g/g}$ peso seco) y Fe (25 - 30 mg/g peso seco) en la fracción fina (<62 μm) del sedimento; sin embargo, los mejillones de bahía Brown no presentaron las mayores concentraciones de esos metales en sus tejidos. Esas altas concentraciones de metales encontradas en el sedimento serían de origen natural ya que sólo hay actividad de maricultura en esa región. Dentro de bahía Ushuaia, las máximas concentraciones de esos tres metales se acumularon en los tejidos de los mejillones transplantados a club Náutico, planta Orión y zona industrial. El Cu y el Fe se acumularon preferencialmente en la glándula digestiva, el Zn

se acumuló mayormente en la branquia, mientras que el Cd y el Pb no mostraron un órgano blanco de acumulación. Resultó notorio en verano de 2007, que las máximas acumulaciones de Cd se registraron en bahía Brown y caleta Aspirante. En invierno de 2006, las máximas concentraciones de Cd se midieron en península Ushuaia. Estos tres últimos sitios fueron considerados de bajo impacto antrópico.

Las enzimas catalasa y la glutatión-S-transferasa mostraron niveles de actividad diferente según el órgano estudiado, encontrándose mayor actividad de catalasa en la glándula digestiva y mayor actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia. Variaciones estacionales se registraron en las actividades de las tres enzimas antioxidantes estudiadas.

Las correlaciones positivas halladas entre los biomarcadores enzimáticos demostraron que el sistema antioxidante se activa de manera conjunta en el mejillón *M. edulis chilensis*. En los experimentos de invierno se halló que el oxígeno disuelto estimuló la actividad de los biomarcadores mientras que los metales la inhibieron. En los experimentos de verano sólo la actividad de glutatión-S-transferasa se asoció con el pH y el oxígeno disuelto, mientras que la actividad de los biomarcadores restantes no pudo ser asociada a ninguno de los parámetros físicos o químicos medidos en este trabajo. También en verano se encontró una correlación negativa entre los metales pesados y el índice de condición, parámetro que refleja la salud de los mejillones.

Las interacciones entre los contaminantes, los factores pro-oxidantes, las respuestas antioxidantes y los daños ocasionados son muy complejas, a menudo muy difíciles de predecir y potencialmente influenciadas por numerosos factores biológicos y ambientales como lo demostró el análisis de componentes principales, ya que cuatro componentes explicaron poco más del 60 % de la variación total. Por ello es tan importante en los estudios de biomonitorio tener en consideración las variaciones biológicas intrínsecas y las variaciones naturales de las respuestas bioquímicas a los cambios ambientales para poder realizar una correcta interpretación de la información obtenida en los monitoreos relacionados a la contaminación acuática.

Considerando las correlaciones negativas encontradas, se puede concluir que las actividades de catalasa y glutatión-S-transferasa, en la branquia y la glándula digestiva de los mejillones, así como la peroxidación lipídica en la branquia, han permitido observar un impacto incipiente en la bahía Ushuaia, especialmente en relación a los metales pesados, en invierno. La peroxidación lipídica en la glándula digestiva mostró correlación positiva con los niveles de fosfato y amonio, relacionados éstos con la calidad del agua de la Bahía.

Teniendo en cuenta estos resultados, se aconseja un mayor control de los vertidos que se realizan sobre la zona costera de la bahía Ushuaia por parte de las autoridades de aplicación de los controles ambientales, para preservar no sólo la calidad del agua y del sedimento sino también la fauna y flora que allí se desarrolla.

ABSTRACT

The increment on the population of Ushuaia city in the past decades and the poor urban planning had brought, among other consequences, a significant issue as many houses are not connected to the city sewage system, favoring urban wastes through direct runoffs and/or through streams that finally discharge its contents along the coastal area of Ushuaia bay. It could be added to it the industrial activity that took place for many years discharging its sewages to the Bay without any treatment at all and also the potential effects of an increasing port activity from the early 1990's up to date. The goal of this work was to evaluate the responses of biomarkers: superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase and lipoperoxidation of the mussel *Mytilus edulis chilensis* transplanted from Brown bay to Ushuaia bay and be able to relate these responses to the environmental parameters and assess the use of the selected biomarkers in the study area.

The analysis of the water quality showed that the coast at the Yacht Club presents characteristics of an eutrophicated environment, product of a very strong anthropic impact caused by the water input from the Encerrada bay and the pluvial outflow that discharge at that specific coastal point. At this location we registered the maximum concentrations of ammonia (4947 μM), nitrate (240 μM), silicate (89 μM), phosphate (48 μM) and particulate organic matter (2266 mg C/m^3). Nevertheless, the dissolved oxygen was always close to the saturation level (8.6 – 11.8 mg/L), probably due to the mixing of the water column produced by the strong winds that prevail in this area and the inverse relationship with the low temperatures that retard the development of the decomposers. At the lesser extend, the industrial area was affected by the Grande stream and other pluvial outflows that discharge in the area, which was evident by the decreased salinity found (23.6 g/L) and the high values of ammonia (564.8 μM), nitrate (238.1 μM), silicate (17.3 μM) and particulate organic matter (1572.9 mg C/m^3).

Brown bay showed the highest concentrations of Cu (36 – 101 $\mu\text{g/g dw}$), Zn (106 – 198 $\mu\text{g/g dw}$) and Fe (25 – 30 mg/g dw) in the fine fraction (<62 μm) of the sediment, nevertheless the mussels from Brown bay did not present the highest concentrations of these metals. These high concentration of metals found in the sediment could be of natural origin since the anthropic input comes only from a developing mussel farming activity in this region. Within Ushuaia bay, the highest concentrations of these three metals were found at the Yacht Club, Orion Dock and Industrial Area. Cu and Fe were preferably accumulated in digestive gland, Zn mainly in gill; while Cd and Pd did not show a target organ of accumulation. It was

notorious in summer of 2007, that the highest accumulations of Cd were registered in Brown bay and Aspirante creek. In winter of 2006, the maximum concentrations of Cd were measured in Ushuaia peninsula. These three places were considered of low antropogenic impact.

Catalase and glutathione-S-transferase enzymes showed different activity levels according to the organ assayed, finding the highest catalase activity in digestive gland and the highest glutathione-S-transferase activity in gill. Seasonal variations were registered in the activities of the three antioxidant enzymes assayed.

The positive correlations found between the enzymatic biomarkers showed that the antioxidant system is activated in a combined way in *M. edulis chilensis*. In winter experiments we found that the dissolved oxygen stimulated the biomarker activities while metals inhibited the activities. In summer experiments only the glutathione-S-transferase activity was related with the pH and the dissolved oxygen, while the rest of the biomarker activities could not be related to any of the physical-chemical parameters measured in this work. Also in summer experiments, a negative correlation between heavy metals and condition index was found, the later index reflecting the health status of the mussels.

The interactions between contaminants, pro-oxidant factors, antioxidant responses and impaired damages are very complex, sometimes very hard to predict and potentially influenced by many biological and environmental aspects. This was described by the principal components analysis, showing that four components explained only 60% of the total variation. That is the reason why in biomonitoring programs it is very important to consider intrinsic biological variations and natural variations of the biochemical responses to the environmental changes to be able to make a proper interpretation of the information obtained in the monitoring related to the aquatic contamination.

Considering the negative correlations found, it can be concluded that the catalase and glutathione-S-transferase activities in gill and digestive gland, and the lipid peroxidation in gill, constitute an effective tool to evaluate the water quality in the coast of Ushuaia bay, especially in relation with heavy metals, in winter. The lipid peroxidation in digestive gland could also be considered as a good biomarker thanks to the positive correlation found with the levels of phosphate and ammonia, which are related to the water quality.

Keeping in mind these results, it is recommended to perform a rigorous control on the spills that discharge on the coastal area of Ushuaia bay by the corresponding authorities in order to preserve, not only the water quality, but also the fauna and flora present there.

INDICE

Capítulo 1

Introducción.....	1
1.1 Importancia de los biomarcadores en el monitoreo de la contaminación.....	2
1.1.1 Contaminantes del ambiente acuático.....	2
1.1.1.1. Nutrientes inorgánicos disueltos.....	2
1.1.1.2. Materia orgánica.....	3
1.1.1.3. Metales pesados.....	3
1.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Estrés Oxidativo.....	6
1.1.3 Biomarcadores de contaminación.....	9
1.2 Biomonitoreo activo mediante trasplante.....	15
1.2.1 Selección de la especie.....	15
1.2.2 Descripción de <i>Mytilus edulis chilensis</i> (Hupé, 1854).....	16
1.2.2.1. Clasificación taxonómica.....	16
1.2.2.2. Biología general.....	16
1.2.2.3. Distribución geográfica y hábitat.....	17
1.2.2.4. Ciclo reproductivo.....	18
1.3 Descripción del área de estudio.....	18
1.3.1 Caracterización del canal Beagle.....	18
1.3.2 Caracterización de la bahía Brown.....	20
1.3.3 Caracterización de la bahía Ushuaia.....	21
1.4 Antecedentes y situación actual.....	22
1.5 Objetivos del presente estudio.....	24

Capítulo 2

Materiales y Métodos.....	26
2.1 Sitios de muestreo.....	27
2.1.1. Bahía Brown.....	27
2.1.2. Bahía Ushuaia.....	28
2.2 Diseño experimental.....	29
2.3 Determinaciones en agua.....	31
2.3.1 Obtención de muestras.....	31
2.3.2 Parámetros físicos.....	32
2.3.3 Parámetros químicos.....	32
2.3.3.1 Nutrientes inorgánicos disueltos.....	32
2.3.3.2 Clorofila <i>a</i>	34
2.3.3.3 Materia orgánica particulada (MOP).....	35
2.4 Determinaciones en sedimento.....	36
2.4.1 Obtención de muestras.....	36
2.4.2 Granulometría del sedimento.....	37
2.4.3 Metales pesados totales en sedimento.....	37
2.4.3.1 Normalización geoquímica y factor de enriquecimiento (FE).....	39
2.4.3.2 Porcentajes de recuperación.....	39
2.4.3.3 Límite de detección del método.....	40
2.5 Determinaciones en organismos.....	40
2.5.1 Obtención de muestras.....	40
2.5.2 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica.....	41

2.5.3	Lípidos totales.....	42
2.5.4	Bioacumulación de metales pesados.....	43
2.5.4.1	Bioconcentración de metales pesados.....	43
2.5.4.2	Porcentajes de recuperación.....	43
2.5.5	Índice de condición.....	44
2.5.6	Biomarcadores.....	44
2.5.6.1	Superóxido dismutasa (SOD).....	45
2.5.6.2	Catalasa (CAT).....	46
2.5.6.3	Glutación-S-transferasa (GST).....	46
2.5.6.4	Peroxidación de lípidos (LPO).....	47
2.6	Análisis estadístico.....	48

Capítulo 3

Resultados: Estudio exploratorio en bahía Brown.....	49
3.1 Determinaciones en agua.....	50
3.1.1 Parámetros físicos.....	50
3.1.2 Parámetros químicos.....	50
3.1.2.1 Nutrientes inorgánicos disueltos.....	50
3.1.2.2 Clorofila <i>a</i>	51
3.2 Determinaciones en sedimento.....	51
3.2.1 Granulometría del sedimento.....	51
3.2.2 Metales pesados totales en sedimento.....	51
3.2.2.1 Factores de enriquecimiento.....	52
3.3 Determinaciones en organismos.....	52
3.3.1 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica.....	52
3.3.2 Lípidos totales.....	52
3.3.3 Bioacumulación de metales pesados.....	53
3.3.3.1 Bioconcentración de metales pesados.....	54
3.3.4 Índice de condición.....	54
3.3.5 Biomarcadores.....	55
3.3.5.1 Superóxido dismutasa.....	55
3.3.5.2 Catalasa.....	56
3.3.5.3 Glutación-S-transferasa.....	57
3.3.5.4 Peroxidación de lípidos.....	58

Capítulo 4

Resultados: Transplantes de Invierno.....	60
4.1 Determinaciones en agua.....	61
4.1.1 Parámetros físicos.....	61
4.1.2 Parámetros químicos.....	64
4.1.2.1 Nutrientes inorgánicos disueltos.....	64
4.1.2.2 Clorofila <i>a</i>	67
4.1.2.3 Materia orgánica particulada.....	68
4.2 Determinaciones en sedimento.....	69
4.2.1 Granulometría del sedimento.....	69
4.2.2 Metales pesados totales en sedimento.....	71
4.2.2.1 Factores de enriquecimiento.....	73
4.3 Determinaciones en organismos.....	75
4.3.1 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica.....	75

4.3.2 Lípidos totales.....	78
4.3.3 Bioacumulación de metales pesados.....	83
4.3.3.1 Bioconcentración de metales pesados.....	88
4.3.4 Índice de condición.....	90
4.3.5 Biomarcadores.....	92
4.3.5.1 Superóxido dismutasa.....	92
4.3.5.2 Catalasa.....	95
4.3.5.3 Glutación-S-transferasa.....	100
4.3.5.4 Peroxidación de lípidos.....	103
4.4 Relación entre parámetros físicos, químicos y biológicos.....	108

Capítulo 5

Resultados: Transplantes de Verano.....	113
5.1 Determinaciones en agua.....	114
5.1.1 Parámetros físicos.....	114
5.1.2 Parámetros químicos.....	116
5.1.2.1 Nutrientes inorgánicos disueltos.....	116
5.1.2.2 Clorofila <i>a</i>	120
5.1.2.3 Materia orgánica particulada.....	120
5.2 Determinaciones en sedimento.....	121
5.2.1 Granulometría del sedimento.....	121
5.2.2 Metales pesados totales en sedimentos.....	122
5.2.2.1 Factores de enriquecimiento.....	124
5.3 Determinaciones en organismos.....	125
5.3.1 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica.....	125
5.3.2 Lípidos totales.....	129
5.3.3 Bioacumulación de metales pesados.....	132
5.3.3.1 Bioconcentración de metales pesados.....	137
5.3.4 Índice de Condición.....	138
5.3.5 Biomarcadores.....	140
5.3.5.1 Superóxido dismutasa.....	140
5.3.5.2 Catalasa.....	143
5.3.5.3 Glutación-S-transferasa.....	146
5.3.5.4 Peroxidación de lípidos.....	149
5.4 Relación entre parámetros físicos, químicos y biológicos.....	152

Capítulo 6

Resultados: Transplantes Intensivos.....	157
6.1 Determinaciones en agua.....	158
6.1.1 Parámetros físicos.....	158
6.2 Determinaciones en organismos.....	161
6.2.1 Biomarcadores.....	161
6.2.1.1 Superóxido dismutasa.....	161
6.2.1.2 Catalasa.....	164
6.2.1.3 Glutación-S-transferasa.....	168
6.2.1.4 Peroxidación de lípidos.....	172
6.3 Relación entre parámetros físicos, químicos y biológicos.....	175

Capítulo 7

Discusión.....	177
----------------	-----

7.1 Determinaciones en agua.....	178
7.2 Determinaciones en sedimento.....	185
7.3 Determinaciones en organismos.....	190
Capítulo 8	
Conclusiones y Consideraciones finales.....	209
Capítulo 9	
Bibliografía.....	215

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los biomarcadores en el monitoreo de la contaminación

1.1.1 Contaminantes del ambiente acuático

Los contaminantes tienen la capacidad de concentrarse en diferentes proporciones en las distintas matrices del ambiente acuático como son el agua, el sedimento y la biota resultando difícil la elección de una matriz para evaluar su toxicidad. El problema es complejo debido a que generalmente están involucradas mezclas de compuestos en una o más matrices. Los contaminantes se acumulan principalmente en los sedimentos, siendo más fáciles de medir y dando un grado de integración temporal que no se consigue en los análisis de agua (Rainbow & Phillips, 1993). Las concentraciones de contaminantes en el agua suelen ser bajas y pueden variar en tiempo y espacio (Villares *et al.*, 2001). De todas maneras, las concentraciones de contaminantes, tanto en sedimentos como en agua, no deberían ser utilizadas en forma aislada para analizar la probable toxicidad de dichas sustancias sobre la biota. Es conveniente incluir en los estudios de contaminación la bioacumulación en los organismos (Rainbow, 1995).

Una sustancia se vuelve contaminante cuando su presencia en el medio altera algún factor biótico o abiótico (o ambos) impactando en la capacidad de los organismos de sobrevivir en esas condiciones. Entre las principales sustancias tóxicas que afectan la biota acuática se encuentran los metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorados (PCB), pesticidas, ácidos, cloro, cianuro, amonio, entre otros (Heath, 1995). El nitrógeno y el fósforo, que no son tóxicos por sí solos, pueden llegar a ocasionar efectos adversos en ciertas condiciones (Camargo & Alonso, 2006).

Aunque hay innumerables compuestos químicos potencialmente contaminantes, los que fueron considerados en el presente estudio fueron:

1.1.1.1 Nutrientes inorgánicos disueltos

Nitrato, nitrito, fosfato y silicato son nutrientes que junto con otros elementos esenciales, son requeridos para asegurar la productividad primaria en el ecosistema marino. Los niveles naturales de nutrientes en el ambiente acuático pueden incrementarse a través del ingreso directo o indirecto desde agua de lluvia, efluentes domésticos, industriales y/o agrícolas, pudiendo utilizarse sus niveles como indicadores de contaminación (Nubi *et al.*, 2008). Aunque no se consideran contaminantes por sí solos, concentraciones elevadas pueden tener efectos tóxicos en organismos acuáticos debido a la eutroficación (Connell *et al.*, 1999).

El contenido de oxígeno disminuye debido a una desmedida proliferación de fitoplancton que incrementa la demanda biológica de oxígeno al disminuir la irradiación en profundidad e incrementar la concentración de materia orgánica (Heath, 1995). El florecimiento algal colapsa cuando se agotan los nutrientes.

El amonio, si bien es también un nutriente, aparece en los efluentes urbanos e industriales y resulta de la descomposición de la materia orgánica. Su grado de toxicidad depende del pH y la temperatura del agua. Incrementos de temperatura o pH, aumentan la toxicidad del amonio ya que hay mayor concentración de amonio en forma no ionizada (Heath, 1995).

1.1.1.2 Materia orgánica

La materia orgánica en descomposición ingresa al medio acuático cuando los desechos domésticos e industriales no son tratados adecuadamente antes de su descarga en el sistema. Estos desechos son descompuestos por microbios que consumen el oxígeno. En el caso de que no haya una población fitoplanctónica en la columna de agua que genere oxígeno o un flujo adecuado del mismo desde la atmósfera, la creciente demanda de oxígeno disuelto por parte de los microorganismos debido a la alta carga de materia orgánica puede llevar a una baja o nula disponibilidad de oxígeno (hipoxia o anoxia respectivamente) (Zakrzewski, 2002).

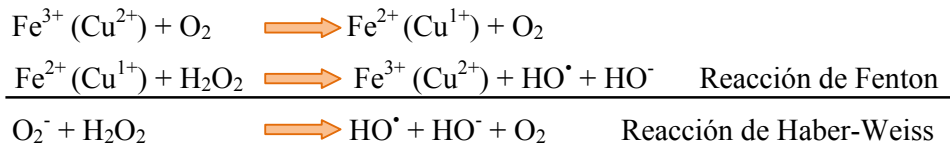
1.1.1.3 Metales pesados

Los metales pesados pueden ser divididos en esenciales y no esenciales. Los esenciales se encuentran naturalmente en los organismos pero pueden ser tóxicos si las concentraciones en el medio son elevadas. En cambio, los metales no esenciales, son altamente tóxicos aún en concentraciones trazas. Los metales pesados se caracterizan por su gran afinidad con el azufre. Son capaces de inactivar las enzimas al unirse a grupos sulfidrilos y también se enlazan a grupos carboxilos y aminos de las proteínas (Espina & Vanegas, 1996). La toxicidad de los metales en agua varía por la formación de complejos con sustancias orgánicas e inorgánicas que modifican su biodisponibilidad. Además las diferencias específicas de su toxicidad se deben a distintas propiedades físicas y químicas de los metales dentro del propio organismo. Por ejemplo, los compuestos con metales que interactúan con H_2O_2 no sólo producen radicales hidroxilo ($HO\bullet$) sino también otros oxidantes fuertes, todos capaces de dañar proteínas, membranas y ADN (Kasprzak, 2002).

Entre los metales que se explotan industrialmente y que resultan de interés para estudiar en este trabajo, en el sentido de la ecotoxicología, figuran los siguientes:

- Cobre: cumple funciones en el centro catalítico de muchas metaloenzimas (ferrooxidasa I y II, aminooxidasa, Zn-Cu superóxido dismutasa, citocromo C oxidasa). El cobre tiene una amplia distribución. Más del 50 % de su producción es usada para la industria eléctrica y electrónica. También se lo usa como alguicida y fungicida. Puede provenir de la minería, de efluentes municipales y de las pinturas anti-incrustantes para los barcos. Se halla disuelto en el agua y también unido a material particulado (Balls, 1985). Su absorción es incrementada por proteínas, aminoácidos, citrato y oxalato; pero disminuida por altas concentraciones de calcio y fosfato. Se han observado interacciones con el zinc. Induce estrés oxidativo que se evidencia en un incremento de los productos de peroxidación lipídica, alcanos, alquenos y lipofuscina (Viarengo *et al.*, 1990). No hay evidencia de efectos teratogénicos, mutagénicos ni cancerígenos (Schäfer *et al.*, 1999).
- Zinc: es utilizado en diversas industrias como las de celulosa, petroquímica, fertilizantes, refinerías de petróleo, acero, cemento, termoeléctrica, fundiciones no ferrosas, pinturas, plásticos y caucho (Förtsner & Wittmann, 1979). La mayoría de los compuestos con zinc son solubles en al agua. De acuerdo a Elliot *et al.* (1984), la acumulación de zinc se produce por difusión pasiva. La mayor parte es filtrada con el alimento y es absorbida en los mejillones por su sistema digestivo, branquias y manto. El zinc en exceso estimula la síntesis de metalotioneínas, las cuales son transferidas a lisosomas por divertículos digestivos donde se producen polímeros insolubles que son eliminados por exocitosis (Viarengo, 1985).
- Hierro: es usado en la industria petroquímica, química, fertilizantes, refinerías de petróleo y acero (Förtsner & Wittmann, 1979). De todos los elementos trazas esenciales para la vida, es el que se requiere en una mayor cantidad (Spiro, 2004). Está presente en todas las células del organismo y juega un rol fundamental en muchas reacciones bioquímicas. Se encuentra en grandes cantidades en suelos y rocas, aunque normalmente en forma insoluble (Fe^{3+}). El hierro acomplejado con adenosin-5-difosfato, histidina, EDTA, citrato y otros quelantes ha mostrado que facilita la formación de especies reactivas de oxígeno y eleva los productos de peroxidación lipídica (Aust, 1989; Ryan & Aust, 1992). La evidencia indica que los iones quelados actúan como un catalítico para la reacción de Fenton, facilitando la conversión del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo, especie frecuentemente propuesta como iniciadora de la peroxidación lipídica (Halliwell & Gutteridge, 1992; Marnett, 1999). Las reacciones entre el hierro y los metabolitos de oxígeno

pueden ser deletéreas para los organismos, especialmente cuando los radicales hidroxilos dañan los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos (Outten & Theil, 2009).



- Cadmio: alrededor del 50-60 % de su producción es utilizada en aleaciones y galvanizaciones, cerca del 10 % se usa en pigmentos. Además es usado en baterías, como estabilizador en plásticos, en fertilizantes y también puede provenir de combustibles fósiles, fertilizantes, aguas servidas municipales y descarga de lodo (Eisler, 2000). Geológicamente, está ampliamente distribuido y suele estar asociado al plomo, zinc y fosfato. Este elemento se encuentra en el agua de mar principalmente en forma disuelta (Balls, 1985). El cadmio no genera radicales libres pero atraviesa la membrana celular a través de los canales de calcio, pudiendo unirse a biomoléculas, acumularse o depositarse en compartimentos subcelulares o bien sufrir transformaciones metabólicas o eliminación (Di Giulio *et al.*, 1995). La presencia de ligandos de alta afinidad con el cadmio como el glutatión (GSH), proteína soluble rica en grupos sulfidrilos, y metalotioneínas dentro de la célula, favorecen la continua renovación de este metal, manteniendo un gradiente permanente con el medio externo (Viarengo, 1989). Hay experimentos con animales que sugieren que el cadmio en altas dosis es teratogénico y mutagénico (Schäfer *et al.*, 1999).

- Plomo: cerca del 40 % es usado en baterías, 7 % en pigmentos y en pequeñas cantidades en agentes químicos, gas antidetonante, soldaduras y lastres. El plomo ingresa al medio acuático por erosión y lixiviados desde el suelo, polvos de la atmósfera, combustión de petróleo, descargas de desechos domésticos e industriales, desprendimientos transportados por escorrentías desde calles y otras superficies (Harte *et al.*, 1991). El plomo se halla en el ambiente en diversas formas químicas y físicas que influyen su comportamiento y sus efectos en el ecosistema. La mayor parte del plomo en el ambiente se encuentra en forma inorgánica, siendo el Pb^{2+} la especie iónica más estable y en la que se cree que es mayoritariamente acumulado por los organismos (Nussey *et al.*, 2000). Por su similitud con el calcio, el plomo es metabolizado por las vías metabólicas del calcio (Schäfer *et al.*, 1999) pero no se conoce que tenga una función esencial en los organismos vivos. Se une a las proteínas, particularmente a los grupos sulfidrilos, de tal manera que puede alterar su estructura y su función, o bien competir con otros metales en los sitios de enlace. Es

mutagénico y teratogénico cuando se absorbe en grandes cantidades y podría llegar a ser carcinogénico (Eisler, 2000).

1.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Estrés Oxidativo

La principal vía para metabolizar el oxígeno molecular en los organismos aeróbicos involucra la reducción completa a agua por aceptación de cuatro electrones y consecuente formación de especies reactivas del oxígeno (ERO): el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (1O_2). Para mantener bajas las concentraciones de ERO en estado estacionario dentro de las células, se requiere un complejo sistema de defensa antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 1999; Lesser, 2006), cuya finalidad es eliminar el O_2 en el sitio de producción y/o eliminar o reducir el flujo de intermediarios reducidos del oxígeno para prevenir la producción de ERO (Young & Woodside, 2001). El sistema de defensa antioxidante de los organismos vivos puede ser subdividido en enzimático y no enzimático (Storey, 1996; Kohen & Nyska, 2002), tal como se muestra en el **Esquema 1**. Los cambios en la producción de ERO en organismos acuáticos han sido adjudicados a: cambios fisiológicos (diferentes estadios del ciclo reproductivo, envejecimiento, etc.) y cambios ambientales (hipoxia, hiperoxia, radiación UV, disponibilidad y calidad de alimento, iones metálicos, solventes, material particulado, óxidos de nitrógeno) (Winston & Di Giulio 1991; Davies, 2005). Para los sistemas biológicos la producción de ERO está directa y positivamente relacionada a la concentración de O_2 (Jamieson *et al.*, 1986).



Esquema 1. Sistema antioxidante.

El ambiente acuático recibe continuamente considerables cantidades de contaminantes que tienen la capacidad potencial de causar estrés oxidativo en los organismos, si no son controlados por el sistema de defensa antioxidante de éstos (Halliwell & Gutteridge, 2007). La medición del estrés oxidativo suele ser llevada a cabo midiendo las modificaciones de los niveles de actividad de diversas enzimas implicadas en el sistema antioxidante en dos órganos principalmente, branquia y glándula digestiva (Manduzio *et al.*, 2005). En ecotoxicología, se ha reportado la inducción de producción de radicales libres que activan el sistema antioxidante en mejillones tanto en condiciones de laboratorio como *in situ* por compuestos como HAPs y PCBs (Orbea *et al.*, 2002; De Luca-Abbott *et al.*, 2005; Damiens *et al.*, 2007) y por metales (Valko *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2006; Verlecar *et al.*, 2007; Vlahogianni *et al.*, 2007).

El **estrés oxidativo**, definido como la producción y acumulación de ERO que sobrepasa la capacidad del organismo de contrarrestar las especies reactivas, puede dañar los lípidos, las proteínas y el ADN (Poli *et al.*, 2004), e incluso también pueden actuar a nivel de la transducción de señales (Apel & Hirt, 2004; Jones, 2006) afectando el balance de óxido-reducción de la célula (Abele & Puntarulo, 2004) y, en última instancia, pueden provocar muerte celular (Winston & Di Giulio, 1991).

➡ **Daño oxidativo a lípidos:** la peroxidación lipídica es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que su destrucción puede provocar un desmoronamiento de la estructura de la membrana que conduce a una pérdida de permeabilidad y, posteriormente, a la muerte celular (Montero Torreiro, 2000). La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende, en gran medida, del grado de insaturación y de la posición de los dobles enlaces (Halliwell & Gutteridge, 1999). Los productos de degradación de la peroxidación lipídica son aldehídos como el malondialdehído e hidrocarburos, como el etano y el etileno (Gutteridge & Halliwell, 1990). La peroxidación lipídica en la mitocondria es particularmente citotóxica, alterando la fluidez y permeabilidad de la membrana, con múltiples efectos en la actividad enzimática y la producción de ATP así como también en la iniciación de apoptosis (Green & Reed, 1998).

➡ **Daño oxidativo a proteínas:** los aminoácidos que forman las proteínas y péptidos son atacados por las ERO provocando fragmentación de la cadena peptídica, agregación de productos de reacciones de entre-cruzamiento, alteración de la carga eléctrica y susceptibilidad incrementadas de remoción y degradación (Halliwell & Gutteridge, 1999). Se diferencian dos tipos de procesos por los cuales las proteínas pueden ser oxidadas: inespecíficos y sitio-específicos. En el primer caso, los efectos se producen al azar sobre cualquier parte de la molécula; mientras que en el segundo, la generación de especies oxidantes es catalizada por un metal unido a sitios específicos de las proteínas y el daño se circunscribe al área cercana a su sitio de formación (Stadtman, 1990).

➡ **Daño oxidativo a ADN:** la naturaleza polianiónica del ADN provee un sustrato apto para la difusión a través de la membrana y la adherencia de los cationes metálicos, facilitando la formación de HO• adyacente a sitios biológicos críticos (Halliwell & Aruoma, 1991). Adicionalmente, la heterogeneidad de la molécula de ADN permite que el HO• ataque las bases y los enlaces azúcar-fosfato (Buxton *et al.*, 1988). Las ERO puede inducir numerosas lesiones en el ADN como la ruptura de cadenas, alteración de bases, pérdida de bases, entre-cruzamientos proteína-ADN y ADN-ADN, y aductos de ADN que pueden tener efectos

genotóxicos, cancerígenos y/o mutagénicos. Se han identificado más de 100 productos diferentes de daño de ADN por varias ERO (Dizdaroglu, 1993).

➡ **Transducción de señales:** Las ERO son también producidas para funciones celulares específicas y se ha propuesto que los sistemas antioxidantes de las células regulan los niveles intracelulares de las ERO por lo cual pueden funcionar como segundos mensajeros (Schrek & Baeuerle, 1991). La función de las ERO como segundos mensajeros son importantes para la expresión de varios factores transcripcionales y de otras moléculas de transducción de señales (Martindale & Holbrook, 2002). El estrés oxidativo también produce apoptosis a través de varios genes del ciclo celular. Se han descrito dos vías apoptóticas: la muerte del receptor y la mitocondrial, pudiendo ambas ocasionar la muerte celular (Johnson *et al.*, 1996). Altos niveles de estrés oxidativo causan necrosis celular, mientras que bajos niveles causan daño al ADN y detención del ciclo celular o iniciación de apoptosis (Halliwell & Gutteridge, 1999; Martindale & Holbrook, 2002).

1.1.3 Biomarcadores de contaminación

Los biomarcadores son definidos como cambios celulares, bioquímicos, moleculares, fisiológicos o comportamentales que pueden ser medidos en las células, fluidos corporales u órganos dentro de un organismo, que indican la exposición a un contaminante (van der Oost *et al.*, 2003). Los efectos mediados por oxidación que pueden ser utilizados como biomarcadores incluyen: (1) respuestas adaptativas, tales como las variaciones de las actividades enzimáticas y de las concentraciones de compuestos no enzimáticos; (2) evaluación de daño oxidativo a proteínas, lípidos, ácidos nucleicos; (3) perturbaciones del equilibrio de óxido reducción de los tejidos (Filho, 1996). La definición de biomarcador es a veces extendida a nivel organismo, incluyendo biomarcadores fisiológicos tales como los índices de condición y la respiración (Schlenk *et al.*, 2008). El uso de biomarcadores en evaluación de riesgo tiene la ventaja de detectar exposiciones potencialmente tóxicas antes que los efectos adversos sean irreversibles y antes de manifestarse en la población o comunidad. Individuos de una misma población pueden responder de manera diferente, dependiendo de una serie de factores como variabilidad genética, estado nutricional, acción de los distintos estresantes actuando sobre el hábitat, etc. (Depledge *et al.*, 1993). Los organismos expuestos a una carga de contaminantes continua sufrirán un progresivo deterioro de su salud que puede llegar a ser mortal.

Existen tres clases de biomarcadores (Schlenk, 1999):

- *de exposición*: son los que estiman la dosis interna de biodisponibilidad de un contaminante particular o de sus metabolitos en un organismo expuesto. Deben representar respuestas bien caracterizadas que tengan en cuenta las propiedades farmacodinámicas del individuo y las propiedades físico-químicas del compuesto. Estos biomarcadores son sensibles y específicos para cada compuesto. Ejemplo: inducción de metalotioneínas por la exposición a metales pesados, inducción de la citocromo P4501A monooxigenasa por la exposición a hidrocarburos planares poliaromáticos.

- *de efecto*: se caracterizan por la inducción de mecanismos de defensa celular, que se inician siempre como una respuesta adaptativa a nivel bioquímico-molecular en el organismo. En el caso de que la capacidad de respuesta se vea sobrepasada, se pueden producir alteraciones fisiológicas o histológicas a mayores niveles de organización biológica. Estas podrían llegar a ser irreversibles (dependiendo del órgano o sistema dañado), afectando la reproducción y el crecimiento. Pueden ser medidos en cualquier nivel de organización biológica, no suelen ser específicos en relación a los contaminantes y no brindan información sobre su naturaleza. Ejemplo: inducción de proteínas de estrés (heat shock proteins), peroxidación de lípidos.

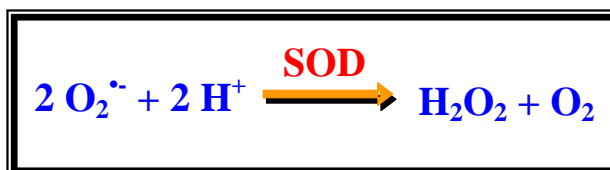
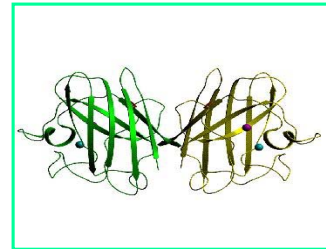
- *de susceptibilidad*: son indicadores de los procesos que causan variaciones de respuesta en la cantidad de exposición o efecto en un compartimiento entre individuos o poblaciones que tienen niveles similares de exposición/efecto en el compartimiento anterior (Barrett *et al.*, 1997). Los organismos, aún de la misma especie, no responden igual a la exposición a contaminantes. El sexo, la edad, el tamaño, el estadio de desarrollo reproductivo, la variación genética de una población, son parámetros de variación en la respuesta. Varios estudios corroboraron que existen significativas diferencias asociadas a esos factores en los circuitos enzimáticos de bioactivación y detoxificación, llevando a susceptibilidad o a resistencia. Ejemplos: incremento en la incorporación de hierro en hemocromatosis, deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Los biomarcadores de efecto están relacionados a efectos adversos, aunque el nivel de evidencia fluctúa para la relación entre un efecto medido dado y las respuestas patológicas específicas, lo que ocurre luego de un período largo y crónico de exposición. Hay un solapamiento entre biomarcadores de exposición y de efecto, por lo que el mismo biomarcador puede ser utilizado para ambas mediciones. Algunos de esos biomarcadores son incluso utilizados para medir diferencias interindividuales de respuesta y, por lo tanto, sirven también como biomarcadores de susceptibilidad (Barrett *et al.*, 1997).

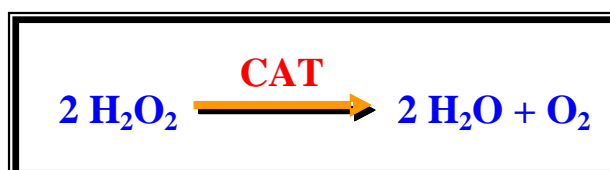
El estudio de las enzimas antioxidantes puede resultar un indicador del estatus antioxidante de los organismos y puede servir como biomarcador de estrés oxidativo. El sistema de defensa antioxidante en los sistemas biológicos es activado cuando son expuestos a contaminantes ambientales. Los niveles de antioxidantes pueden bajar o subir en post de contrarrestar el desbalance causado por el daño oxidativo (Winston & Di Giulio, 1991) y han sido exitosamente utilizados en estudios en campo con el propósito de caracterizar áreas impactadas, donde las mezclas complejas de contaminantes suelen estar presentes (Geracitano *et al.*, 2004b; Amado *et al.*, 2006). Las defensas antioxidantes se encuentran prácticamente en todas las especies animales y en diferentes tipos de tejidos y son ampliamente halladas en organismos acuáticos.

Los biomarcadores de efecto de interés para este trabajo de tesis fueron los siguientes:

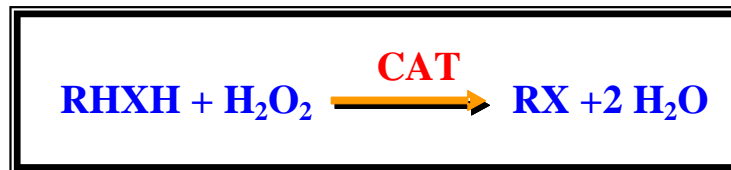
- **Superóxido dismutasa** es una glicoproteína hidrofóbica tetramérica compuesta por dos dímeros unidos por puentes disulfuro (Fattman *et al.*, 2000). Cataliza la liberación de un electrón del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno (Fridovich, 1997). La enzima contiene un átomo de cobre y uno de zinc por subunidad: el cobre cumple la función de dismutación del anión superóxido, mientras que el zinc sólo tendría un rol estructural.



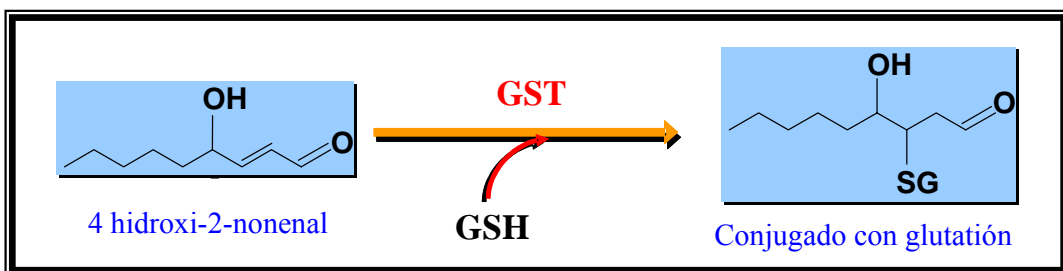
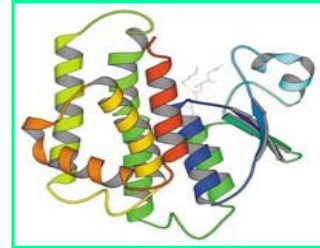
- **Catalasa** es una hemoproteína con cuatro átomos de hierro por molécula unido a la proteína y quelado a la protoporfirina IX. Se encuentra en los peroxisomas donde se produce la oxidación de los lípidos, proceso que genera peróxido de hidrógeno. Su función principal es justamente transformar el peróxido de hidrógeno en altas concentraciones en oxígeno y agua (Filho, 1996).



Alternativamente, puede actuar como una peroxidasa en presencia de bajos niveles de peróxido de hidrógeno utilizando co-sustratos reductores como alcoholes, ascorbato y fenoles.



- **Glutación-S-transferasa** constituye una gran familia de enzimas multifuncionales involucradas en la conjugación de glutatión reducido (GSH) a contaminantes y productos aldehídicos de la peroxidación lipídica, neutralizando sus sitios electrofílicos y volviendo a los productos más hidrosolubles. Se cree que los conjugados con el GSH son metabolizados por ruptura de los residuos de glutamato y glicina, seguido por la acetilación del grupo de aminoácido resultante del residuo de cisteinil, para producir ácidos mercaptúricos como producto final, los cuales son excretados mediante una bomba ubicada en la membrana dependiente de ATP (Mathews & Van Holde, 1990).

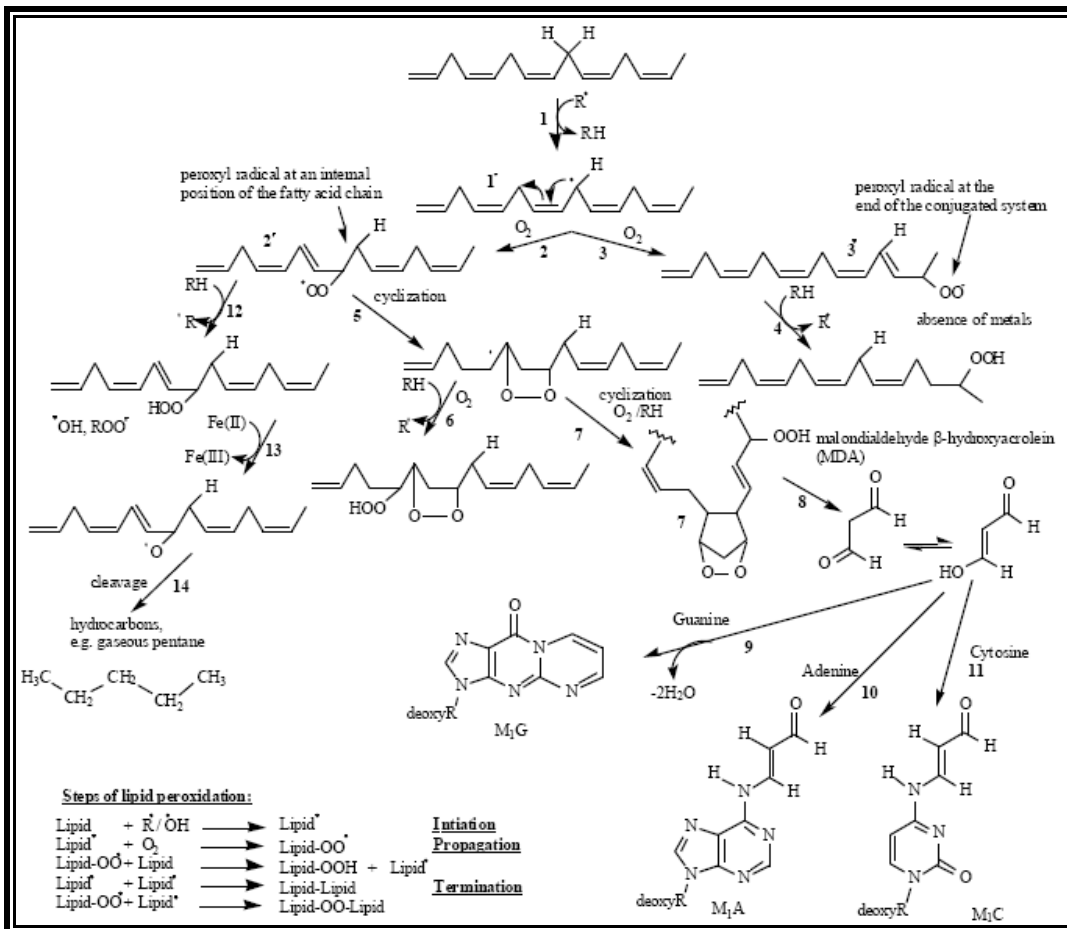


- **Peroxidación lipídica** se denomina a la degradación de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), considerados las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (**Esq. 2**). La *iniciación* involucra el ataque de una especie reactiva de oxígeno que por tener uno o más electrones desapareados es capaz de sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metilo de un ácido graso. La presencia de un doble enlace adyacente al grupo metilo debilita el enlace entre el carbono y el hidrógeno por lo que el hidrógeno puede ser más fácilmente removido de un ácido graso. En presencia de oxígeno, el ácido graso radical puede reaccionar formando radicales peroxil lipídicos (ROO•)

durante el proceso de *propagación*. Estos radicales son muy reactivos y capaces de sustraer otro hidrógeno de ácidos grasos vecinos creando hidroperóxidos lipídicos ($\text{ROO}\bullet + \text{H}\bullet \rightarrow \text{RO-OH}$). Estos últimos pueden ser reducidos por la glutatión peroxidasa a alcoholes no reactivos o reaccionar con metales para producir una variedad de productos intermedios reactivos como malondialdehído o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). La peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico, cuya *terminación* puede darse por la recombinación de radicales ($\text{R}\bullet + \text{R}\bullet \rightarrow \text{producto no radical}$) o la disminución del sustrato (Valko *et al.*, 2005).

Es importante señalar que para que esta cadena se inicie, es requisito la presencia de algún metal de transición o bien un complejo de metales (Sevanian & Ursini, 2000). El daño de la peroxidación lipídica a las membranas biológicas puede tener distintas consecuencias, dependiendo de la naturaleza y concentración del oxidante (Hermes-Lima, 2004). Los productos de la peroxidación lipídica pueden afectar el ADN, a través de mutaciones y alteraciones de los patrones de expresión génica (Marnett, 1999). Además las membranas peroxidadas se vuelven rígidas, pierden permeabilidad e integridad.

Se conoce que las especies reactivas de oxígeno son capaces de inducir peroxidación lipídica, reaccionando fuertemente con los ácidos grasos poli-insaturados para formar hidroperóxidos (Rawls & Van Santen, 1970; Bragadóttir, 2001). La peroxidación lipídica es probablemente uno de los procesos de daño tisular inducido por radicales libres más estudiado, pero debido a que es complicado el análisis directo de los productos endógenos de la peroxidación lipídica, la mayoría de los métodos miden los niveles de productos de oxidación secundarios. Según Draper *et al.* (1993) y Janero (1990), el análisis más ampliamente utilizado es la medición de malondialdehído (MDA) como producto secundario de la peroxidación lipídica, con el test de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico.



Esquema 2. Esquema del proceso de peroxidación lipídica (Valko *et al.*, 2005). En este proceso se forman una serie de aldehídos reactivos como productos intermedios que incluyen acroleína, crotonaldehído, 2,4-decadienal, 4-hidroxi-2-nonenal y malondialdehído que pueden reaccionar con las bases de ADN formando una serie de aductos de ADN.

Además de los biomarcadores previamente descriptos, el estado nutricional y de estrés en los mejillones puede ser analizado en forma integral mediante *biomarcadores fisiológicos*. Estos parámetros constituyen una respuesta a la exposición crónica a contaminantes. Sin embargo, no son muy sensibles y pueden estar afectados por otras variables como estacionalidad, enfermedades, disponibilidad de alimento y estadio del ciclo de vida (van der Oost *et al.*, 2003). En condiciones de estrés, las reservas energéticas disminuyen debido a que son destinadas a procesos de detoxificación que requieren gasto energético y, en consecuencia, los mejillones que viven en aguas contaminadas presentan un retraso en el crecimiento y una pobre condición tisular (Mayer *et al.*, 1992; Nicholson, 1999). En este sentido, biomarcadores fisiológicos tales como índices de condición corporales, ritmo cardíaco y tasa de aclaramiento, han sido utilizados en programas de biomonitoreo en relación

a las condiciones de exposición (Smolders *et al.*, 2004; Mubiana *et al.*, 2006; Yeats *et al.*, 2008).

1.2 Biomonitorio activo mediante transplante

El uso de bivalvos para estudiar niveles y tendencias de contaminación química en aguas costeras fue sugerido por primera vez a mediados de la década del '70 (Goldberg, 1975). Algunos investigadores usan poblaciones residentes o de cultivo, es lo que se conoce como *biomonitorio pasivo* (Porte *et al.*, 2001; Vlahogianni *et al.*, 2007); mientras que otros transplantan individuos desde un sitio de referencia a sitios contaminados y es lo que se conoce como *biomonitorio activo* (Roméo *et al.*, 2003; Pytharopoulou *et al.*, 2008). La técnica de transplante fue utilizada para resolver el problema de escasez de bancos naturales de mejillones en varios sitios de la zona costera; además permite sumergir a los mejillones a cualquier profundidad. Esta metodología también hace posible controlar la fuente, edad y estadio de madurez sexual de las muestras. Transplantando organismos que provienen de una misma cohorte mejora el potencial de respuesta de los biomarcadores entre sitios, ya que se reduce la heterogeneidad genética que existe entre individuos que provienen de diferentes sitios. Además es muy probable que poblaciones naturales provenientes de áreas contaminadas desarrollen mecanismos adaptativos compensatorios (Regoli & Principato, 1995). Sin embargo, implementarlo en una escala geográfica muy grande introduce factores como variaciones en las características físicas y químicas y disponibilidad de alimento en las zonas de inmersión (Andral *et al.*, 2004).

1.2.1 Selección de la especie

Los bivalvos presentan una serie de características que los hace aptos para ser utilizados como organismos centinelas (Farrington *et al.*, 1983).

- Se encuentran en costas de todo el mundo, lo que permite comparar resultados.
- Son organismos sésiles y, por lo tanto, representan el estado de contaminación del sitio donde se hallan.
- Concentran en sus tejidos, en niveles mayores de los que se encuentran en el agua circundante, muchos contaminantes de interés permitiendo obtener una medida de la disponibilidad biológica de la sustancia.
- Son organismos abundantes en todas las épocas del año y representativos del ecosistema bajo estudio.

- Son muy resistentes a los contaminantes y sobreviven en sitios donde otros organismos no son capaces de hacerlo.
- Pueden ser fácilmente transplantados de un área a otra.
- Son de interés comercial, ampliamente consumidos en varias áreas del mundo. Por ello, conocer la carga de contaminantes que presentan es fundamental para mantener la salud pública.
- La vida media de los contaminantes en estos organismos puede ser de meses, por lo cual, se consigue una integración espacio-temporal de los niveles de estas sustancias.
- Se tiene amplio conocimiento sobre el ciclo reproductivo, hábitos alimenticios, fisiología y comportamiento, factores que modifican los efectos de los contaminantes.

*1.2.2 Descripción de *Mytilus edulis chilensis* (Hupé, 1854)*

1.2.2.1 Clasificación taxonómica

Phyllum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Subclase: Pteriomorphia

Orden: Mytiloidea

Suborden: Mytilina

Superfamilia: Mytiloidea

Familia: Mytilidae

Subfamilia: Mytilinae

Género: *Mytilus*

Especie: *edulis chilensis* (Hupé, 1854)

1.2.2.2 Biología general

Esta especie presenta la típica forma de los mitílidos. Las valvas están cubiertas con un periostraco negro brillante. El umbo en el vértice agudo es puntiagudo y ligeramente inclinado. El margen de la valva dorsal es angular en la porción central, mientras que en la margen ventral es casi recta. Presenta contorno triangular y la línea de la margen ventral redondeada. La superficie externa de las valvas está surcada por líneas finas concéntricas. La charnela presenta numerosos dientecillos (Zagal & Hermosilla, 2001). En la **Figura 1** se puede observar el aspecto externo e interno del mejillón *Mytilus edulis chilensis*.

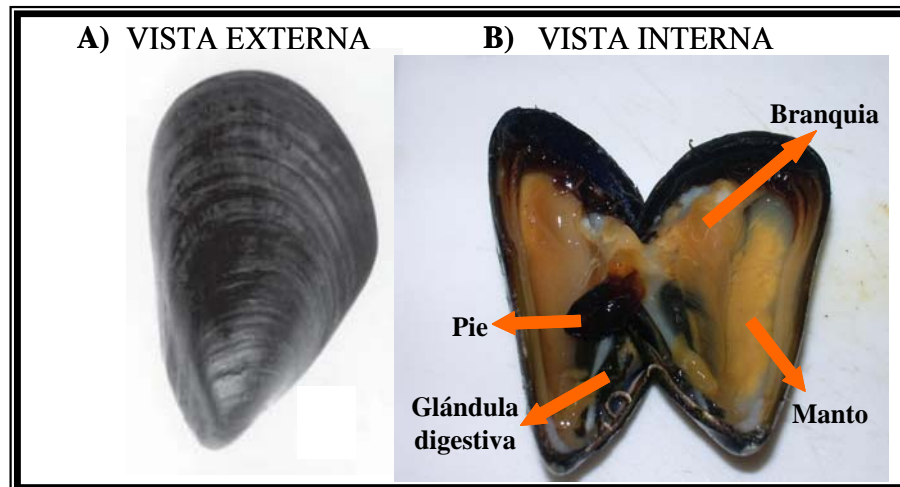


Figura 1. A) Vista externa del mejillón *Mytilus edulis chilensis* y B) vista interna donde se señalan los principales órganos.

Tanto la respiración como la alimentación de los mejillones son funciones de las branquias que, al filtrar el agua a través de ellas, retienen las partículas alimenticias (fitoplancton y finas partículas de materia orgánica muerta). Como el mejillón no tiene fermentos libres en el tubo digestivo, la digestión es de tipo intracelular. Los palpos labiales recogen las partículas retenidas por las branquias y las seleccionan para llevarlas a la boca. Las aguas residuales salen hacia fuera por el sifón.

1.2.2.3 Distribución geográfica y hábitat

M. edulis chilensis se distribuye desde Iquique (20° S) en Chile hasta la isla Navarino (55° S), el Estrecho de Magallanes (53° S) y continúa por la costa atlántica de Argentina hasta el norte de Brasil (Menzel, 1991). Sin embargo, hay controversias en referencia a la distribución geográfica de esta especie, y observaciones (fenotípicas) de distinto grado de mezcla se han efectuado en la costa patagónica entre *M. edulis chilensis* o *M. chilensis* y *M. edulis platensis* o *M. platensis*. Se encuentra comúnmente dominando comunidades costeras litorales y sublitorales (Seed & Suchanek, 1992) hasta 25 m de profundidad. Es usualmente encontrado adherido a rocas (granito, gneis, argilita, esquisto, basalto), en playas con canto rodado, o en las frondes y/o rizoides de la macroalga *Macrocystis sp.* Se lo ha encontrado en lugares muy protegidos así como en otros muy expuestos. Los mejillones marinos, por lo general, son encontrados en grupo, sobre las rocas lavadas por las olas, cada uno unido a la superficie de roca por su biso. El patrón de agregación en manchones evita que el impacto de las olas los disgregue con facilidad. Además, durante la bajamar, aquéllos que se encuentren

en medio de un grupo sufrirán menos pérdida de agua debido a la captura de agua por otros mejillones (Menzel, 1991).

1.2.2.4 Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de *M. edulis* varía espacial y temporalmente y generalmente exhibe un marcado patrón estacional. La época y duración de este ciclo probablemente resultan de una compleja interacción entre varios factores endógenos y exógenos. Aunque la temperatura y la disponibilidad de alimento son conocidos como los principales reguladores (Bayne, 1975; Newell *et al.*, 1982), los mejillones deben desarrollar gametas aún cuando las temperaturas son cercanas a cero (Kautsky, 1982), sugiriendo que la calidad y cantidad de alimento es el principal factor limitante (Bayne & Worrall, 1980; Newell *et al.*, 1982).

Tortorelli (1987) describe para la población de *M. edulis chilensis* de la bahía Ushuaia un período de desove muy prolongado; desde mayo hasta enero se suceden emisiones parciales asincrónicas con un pico de intensidad en mayo-junio y otro más importante en octubre-noviembre. El estadio de reposo sexual sólo aparece en bajos porcentajes en meses alternados durante prácticamente todo el año. En un estudio realizado en las islas Malvinas, también sobre el mejillón *M. edulis chilensis* (Gray *et al.*, 1997), se encontró que la gametogénesis comenzó hacia finales del invierno (Agosto-Septiembre) y el pico reproductivo se alcanzó a fines de la primavera (Noviembre-Diciembre). El principal período de desove ocurrió durante el verano (Diciembre-Marzo), luego del cual los organismos entraron en una fase de quiescencia reproductiva sin evidencia de gametogénesis hasta finales del invierno siguiente.

1.3 Descripción del área de estudio

1.3.1 Caracterización del canal Beagle

Las masas de agua que circundan la isla grande de Tierra del Fuego forman parte del ambiente oceánico subantártico. El canal Beagle presenta un régimen micromareal y semidiurno con desigualdades diurnas, con una amplitud media en Ushuaia de 1,1 m (Servicio de Hidrografía Naval, 2009). El canal posee una estratificación y dinámica estuarina equivalente a la de un fiordo, condicionada morfológicamente por el angostamiento de la isla Gable (**Fig. 2**). La costa del canal es rocosa dentada y sus bahías tienen origen en lineamientos tectónicos, afectados por la acción modeladora del hielo. Estas entrantes costeras

presentan un ambiente hidrodinámico restringido donde se desarrollan pequeñas playas de grava y conchas (Bujalesky *et al.*, 2004).

La isla de Tierra del Fuego se encuentra bajo la influencia de la masa oceánica, y debido al efecto moderador del mar las temperaturas mínimas no son tan bajas y las máximas son menores que en otras localidades a igual latitud en el hemisferio norte. La temperatura media anual al nivel del mar es del orden de los 5° C. Son poco comunes marcas menores a -12 °C en invierno y en verano rara vez superan los 23° C. El clima fueguino se caracteriza también por la presencia de viento entre los meses de septiembre y marzo. El viento predominante proviene del cuadrante oeste, pero en el caso de Ushuaia y debido a la presencia del cordón montañoso, el viento procede del cuadrante sudoeste con velocidades comprendidas entre 15 km/h y 100 km/h. La cordillera funciona como una barrera para los frentes de aire frío que llegan desde el Pacífico. Los vientos cargados de humedad se encuentran con las montañas, descargando gran parte del vapor que precipita en forma de nieve o lluvia sobre los valles y faldeos y continúan hacia el este con una carga menor de humedad. Debido a las características de circulación de las masas de aire antes mencionadas, las precipitaciones decaen fuertemente hacia el este, a lo largo del cordón cordillerano y ya a la altura de la ciudad de Ushuaia se pueden medir no más de 550 mm anuales. En las montañas se producen precipitaciones nivales de hasta 200 mm mensuales, que al licuarse alimentan a los ríos cortos y torrenciales que desembocan en el canal Beagle (Valladares, 2004).

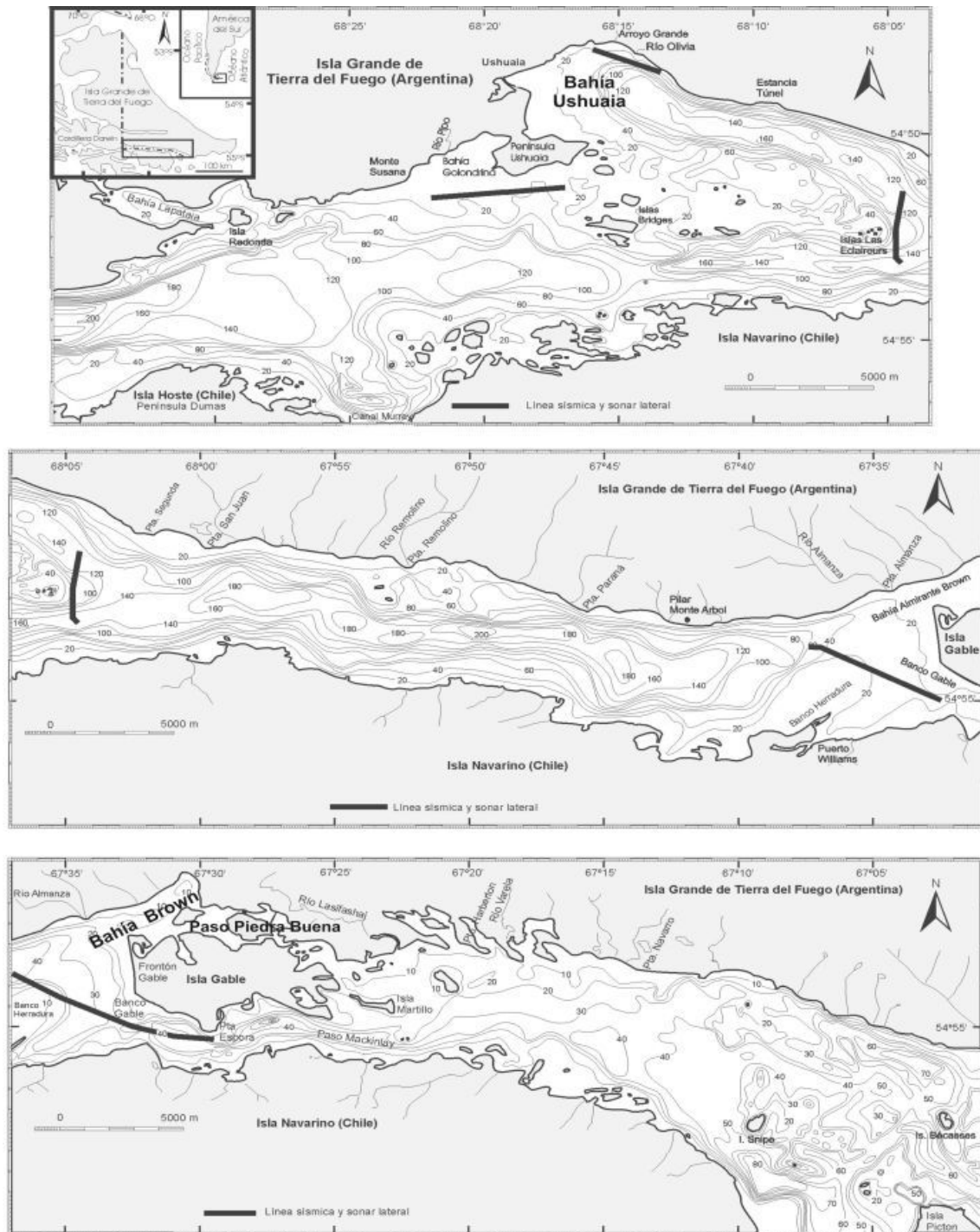


Figura 2. Mapa de ubicación.

1.3.2 Caracterización de la bahía Brown

En la bahía Brown está ubicado el asentamiento Almanza, a unos 45 km al este de la ciudad de Ushuaia, en la costa norte del canal Beagle a $54^{\circ} 52' 21.74''$ S y $67^{\circ} 34' 36.85''$ W y a 7 km al noreste del puerto chileno de Puerto Williams (Fig. 2). No es mucha la información

disponible para este sector del canal Beagle (Hernando *et al.*, 2005, 2008; Esteves *et al.*, 2006a). Estudios preliminares de corrientes realizados en el área de bahía Brown indican que en marea descendente el agua permanece en el interior de la Bahía, describiendo una derrota casi lineal en dirección sur (Amin, com. pers.). Con la marea en ascenso el agua ingresaría a la Bahía, registrándose velocidades de corriente superiores a las obtenidas con la marea en bajante, en dirección este, saliendo por paso Piedra Buena. Los argumentos presentados permiten interpretar que la renovación de agua en la Bahía se realiza en dirección oeste-este (Hernando *et al.*, 2008). Actualmente en la zona costera de Almanza se desarrollan cultivos de moluscos que son comercializados localmente en Río Grande y Ushuaia. Las autoridades provinciales pretenden obtener la clasificación de las aguas según las normas establecidas por SENASA con el propósito de impulsar esta actividad, ya que permitiría comercializar y exportar moluscos bivalvos vivos para el consumo humano. A esta zona costera llegan chorrillos de variado caudal y la deriva del material aportado por el río Almanza. Es una zona de navegación restringida a embarcaciones de pequeño y mediano tamaño afectadas a los cultivos (Hernando *et al.*, 2008).

1.3.3 Caracterización de la bahía Ushuaia

Bahía Ushuaia tiene 9 km de longitud, es más profunda en el lado oriental y hacia el canal Beagle, alcanzando los 130 m de profundidad. Su fondo es de consolidado blando con rocas y valvas. El sector de la bahía Ushuaia fue caracterizado sedimentológicamente como de limolitas arenosas con mayor proporción de arcilla que evidencia un sector de menor dinámica (Colizza, 1991). Presenta una corriente que se desplaza del oeste a lo largo de la costa norte de la Bahía a 2 cm/seg. y avanza hacia el sudeste por la costa sur a 16,3 cm/seg. (Balestrini *et al.*, 1998).

La costa presenta sectores contorneados por montañas cubiertas por bosques y otros de perfil bajo, con playas de pedregullo o arena y fragmentos de rocas. El aspecto general es rocoso, recortado y escarpado con terrazas de agradación marina y playas que sólo alcanzan cierto desarrollo cuando se vinculan con áreas de escaso relieve relativo. Las playas son reducidas y están asociadas con desembocaduras de ríos (Boltovskoy, 2008).

Entre los cauces de agua dulce que recibe la bahía Ushuaia se destacan los siguientes (Valladares, 2004):

- Río Grande de Ushuaia: tiene su cabecera en los montes Martial. En su corto recorrido, fluye primero hacia el sudeste cambiando rápidamente su rumbo hacia el sur hasta desembocar en la bahía Ushuaia.

- Río Olivia: nace de la acumulación de aguas de deshielo de la vertiente austral de la sierra de Alvear y de las laderas nororientales de la sierra Valdivieso. Fluye hacia el este hasta recibir el aporte del río Carabajal. Allí desvía su curso hacia el sur y corre formando sinuosidades hasta su desembocadura, en la bahía Ushuaia. Su cuenca activa es de 140 km².
- Arroyo Grande: presenta un valle de desarrollo O-E, casi paralelo al del río Olivia, de morfología glaciar, con numerosos aportes transversales. Su cuenca es de 120 km². La cuenca superior pertenece a la jurisdicción del Parque Nacional de Tierra del Fuego. En la cuenca intermedia el valle se amplía y está ocupado principalmente por turbales. En el tramo inferior, el valle se estrecha y el cauce describe un quiebre de casi 90° para desembocar en el canal Beagle dentro del ejido urbano de Ushuaia. La Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios realiza una captación de hasta 200 l/seg. para su planta potabilizadora en Ushuaia. En los últimos 500 m, el curso está contaminado por efluentes cloacales.
- Arroyo Buena Esperanza: en su cabecera se encuentra el glaciar Martial (1300 m de altura). Este arroyo baja con pendiente significativa y desemboca en la ciudad de Ushuaia, en la bahía Encerrada. En su último tramo, está contaminado por aportes pluvio-cloacales. La cuenca es pequeña (10 km²) pero es importante por ser una de las fuentes de captación de agua potable para la ciudad. En la cuenca intermedia hay actividad turística, habiéndose construido importantes hoteles.

1.4 Antecedentes y situación actual

La ciudad de Ushuaia es la capital de la provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Ushuaia ha sido considerada como la ciudad más austral del mundo y se encuentra sobre la costa norte del canal Beagle al pie del cordón Martial, en plena cordillera de los Andes. Está situada a 54° 48' de latitud sur y 68° 17' de longitud oeste, a nivel del mar.

Según el Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas del año 2001 (INDEC, 2001), en el departamento de Ushuaia se censaron 45.785 habitantes, lo que implicó un crecimiento relativo de 55,67 % respecto al censo anterior en 1991. Gran parte de esa inmigración se ha debido a la Ley Nacional 19640 de Promoción Industrial que impulsó la instalación de numerosas fábricas, de las cuales quedan muy pocas en la actualidad. Este incremento poblacional no estuvo acompañado de la ampliación adecuada de las redes de servicios. En este sentido, las aguas servidas y cloacales, los drenajes pluviales y los efluentes industriales desde entonces y hasta la actualidad son vertidos a la bahía Ushuaia sin

tratamiento alguno. La gran mayoría de las descargas se ubican en la línea costera adyacente a la ciudad, mientras que el dispersor cloacal ubicado sobre la península Ushuaia (bahía Golondrina) funciona como un sumidero que colecta descargas desde una red principal que se encuentra sobre la línea costera de bahía Ushuaia y de redes secundarias que provienen del sector sudoeste de la ciudad. A pesar de que la ciudad cuenta con el dispersor cloacal que vierte en la bahía Golondrina, se ha detectado en las zonas costeras contaminación urbana por líquidos cloacales, caracterizados por concentraciones mínimas de oxígeno disuelto, máximos nutrientes (amonio, nitrito y fosfato) y concentraciones elevadas de coliformes fecales y *Escherichia coli* (Esteves & Amin, 2004).

La actividad portuaria se ha visto modificada notablemente en los últimos años. El puerto de Ushuaia tiene destino comercial cuyas principales actividades son la pesca, el turismo y el manejo de cargas generales en bultos y contenedores. Considerable aumento han mostrado las actividades marítimas relacionadas a barcos de pasajeros. En los últimos cinco años han arribado entre 200 y 350 barcos por año. Por otro lado, los buques de pesca han descendido de 95 en el 2004 a 48 en el 2008; los de carga también bajaron de 100 en 2004 a 50 en 2008; los científicos bajaron de 8 en 2004 a 3 en 2008; mientras que los militares y tanques se han mantenido entre 16 y 26.

Además se encuentra el muelle de combustible Planta Orión, que es operado y administrado por Repsol YPF SA como puerto privado. Se encuentra ubicado dentro de la bahía Ushuaia, sobre el lado noroeste. Esta terminal opera con hidrocarburos persistentes (derivados pesados, gas-oil, fuel-oil, etc.) y no persistentes (naftas). La operatoria de esta plataforma consiste en cargas y descargas de buques tanques, embarcaciones medianas (pesqueros, catamaranes, etc.) y embarcaciones menores (veleros y lanchas). Estas actividades relacionadas a la explotación y transporte de petróleo, tráfico marítimo y operaciones portuarias representan un potencial riesgo de contaminación de la zona costera.

El laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Marina del Centro Austral de Investigaciones Científicas de Ushuaia, en cooperación con el laboratorio de Química Marina del Instituto Argentino de Oceanografía de Bahía Blanca y el laboratorio de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas del Centro Nacional Patagónico desarrollaron desde 1994 un Programa de *Evaluación de la contaminación en la zona costera próxima a Ushuaia*. Este programa ha permitido obtener datos sobre diferentes aspectos oceanográficos del sistema, comprobar la existencia de aportes terrestres de metales pesados al sistema costero del canal Beagle, a partir de niveles significativos de esos elementos en los sedimentos y mejillones (Amin *et al.*, 1996a; 1996b) y analizar efectos letales y subletales de los metales

pesados e hidrocarburos sobre algunas especies de interés comercial como *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Amin, 1995; Amin *et al.*, 1998, 2003; Amin & Comoglio, 1999, 2002). En cuanto a los hidrocarburos, se han encontrado niveles moderados en sedimentos superficiales de bahía Encerrada y altas concentraciones en el puerto de Ushuaia, en este último caso con una fuerte componente antrópica (Esteves *et al.*, 2006b). En la zona de estudio se han realizado trabajos preliminares con mitílidos transplantados para evaluar bioacumulación de metales, parámetros fisiológicos y bioquímicos (Amin *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2005), aunque sin una visión holística que incluyera una serie sincrónica completa de estudios ambientales y biológicos.

La mayoría de los estudios previos sobre calidad ambiental marina se han focalizado en determinar las concentraciones de contaminantes en los sedimentos, en el agua o en la biota. Esos estudios, sin embargo, no han considerado los efectos ecológicos de los contaminantes en los organismos marinos en conjunto con las concentraciones ambientales, pudiendo estar bajo riesgo la salud de los organismos. Muchos autores han enfatizado la necesidad de acoplar las determinaciones químicas de los contaminantes ambientales con el uso de biomarcadores de exposición y/o de efecto que permitan proveer evidencia de una relación causa-efecto y mejores directivas de manejo de riesgo ambiental (Verlecar *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2007). La originalidad del presente trabajo se basa en la necesidad de desarrollar e implementar técnicas de monitoreo ecotoxicológicas que sean sensibles, poco costosas e informativas para utilizar con organismos marinos de la bahía Ushuaia.

1.5 Objetivos del presente estudio

- Analizar la respuesta del mejillón *Mytilus edulis chilensis* (proveniente de cultivos comerciales en bahía Brown) transplantado a la bahía Ushuaia (zona con reconocido impacto de actividades antropogénicas), a partir de la medición de biomarcadores de contaminación

- Caracterizar desde el punto de vista físico y químico la zona costera de la bahía Ushuaia, a fin de identificar fuentes naturales y antrópicas y describir patrones locales de cambios en esos parámetros.

- Desarrollar los protocolos analíticos para el estudio de biomarcadores bioquímicos para la validación cuantitativa de los efectos biológicos producidos por el estrés antrópico, con el fin de utilizarlo como herramienta en el monitoreo de un ambiente costero.

- Validar el uso de un organismo de interés local como especie indicadora.

- Generar información básica que facilite la toma de decisiones a las instituciones responsables de la regulación y el manejo de recursos costeros de la ciudad de Ushuaia.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitios de muestreo

Se realizó un relevamiento de la zona costera de bahía Ushuaia en la provincia de Tierra del Fuego con el propósito de definir los sitios a monitorear y se diseñaron los dispositivos para los trasplantes.

2.1.1 Bahía Brown

Puerto Almanza está ubicado en la bahía Brown a unos 45 km al este de la ciudad de Ushuaia, en la costa norte del canal Beagle a $54^{\circ} 52' 21.74''$ S y $67^{\circ} 34' 36.85''$ W y a siete kilómetros al noreste del puerto chileno Williams. En 1987 se promulgó la Ley N° 308 para crear el asentamiento urbano Almanza con el fin de fomentar el establecimiento y desarrollo de las actividades de pesca, turismo y comercio en esa región. Recién en el año 1991 llegaron los primeros pobladores civiles y en el 2001 se establecieron algunos pescadores y acuicultores que construyeron sus cabañas allí y comenzaron con el cultivo de mejillones en bateas como las que se muestran en la **Figura 3** y de donde fueron extraídos los mejillones para el presente estudio. Actualmente la población de Almanza, de asentamiento permanente y esporádico, suma un total de unas 30 personas.



Figura 3. Bateas de cultivo del mejillón *Mytilus edulis chilensis* ubicadas frente a Almanza en la bahía Brown.

2.1.2 Bahía Ushuaia

Los mejillones fueron transplantados a cinco sitios de la bahía Ushuaia donde se sumergieron a unos cinco metros de profundidad: zona industrial, planta Orión, club Náutico, caleta Aspirante y península Ushuaia (**Fig. 4**). Los sitios fueron seleccionados de acuerdo a fuentes de impacto antrópico (**Tabla 1**).



Figura 4. Ubicación de los sitios de muestreo en la bahía Ushuaia.

Tabla 1. Descripción de los sitios de muestreo seleccionados.

SITIO	IMPACTO HUMANO	IMPACTO ESPERADO
Zona Industrial (ZI)	-Fábricas -Población -Desechos urbanos -Desechos industriales	Alto
Planta Orión (PO)	-Muelle carga/descarga combustible -Muelle militar -Intenso tráfico marítimo	Alto
Club Náutico (CN)	-Desechos urbanos -Descargas pluviales -Tráfico de barcos -Actividades náuticas deportivas	Alto
Caleta Aspirante (CA)	-Acceso sólo por agua -Sin actividad antrópica	Bajo
Península Ushuaia (PU)	-Acceso solo por agua -Zona de buceo deportivo	Bajo

2.2 Diseño experimental

En la bahía Brown se seleccionaron organismos provenientes de una misma cohorte y de tallas homogéneas para minimizar la variabilidad. Los mismos fueron transportados, en recipientes plásticos con abundante agua, al laboratorio localizado en la ciudad de Ushuaia. En el laboratorio, los organismos fueron colocados en acuarios en el interior de una cámara climatizada y divididos en subgrupos de 50 individuos. Posteriormente se colocaron en cajas plásticas de 18x12x18 cm con una apertura de malla de 1 cm² para asegurar la libre circulación de agua a través de ellas. Se formaron dispositivos con tres cajas unidas a un cabo, con una boya en el extremo superior y un lastre de cemento de unos 15 kg. en el extremo inferior (**Fig. 5**) para fijarlo en la posición deseada. Los dispositivos fueron llevados a los sitios bajo estudio (ver **Sección 2.1.2**) y fueron sumergidos 5 metros aproximadamente.



Figura 5. Dispositivo utilizado.

➤ Experimento 1

Con el fin de caracterizar el área de donde provienen los individuos a utilizar en los experimentos planteados en esta tesis, se realizó un estudio *in situ* de bahía Brown entre abril y agosto del 2005. Se seleccionaron mejillones de talla homogénea y se introdujeron en los dispositivos contruidos para tal fin. Los mismos se colocaron en la misma batea de cultivo de donde fueron sustraídos y se tomaron submuestras de treinta individuos al inicio del experimento y a las dos, seis, once y dieciocho semanas de exposición. A esos mismos tiempos se midieron parámetros físicos *in situ* en el agua y se colectaron muestras de agua para determinar nutrientes y clorofila *a* en el laboratorio. A tiempo cero y a las dieciocho semanas de exposición se colectaron muestras de sedimentos y de mejillones, de éstos últimos se separaron muestras de branquia y glándula digestiva, para determinar en ambas matrices los niveles de metales pesados.

Parámetros medidos en:

❖ Agua

- Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad
- Nitrito, nitrato, fosfato y silicato
- Clorofila *a*

❖ **Sedimento**

- Concentración de Cu, Zn, Fe, Cd y Pb en fracción <62 µm.

❖ **Organismos**

- Actividades de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión-S-transferasa en branquia y glándula digestiva
- Niveles de peroxidación lipídica en branquia y glándula digestiva
- Lípidos totales en branquia, manto y glándula digestiva
- Concentración de Cu, Zn, Fe, Cd y Pb en branquia y glándula digestiva
- Contenido de ceniza, materia orgánica y agua en la totalidad del tejido blando
- Índice de condición

➤ **Experimento 2**

Este experimento se realizó con la finalidad de evaluar la calidad ambiental de la bahía Ushuaia, considerando cinco sitios puntuales, y su posible impacto sobre mejillones transplantados. Para incorporar el efecto de la estacionalidad, se plantearon experimentos de verano y de invierno con una duración total de seis semanas cada uno, que se repitieron en la misma época del año siguiente. Los experimentos de invierno se realizaron en: agosto de 2006, julio y agosto de 2007 y de 2008. Mientras que los experimentos de verano se realizaron en: enero y febrero de 2007 y de 2008.

Se transplantaron mejillones desde la bahía Brown a los cinco sitios en la bahía Ushuaia: zona industrial, planta Orión, club Náutico, caleta Aspirante y península Ushuaia (ver **Sección 2.1.2**). En cada sitio se colocó un total aproximado de 150 mejillones de tamaño homogéneo. Las muestras de mejillones de cada sitio fueron tomadas al inicio del experimento (t=0) y a las semanas dos, cuatro y seis de exposición. Las muestras de agua fueron tomadas previamente a las muestras de organismos a las semanas uno, tres y cinco para conocer las condiciones ambientales a las cuales estuvieron expuestos. Las muestras de sedimento fueron colectadas al inicio del experimento.

Parámetros medidos en:

❖ **Agua**

- Temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad
- Nitrito, nitrato, amonio, fosfato y silicato
- Clorofila *a*
- Materia orgánica particulada

❖ Sedimento

- Concentración de Cu, Zn, Fe, Cd y Pb en fracción <math><62\ \mu\text{m}</math> al inicio del experimento, tanto de la bahía Brown como de las cinco áreas de bahía Ushuaia

❖ Organismos

- Actividades de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión-S-transferasa en branquia y glándula digestiva
- Niveles de peroxidación lipídica en branquia y glándula digestiva
- Lípidos totales en manto y glándula digestiva
- Contenido de ceniza, materia orgánica y agua en la totalidad del tejido blando
- Concentración de Cu, Zn, Fe, Cd y Pb en branquia y glándula digestiva
- Índice de condición

➤ Experimento 3

Con el propósito de evaluar si existían variaciones en los biomarcadores previo a la semana dos de exposición, se diseñó un experimento con muestreos a cero, dos, cinco, ocho y once días de exposición. Se efectuó un transplante en invierno de 2007 y otro en verano de 2008, para contemplar las posibles variaciones estacionales. El mismo consistió en el transplante de mejillones desde la bahía Brown hacia tres sitios de la bahía Ushuaia: zona industrial, planta Orión y club Náutico. En estos experimentos se midió actividad enzimática y peroxidación lipídica en branquia y glándula digestiva. Se midió *in situ* en el agua de mar: temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad.

2.3 Determinaciones en agua

2.3.1 Obtención de muestras

Muestras de agua superficial se colectaron en botellas plásticas de 2 litros, desde el bote. Una vez en el laboratorio se filtraron con filtros de fibra de vidrio (Whatman, GF/C) de $1,2\ \mu\text{m}$ tamaño de poro y 45 mm de diámetro usando un sistema de filtrado de material plástico (**Fig. 6**).



Figura 6. Sistema de filtrado.

2.3.2 Parámetros físicos

Los siguientes parámetros físicos fueron medidos *in situ* en el agua de mar sub-superficial: pH, temperatura, oxígeno disuelto y salinidad, utilizando una sonda multiparamétrica Horiba U-10 (Fig. 7). Las precisiones de las lecturas fueron de 0,01 para el pH y de 0,1 para la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad.



Figura 7. Sonda multiparamétrica Horiba U-10.

2.3.3 Parámetros químicos

2.3.3.1 Nutrientes inorgánicos disueltos

Para la determinación de nutrientes disueltos se filtraron 25 ml de muestra y se almacenaron en freezer a -20°C hasta su análisis. Para el caso particular del amonio se filtraron 2 réplicas de 25 ml cada una, se fijaron con 1 ml de fenol y se guardaron en frascos de vidrio ámbar en heladera a 4°C en oscuridad hasta su análisis.

➤ Nitrito

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

➤ Nitrito

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

➤ Silicato

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

➤ *Fosfato*

La determinación de la concentración de fosfato se realizó siguiendo el método de Eberlein & Kattner (1987), basado en el método original de azul de molibdeno de Murphy & Riley (1962). En este caso, los iones ortofosfatos reaccionan con el molibdato de amonio para formar un complejo de color amarillo, el fosfomolibdato de amonio, que luego de la reducción da una coloración azul. Como agente reductor se utiliza ácido ascórbico pues se obtienen resultados reproducibles y brinda la ventaja de poder utilizar un único reactivo formado por: ácido sulfúrico (H_2SO_4), molibdato de amonio hidratado $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 7H_2O]$, ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) y tartrato de antimonio y potasio $[K(SbO)-C_4H_4O_6 \times 0,5H_2O]$. Al circuito analítico además se le agrega un agente de lavado que contiene 2,5 ml del “Aerosol 22” (Technicon GmbH, Bad Vilbel, FRG) en 1 litro de agua bidestilada.

La determinación de nitrato, nitrito, silicato y fosfato siguiendo los métodos ya mencionados, se realizó en el Laboratorio de Química Marina del Instituto Argentino de Oceanografía en la ciudad de Bahía Blanca. Para ello se utilizó un autoanalizador Technicon® AA-II automático de cuatro canales. Las muestras de agua, los blancos y patrones se colocaron en cubetas acondicionadas en el muestreador del equipo. Luego, las muestras con el agregado de los reactivos correspondientes fueron incorporadas automáticamente permitiendo en cada caso el desarrollo del color propio de cada nutriente, seguido de la medición de la absorbancia de cada uno a la longitud de onda programada en un detector, registrando automáticamente la concentración.

➤ *Amonio*

La concentración de amonio fue analizada por el método del azul de indofenol descrito por Strickland & Parsons (1972). En solución alcalina (pH 10,4 - 11,5), los iones amonio reaccionan con el hipoclorito para formar monocloramina. En presencia de fenol e hipoclorito en exceso, la monocloramina forma un compuesto azulado llamado indofenol, cuando el nitroprusiato es utilizado como catalizador.

La muestra fijada originalmente con fenol y conservada en heladera a 4° C, se retiró de la heladera hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Se le adicionó 1 ml de nitroprusiato de sodio como catalizador y 2,5 ml de solución oxidante (solución concentrada de hipoclorito de sodio en medio alcalino). La muestra se agitó y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por una hora. Luego se leyó la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro y se sustrajo la absorbancia de los blancos que fueron preparados de la misma manera que las muestras pero

con agua de mar con bajo contenido de amonio. Para la calibración, se preparó una curva en base a tres diluciones diferentes a partir de una solución madre de sulfato de amonio de 3 $\mu\text{mol/L}$. Las muestras, blancos y curva de calibración se realizaron por duplicado.

Para el cálculo de la concentración de cada uno de los nutrientes disueltos, se midió en el registro de papel la altura de cada pico en milímetros, correspondiente al valor de absorbancia del blanco de reactivo, los estándares y las muestras. El valor de absorbancia es proporcional a la cantidad de nutriente en la muestra. Para efectuar el cálculo se aplica un factor F (específico para cada nutriente), obtenido a partir de la ley de Lamber-Beer, con el cual cada dato de muestra obtenido en milímetros es expresado en concentración.

$$F = \frac{\left(\frac{\mu\text{mol}}{L} \right)}{\text{mm}_{\text{patrón}}} \quad (1)$$

Donde:

mm patrón = altura del pico del patrón

La concentración final de la muestra resulta entonces:

$$C = F * \text{mm}_{\text{muestra}} \quad (2)$$

Donde:

C = concentración de la muestra ($\mu\text{mol/L}$)

F = factor

mm muestra = altura del pico de la muestra

2.3.3.2 *Clorofila a*

Las muestras para la determinación de clorofila *a* se obtuvieron a partir del material retenido en los filtros utilizados durante la filtración de agua para nutrientes disueltos, detallada previamente en la **Sección 2.3.3**. El volumen filtrado varió entre 750 y 1250 ml. Los filtros con el material retenido fueron guardados en tubos graduados de vidrio y almacenados en oscuridad en freezer a -20°C hasta su posterior análisis.

La extracción de los pigmentos fotosintéticos en el filtro se realizó según Holm-Hansen & Riemann (1978), mediante extracción con metanol. Cada filtro con la muestra se colocó en un tubo de 10 ml de capacidad y se le agregó 5 ml de metanol. Se dejó incubar un tiempo

mínimo de 60 minutos en oscuridad a 4° C. Posteriormente se realizó la lectura de fluorescencia de los extractos en un fluorómetro Sequoia Turner Modelo 450 (Holm-Hansen *et al.*, 1965). Con el fin de discriminar los productos de degradación de la clorofila, se añadieron a continuación, tres gotas de ácido clorhídrico 1 N a la cubeta de lectura, basándose en el principio de que la clorofila *a* puede ser convertida en feofitina por la simple adición de ácido diluido o débil. Se dejó reposar y se realizó nuevamente la lectura.

Para calcular la cantidad de clorofila *a* en el agua de mar se aplicó la fórmula 3:

$$C = \left\{ \frac{[0,03 * (Ra - Rb)]}{(V * 100)} \right\} * \left(\frac{10}{v} \right) \quad (3)$$

Donde:

C = concentración de clorofila *a* (µg clorofila *a*/L)

Ra = lectura fluorómetro antes de agregar HCl

Rb = lectura fluorómetro después de agregar HCl

V = volumen de agua de mar filtrada (L)

v = volumen de metanol (ml)

2.3.3.3 *Materia orgánica particulada (MOP)*

Para la determinación de materia orgánica particulada se aplicó el método descrito por Strickland & Parsons (1972). Se filtraron entre 750 y 1250 ml de muestra a través filtros de fibra de vidrio (Whatman, GF/C) previamente calcinados (450° C durante media hora) de 1,2 µm tamaño de poro y 45 mm de diámetro. Se adicionaron 2-4 ml de sulfato de sodio anhidro al filtro con el material retenido para evitar una disrupción celular significativa y pérdida de carbono. Los filtros así tratados, fueron colocados en sobres de aluminio previamente calcinados a la misma temperatura y almacenados en freezer a -20° C hasta su análisis.

Según el método aplicado, la MOP fue determinada por oxidación húmeda con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y dicromato de potasio, adaptada para espectrofotometría, que da una estimación rápida del contenido de materia orgánica particulada en el agua de mar. El principio de este método es medir la disminución en la absorbancia del color amarillo del dicromato (Cr²⁺), después de que fuera oxidado por la materia orgánica presente a Cr³⁺. Los cloruros interfieren con la oxidación de material orgánico con dicromato, reduciendo este último. El agregado de ácido fosfórico volatiliza la mayor parte de los cloruros como cloruro de hidrógeno y reduce el resto a un nivel aceptable (<0,1 mg Cl).

Los filtros con la muestra de materia orgánica particulada se colocaron en probetas de 50 ml de capacidad y se les adicionó (bajo campana) 1 ml de ácido fosfórico concentrado y 1 ml de agua destilada; seguidamente fueron colocados en baño termostático a $105 \pm 5^\circ \text{C}$ durante 30 minutos. Luego se les agregó 10 ml de oxidante (mezcla de dicromato de potasio con ácido sulfúrico concentrado) y 4 ml de agua destilada y se calentaron nuevamente en baño termostático a $105 \pm 5^\circ \text{C}$ durante 60 minutos, para asegurar una oxidación completa. Se enfriaron y luego se llevaron a volumen final (50 ml) con agua bidestilada. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS, leyendo la extinción de la solución blanco luego de llevar a cero con la muestra a 440 nm. Para la calibración se usó una solución estandarizada de glucosa. Todas las determinaciones de estándares y blanco se realizaron por duplicado.

Para calcular la cantidad de materia orgánica particulada en el agua de mar se aplicó la fórmula 4:

$$C = \frac{(A * F * v)}{V} \quad (4)$$

Donde:

C = concentración de carbono (mg/m^3)

A = absorbancia corregida para la absorbancia del cromo trivalente según la expresión:

$$A = 1,1 * A_{\text{obs.}}$$

F = factor determinado por $F = 120 / A_C$ (mg/ml)

A_C = absorbancia promedio de tres estándares

v = volumen del oxidante utilizado (ml)

V = volumen de muestra filtrada (L)

El material utilizado para las determinaciones en agua previamente detalladas fue lavado con detergente no iónico, solución sulfocrómica y agua destilada, siendo la única excepción el material utilizado para la determinación de nitrito, nitrato, silicato y fosfato donde en lugar de solución sulfocrómica se utilizó ácido clorhídrico al 5 %.

2.4 Determinaciones en sedimento

2.4.1 Obtención de muestras

Las muestras de sedimento fueron recolectadas en cada sitio usando una draga manual Van Veen (**Fig. 8**). La draga se sumergió entre 3 y 5 veces por sitio obteniéndose una muestra compuesta que se almacenó en bolsa plástica y se transportó al laboratorio. Posteriormente las muestras se secaron en estufa a $60 \pm 5^\circ \text{C}$ hasta peso constante y se guardaron en bolsas plásticas en un ambiente seco hasta su utilización.



Figura 8. Obtención de muestra de sedimento.

2.4.2 Granulometría del sedimento

Para determinar las fracciones granulométricas se utilizó un método gravimétrico, mediante tamizado en seco, separando en tres fracciones: $>1000\mu\text{m}$, $1000\mu\text{m} - 62\mu\text{m}$, $<62\mu\text{m}$ y pesándose cada fracción en balanza analítica. En la **Tabla 2** se detalla el rango de tamaño de grano en que se halla comprendida cada fracción granulométrica.

Tabla 2. Clasificación de los sedimentos según el tamaño de grano.

Fracción	Clasificación
$< 62 \mu\text{m}$	Fango (limo + arcilla)
$1 \text{ mm} - 62 \mu\text{m}$	Arena
$> 1 \text{ mm}$	Grava

2.4.3 Metales pesados totales en sedimento

La determinación de metales pesados totales se realizó sobre la fracción fina seca ($<62 \mu\text{m}$) obtenida según se describió en el párrafo anterior. Los metales Cu, Zn, Cd, Pb y Fe fueron determinados en 0,5 g de esa fracción usando el método propuesto por Dalziel & Baker (1983), modificado por Marcovecchio *et al.* (1988), reemplazando por ácido perclórico al peróxido de hidrógeno utilizado originalmente para mejorar la oxidación de las muestras. Esta técnica consiste en una mineralización con una mezcla de ácidos fuertes ($\text{HClO}_4:\text{HNO}_3$, 1:3) bajo condiciones controladas de temperatura en un baño de glicerina ($110 \pm 10^\circ \text{C}$). En los casos en que fue necesario, se agregaron cantidades adicionales de ácido nítrico concentrado. Una vez completada la mineralización y obtenido un extracto de aproximadamente 1 ml, los tubos se retiraron del baño y se dejaron enfriar. Cada extracto se trasvasó con pipeta Pasteur a tubos de centrifuga graduados con tapa esmerilada. El tubo de ensayo fue enjuagado 3-4 veces con solución acuosa de ácido nítrico 0,7 % v/v y cada enjuague fue trasvasado al tubo graduado enrasando a un volumen final de 10 ml. Para cada

metal se leyeron blancos, estándares y muestras en forma conjunta. Se analizaron por series de unas 10-12 muestras con sus duplicados. Con cada serie se leyeron nuevamente las soluciones patrón para cada uno de los metales bajo análisis. Las concentraciones de metales en esas soluciones fueron medidas utilizando un espectro de absorción atómica Perkin Elmer AA-2380 con llama de aire-acetileno y corrección de fondo de deuterio (D₂BGC). Las muestras y los blancos se realizaron por duplicado.

Todo el material utilizado fue previamente lavado con detergente no iónico, enjuagado con abundante agua corriente y luego con agua destilada grado-laboratorio. Se mantuvo unas 48 hs. en ácido nítrico (HNO₃) al 0,7 % y se enjuagó con agua destilada repetidas veces.

Para calcular las concentraciones de cada uno de los metales en sedimento y en organismo, se realizó una curva de calibración - de manera similar a la correspondiente a nutrientes - graficando los valores de absorbancia obtenidos de cada elemento en función de las concentraciones de las soluciones patrones de trabajo. Se utilizó un mínimo de 4 patrones y un máximo de 7, cada uno de ellos por duplicado. Se ajustaron los valores obtenidos a una recta de regresión según la ecuación 5:

$$Y = a * X + b \quad (5)$$

Donde:

Y = absorbancia del elemento de interés

X = concentración correspondiente (µg/g o mg/g) para matrices sólidas

a = pendiente de la recta

b = ordenada al origen

Con las lecturas de absorbancia (**Y**) en cada uno de los extractos, se calculó luego la concentración de cada metal (**C**), siendo posteriormente corregida para que el resultado final en la matriz de muestra original quede expresado en µg/g, excepto para el hierro en sedimento que se expresó en mg/g. Se promediaron los valores de ambas réplicas para cada metal. Se aplicó la ecuación 6:

$$C = \frac{\left\{ \left[\frac{(Abs. - b)}{a} \right] * 10 \right\}}{\text{peso}} \quad (6)$$

Donde:

C = concentración de metal (µg o mg metal/g tejido o sedimento seco)

10 = volumen final del extracto (ml)

Peso = peso seco (g)

2.4.3.1 Normalización geoquímica y factor de enriquecimiento (FE)

En un esfuerzo por compensar la variabilidad natural de los elementos en los sedimentos, se realizó una normalización para que cualquier contribución antrópica de los metales pudiera descubrirse y cuantificarse. Loring (1991) indicó que la variabilidad mineralógica y granular natural se pueden compensar mediante la normalización geoquímica con el elemento más abundante. La ecuación siguiente fue usada para estimar el FE de los metales Cu, Zn, Cd y Pb en el sedimento de cada sitio utilizando el Fe como elemento normalizador:

$$FE = \frac{\left(\frac{Me}{Fe}\right)_{muestra}}{\left(\frac{Me}{Fe}\right)_{corteza}} \quad (7)$$

Donde:

FE = factor de enriquecimiento

(Me/Fe) muestra = concentración media del metal ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en relación a la concentración media de Fe (mg/g peso seco) en la muestra

(Me/Fe) corteza = concentración del metal ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en relación a la concentración de Fe (mg/g peso seco) en la corteza terrestre

Los valores promedio de composición de la roca superficial de la corteza terrestre expuesta a erosión fueron tomados de Martin & Meybeck (1979). Dichos valores fueron: Fe 4,1 %, Cu 32, Zn 127, Cd 0,2 y Pb 16 $\mu\text{g/g}$.

2.4.3.2 Porcentajes de recuperación

La calidad analítica de la determinación de cada metal se controló con materiales de referencia provistos por el National Institute for Environmental Studies (NIES) de Tsukuba (Japón). Se tomaron los valores obtenidos por Ferrer (2001) y Andrade (2001), quienes determinaron la concentración, y a partir de ella los porcentajes de recuperación, de los metales pesados Cu, Zn, Fe, Cd y Pb en el material de referencia "Pond Sediments, R.M. N° 2" (**Tabla 3**).

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de los metales estudiados en el material de referencia (NIES) para determinar la calidad analítica (rangos).

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

2.4.3.3 Límite de detección del método

Es la concentración mínima de un elemento que cuando es procesado a través del método completo puede ser detectada por encima del ruido de fondo con un nivel de confianza del 99 %. Los resultados por debajo de este límite son reportados como “no detectables” (nd).

Para estimar los límites de detección (LDM) del método aplicado bajo las condiciones de trabajo antes mencionadas se procedió de la siguiente manera. Se tomaron en cada caso 7 ensayos de blanco de reactivo sometidos a los mismos pasos de procesamiento de las muestras y se obtuvieron los valores de absorbancia. Con éstas se calcularon las concentraciones finales teniendo en cuenta los algoritmos específicos. Se aplicó el mismo factor de corrección que a las muestras para que quedaran expresadas en las mismas unidades. Finalmente el LDM se calculó multiplicando la desviación estándar (DS) de las siete réplicas (n) por el valor apropiado obtenido de la tabla de “t-Student” para n-1 grados de libertad y un alfa de 0,01 (**Tabla 4**).

$$LDM = t_{(n-1,1-\alpha)} * DS \quad (8)$$

Tabla 4. Límites de detección del método aplicado para cada metal.

	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb
$\mu\text{g/g}$	0,77	0,88	2,73	0,27	2,15

2.5 Determinaciones en organismos

2.5.1 Obtención de muestras

Los mejillones se obtuvieron manualmente de los dispositivos accediendo al sitio de muestreo en bote. Los organismos fueron llevados inmediatamente al laboratorio, donde se realizó la disección dentro de las 12 horas de obtenida la muestra. Se registró el largo de todos los individuos.

2.5.2 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica

Se utilizaron 5 mejillones por sitio, a los cuales se les removió todo el tejido blando. Individualmente se retiró el exceso de agua al tejido con papel absorbente y se colocó en una caja de aluminio previamente pesada. Se pesó la caja con el tejido fresco.

Para obtener el porcentaje de agua de las muestras fue necesario secarlas en estufa a $60 \pm 5^\circ \text{C}$ hasta peso constante. La muestra se introdujo en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, previa a la pesada de la muestra seca. El porcentaje de agua en tejido se calculó aplicando la fórmula 9:

$$\% \cdot \text{agua} = \frac{[(P_{MH} - P_{MS}) - P_{CA}] * 100}{P_{MT}} \quad (9)$$

Donde:

P_{MH} = peso de muestra húmeda + tara (g)

P_{MS} = peso de muestra seca + tara (g)

P_{CA} = tara (g)

P_{MT} = peso de muestra total húmeda (g)

$\% \text{ agua}$ = porcentaje de agua en peso fresco (PF)

La determinación del porcentaje de ceniza en el tejido se llevó a cabo usando la muestra empleada previamente para calcular el porcentaje de humedad de la muestra. Se incineró dicho tejido en una mufla a 450°C durante 5 horas. Transcurrido dicho tiempo se pasó la muestra a un desecador hasta que alcanzó temperatura ambiente y se realizó la pesada. El porcentaje de ceniza se calculó de la siguiente forma:

$$\% \cdot \text{cenizas} = \frac{(P_{MI} - P_{CA}) * 100}{P_{MT}} \quad (10)$$

Donde:

P_{MI} = peso de muestra incinerada + tara (g)

P_{CA} = tara (g)

P_{MT} = peso de muestra total húmeda (g)

$\% \text{ cenizas}$ = porcentaje de ceniza en peso fresco (PF)

El porcentaje de materia orgánica se obtuvo a partir de la diferencia entre el peso seco y el peso de ceniza, empleándose la ecuación 11 para su cálculo:

$$\% \cdot \text{materia} \cdot \text{orgánica} = \frac{[(P_{MS} - P_{MI}) - P_{CA}] * 100}{P_{MT}} \quad (11)$$

Donde:

P_{MS} = peso de muestra seca + tara (g)

P_{MI} = peso de muestra incinerada + tara (g)

P_{CA} = tara (g)

P_{MT} = peso de muestra total húmeda (g)

% materia orgánica = porcentaje de materia orgánica en peso fresco (PF)

2.5.3 Lípidos totales

Se utilizaron individualmente 4 mejillones a los cuales se les diseccionó manto y glándula digestiva a 4° C. Las muestras fueron guardadas individualmente en sobres de papel aluminio y almacenadas en freezer a -20° C hasta su posterior análisis.

El contenido de lípidos totales fue cuantificado utilizando el método gravimétrico de Bligh & Dyer (1959): aproximadamente 0,8 g de tejido fresco fue homogenizado durante 3 minutos con 2 ml de metanol y 2 ml de cloroformo con un homogenizador Ultra Turrax T 25. Luego se adicionó 1 ml de NaCl-H₂O (1,8 % NaCl) y se pasó toda la mezcla por un papel de filtro Whatman #1. El filtro se lavó con cloroformo:metanol (1:1). El filtrado se colocó en un tubo graduado cilíndrico, se dejó separar en dos fases durante 30 minutos por decantación y se registró el volumen de la fase clorofórmica inferior. La separación de fases de la mezcla de solventes fue realizada agregando metanol:NaCl-H₂O (1:1) para obtener una relación final de cloroformo/metanol/NaCl-H₂O de 1/1/0,9 (v/v/v). Pasados 10 minutos, la fase inferior fue recolectada y trasvasada mediante pipeta Pasteur a un balón previamente pesado. Se dejó la muestra en estufa a 45° C para la evaporación del solvente. Luego de 24 horas, se le adicionó 1 ml de cloroformo:acetona (1:1) con el fin de disolver partículas sólidas que pudieran haber quedado. Pasadas otras 24 horas de evaporación en estufa, se registró el peso del balón. Se reiteraron las pesadas hasta alcanzar peso seco constante.

El contenido de lípidos totales de cada muestra se calculó como la diferencia entre el peso del balón luego de que el solvente se ha evaporado y el peso del balón previo a colocarle el extracto.

$$\text{Contenido} \cdot \text{lípidos} = \frac{(B_M - B_V)}{\text{peso}} \quad (12)$$

Donde:

Contenido lípidos = mg lípidos/g tejido fresco

B_M = peso balón con muestra seca expresado en gramos

B_V = peso balón vacío expresado en gramos

Peso = gramos de tejido fresco

2.5.4 Bioacumulación de metales pesados

Los metales Cu, Zn, Fe, Cd y Pb fueron determinados en 0,5 g de tejido seco empleando el método propuesto por Dalziel & Baker (1983), modificado por Marcovecchio *et al.* (1988) según fue descrito en la **Sección 2.4.3**. Las branquias y las glándulas digestivas de 10 organismos fueron diseccionadas a 4° C. Se guardó el conjunto de cada órgano en bolsa de polietileno. Las muestras se secaron en estufa a $60 \pm 5^\circ$ C hasta peso constante. Luego se homogenizaron en mortero de porcelana y se guardaron en bolsas de polietileno en un desecador hasta su posterior análisis.

2.5.4.1 Bioconcentración de metales pesados

Para evaluar la eficiencia de bioacumulación de metales en el mejillón, se calculó el factor de bioconcentración, el cual se define según la fórmula 13 (Usero *et al.*, 2005):

$$FBC = \frac{Me_{organismo}}{Me_{sedimento}} \quad (13)$$

Donde:

FBC = factor de bioconcentración

Me_{organismo} = concentración media del metal ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en la muestra de tejido

Me_{sedimento} = concentración media del metal ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en la muestra de sedimento

2.5.4.2 Porcentajes de recuperación

La calidad analítica de la determinación de cada metal en tejido se controló con materiales de referencia provistos por el National Institute for Environmental Studies (NIES) de Tsukuba (Japón). Se tomaron los valores obtenidos por Ferrer (2001) y Andrade (2001), quienes determinaron la concentración, y a partir de ella los porcentajes de recuperación, de los metales pesados Cu, Zn, Fe, Cd y Pb en el material de referencia “Mussel Tissue Flour, R.M. N°6” (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de los metales estudiados en el material de referencia (NIES) para determinar la calidad analítica (rangos).

Metal Analizado	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb
Organismos	93,1 - 97,9 %	96,5 - 102,3 %	95,6 - 101,7 %	92,4 - 98,7 %	95,3 - 99,8 %

2.5.5 Índice de condición

Para analizar el Índice de Condición (IC) de los mejillones, 4 especímenes fueron tomados a cada tiempo de exposición en cada sitio de estudio. El tejido blando fue removido de las valvas y se secaron el tejido y las valvas en estufa a 60° C hasta peso constante. El Índice de Condición de cada mejillón se calculó según Couillard *et al.* (1995) como:

$$IC = \frac{\text{Peso} \cdot \text{Tejido} \cdot \text{Seco}(g)}{\text{Peso} \cdot \text{Valvas} \cdot \text{Secas}(g)} \quad (14)$$

Índice de condición = g tejido seco/g valva seca

2.5.6 Biomarcadores

Las actividades de las defensas antioxidantes, así como los niveles de peroxidación de lípidos, se midieron usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS (**Fig. 9**). En cada caso se corrieron blancos en las mismas condiciones que las muestras pero reemplazando el volumen de muestra por buffer de homogenización. Cada muestra se leyó por duplicado y la actividad final de la misma se calculó como el promedio de ambas lecturas.



Figura 9. Espectrofotómetro UV/VIS.

Para poder cuantificar los biomarcadores se requirió la concentración de proteínas solubles que se determinaron siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Markwell *et al.* (1978). El método se basa en la determinación espectrofotométrica a 750 nm del complejo coloreado formado por las proteínas en medio alcalino con el sulfato cúprico y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Cada muestra se leyó por triplicado y la concentración final se calculó como el promedio de las tres lecturas y se expresó en mg proteína/ml.

➤ *Preparación de las muestras:*

- Para la determinación de las actividades enzimáticas, branquias y glándulas digestivas de 5 mejillones fueron analizadas individualmente. Las muestras se homogenizaron en una relación 1:3 (tejido:buffer) en buffer pH 7,6 TRIS Base 20 mM, EDTA 1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, sacarosa 0,5 M y KCl 0,15 M adicionando fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) 0,1 mM como inhibidor de proteasas. La homogenización se llevó a cabo a 4° C utilizando un homogenizador Ultra Turrax T 25. El homogenato se centrifugó durante 30 minutos a 9000×g a 4° C en una microcentrífuga refrigerada y el sobrenadante se guardó en freezer a -20° C hasta su análisis (Bainy *et al.* 1996).

- Para la determinación de la peroxidación de lípidos, branquias y glándulas digestivas de 5 mejillones fueron disecionadas e inmediatamente homogenizadas en relación 1:3 (tejido/buffer) con solución buffer Tris 0,1 M pH 7,8 a 4° C utilizando un homogenizador Ultra Turrax T 25. Cada homogenato fue centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos a 4° C en una microcentrífuga refrigerada, con un rotor de 180 mm de diámetro. El sobrenadante crudo se guardó en freezer a -20° C hasta el momento del análisis.

2.5.6.1 *Superóxido dismutasa (SOD)*

La actividad de SOD se midió de acuerdo a Misra & Fridovich (1972) a 480 nm utilizando solución reguladora de pH glicina 50 mM pH 10,2 y adrenalina 60 mM a temperatura constante (30° C) mediante baño térmico. Se determinó la actividad de SOD a través de su habilidad de inhibir la autooxidación (o reducción) de la adrenalina a adrenocromo a pH alcalino, siendo el anión superóxido el intermediario de dicha reacción. Se registró la absorbancia cada 30 segundos durante 150 segundos. Se definió una unidad de actividad de SOD como la cantidad de muestra que inhibe el 50 % de reducción de adrenalina a adrenocromo.

Para poder cuantificar la actividad de esta enzima se graficó la absorbancia del blanco durante 150 segundos a intervalos de 30 segundos. Se le ajustó como mejor estimador la recta de regresión (**Ecuación 5**) y de esa ecuación se rescató el valor de la ordenada al origen (a). Además, se graficó la absorbancia de cada muestra para los mismos intervalos de tiempo que el blanco, se le ajustó la recta de regresión (**Ecuación 5**) y también se rescató el valor de la ordenada al origen (A) para ser utilizado en la cuantificación. Se calculó A/a para cada volumen de muestra y se graficó el log (A/a) en función de los volúmenes de muestra. A ese

gráfico se le ajustó una recta de regresión y de ella se despejó el valor x para $y = 0,5$ que equivale a la cantidad de microlitros que inhiben el 50 % de actividad de la enzima.

La actividad específica de esta enzima se obtuvo empleando la ecuación 17:

$$\text{Actividad} \cdot \text{Específica} = \frac{1000}{(v * \text{proteínas})} \quad (17)$$

Donde:

Act. Esp. = μl de muestra que inhiben el 50 % de formación de adrenocromo/mg proteína

v = volumen de muestra que inhibe el 50 % de formación de adrenocromo (μl)

Proteínas = concentración (mg/ml)

2.5.6.2 Catalasa (CAT)

La actividad de CAT se determinó a través del método descrito por Beutler (1982) midiendo la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a 240 nm durante 90 segundos cada 15 segundos a temperatura constante (30°C) mediante baño térmico. La mezcla de reacción contiene solución reguladora de pH TRIS Base 1 M y EDTA 5 mM pH 8 y H_2O_2 10 nM.

La actividad específica de esta enzima se obtuvo empleando la ecuación 15:

$$\text{Actividad} \cdot \text{Específica} = \frac{(\Delta \text{abs} / \text{min} * \text{dilución})}{(\varepsilon * v * \text{proteínas})} \quad (15)$$

Donde:

Act. Esp. = cantidad de enzima que degrada 1 μM H_2O_2 /min/mg proteína

Δabs = $(\text{abs}_{15 \text{ seg.}} - \text{abs}_{90 \text{ seg.}}) * 60$

ε (coeficiente de extinción molar de la molécula de H_2O_2) = 0,071

v = volumen de muestra (ml)

Proteínas = concentración (mg/ml)

2.5.6.3 Glutación-S-transferasa (GST)

La actividad de GST se midió de acuerdo a Habig *et al.* (1974). El método consiste en medir la formación de un complejo entre glutati3n reducido (GSH) y su sustrato aceptor el 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB) a 340 nm. El ensayo se llevó a cabo a temperatura constante (25°C) mediante baño térmico en solución reguladora de pH fosfato de potasio 0,1 M pH 7, CNDB 50 mM y glutati3n reducido 100 mM. Se midió el aumento de absorbancia cada 30 segundos durante 120 segundos.

La actividad específica de esta enzima se obtuvo empleando la ecuación 16:

$$\text{Actividad} \cdot \text{Específica} = \frac{(\Delta \text{abs} / \text{min} * \text{dilución})}{(\varepsilon * v * \text{proteínas})} \quad (16)$$

Donde:

Act. Esp. = mM/cm/mg proteína

Δabs = (abs_{120 seg.} - abs_{30 seg.}) * 60

ε (coeficiente de extinción) = 9,6 nM⁻¹*cm⁻¹

v = volumen de muestra (ml)

Proteínas = concentración (mg/ml)

2.5.6.4 Peroxidación de lípidos (LPO)

Se midió peroxidación lipídica a través de la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y se cuantificó en términos de equivalentes de malondialdehído (MDA) (Buege & Aust, 1978). Se realizaron diluciones de las muestras 1:10 con buffer de homogenización TRIS 0,1 pH 7,8. En tubos de ensayo de vidrio de 10 ml se colocaron 400 μ l de muestra diluida y 800 μ l de medio de reacción (ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico y ácido clorhídrico). Se agitaron los tubos y se colocaron en baño de agua a 100° C durante 15 minutos. Luego se colocaron en un baño 4° C por 10 minutos para finalizar la reacción. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 1000×g en una centrifuga Gelec G.142-D. En el sobrenadante se midió la absorbancia a 532 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS.

Los niveles de peroxidación lipídica se calcularon aplicando la fórmula 18:

$$C = \frac{\left[\frac{(\Delta \text{abs.}) * \text{dilución}}{\varepsilon} \right]}{v} \cdot \text{proteínas} \quad (18)$$

Donde:

C = concentración de MDA (μ mol MDA/mg proteína)

Δabs = (abs_{muestra} - abs_{blanco}.)

ε (coeficiente de extinción) = 0,156 μ mol⁻¹*cm⁻¹

v = volumen de muestra (ml)

Proteínas = concentración (mg/ml)

2.6 Análisis estadístico

Índice de condición, lípidos totales y niveles de biomarcadores

Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, para evaluar el efecto de los tiempos de exposición y de los sitios, así como la interacción entre ambos. Cuando se registraron diferencias significativas, se utilizó el test de Tukey para encontrar qué media difería.

Concentraciones de metales totales en sedimento

Con la finalidad de comparar las concentraciones medias de metales pesados en los sedimentos de los sitios en estudio, se realizó ANOVA de un factor para cada metal. Cuando se registraron diferencias significativas, se utilizó el test de Tukey para encontrar cuál era la media que difería.

Integración de toda la información

Con finalidad de evaluar asociaciones entre las variables ambientales y las biológicas, se llevaron a cabo correlaciones de Pearson con los parámetros físicos y químicos del agua, las concentraciones medias de metales pesados en tejido y los valores medios de todas las variables biológicas. Se analizaron separadamente los inviernos y los veranos. Las correlaciones se consideraron altamente significativas cuando $p < 0,01$ y significativas cuando $p < 0,05$. No se incluyeron los datos correspondientes al invierno de 2006 debido a que no se cuenta con la totalidad de los parámetros.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Statistica 6.0. El nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$. Se comprobó normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homoscedasticidad con la prueba de Levene. Aquellos casos en los que fue necesario transformar los datos para cumplir con los supuestos, se aplicó la transformación logarítmica para los biomarcadores y arcseno para los lípidos. Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DS) para las n muestras.

Capítulo 3

Resultados

ESTUDIO

EXPLORATORIO EN

BAHÍA BROWN

3.1 Determinaciones en agua

3.1.1 Parámetros físicos

En la **Tabla 6** se presentan los parámetros físicos obtenidos en bahía Brown. Se observó una tendencia de disminución de la temperatura a medida que transcurrió el experimento y se aproximó al invierno. El pH registró un aumento gradual, contrariamente la salinidad descendió levemente; mientras que el oxígeno disuelto se mantuvo saturado.

Tabla 6. Parámetros físicos medidos en bahía Brown entre abril y agosto de 2005 en las semanas 0, 2, 6, 11 y 18 de exposición.

Tiempo (semanas)	pH	Salinidad (g/L)	O ₂ disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)
0	7,16	33,3	10,37	8,2
2	7,28	32,1	10,57	7,8
6	7,48	31,1	9,23	7,2
11	7,74	31,8	10,47	6,2
18	7,93	31,9	9,97	4,5

3.1.2 Parámetros químicos

3.1.2.1 Nutrientes inorgánicos disueltos

En cuanto a los niveles de nutrientes inorgánicos disueltos (**Tabla 7**) se observó que la concentración de nitrito decreció a lo largo de la experiencia, siendo 0,63 μM a tiempo cero y llegando a 0,20 μM en la semana 18. El nitrato varió entre 12,63 μM y 16,70 μM . El fosfato se mantuvo estable entre 1,09 μM y 1,28 μM . El silicato, contrariamente al nitrito, aumentó a medida que se incrementó el tiempo de exposición comenzando en 2,96 μM al inicio del experimento y llegando a 4,76 μM al final del mismo.

Tabla 7. Concentración de nutrientes inorgánicos disueltos y de clorofila *a* medidos en bahía Brown entre abril y agosto de 2005 en las semanas 0, 2, 6, 11 y 18 de exposición.

Tiempo (semanas)	Nitrito (μM)	Nitrato (μM)	Fosfato (μM)	Silicato (μM)	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)
0	0,63	12,63	1,18	2,96	0,35
2	0,56	14,73	1,21	3,35	0,29
6	0,43	16,70	1,28	4,07	0,16
11	0,32	15,47	1,23	4,44	0,08
18	0,20	13,82	1,09	4,76	0,02

3.1.2.2 Clorofila *a*

Los niveles de clorofila *a* decrecieron gradualmente de 0,35 $\mu\text{g/L}$ a tiempo cero hasta 0,02 $\mu\text{g/L}$ en la semana 18 (**Tabla 7**), lo cual muestra su menor disponibilidad hacia el invierno.

3.2 Determinaciones en sedimento

3.2.1 Granulometría del sedimento

En la **Tabla 8** se presentan los porcentajes de grava, arena y fango de los sedimentos de bahía Brown, a tiempo cero y en la semana 18 de experimentación. Si bien existen pequeñas diferencias entre ambos muestreos para las diferentes fracciones analizadas, los sedimentos presentaron proporciones similares de arena y grava, mientras que el fango fue la fracción menos abundante.

Tabla 8. Porcentaje de fracciones granulométricas (grava, arena y fango) de los sedimentos de bahía Brown sedimento al inicio y al final del experimento.

Tiempo (semanas)	Grava (%)	Arena (%)	Fango (%)
0	41,05	51,05	7,90
18	57,96	31,21	10,83

3.2.2 Metales pesados totales en sedimento

Las concentraciones de metales pesados en sedimento se mantuvieron en los mismos órdenes de magnitud entre el inicio y final del experimento (**Tabla 9**). Como era de esperar, el Fe fue el metal más abundante, tres órdenes de magnitud mayor que el Zn y cuatro con respecto al Cd. Le siguió en concentración el Zn, el Pb y luego el Cu. Los niveles de Cd se encontraron por debajo del límite de detección ($<0,27 \mu\text{g/g}$).

Tabla 9. Concentración de los metales pesados Cu, Zn, Cd y Pb expresada en $\mu\text{g/g}$ (peso seco) y de Fe expresado en mg/g (peso seco) en la fracción $<62\mu\text{m}$ del sedimento de bahía Brown al inicio y al final del experimento.

Tiempo (semanas)	Cu ($\mu\text{g/g PS}$)	Zn ($\mu\text{g/g PS}$)	Cd ($\mu\text{g/g PS}$)	Pb ($\mu\text{g/g PS}$)	Fe (mg/g PS)
0	$7,00 \pm 0,02$	$24,86 \pm 0,52$	$<0,27$	$7,5 \pm 0,01$	$24,99 \pm 0,001$
18	$6,25 \pm 0,02$	$25,62 \pm 0,19$	$<0,27$	$9,12 \pm 0,88$	$24,91 \pm 0,015$

3.2.2.1 Factores de enriquecimiento

Los factores de enriquecimiento para el Cu, Zn, y Pb se presentan en la **Tabla 10**, mientras que no se presentan valores para el Cd por hallarse dicho metal por debajo del límite de detección. Los factores hallados para los tres metales se encontraron todos por debajo de 1, entre 0,32 y 0,94, lo cual manifiesta una movilización respecto de su concentración en la corteza terrestre. Los factores prácticamente no variaron luego de las 18 semanas de exposición evidenciando la estabilidad de los sedimentos.

Tabla 10. Factores de enriquecimiento de los metales pesados en los sedimentos de bahía Brown.

Semana	Cu	Zn	Pb
0	0,36	0,32	0,77
18	0,32	0,33	0,94

3.3 Determinaciones en organismos

La talla promedio de los organismos utilizados en este experimento fue de $61,89 \pm 4,23$ mm.

3.3.1 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica

Los porcentajes de agua, ceniza y materia orgánica se mantuvieron a lo largo del experimento en $82,16 \pm 1,51$ %, $2,73 \pm 0,67$ % y $15,12 \pm 1,59$ %, respectivamente (**Tabla 11**). No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición en ninguno de los parámetros (ANOVA I vía, $p > 0,05$).

Tabla 11. Porcentaje de agua, ceniza y materia orgánica en el tejido blando de los mejillones. Los resultados se expresan como media \pm DS para 5 determinaciones.

Tiempo (semanas)	Agua (%)	Ceniza (%)	Materia orgánica (%)
0	$79,52 \pm 4,28$	$2,68 \pm 0,46$	$17,79 \pm 4,48$
2	$82,41 \pm 3,54$	$3,90 \pm 1,46$	$13,69 \pm 2,26$
6	$82,51 \pm 1,19$	$2,28 \pm 0,18$	$15,20 \pm 1,19$
11	$83,21 \pm 2,20$	$2,42 \pm 0,07$	$14,37 \pm 2,18$
18	$83,12 \pm 2,92$	$2,36 \pm 0,17$	$14,52 \pm 3,06$

3.3.2 Lípidos totales

El contenido de lípidos totales se muestra en la **Figura 10**. En la branquia se registraron los valores más bajos de lípidos totales ($7,34 \pm 1,16$ mg/g tejido fresco) y los mismos no variaron de manera significativa en el tiempo que duró el experimento (ANOVA I

vía, $p > 0,05$). En manto los valores se mantuvieron relativamente constantes hasta la semana 6, posteriormente bajaron significativamente respecto del inicio del experimento (ANOVA I vía, $p < 0,05$). Los lípidos totales en glándula digestiva mostraron un aumento significativo del 39 % en la semana 6 ($32,48 \pm 3,77$ mg/g tejido fresco), bajaron en la semana 11 a niveles semejantes a los iniciales, mientras que en la semana 18 descendieron significativamente un 37 % (ANOVA I vía, $p < 0,05$).

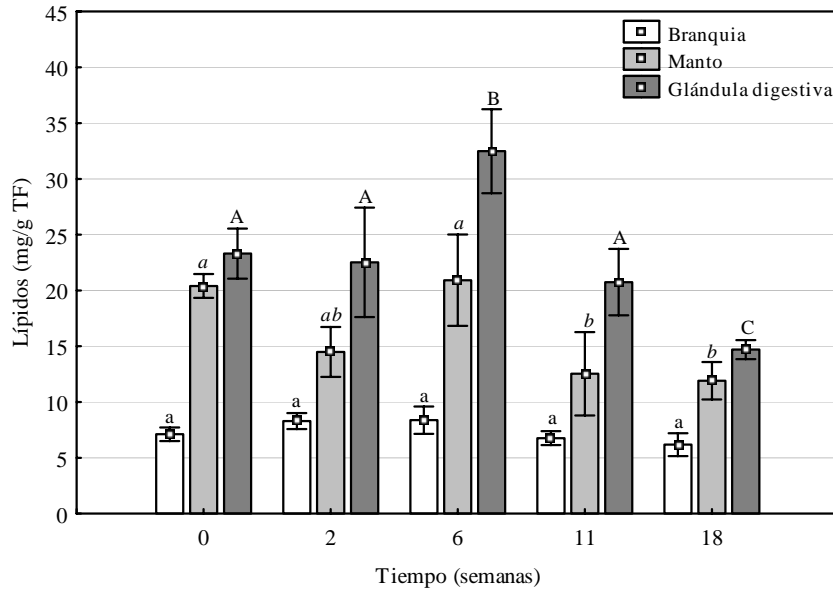


Figura 10. Contenido de lípidos totales en branquia, manto y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown expuesto por 0, 2, 6, 11 y 18 semanas. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 4 determinaciones. Para cada órgano, letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos de exposición.

3.3.3 Bioacumulación de metales pesados

En la **Tabla 12** se presenta la concentración de metales pesados en la branquia y la glándula digestiva al inicio y final del experimento. En la branquia, el Zn mostró un incremento en su concentración en la semana 18. El Cu disminuyó de 2,90 a 1,81 $\mu\text{g/g}$ y el Cd de 1,43 a 0,98 $\mu\text{g/g}$. El Fe y el Pb mantuvieron sus concentraciones entre el inicio y el final del experimento. En la glándula digestiva, el Cu prácticamente duplicó su concentración; las concentraciones de Fe, Cd y Pb disminuyeron, mientras que el Zn no mostró variaciones. En resumen, en la branquia el metal más acumulado fue el Zn, seguido por el Fe y en mucha menor medida por el Pb, Cu y Cd. En la glándula digestiva, el Fe fue el metal más acumulado, seguido por el Zn y en menor proporción por el Cu, Pb y Cd.

Tabla 12. Concentración de metales pesados en la branquia y la glándula digestiva al inicio y al final del experimento expresada en $\mu\text{g/g}$ peso seco.

Tiempo (semanas)	Órgano	Cu ($\mu\text{g/g PS}$)	Zn ($\mu\text{g/g PS}$)	Fe ($\mu\text{g/g PS}$)	Cd ($\mu\text{g/g PS}$)	Pb ($\mu\text{g/g PS}$)
0	Branquia	$2,90 \pm 0,61$	$93,60 \pm 8,30$	$79,86 \pm 3,63$	$1,43 \pm 0,32$	$3,88 \pm 0,37$
	Gl. digestiva	$4,61 \pm 0,58$	$84,62 \pm 13,09$	$589,35 \pm 21,78$	$2,57 \pm 0,02$	$6,01 \pm 0,04$
18	Branquia	$1,81 \pm 0,13$	$166,80 \pm 3,47$	$74,13 \pm 5,52$	$0,98 \pm 0,07$	$3,70 \pm 0,44$
	Gl. digestiva	$8,51 \pm 0,64$	$85,04 \pm 4,41$	$474,53 \pm 4,35$	$2,06 \pm 0,13$	$2,16 \pm 0,53$

3.3.3.1 Bioconcentración de metales pesados

Los factores de bioconcentración en la branquia y la glándula digestiva de mejillones provenientes de bahía Brown se presentan en la **Tabla 13**. El Cd fue el metal más bioconcentrado tanto en la branquia como en la glándula digestiva, pero su valor no fue calculado, al determinarse valores por debajo del límite de detección en el sedimento. Los factores de bioconcentración para el Zn variaron entre 3 y 6 evidenciando la acumulación de este metal en los tejidos de los mejillones. Excepto por el factor de Cu encontrado en la semana 18 en la glándula digestiva (1,36), el Cu y el Pb presentaron valores menores a 1 indicando que estos metales se encuentran en mayor proporción en el sedimento. El Fe presentó la menor tasa de bioconcentración, a pesar de ser el metal más abundante en el sedimento.

Tabla 13. Factores de bioconcentración de metales pesados en branquia y glándula digestiva al inicio y al final del experimento.

Semana	Órgano	Cu	Zn	Fe	Pb
0	Branquia	0,41	3,77	0,003	0,52
0	Gl. Digestiva	0,66	3,40	0,024	0,80
18	Branquia	0,29	6,51	0,003	0,41
18	Gl. Digestiva	1,36	3,32	0,019	0,24

3.3.4 Índice de condición

El índice de condición fue mayor al inicio del experimento (tiempo cero) con una media de $0,26 \text{ g tejido seco/g valva seca}$. El valor medio de este índice tendió a bajar con el transcurso del experimento, siendo en las semanas 6, 11 y 18 significativamente menor que a tiempo 0 (ANOVA I vía, $p < 0,05$) (**Fig. 11**), probablemente asociado a la disminución de nutrientes como se mostró en la **Tabla 7**.

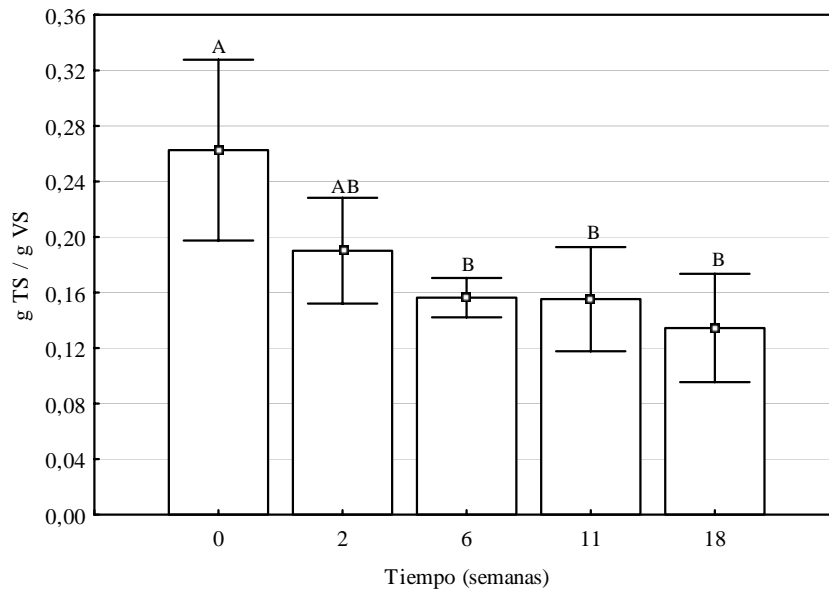


Figura 11. Índice de condición del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown expuesto por 0, 2, 6, 11 y 18 semanas. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos de exposición.

3.3.5 Biomarcadores

3.3.5.1 Superóxido dismutasa

La **Figura 12** muestra que la actividad de la enzima superóxido dismutasa en la glándula digestiva ($7,55 \pm 1,08$ U/mg prot.) fue entre 53 % en la semana 6 y 90 % en las semanas 0 y 2 más alta que en branquia ($4,38 \pm 0,95$ U/mg prot.). En ambos órganos se registraron diferencias significativas entre tiempos de exposición (ANOVA I vía, $p < 0,05$), pero en ningún caso respecto a las condiciones iniciales.

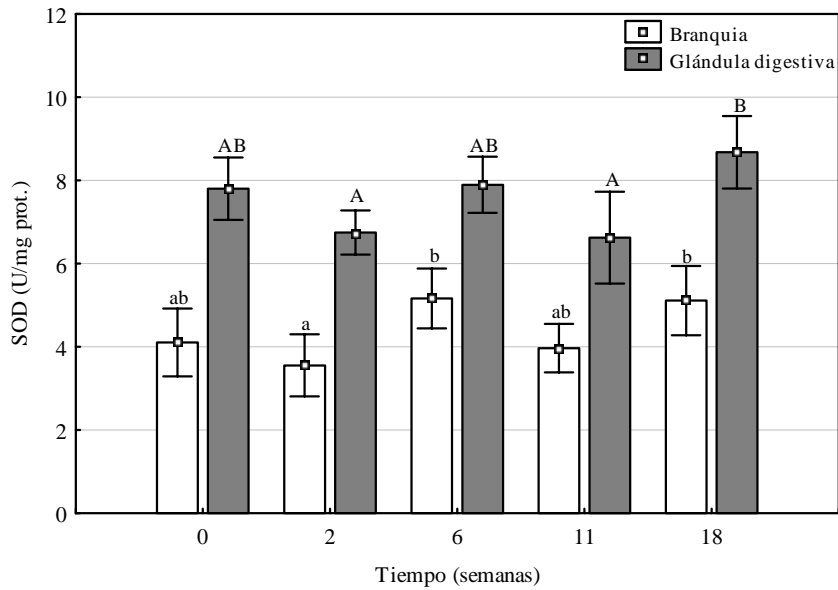


Figura 12. Actividad de superóxido dismutasa en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown expuesto por 0, 2, 6, 11 y 18 semanas. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones. Para cada órgano, letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos de exposición.

3.3.5.2 Catalasa

Para esta enzima no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición para ninguno de los dos órganos analizados (ANOVA I vía, $p > 0,05$). La actividad en la glándula digestiva ($6,17 \pm 0,76$ U/mg prot.) fue entre un 60 y 116 % mayor que la registrada en la branquia ($3,11 \pm 0,80$ U/mg prot.) en las semanas 11 y 2, respectivamente (**Fig. 13**).

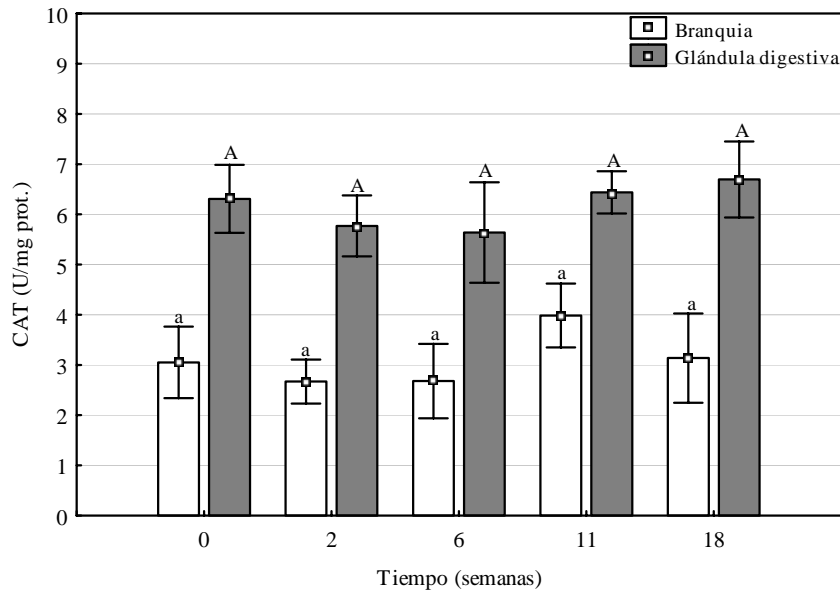


Figura 13. Actividad de catalasa en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown expuesto por 0, 2, 6, 11 y 18 semanas. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones. Para cada órgano, letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos de exposición.

3.3.5.3 Glutación-S-transferasa

La actividad de esta enzima en branquia ($0,21 \pm 0,05$ U/mg prot.) fue entre un 54 y 115 % mayor que en glándula digestiva ($0,11 \pm 0,03$ U/mg prot.) en las semanas 6 y 11, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre tiempos de exposición en la branquia (ANOVA I vía, $p > 0,05$). En la glándula digestiva se registró un pico de actividad ($0,15 \pm 0,02$ U/mg prot.) en la semana 6 que resultó significativamente mayor que la condición inicial en el tiempo 0 y que la semana 11 de exposición (ANOVA I vía, $p < 0,05$) (Fig. 14).

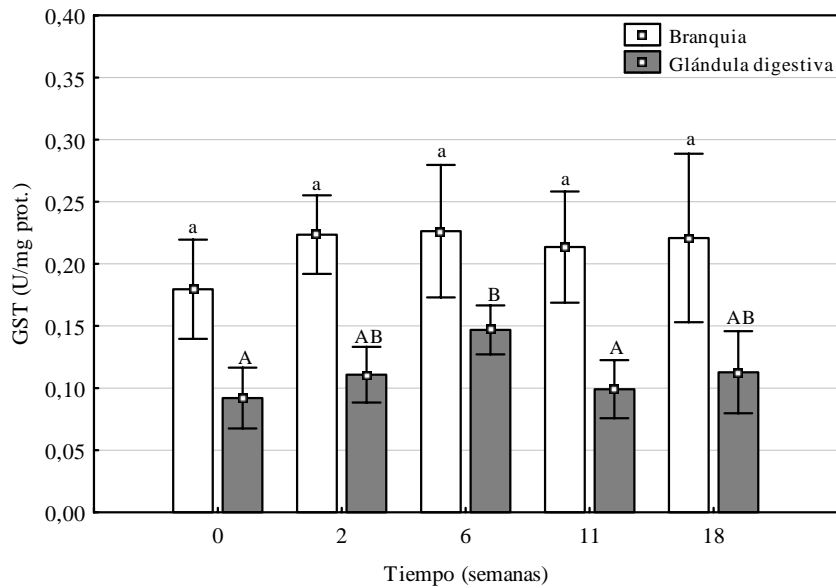


Figura 14. Actividad de glutatión-S-transferasa en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de Bahía Brown expuesto por 0, 2, 6, 11 y 18 semanas. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos para cada órgano.

Las actividades enzimáticas variaron según el tipo de órgano: las actividades de catalasa y superóxido dismutasa fueron en general más altas en glándula digestiva, mientras que la actividad de glutatión-S-transferasa fue mayor en branquia.

3.3.5.4 Peroxidación de lípidos

La peroxidación lipídica no mostró un patrón definido según el órgano analizado (**Fig. 15**). En la branquia se registró en la semana 11 ($3,12 \pm 0,86 \mu\text{mol}/\text{mg prot.}$) un aumento significativo en los niveles de malondialdehído con respecto a la semana 6. En la glándula digestiva se registró un aumento gradual a medida que avanzaba el experimento, midiéndose un aumento significativo con respecto a las condiciones iniciales sólo en la semana 18 (ANOVA I vía, $p < 0,05$).

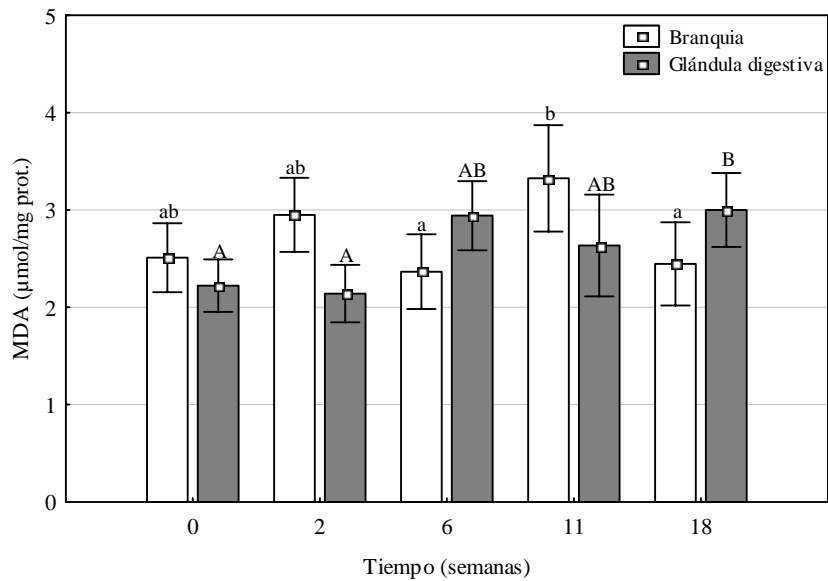


Figura 15. Niveles de malondialdehído en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown expuesto por 0, 2, 6, 11 y 18 semanas. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones. Para cada órgano, letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos de exposición.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente capítulo, puede observarse un descenso del nitrito e incremento de silicato hacia el invierno. Nitrato y fosfato se mantienen con concentraciones relativamente constantes y se observa una disminución en la concentración de clorofila *a* durante esta época. Tal disminución podría explicar la tendencia decreciente del índice de condición y de los lípidos totales. La variabilidad encontrada en los biomarcadores estaría asociada a los procesos naturales que se desarrollan en la bahía Brown. Los datos aquí presentados correspondientes a dicha Bahía podrían ser considerados como datos de base.

Capítulo 4

Resultados

TRANSPLANTES DE

INVIERNO

El transplante de invierno de 2006 cuenta con resultados para 4 sitios (zona industrial, planta Orión, caleta Aspirante y península Ushuaia) en las semanas 2 y 4 de exposición. La finalización adelantada de dicho experimento, antes de cumplimentar las 6 semanas de exposición, fue debido a la desaparición de los dispositivos en dos de los sitios seleccionados: club Náutico (semana 2) y península Ushuaia (semana 5). Las causas probables se asocian a extravío, rotura o sustracción. Debido a que sólo se midió la actividad de catalasa y la peroxidación de lípidos, se decidió realizar un tercer experimento de invierno en el año 2008, además del efectuado en 2007.

4.1 Determinaciones en agua

Para todas las variables medidas, los datos corresponden a bahía Brown a tiempo cero y a cada uno de los sitios seleccionados dentro de bahía Ushuaia en las semanas 1 y 3 para el invierno de 2006 y en las semanas 1, 3 y 5 para los experimentos de 2007 y 2008.

4.1.1 Parámetros físicos

pH. Puede observarse una cierta homogeneidad en los datos de pH entre los sitios y a lo largo del tiempo de duración de cada experimento (**Fig. 16**). En 2006 el valor de pH promedio fue de $7,81 \pm 0,08$, en 2007 fue de $7,86 \pm 0,11$; mientras que en 2008 fue menor, $7,58 \pm 0,09$. Tanto en 2007 como en 2008, en club Náutico se registraron los menores valores de pH. Si se analiza la evolución individual, los valores de pH en el 2007, se incrementaron en todos los casos en el orden de 0,2 unidades de pH a medida que avanzó la experimentación. Sólo en el caso de península Ushuaia no se observó esta tendencia.

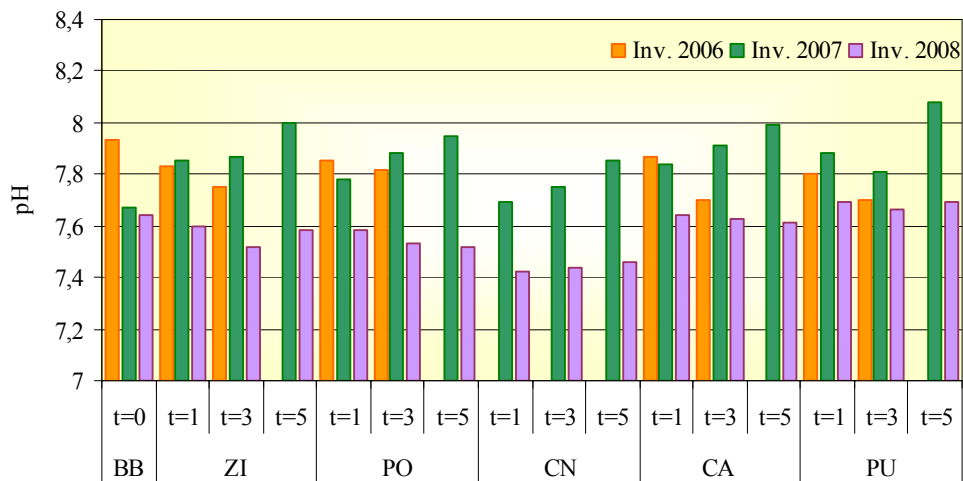


Figura 16. pH medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Temperatura. Este parámetro presentó variaciones espacio-temporales muy pequeñas (**Fig. 17**). Las temperaturas medias con sus respectivos desvíos para cada año de muestreo fueron: $4,94 \pm 0,46$ °C en 2006, $4,71 \pm 0,44$ °C en 2007 y $4,88 \pm 0,42$ °C en 2008. En península Ushuaia se midieron temperaturas levemente más altas que se mantuvieron a lo largo del tiempo, incluso en los tres años estudiados. La diferencia de temperaturas observadas entre sitios puede estar relacionada a la influencia continental.

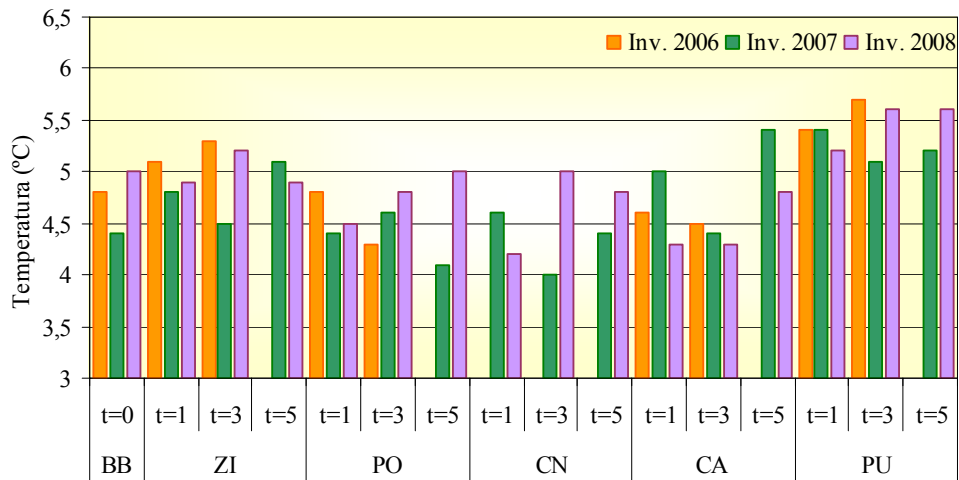


Figura 17. Temperatura medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Oxígeno disuelto. Los valores promedios con sus desvíos que fueron $8,93 \pm 0,48$ en 2006, $10,29 \pm 0,74$ en 2007 y $9,70 \pm 0,85$ mg/L en 2008. En el año 2006 se registraron los valores más bajos de oxígeno disuelto, registrándose un leve descenso de la semana 1 a la semana 3 en los cuatro sitios de la bahía Ushuaia. En 2007 los valores de este parámetro estuvieron cercanos al valor de saturación, descendiendo también en las semanas 3 y 5 respecto de la semana 1 en los cinco sitios de bahía Ushuaia. En 2008, excepto en zona industrial donde el oxígeno disuelto tendió a disminuir al aumentar el tiempo de experimentación, este parámetro se mantuvo constante a lo largo del tiempo. Con la única excepción de península Ushuaia a las semanas 3 y 5, el oxígeno disuelto medido en 2008 fue menor que en 2007. En 2007 como en 2008, en los tres tiempos de muestreo, club Náutico presentó los valores más bajos de oxígeno disuelto (**Fig. 18**).

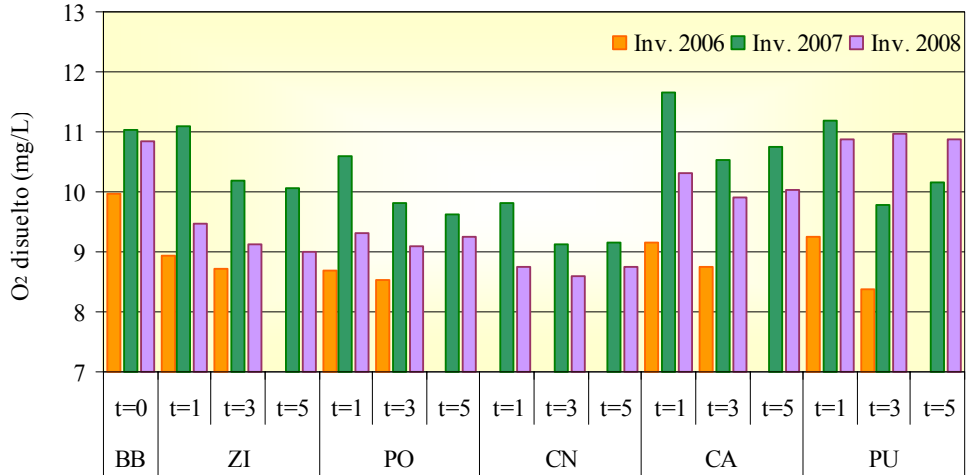


Figura 18. Oxígeno disuelto medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Salinidad. En 2006 la salinidad fue en promedio $30,66 \pm 0,28$ g/L, resultando levemente más baja que en los dos años posteriores. En 2007 y 2008 las salinidades fueron similares: $31,98 \pm 0,80$ g/L y $32,61 \pm 0,24$ g/L, respectivamente. En cada año analizado, se midieron valores relativamente homogéneos entre los sitios y a lo largo del tiempo de exposición (**Fig. 19**). Las variaciones interanuales de la salinidad están asociadas en este caso, a las precipitaciones (pluviales o niveas en esta época), que tienen un impacto directo sobre la zona costera. En club Náutico en las semanas 3 y 5 y en planta Orión en la semana 3 del año 2007, comparando con el resto de los sitios, se observó una disminución importante de la salinidad, como reflejo de los aportes continentales.

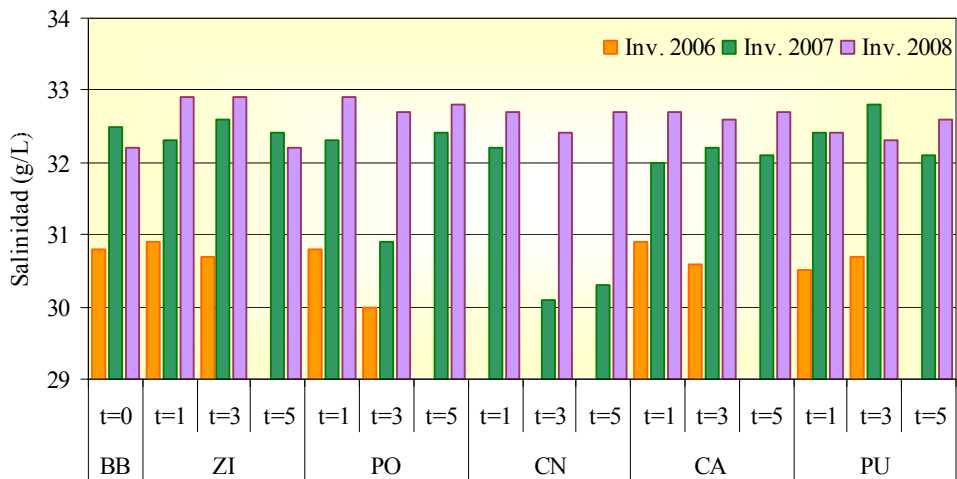


Figura 19. Salinidad medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

4.1.2 Parámetros químicos

4.1.2.1 Nutrientes inorgánicos disueltos

Nitrato. La concentración de nitrato (μM) se presenta en la **Figura 20**. Bahía Brown presentó la concentración más baja de este nutriente ($12,4 \mu\text{M}$). En los sitios de bahía Ushuaia, prácticamente no se observaron diferencias entre sitios ni entre semanas de exposición en el experimento de 2006 ($14,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$). En 2007, bahía Brown nuevamente presentó la concentración más baja de nitrato de $4,0 \mu\text{M}$, mientras que en bahía Ushuaia las menores concentraciones en las tres semanas de muestreo se registraron en península Ushuaia. En la semana 1, club Náutico registró un pico de $43,1 \mu\text{M}$, valor que resultó tres veces mayor que los medidos en el resto de los sitios en ese período de experimentación. En la semana 3 los valores fueron muy semejantes entre sitios $11,2 \pm 1,0 \mu\text{M}$; mientras que en la semana 5 en zona industrial, planta Orión y club Náutico las concentraciones de nitrato fueron notablemente más altas que las medidas en caleta Aspirante y península Ushuaia. En el año 2008, las concentraciones de nitrato tendieron a ser más altas que los años anteriores. El valor promedio considerando todos los tiempos de muestreo, sin club Náutico, fue de $11,5 \pm 1,5 \mu\text{M}$. Club Náutico presentó picos de concentración de $23,1$ y $98,8 \mu\text{M}$, en las semanas 1 y 3 respectivamente. Esta es una indicación clara del impacto antrópico que recibe este sitio.

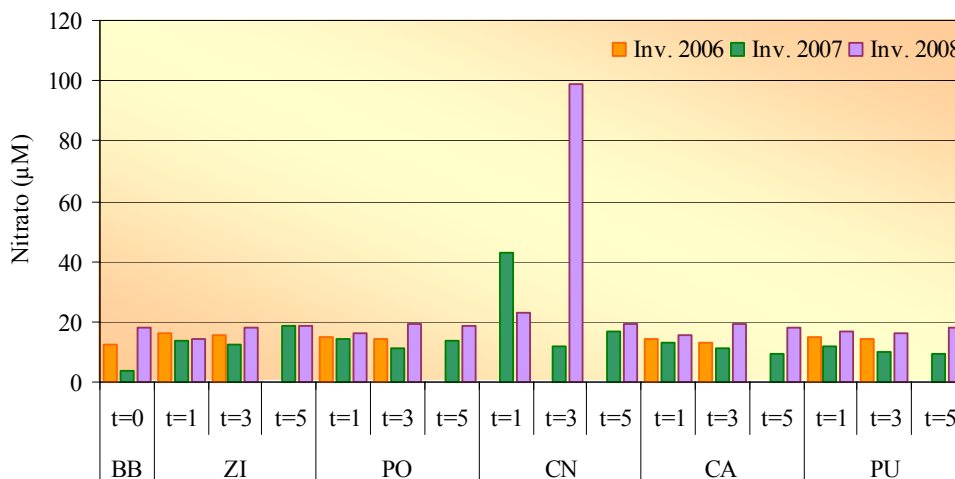


Figura 20. Concentración de nitrato medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Nitrito. La **Figura 21** muestra la concentración de nitrito (μM). En los años 2006 y 2007, bahía Brown presentó la concentración más baja ($0,2 \mu\text{M}$). En 2007, bajas concentraciones también se midieron en península Ushuaia en los tres tiempos de muestreo (\leq

0,2 μM). Sin considerar club Náutico, los valores de nitrito medidos en bahía Ushuaia fueron homogéneos entre sitios y entre tiempos de exposición, con una media general de $0,3 \pm 0,1$ μM . Club Náutico representó un caso particular en los dos años analizados. En el 2007, presentó las mayores concentraciones de nitrito siendo 2,0, 0,5 y 0,8 μM en las semanas 1, 3 y 5 respectivamente. En el año 2008, este sitio mostró también valores más altos que el resto de los sitios en las semanas 1 y 3 de 0,7 y 1,2 μM , respectivamente. De la misma manera que para el caso del nitrato, club Náutico representó un caso particular evidenciando un impacto antrópico.

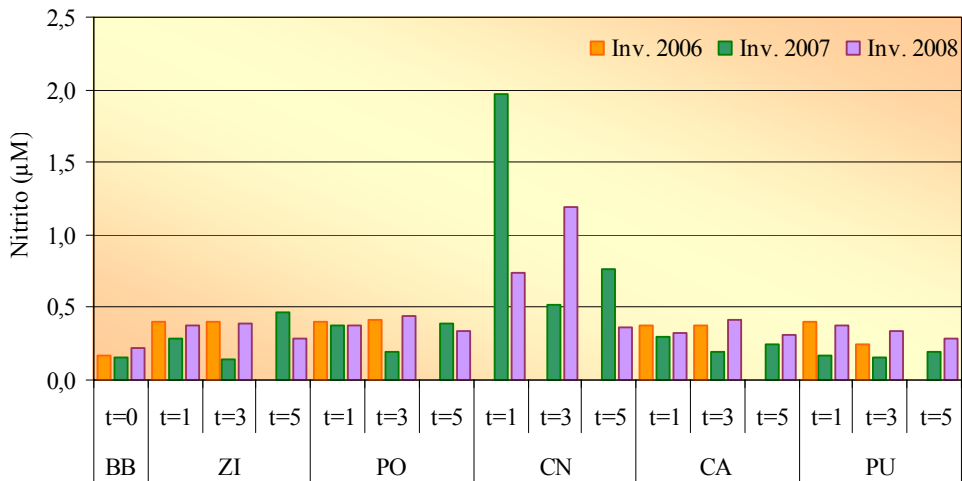


Figura 21. Concentración de nitrito medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Amonio. La **Figura 22** muestra la concentración de amonio (μM), en escala logarítmica, para poder minimizar las diferencias entre los valores extremos y obtener una mejor representación gráfica. En 2006, las concentraciones medidas fueron muy heterogéneas. En bahía Brown se encontró la concentración más baja de 0,4 μM . En las semanas 1 y 3, en zona industrial y planta Orión se registraron valores notablemente más altos que en caleta Aspirante y península Ushuaia. Club Náutico, en los tres muestreos del 2007, presentó valores considerablemente mayores que el resto de los sitios: 4946,6 μM en la semana 1, 157,2 μM en la semana 3 y 1052,8 μM en la semana 5 lo que evidencia un gran impacto antrópico. En contraposición, península Ushuaia fue el sitio de bahía Ushuaia que presentó las menores concentraciones: 21,3 μM en la semana 1, 1,4 μM en la semana 3 y 1,0 μM en la semana 5. En 2008, las concentraciones de amonio no fueron tan heterogéneas entre sitios ni entre tiempos, variando desde no detectable en península Ushuaia en la semana 1 hasta 3,6 μM en

planta Orión en la semana 5. La excepción fue nuevamente club Náutico donde en las semanas 1 y 3 de exposición las concentraciones fueron de 76,6 y 157,9 μM , respectivamente.

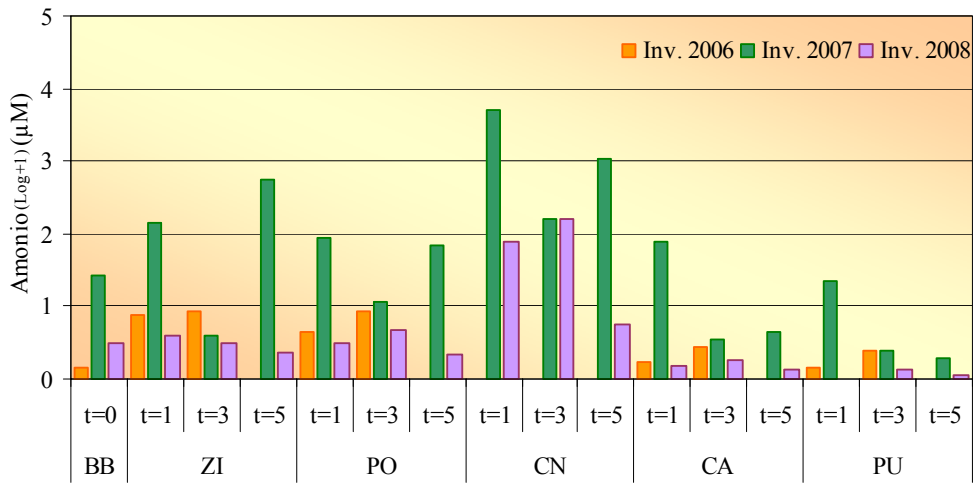


Figura 22. Concentración de amonio, en escala logarítmica, medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Fosfato. Los valores de este nutriente también fueron transformados con escala logarítmica para una mejor visualización de la información (**Fig. 23**). En el año 2006 las concentraciones fueron semejantes en todos los sitios y en los distintos tiempos de muestreo ($1,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$). En 2007 y 2008, los picos de este nutriente se registraron nuevamente en club Náutico alcanzando valores máximos de 48,3 y 15,6 μM , respectivamente. En el resto de los casos, incluyendo todos los tiempos de exposición y ambos años, los valores medidos

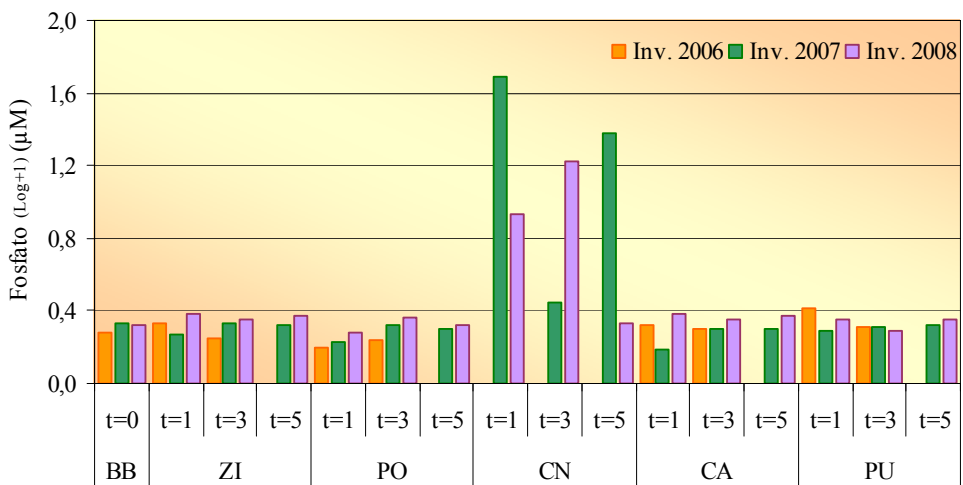


Figura 23. Concentración de fosfato, en escala logarítmica, medida en agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

oscilaron entre 0,5 y 1,8 μM . Al igual que para los nutrientes anteriores, club Náutico evidenció el impacto de los efluentes que desembocan allí.

Silicato. En la **Figura 24** puede observarse la concentración de silicato (μM). Bahía Brown en 2006 presentó la concentración más baja (4,1 μM). En la semana 1 de 2006, zona industrial y planta Orión presentaron concentraciones 80 % más altas que caleta Aspirante y península Ushuaia; mientras que en la semana 3, las concentraciones fueron menos variables entre los sitios (8,6 \pm 1,0 μM). En el año 2007, en club Náutico se midieron las mayores concentraciones en las tres semanas estudiadas siendo los valores hallados de 89,26 μM en la semana 1, 8,15 μM en la semana 3 y 22,96 μM en la semana 5. A su vez, las concentraciones medidas en zona industrial y planta Orión fueron superiores a las registradas en caleta Aspirante y península Ushuaia. En estos últimos sitios este nutriente incluso estuvo menos concentrado que en bahía Brown donde fue de 6,85 μM . En 2008, club Náutico presentó las concentraciones más altas en las semanas 1 y 3 que fueron 23,4 y 55,7 μM respectivamente; mientras que en la semana 5, la mayor concentración de silicato se registró en península Ushuaia (11,9 μM). Los niveles más bajos de silicato se midieron en bahía Brown y en península Ushuaia en las semanas 1 y 3, siendo en todos los casos de 4,8 μM .

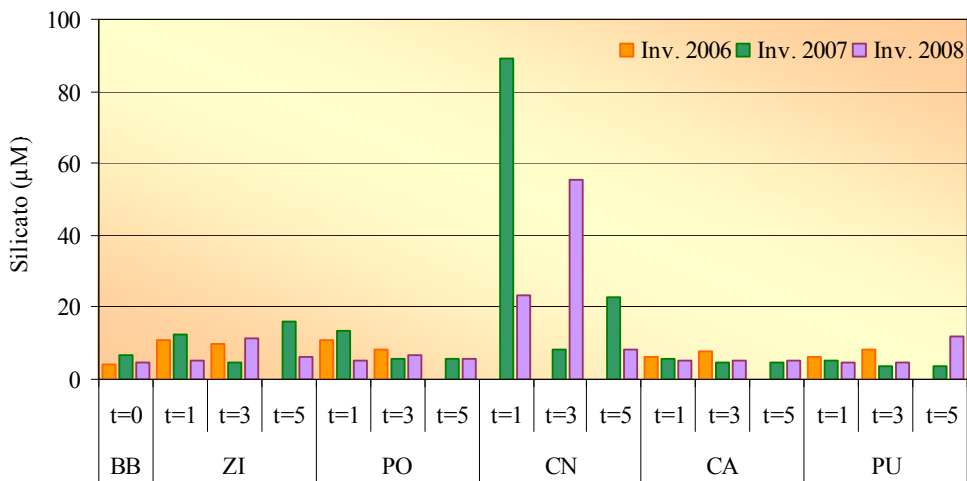


Figura 24. Concentración de silicato medida en agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

4.1.2.2 *Clorofila a*

La **Figura 25** muestra la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$). Los valores encontrados oscilaron entre: 0,02 y 0,22 $\mu\text{g/L}$ en 2006, 0,01 y 0,05 $\mu\text{g/L}$ en 2007 y 0,01 y 0,03 $\mu\text{g/L}$ en

2008. En todos los sitios, se midieron las mayores concentraciones en el experimento de 2006.

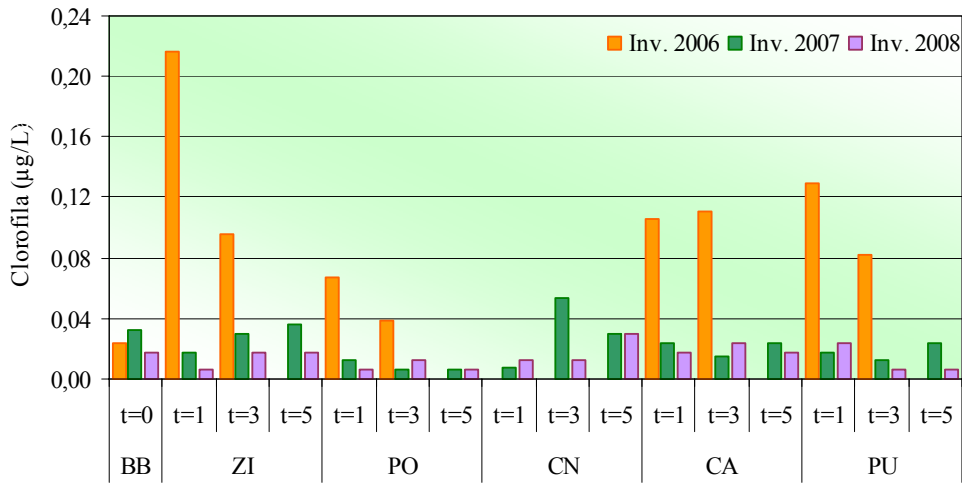


Figura 25. Concentración de clorofila *a* medida en agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

4.1.2.3 Materia orgánica particulada

La **Figura 26** representa la concentración de materia orgánica particulada (mg/m^3). En 2006, los valores registrados en la semana 1 oscilaron entre $115,4 \text{ mg}/\text{m}^3$ en caleta Aspirante y $665,8 \text{ mg}/\text{m}^3$ en zona industrial. En la semana 3, en todos los sitios los niveles de materia orgánica particulada fueron no detectables. En 2007 y 2008, las concentraciones fueron más altas y estuvieron en el mismo rango: $449,6 - 1991,9 \text{ mg}/\text{m}^3$ y $631,2 - 1933,6 \text{ mg}/\text{m}^3$,

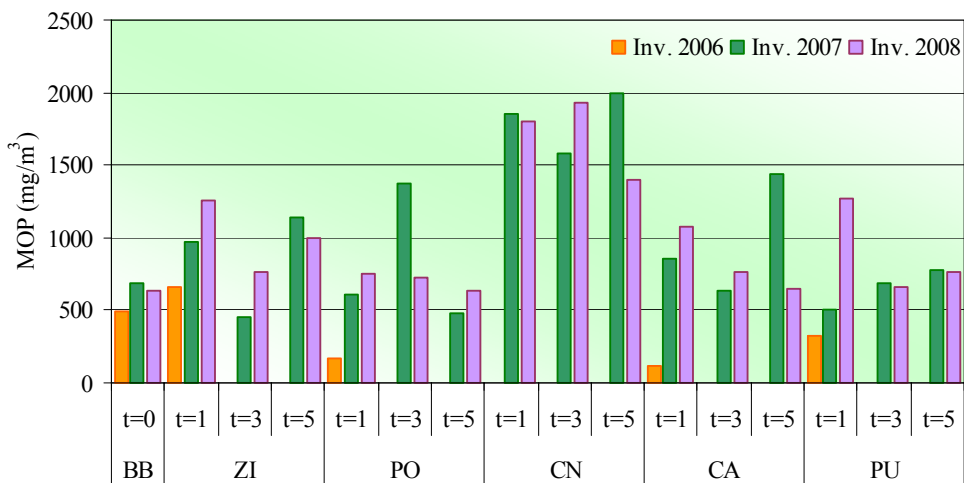


Figura 26. Concentración de materia orgánica particulada en agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 3 en Invierno 2006 (naranja) y en las semanas 1, 3 y 5 en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

respectivamente. Club Náutico resultó ser el sitio con los valores más altos en cada semana de muestreo, tanto en 2007 como en 2008.

4.2 Determinaciones en sedimento

4.2.1 Granulometría del sedimento

En la **Figura 27** se presentan los resultados (expresados en porcentajes) de las fracciones granulométricas del sedimento. En general, en el experimento de 2006, los sedimentos de bahía Brown, caleta Aspirante y península Ushuaia se caracterizaron como gravosos; los de zona industrial como arenosos y los de planta Orión como gravosos-arenosos. El porcentaje de fango fue menor a 6,5 % en todos los sitios. En 2007, bahía Brown nuevamente presentó la mayor proporción de grava (80 %). Los sedimentos de zona industrial, planta Orión y península Ushuaia se caracterizaron por mayor contenido de arena, los de caleta Aspirante fueron gravosos-arenosos, mientras que los de club Náutico fueron arenosos-fangosos. En 2008, bahía Brown y caleta Aspirante, en la semana 5, presentaron 79,87 y 81,88 % respectivamente de grava en su composición granulométrica. Caleta Aspirante en la semana 1, así como planta Orión en la semana 5, se caracterizaron por sedimentos gravosos-arenosos. En ambas semanas, península Ushuaia presentó mayor proporción de arena en su composición. Zona industrial y planta Orión en la semana 1 presentaron sedimentos con mayor proporción de grava seguido de arena. Club Náutico se caracterizó por sedimentos arenosos y la mayor proporción de fango (28-33 %).

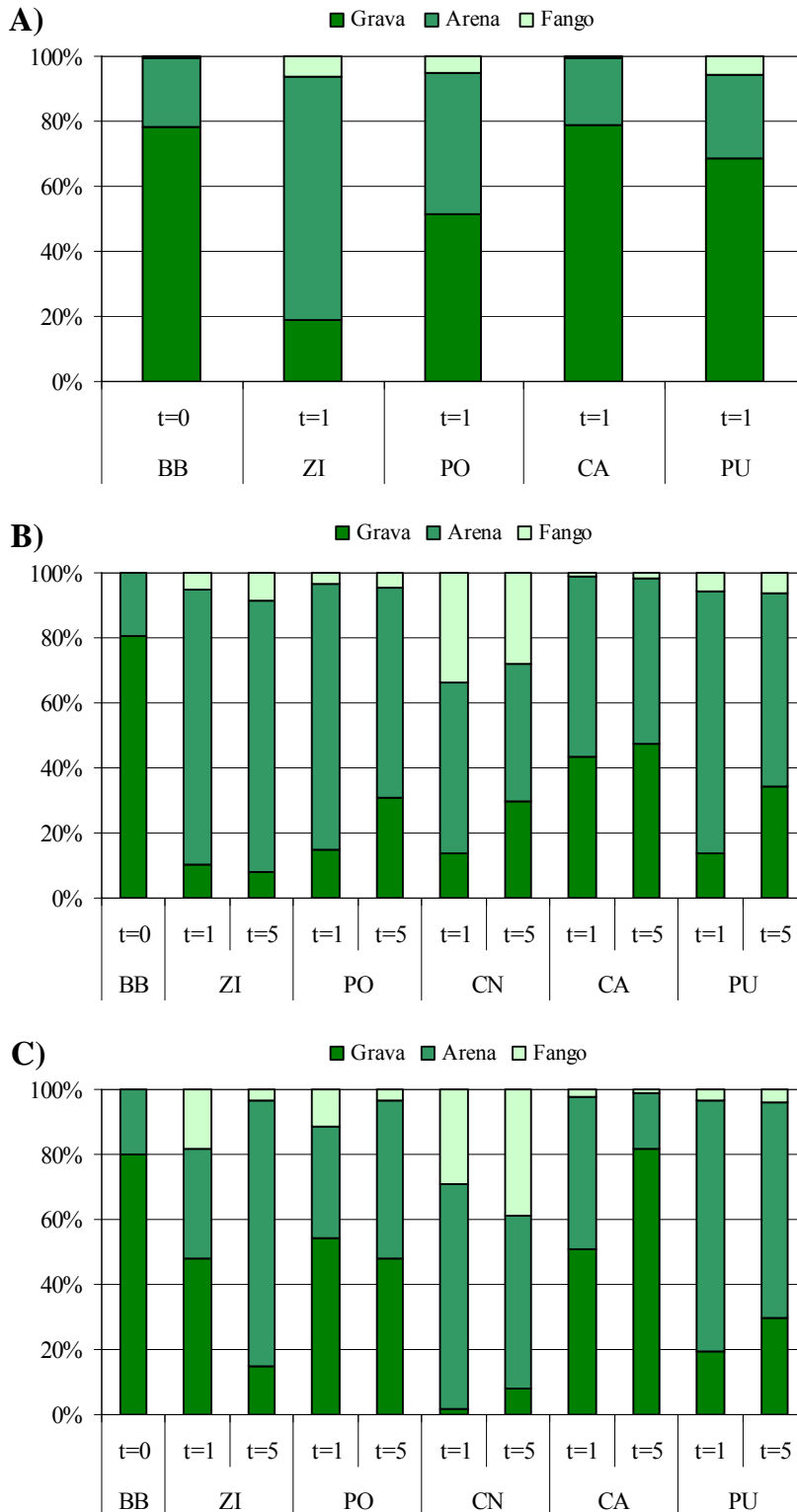


Figura 27. Porcentaje de fracciones granulométricas (fango, arena y grava) de los sedimentos de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en la semana 1 en experimento de **A)** Invierno de 2006 y en las semanas 1 y 5 del experimento de **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008.

A modo de resumen se calculó el promedio de cada fracción granulométrica a partir de los tres años de experimentación para cada sitio de estudio (**Tabla 14**). Bahía Brown fue el sitio que presentó mayor homogeneidad en su estructura granulométrica, lo cual se evidencia con los bajos desvíos estándares. Este lugar fue el que presentó mayor proporción de grava y menor contenido de fango. Por el contrario, los sedimentos de club Náutico fueron los más variables y los que presentaron mayor proporción de fango. Los sitios restantes se caracterizaron por altos contenidos de grava y arena, en proporciones variables.

Tabla 14. Media y desvío estándar de las fracciones granulométricas del sedimento correspondiente a los tres analizados para cada sitio estudiado.

Sitio	Grava (%)	Arena (%)	Fango (%)
Bahía Brown	79,6 ± 1,4	20,1 ± 1,3	0,30 ± 0,1
Zona industrial	20,0 ± 16,1	67,2 ± 21,5	8,3 ± 5,9
Planta Orión	39,8 ± 16,6	54,4 ± 18,5	5,5 ± 3,3
Club Náutico	26,2 ± 31,1	49,0 ± 18,1	26,1 ± 14,7
Caleta Aspirante	60,5 ± 18,3	36,1 ± 18,0	1,4 ± 0,6
Península Ushuaia	33,2 ± 21,3	61,9 ± 21,8	4,9 ± 1,3

4.2.2 Metales pesados totales en sedimento

En la **Figura 28** se presentan las concentraciones de los metales pesados Cu, Zn, Cd y Pb expresadas en µg/g (peso seco) y de Fe expresado en mg/g (peso seco) en la fracción <62µm del sedimento de todos los sitios analizados en invierno de 2006, 2007 y 2008.

En los tres años muestreados, bahía Brown presentó las concentraciones más altas de Cu (36,25 - 94,80 µg/g), Zn (105,62 - 198,06 µg/g) y Fe (24,91 - 29,77 mg/g). En el caso del Cu y el Zn, las concentraciones tendieron a aumentar de un año a otro; mientras que el Fe se mantuvo relativamente estable en $27,76 \pm 2,54$ mg/g. La concentración de Cd subió desde no detectable (<0,27 µg/g) en 2006 hasta 3,01 µg/g en 2008. El Pb también se incrementó desde 12,12 µg/g en 2006 hasta 22,97 µg/g en 2008.

Cobre. Analizando los sitios de bahía Ushuaia, se observó un incremento de este metal en los cinco sitios en el año 2008 respecto del año anterior. La mayor concentración se registró en zona industrial (42,88 µg/g), seguida de la medida en club Náutico (33,23 µg/g). Promediando los valores correspondientes a los tres años, caleta Aspirante y península Ushuaia presentaron las concentraciones más bajas de $9,36 \pm 4,53$ µg/g y $9,36 \pm 2,81$ µg/g, respectivamente.

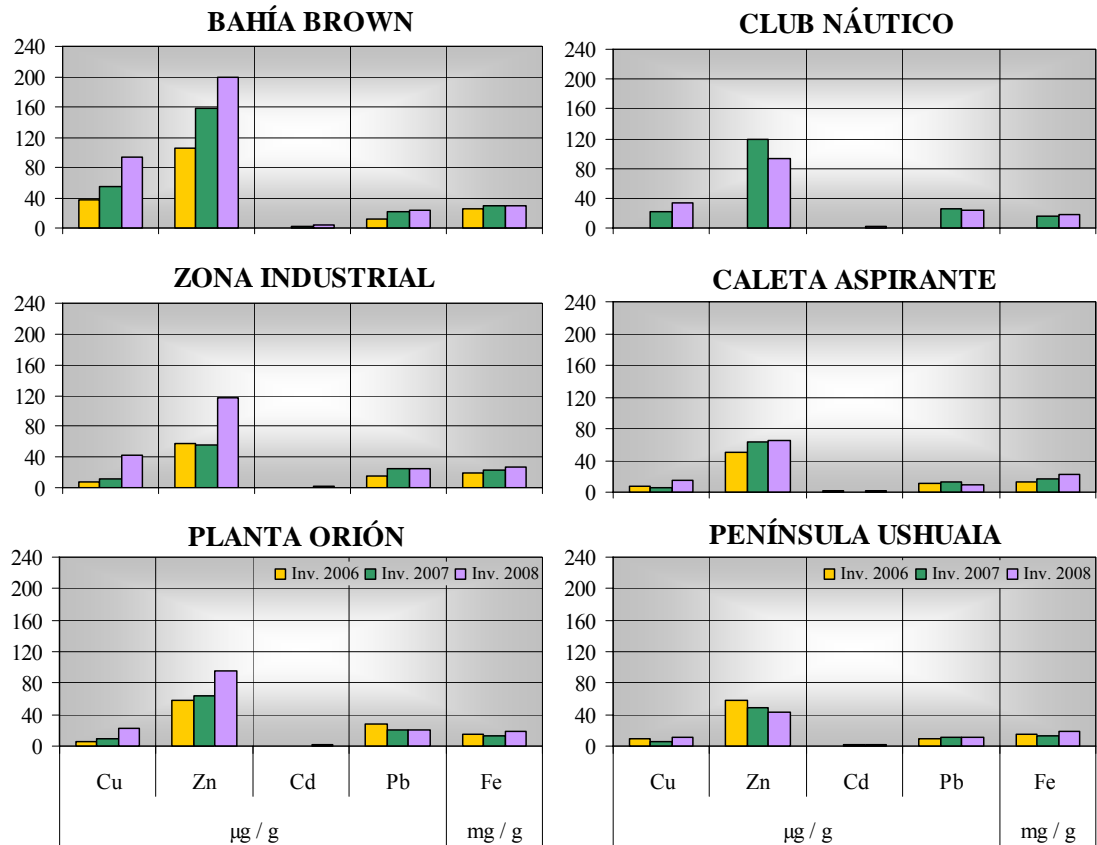


Figura 28. Concentración de Cu, Zn, Cd, Pb y Fe en la fracción fina (<62µm) del sedimento para cada uno de los sitios en estudio en Invierno de 2006 (amarillo), Invierno de 2007 (verde) e Invierno de 2008 (lila) al inicio del experimento (semana 1). Los resultados están expresados en µg/g, excepto el hierro en mg/g.

Zinc. En zona industrial se registraron concentraciones de $56,72 \pm 1,57$ µg/g en los años 2006 y 2007, llegando a duplicarse en 2008 ($117,89$ µg/g). En planta Orión se incrementó desde $57,93$ µg/g en 2006 hasta $95,17$ µg/g en el año 2008. En club Náutico se registró un descenso de $119,07$ µg/g en 2007 a $93,85$ µg/g en 2008. En caleta Aspirante y península Ushuaia, se registraron las menores concentraciones de Zn que fueron $59,70 \pm 7,98$ µg/g y $50,43 \pm 7,84$ µg/g, respectivamente.

Cadmio. En zona industrial se midió la mayor concentración de Cd ($2,25$ µg/g) en el año 2008, mientras que en el resto de los casos los niveles de dicho metal variaron desde no detectable hasta $1,81$ µg/g en caleta Aspirante en 2006. Excepto por ese dato de 2006, las mayores concentraciones se registraron en 2008.

Plomo. Zona industrial, planta Orión y club Náutico presentaron concentraciones semejantes de Pb siendo en promedio de $22,84 \pm 4,12$ µg/g. Caleta Aspirante y península Ushuaia presentaron las concentraciones más bajas de $10,97 \pm 1,89$ µg/g y $10,50 \pm 1,18$ µg/g, respectivamente.

Hierro. Los sedimentos de zona industrial presentaron las concentraciones más altas de Fe, las cuales se fueron incrementando en cada año de muestreo desde 19,85 mg/g en 2006 hasta 26,68 mg/g en 2008. El resto de los sitios de bahía Ushuaia presentaron valores entre 12,81 mg/g y 21,40 mg/g.

4.2.2.1 Factores de enriquecimiento

Los factores de enriquecimiento para el Cu, Zn, Cd y Pb se muestran en la **Figura 29**. El Cd fue el metal con los valores más altos de este factor en caleta Aspirante (28,92) en 2006, así como en bahía Brown (11,35) y en península Ushuaia (16,42) en 2007. No se calcularon factores de enriquecimiento para Cd para los sedimentos de bahía Brown en el experimento de 2006 ni para los de planta Orión y club Náutico en el experimento de 2007 por hallarse por debajo del límite de detección. En el experimento de 2008 todos los sitios presentaron factores mayores a 10, siendo el valor máximo el registrado en bahía Brown (21,58). En general, factores mayores a 1 manifiestan que el metal puede provenir de una fuente antrópica. Sin embargo, el canal Beagle en general y la bahía Brown en particular, no presentan un impacto antrópico de magnitud que pudiera hacer pensar necesariamente en este origen. Por este motivo, es posible que estos factores sean naturales y no estén relacionados con influencia antrópica. Los tres metales restantes presentaron factores entre 0,41 y 4,95 lo cual manifiesta un origen natural.

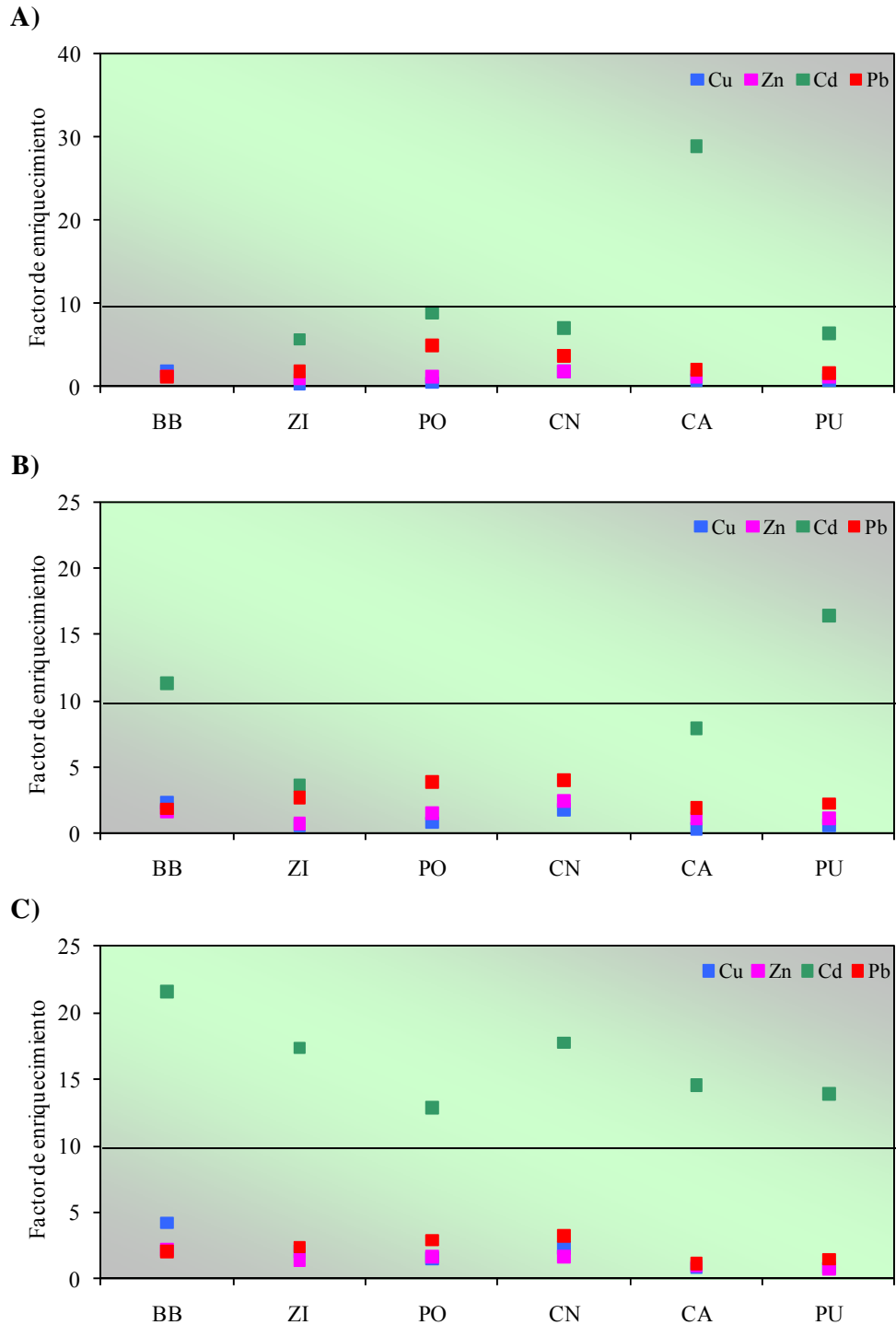


Figura 29. Factores de enriquecimiento de Cu, Zn, Cd y Pb para los sedimentos de bahía Brown (BB), zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en los experimentos de **A)** Invierno 2006, **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008.

4.3 Determinaciones en organismos

Mediante la medición de diferentes parámetros biológicos se propuso conocer el estado fisiológico y bioquímico de los mejillones de bahía Brown y de los transplantados a los cinco sitios de bahía Ushuaia. El largo promedio de todos los mejillones utilizados fue de $58,32 \pm 5,24$ mm.

4.3.1 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica

El componente más abundante de los tejidos es el agua, el cual facilita las reacciones químicas y enzimáticas y el crecimiento microbiano. La ceniza representa el contenido de material mineral presente en los tejidos. La materia orgánica es considerada una fuente de energía pero se encuentra sujeta a descomposición hidrolítica.

Los porcentajes de agua, ceniza y materia orgánica de los mejillones provenientes de bahía Brown, promediando los tres años estudiados, fueron de $77,98 \pm 2,07$ %, $2,25 \pm 0,36$ % y $19,76 \pm 2,40$ %, respectivamente. Los porcentajes obtenidos en 2007 y 2008 fueron semejantes entre sí y presentaron algunas variaciones respecto del 2006. El contenido de agua bajó entre 4-5 % así como el porcentaje de ceniza (20-25 %), mientras que la materia orgánica se incrementó entre 22-26 %.

El contenido de agua presentó una tendencia de disminución a lo largo de los años de muestreo. Incluyendo todos los sitios muestreados y los diferentes tiempos de exposición, los promedios de agua hallados fueron $81,01 \pm 0,78$ % en 2006, $78,74 \pm 1,90$ % en 2007 y $75,20 \pm 0,89$ % en 2008. Solamente se encontraron diferencias entre sitios y entre tiempos en el experimento de 2007. Para ninguno de los años estudiados, se halló interacción entre los factores sitios y tiempos (ANOVA II factores, $p > 0,05$). En 2006, el contenido de agua no presentó significancia estadística con los sitios ni con los tiempos. En 2007, ambos factores resultaron significativos (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En el caso del factor tiempo, se encontró un porcentaje de agua significativamente mayor en la semana 4 en comparación con la semana 2. En cuanto a los sitios, el contenido de agua en los mejillones transplantados a club Náutico fue mayor al de aquéllos transplantados a península Ushuaia, planta Orión y caleta Aspirante (**Figura 30**). En el experimento de 2008 solo se halló una significancia estadística en el factor tiempo (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En concordancia con el experimento de 2007, el contenido de agua en la semana 4 fue mayor al de la semana 2.

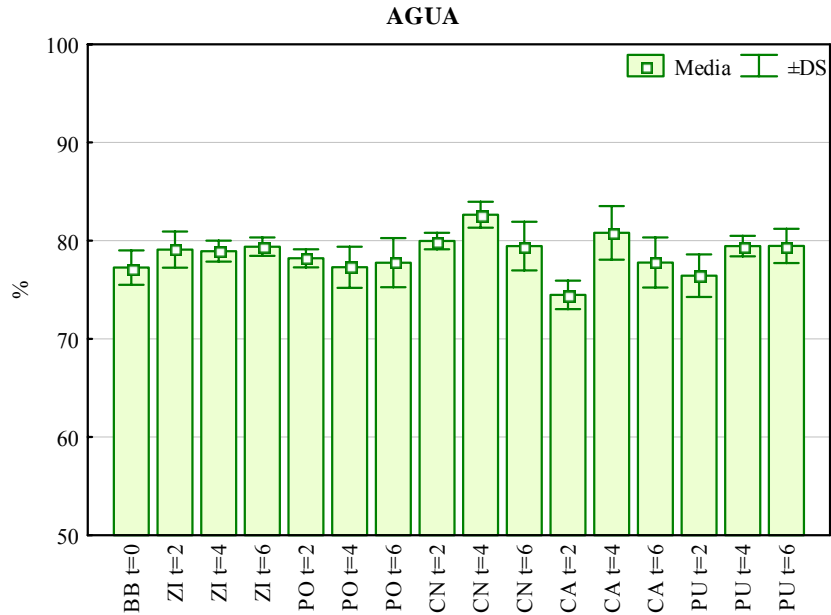


Figura 30. Contenido de agua expresado en porcentaje en el mejillón *M. edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007. Los resultados se expresan como la Media \pm DS para 5 determinaciones.

El porcentaje de ceniza presentó muy poca variación interanual, pero en los experimentos de 2006 y 2008 los valores mostraron mayor dispersión. En ninguno de los experimentos se halló interacción significativa entre los sitios y los tiempos de exposición (ANOVA II factores, $p > 0,05$). En 2006 y en 2008, el contenido de cenizas fue independiente de los sitios y tiempos estudiados (ANOVA II factores, $p > 0,05$). En 2007 (**Fig. 31**), el porcentaje de ceniza resultó dependiente del sitio. En zona industrial fue significativamente mayor que en caleta Aspirante y club Náutico, mientras que en península Ushuaia y planta Orión fue mayor que en club Náutico. En ese mismo año, los tiempos de exposición también afectaron significativamente el contenido de ceniza, resultando el porcentaje de la semana 6 mayor que a las semanas 2 y 4 (ANOVA II factores, $p < 0,05$).

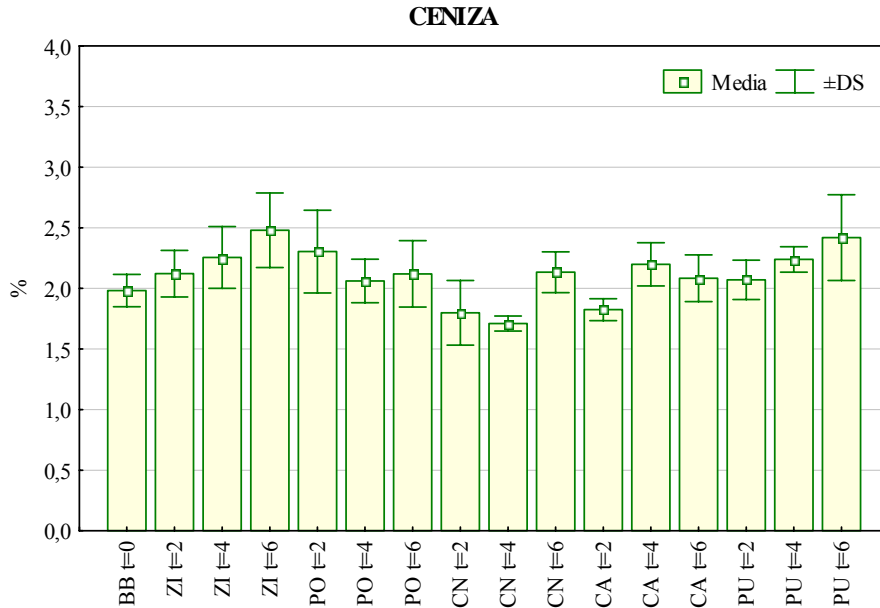


Figura 31. Contenido de ceniza expresado en porcentaje en el mejillón *M. edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007. Los resultados se expresan como la Media \pm DS para 5 determinaciones.

Contrariamente a lo encontrado en el contenido de agua, la materia orgánica presentó una tendencia de incremento en escala interanual. Incluyendo todos los sitios muestreados y los diferentes tiempos de exposición, los promedios de materia orgánica encontrados fueron $16,28 \pm 0,79$ % en 2006, $19,13 \pm 1,92$ % en 2007 y $22,22 \pm 0,86$ % en 2008. En concordancia con los resultados de contenido de agua y ceniza, en ningún experimento se encontró interacción significativa entre sitios y tiempos de exposición (ANOVA II factores, $p > 0,05$). En el experimento de 2006, el contenido de agua fue independiente de ambos factores. En general, los contenidos de agua hallados en 2007 fueron los que presentaron mayor variabilidad, encontrándose en este experimento diferencias con significancia estadística entre sitios y entre tiempos (ANOVA II factores, $p < 0,05$) (**Fig. 32**). Los mejillones transplantados a caleta Aspirante y planta Orión mostraron mayor contenido de agua que los de club Náutico. En las semanas 4 y 6 se registró una disminución significativa del contenido de agua respecto de la semana 2. En el experimento de 2008, el porcentaje de agua también fue dependiente de los tiempos de exposición, presentando la misma respuesta que en el experimento de 2007.

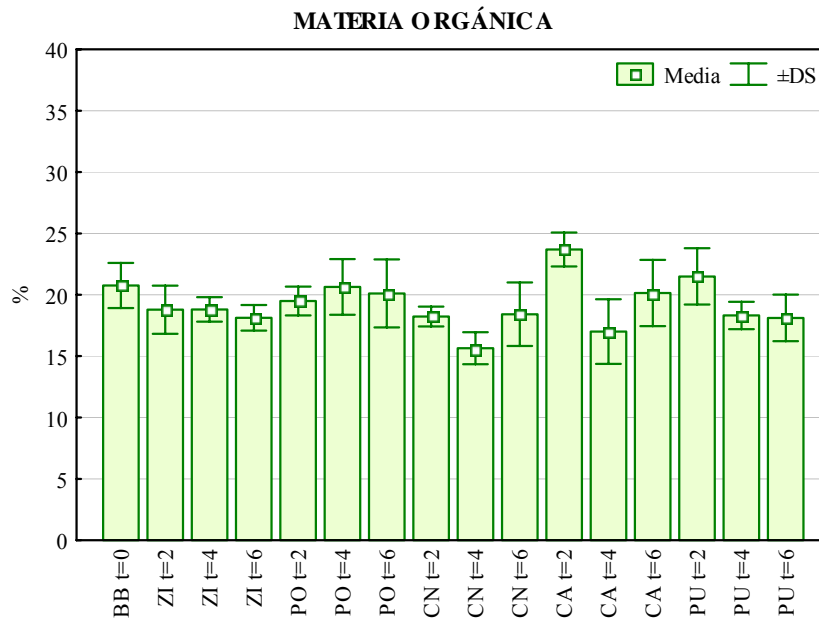


Figura 32. Contenido de materia orgánica expresado en porcentaje en el mejillón *M. edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007. Los resultados se expresan como la Media ± DS para 5 determinaciones.

Diferencias espacio-temporales en el contenido de agua, ceniza y materia orgánica fueron encontradas sólo en el experimento de 2007, pero al agrupar la información para cada sitio independientemente del factor temporal, los porcentajes de los tres parámetros resultaron muy homogéneos sin diferenciarse entre sitios (**Tabla 15**).

Tabla 15. Media y desvío estándar de los porcentajes de ceniza, materia orgánica y agua de los tres años y los diferentes tiempos para cada sitio estudiado.

Sitio	Agua (%)	Ceniza (%)	Materia orgánica (%)
Bahía Brown	77,99 ± 2,07	2,25 ± 0,35	19,76 ± 2,40
Zona Industrial	78,22 ± 2,32	2,47 ± 0,25	19,31 ± 2,29
Planta Orión	77,57 ± 2,13	2,54 ± 0,44	19,88 ± 2,28
Club Náutico	78,77 ± 3,69	2,35 ± 0,44	18,88 ± 3,56
Caleta Aspirante	77,75 ± 3,45	2,39 ± 0,41	19,86 ± 3,59
Península Ushuaia	77,88 ± 2,47	2,46 ± 0,31	19,67 ± 2,46

4.3.2 Lípidos totales

Los lípidos totales son analizados por ser una fuente importante de calorías y además por constituir una barrera para la salida de otros componentes nutricionales.

El contenido de lípidos totales en el manto de mejillones de bahía Brown a tiempo cero fue aumentando notablemente de año a año siendo $2,70 \pm 0,74$ mg/g en 2006, $15,60 \pm 0,94$ mg/g en 2007 y $26,28 \pm 2,57$ mg/g en 2008, expresados en peso fresco. La concentración de lípidos totales en la glándula digestiva de los mismos moluscos también aumentó gradualmente de $2,31 \pm 0,39$ mg/g en 2006, $22,53 \pm 4,47$ mg/g en 2007 a $39,15 \pm 8,06$ mg/g en 2008, expresados en tejido fresco. En invierno de 2006 no se observaron diferencias entre estos dos órganos. Sin embargo, en 2007 y 2008, el contenido de lípidos en el manto fue 30 % y 33 % respectivamente menor que el de la glándula digestiva.

Manto. La concentración de lípidos totales en manto se muestra en la **Figura 33**. En el experimento de 2006 (**Fig. 33A**), el ANOVA de II factores reveló una interacción significativa entre los sitios y el tiempo de exposición para este parámetro ($p < 0,05$). Al evaluar los efectos simples, se halló un efecto significativo del tiempo en la concentración de lípidos en el manto en zona industrial, planta Orión y caleta Aspirante aumentando en los tres casos con el tiempo de exposición. En península Ushuaia, los lípidos no variaron en función del tiempo. El ANOVA reveló efecto de los sitios en ambos tiempos de exposición. En la semana 2, los mejillones transplantados a península Ushuaia presentaron el mayor contenido de lípidos totales en manto, seguido por los de zona industrial; no habiendo diferencias entre los de caleta Aspirante y planta Orión. En la semana 4, los lípidos medidos en los mejillones de planta Orión fueron mayores a los de caleta Aspirante. Dentro de bahía Ushuaia, los menores contenidos de lípidos se midieron en la semana 2 en planta Orión y en caleta Aspirante siendo semejantes al valor medido en bahía Brown, mientras que en el resto de los casos los lípidos fueron entre 5 y 10 veces mayores que el del tiempo cero.

En invierno de 2007 (**Fig. 33B**), el ANOVA de II factores no mostró interacción significativa entre sitios y semanas de exposición ($p > 0,05$). El contenido de lípidos resultó dependiente de los sitios como del tiempo de experimentación (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Los mejillones de zona industrial y club Náutico presentaron concentraciones de lípidos en el manto significativamente menores que los mejillones de los tres sitios restantes. En cuanto al tiempo, se observó una disminución significativa en la semana 4. Comparativamente con bahía Brown, solamente los lípidos totales medidos en zona industrial resultaron menores mientras que el resto de las estaciones presentaron valores semejantes a la condición inicial.

En invierno de 2008 (**Fig. 33C**) tampoco se encontró una interacción significativa entre los sitios y los tiempos de exposición (ANOVA II factores, $p > 0,05$), pero si resultaron significativos los efectos de ambos factores por separado ($p < 0,05$). Con respecto a los sitios,

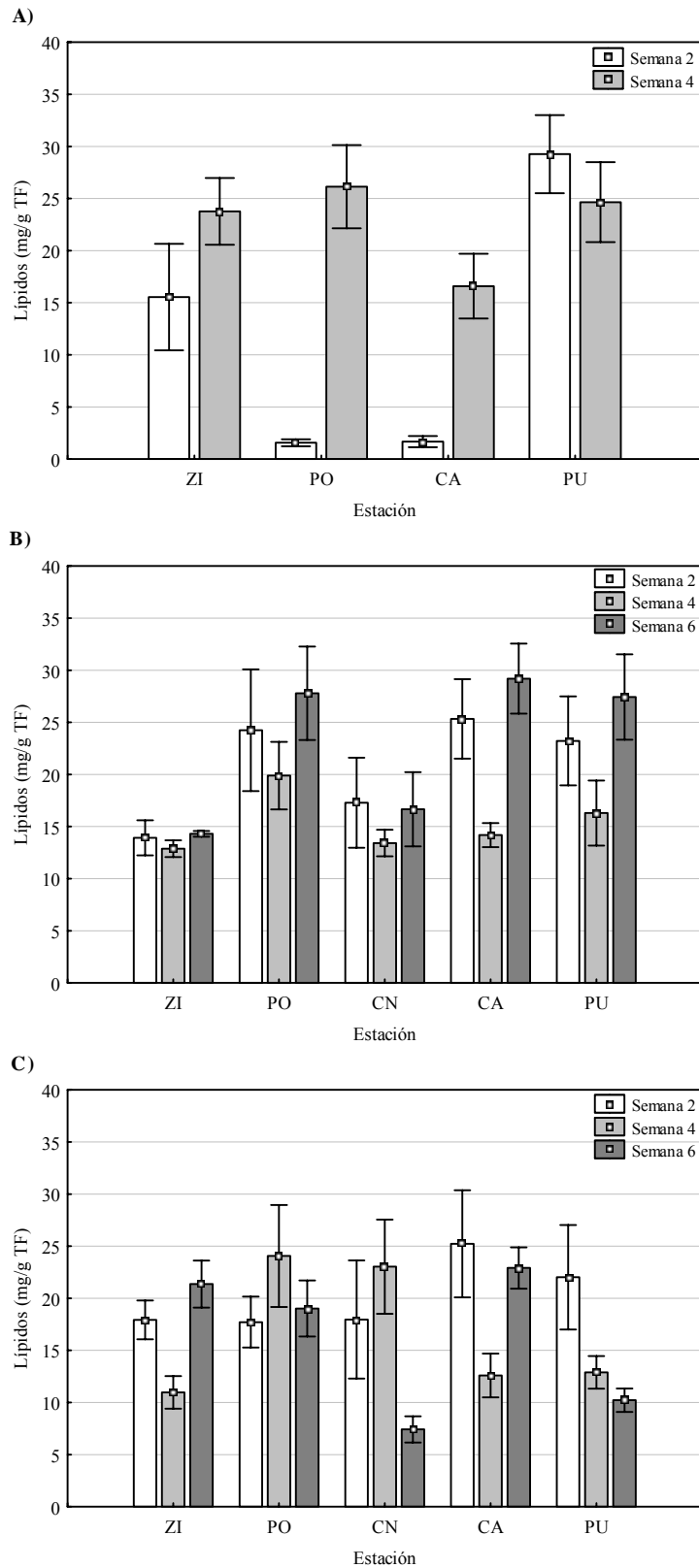


Figura 33. Contenido de lípidos totales en el manto del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 4 determinaciones.

se encontró en los mejillones de península Ushuaia un contenido de lípidos significativamente menor que el registrado en los organismos de caleta Aspirante y planta Orión. A su vez, en este último sitio, los mejillones presentaron mayor concentración de lípidos totales en el manto que los de club Náutico. Con respecto a los tiempos de exposición, se halló una disminución significativa en las semanas 4 y 6 de experimentación. Los lípidos medidos en zona industrial en las semanas 2 y 4, en club Náutico en la semana 6, en caleta Aspirante en la semana 4 y en península Ushuaia en las semanas 4 y 6 fueron menores a los de bahía Brown, mientras que el resto de los casos de bahía Ushuaia fueron del mismo orden de magnitud.

Glándula digestiva. Los resultados correspondientes a lípidos totales en glándula digestiva se presentan en la **Figura 34**. En invierno de 2006 (**Fig. 34A**), en concordancia con los resultados encontrados en el manto, el ANOVA de II factores reveló interacción significativa entre sitios y tiempos de experimentación ($p < 0,05$). El efecto de los sitios sólo se encontró en la semana 2 de experimentación, donde el contenido de lípidos medido en planta Orión resultó significativamente mayor que el de zona industrial y península Ushuaia, y el de éstos, mayor al de caleta Aspirante (ANOVA I factor, $p < 0,05$). El análisis de los efectos simples evidenció efecto del tiempo solamente en planta Orión y caleta Aspirante. Los resultados fueron opuestos: en planta Orión hubo un descenso significativo en la semana 4, mientras que en caleta Aspirante se registró un aumento en dicha semana. Cuando se comparan los valores obtenidos en bahía Ushuaia con el de bahía Brown, los primeros fueron ampliamente mayores llegando a ser, como en el caso de planta Orión en la semana 2, 22 veces más alto que el valor registrado en bahía Brown.

En invierno de 2007 (**Fig. 34B**), la interacción de los factores sitios y tiempos no resultó significativa sobre el contenido de lípidos totales en la glándula digestiva (ANOVA II factores, $p > 0,05$). Sin embargo, este parámetro varió en función de cada uno de esos factores individualmente. En los mejillones de club Náutico y planta Orión, el contenido de lípidos totales fue significativamente más alto que en los demás sitios; mientras que en zona industrial resultó mayor que en península Ushuaia (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En cuanto al efecto temporal, se halló una disminución significativa al incrementarse el tiempo de exposición (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Excepto en zona industrial en la semana 4, en caleta Aspirante y península Ushuaia en las semanas 4 y 6, se observó un incremento de los lípidos totales en la bahía Ushuaia con respecto a bahía Brown.

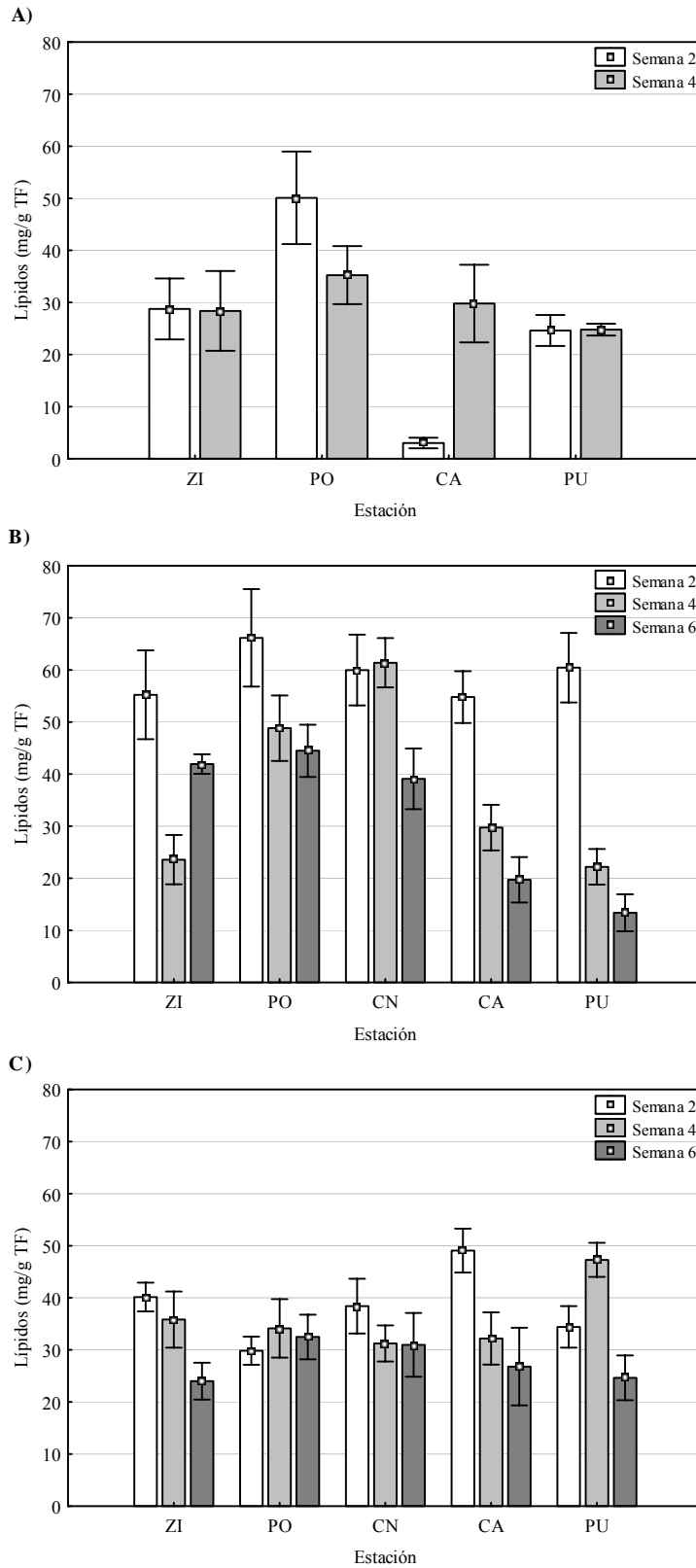


Figura 34. Contenido de lípidos totales en glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 4 determinaciones.

En el experimento de 2008 (**Fig. 34C**), sólo se halló efecto significativo del tiempo sobre el contenido de lípidos, registrándose una disminución en la semana 6 de experimentación. Sólo los lípidos medidos en caleta Aspirante en la semana 2 y en península Ushuaia en la semana 4 sobrepasaron el valor medido en bahía Brown.

4.3.3 Bioacumulación de metales pesados

Cobre. La **Figura 35** muestra las concentraciones de Cu en la branquia y la glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* expresadas en µg/g (peso seco). En cuanto a la branquia, en el experimento de 2006 se registraron los valores más altos de Cu, observándose un descenso en la bioacumulación en la semana 4 de exposición. En los experimentos de 2007 y 2008 las concentraciones acumuladas fueron muy similares en la semana 2 en todos los sitios, mientras que en las semanas 4 y 6 del experimento de 2008 se observó mayor acumulación. Los valores más altos se midieron en los sitios más cercanos a la influencia antrópica desde la ciudad de Ushuaia como son la zona industrial, planta Orión y club Náutico donde se halló un notorio incremento en las semanas 4 y 6, respecto de la semana 2.

En la glándula digestiva, el Cu acumulado en 2006 resultó más alto que en los experimentos posteriores, incluso en bahía Brown. La tendencia de bioacumulación fue similar en 2007 y 2008 pero alcanzando mayores concentraciones en 2008, en concordancia con los resultados hallados en la branquia. En los experimentos de 2007 y 2008, al igual que en la branquia, los valores más altos se midieron en zona industrial, planta Orión y club Náutico. Este metal se acumuló en mayor proporción en la glándula digestiva llegando a duplicar la concentración medida en la branquia.

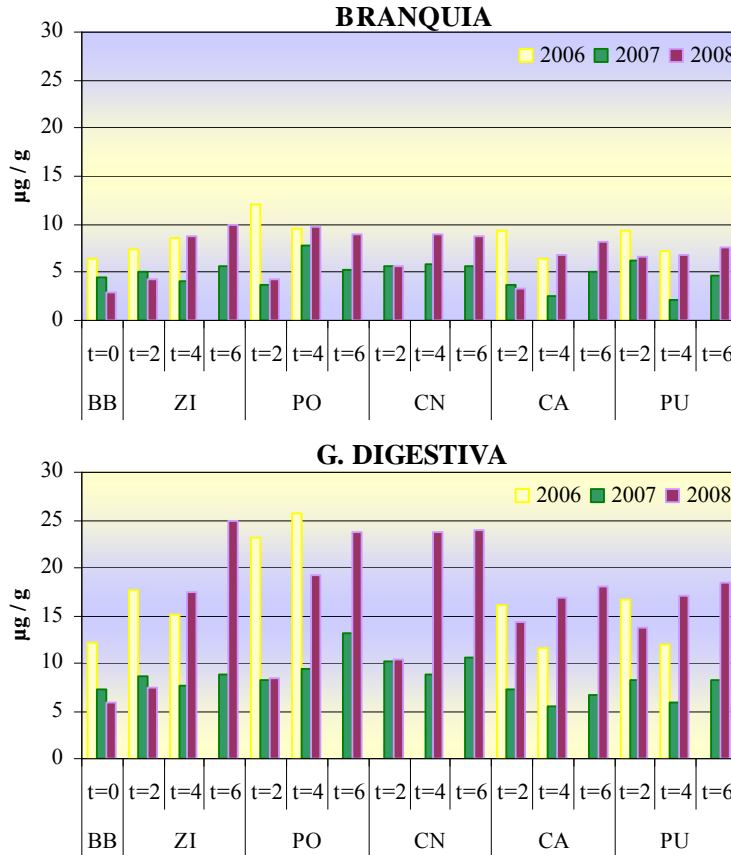


Figura 35. Concentración de Cu expresada en $\mu\text{g/g}$ en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantedos a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en Invierno 2006 (amarillo) y 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Zinc. La bioacumulación de Zn en la branquia y la glándula digestiva fue muy variable tanto en el espacio como en el tiempo (**Fig. 36**). En la branquia, en el experimento de 2006, se produjo en zona industrial y península Ushuaia una disminución de dicho metal en la semana 2 a menos de la mitad respecto de la condición inicial; mientras que en la semana 4 aumentaron a niveles semejantes a los iniciales. En planta Orión y caleta Aspirante, la concentración de Zn bajó más del 100 % en la semana 4. En 2007 y 2008, se observó una gran variación espacio-temporal tendiendo a ser mayores las concentraciones a medida que se incrementaba el tiempo de exposición. En 2008 se midieron mayores concentraciones que en 2007 en la branquia, con la única excepción de club Náutico en la semanas 4 y 6.

El Zn acumulado en la glándula digestiva en 2006 fue parecido en todos los sitios a lo largo del tiempo de exposición, siendo la máxima concentración la registrada en planta Orión en la semana 2 (102,54 $\mu\text{g/g}$). En 2007 se encontró la mayor acumulación en la semana 4 en todos los sitios analizados, siendo semejantes los valores hallados en todos los sitios. En 2008

se encontró un aumento gradual en zona industrial, planta Orión y club Náutico, mientras que en caleta Aspirante y península Ushuaia la concentración de Zn bajó en las semanas 4 y 6. La mayor acumulación se observó en el experimento de 2008, en concordancia con los resultados obtenidos en la branquia. Al comparar la acumulación en función del tejido estudiado, en la glándula digestiva el Zn resultó hasta cuatro veces menor que en la branquia.

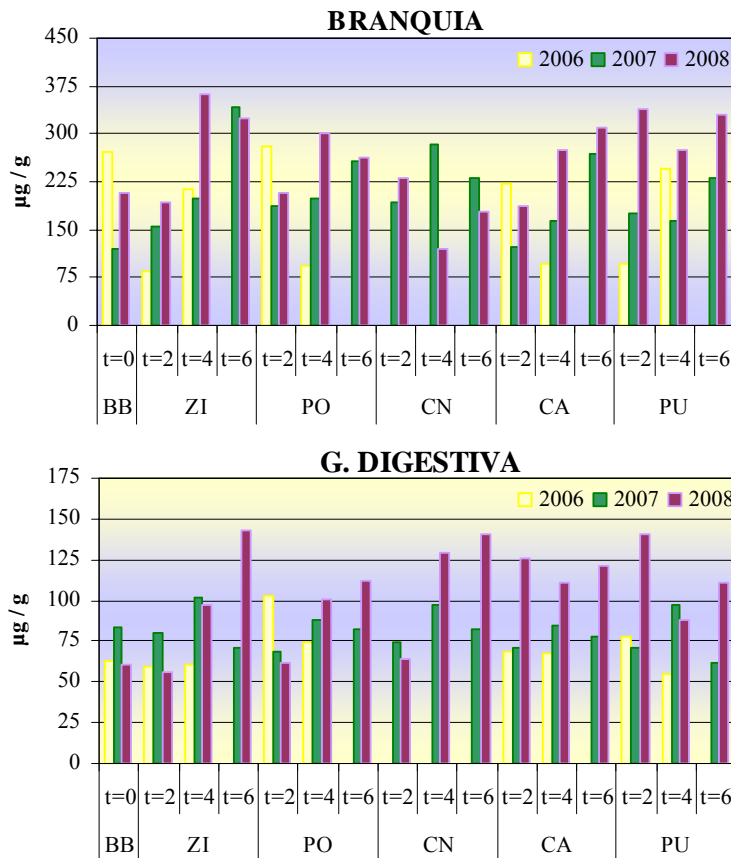


Figura 36. Concentración de Zn expresada en $\mu\text{g/g}$ en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantedos a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas, en Invierno 2006 (amarillo) y 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Hierro. En la **Figura 37** se presentan las concentraciones de Fe en la branquia y la glándula digestiva. En el experimento de 2006, se observó un aumento gradual en los niveles de este metal en la branquia en zona industrial y península Ushuaia. En caleta Aspirante se mantuvo en $107,86 \pm 2,59 \mu\text{g/g}$, mientras que en planta Orión se incrementó un 31 % en la semana 2 respecto de la condición inicial y descendió hasta niveles semejantes a los del tiempo cero en la semana 4. En los experimentos de 2007 y 2008, se observó una tendencia de aumento de Fe a medida que aumentaba el tiempo de experimentación, excepto en club Náutico que se registró una disminución en la semana 4 en esos años y, en zona industrial

sólo en 2007. La máxima concentración se registró en 2008 en zona industrial en la semana 6 (417,38 µg/g) y las menores en península Ushuaia en 2007 en las semanas 2 y 4 (61,43 ± 2,88 µg/g), siendo incluso menores a la registrada en bahía Brown (69,52 µg/g).

Con respecto al Fe en la glándula digestiva, en 2006 se observó un incremento en la semana 2 y un posterior descenso en la semana 4 en los cuatro sitios de bahía Ushuaia. En el experimento de 2007 se registró un descenso en la semana 2 en los cinco sitios de bahía Ushuaia, con posteriores incrementos en todos los casos, principalmente en la semana 6. En el experimento de 2008 se observó un incremento desde la semana 2 de exposición, excepto en zona industrial que se observó en la semana 4, alcanzando concentraciones superiores a las de 2007. Al igual que en la branquia, se registró en zona industrial la máxima acumulación de Fe (2628,74 µg/g) en la semana 6. Dicho metal se acumuló preferencialmente en la glándula digestiva, superando hasta en 13 veces el valor medido en la branquia, como ocurrió en bahía Brown y en península Ushuaia (semana 6) en el experimento de 2007.

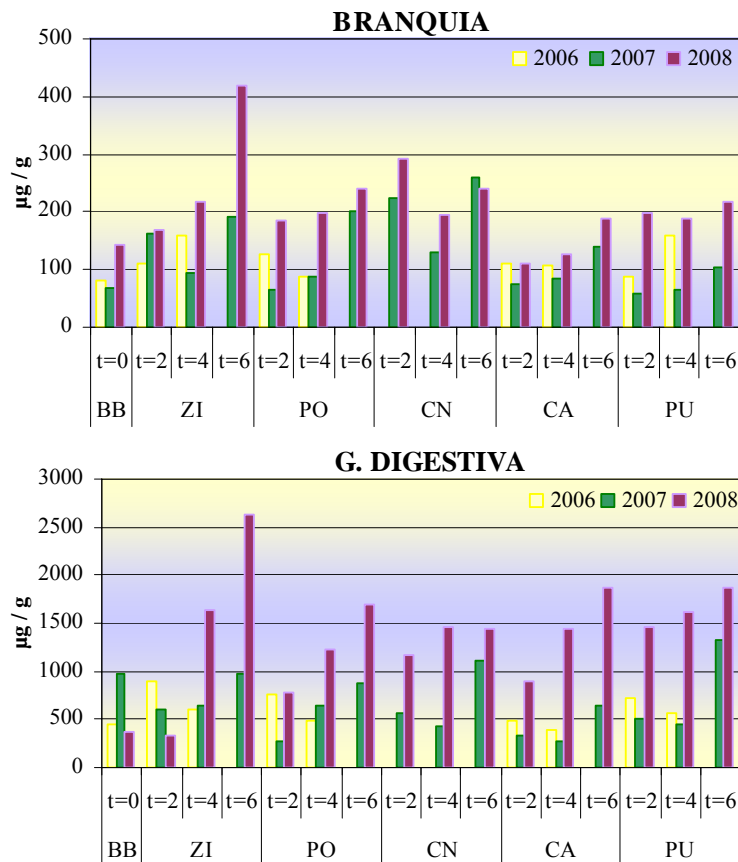


Figura 37. Concentración de Fe expresada en µg/g en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en Invierno 2006 (amarillo) y 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

Cadmio. La acumulación de Cd en la branquia y la glándula digestiva presentó heterogeneidad en tiempo y espacio (Fig. 38). En la branquia las concentraciones variaron entre 0,34 y 2,57 $\mu\text{g/g}$. Se registraron los máximos valores en caleta Aspirante, en la semana 2 en 2006 (2,57 $\mu\text{g/g}$) y en 2008 (2,39 $\mu\text{g/g}$). En 2007 la acumulación de Cd aumentó a lo largo del tiempo de exposición. En planta Orión, club Náutico y península Ushuaia la concentración tendió a disminuir, mientras que en caleta Aspirante se mantuvo estable. En el experimento de 2008 se observó una tendencia de disminución a medida que se incrementaba el tiempo de experimentación.

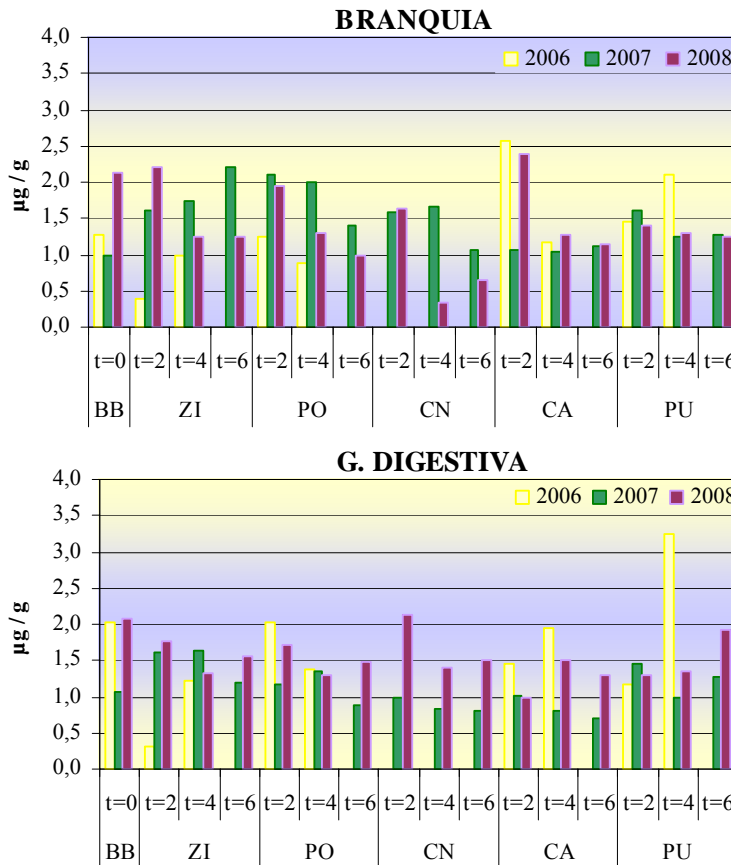


Figura 38. Concentración de Cd expresada en $\mu\text{g/g}$ en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantedos a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en Invierno 2006 (amarillo) y 2, 4 y 6 semanas en Invierno 2007 (verde) e Invierno 2008 (lila).

En la glándula digestiva se encontró en el experimento de 2006 un descenso en la concentración de Cd en la semana 2 en zona industrial, caleta Aspirante y península Ushuaia respecto de la concentración medida en bahía Brown (2,03 $\mu\text{g/g}$), con un posterior ascenso en la semana 4 alcanzando un valor máximo de 3,25 $\mu\text{g/g}$ en península Ushuaia. En 2007 las concentraciones de Cd presentaron poca variación espacio-temporal. Una tendencia similar se

halló en 2008 pero alcanzando valores mayores que en 2007. En bahía Brown se halló una concentración de 2,07 $\mu\text{g/g}$, igualando el valor encontrado en 2006. El único dato mayor al del tiempo cero fue el medido en club Náutico en la semana 2 (2,14 $\mu\text{g/g}$). No se observó un órgano preferencial de acumulación para este metal.

Plomo. Valores de Pb por encima del límite de detección (2,15 $\mu\text{g/g}$) se registraron en los dos órganos en el experimento de 2006 y en la branquia de los mejillones transplantados a club Náutico por 2 semanas en el experimento de 2007 (3,37 $\mu\text{g/g}$). El resto de las concentraciones se situaron por debajo del límite de detección, por lo cual los resultados no se presentan gráficamente. Con respecto a la branquia, se registró en 2006 la máxima concentración de Pb en la semana 2 en zona industrial (15,57 $\mu\text{g/g}$) con un posterior descenso en la semana 4 (3,37 $\mu\text{g/g}$). El mismo comportamiento temporal, aunque en magnitudes menores, se observó en caleta Aspirante y península Ushuaia; mientras que en planta Orión la concentración de este metal aumentó desde no detectable en la semana 2 hasta 5,05 $\mu\text{g/g}$ en la semana 4.

Con respecto a la acumulación de Pb en la glándula digestiva, se encontró el máximo valor en bahía Brown (9,10 $\mu\text{g/g}$). En zona industrial y caleta Aspirante la concentración se mantuvo relativamente constante, mientras que en planta Orión y península Ushuaia se registró un descenso en la semana 4. Este metal no evidenció acumulación selectiva según el órgano estudiado.

4.3.3.1 Bioconcentración de metales pesados

Con la finalidad de evaluar la eficiencia de bioacumulación de los metales, se calculó el factor de bioconcentración a partir de la concentración de metal en el organismo en función de la concentración del mismo metal en el sedimento (**Tabla 16**). El Cd fue uno de los metales más bioconcentrado, aunque en varios casos no pudieron calcularse los factores de bioconcentración, por ser no detectables los niveles de dicho metal en el sedimento. En península Ushuaia, en los dos órganos evaluados, y en planta Orión, en la glándula digestiva, en el experimento de 2006. Valores altos también se hallaron en zona industrial en el experimento de 2007, en la branquia como en la glándula digestiva. El Zn fue el otro metal más bioconcentrado en la branquia de todos los sitios de bahía Ushuaia en los tres experimentos realizados, y en bahía Brown en el experimento de 2006. En el experimento de 2008, en la glándula digestiva de los mejillones transplantados a la península Ushuaia, se encontró el factor de bioconcentración más alto para el Zn. Con respecto al Cu, los mayores

valores se midieron en zona industrial y planta Orión en la glándula digestiva en el experimento de 2006. El Pb y el Fe presentaron, en todos los casos, factores menores a 1.

Tabla 16. Factores de bioconcentración en branquia y glándula digestiva de *M. edulis chilensis* proveniente de bahía Brown (BB) y de los cinco sitios de bahía Ushuaia (BU): zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia. Promedio de los tres tiempos con su desvío para los sitios de BU. s/d = sin dato.

Estación	Cu			Zn			Fe			Cd			Pb	
	2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2007	2008	2006	2008
Branquia														
BB	0,18	0,08	0,03	2,56	0,75	1,05	0,003	0,002	0,005	---	0,59	0,71	---	0,59
ZI	1,13 ± 0,12	0,40 ± 0,06	0,18 ± 0,07	2,56 ± 1,57	4,16 ± 1,75	2,48 ± 0,76	0,007 ± 0,002	0,006 ± 0,002	0,010 ± 0,005	1,22 ± 0,76	4,53 ± 0,77	0,69 ± 0,24	1,66 ± 0,39	0,64 ± 0,58
PO	1,84 ± 0,29	0,62 ± 0,22	0,35 ± 0,14	3,22 ± 2,30	3,36 ± 0,57	2,70 ± 0,49	0,007 ± 0,002	0,009 ± 0,005	0,011 ± 0,002	---	---	1,24 ± 0,43	---	0,18
CN	s/d	0,260 ± 0,003	0,23 ± 0,06	s/d	1,98 ± 0,38	1,88 ± 0,59	s/d	0,013 ± 0,004	0,013 ± 0,003	s/d	---	0,56 ± 0,43	s/d	s/d
CA	0,95 ± 0,25	0,69 ± 0,24	0,43 ± 0,18	3,15 ± 1,76	2,93 ± 1,20	3,92 ± 0,98	0,008 ± 0,000	0,006 ± 0,002	0,007 ± 0,002	1,03 ± 0,55	1,61 ± 0,06	1,05 ± 0,45	1,03 ± 0,55	0,71 ± 0,25
PU	0,82 ± 0,15	0,70 ± 0,33	0,59 ± 0,04	2,89 ± 1,80	3,89 ± 0,73	7,25 ± 0,81	0,008 ± 0,003	0,006 ± 0,002	0,011 ± 0,001	3,87 ± 0,99	1,29 ± 0,19	1,08 ± 0,07	3,87 ± 0,99	0,67 ± 0,19
Glándula digestiva														
BB	0,33	0,13	0,06	0,60	0,53	0,31	0,018	0,033	0,013	---	0,65	0,69	---	0,75
ZI	2,31 ± 0,26	0,69 ± 0,05	0,39 ± 0,21	1,05 ± 0,01	1,51 ± 0,29	0,84 ± 0,37	0,025 ± 0,023	0,032 ± 0,008	0,058 ± 0,043	1,37 ± 1,17	3,63 ± 0,61	0,69 ± 0,10	2,64 ± 0,70	0,44 ± 0,02
PO	4,16 ± 0,31	1,13 ± 0,29	0,79 ± 0,36	1,53 ± 0,34	1,25 ± 0,16	0,96 ± 0,28	0,028 ± 0,026	0,044 ± 0,023	0,068 ± 0,025	---	---	1,31 ± 0,18	---	0,26 ± 0,03
CN	s/d	0,45 ± 0,05	0,58 ± 0,23	s/d	0,71 ± 0,09	1,18 ± 0,44	s/d	0,045 ± 0,023	0,074 ± 0,009	s/d	---	1,06 ± 0,25	s/d	s/d
CA	1,67 ± 0,39	1,19 ± 0,18	1,15 ± 0,13	1,35 ± 0,01	1,23 ± 0,11	1,82 ± 0,12	0,023 ± 0,020	0,024 ± 0,011	0,066 ± 0,023	0,94 ± 0,19	1,26 ± 0,23	0,84 ± 0,17	0,94 ± 0,19	0,51 ± 0,03
PU	1,42 ± 0,33	1,20 ± 0,22	1,40 ± 0,21	1,13 ± 0,26	1,56 ± 0,39	2,61 ± 0,61	0,029 ± 0,026	0,057 ± 0,037	0,092 ± 0,012	4,80 ± 3,18	1,16 ± 0,21	1,26 ± 0,29	4,80 ± 3,18	0,55 ± 0,27

4.3.4 Índice de condición

El índice de condición de los mejillones provenientes de bahía Brown a tiempo cero no fue diferente entre los años de muestreo: $0,16 \pm 0,05$ en 2006, $0,20 \pm 0,03$ en 2007 y $0,14 \pm 0,03$ en 2008 expresados en g tejido seco/g valva seca.

El índice de condición de los sitios de bahía Ushuaia para los experimentos de invierno se presenta en la **Figura 39**. El ANOVA de II factores no reveló interacción entre sitios y tiempos de exposición para ninguno de los experimentos de invierno ($p > 0,05$). El único efecto significativo hallado fue el de los sitios en el experimento de 2007, donde el índice de condición de los mejillones transplantados a planta Orión resultó mayor al correspondiente a caleta Aspirante (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En 2006 y 2008 los resultados fueron menos variables en comparación con los de 2007, donde se observó mayor desvío en los resultados. El índice de condición de los mejillones transplantados no fue diferente del obtenido en bahía Brown en el tiempo cero.

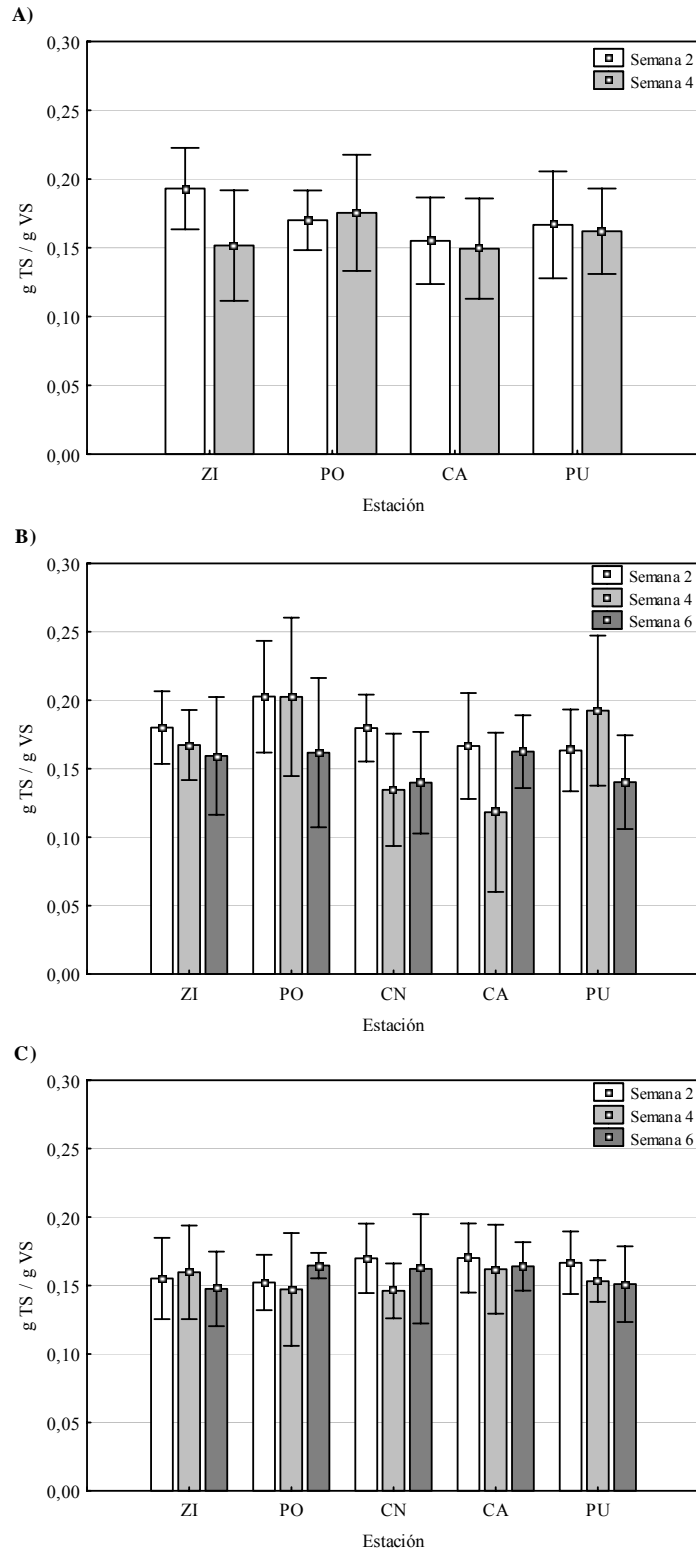


Figura 39. Valores de los índices de condición calculados para el mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

4.3.5 Biomarcadores

Los biomarcadores son considerados una respuesta medible a cualquier nivel de organización biológica que puede ser relacionada con niveles de contaminantes en el medio y el estado de salud ambiental. En este trabajo se midieron respuestas enzimáticas y un marcador de daño oxidativo como biomarcadores en mejillones, cuyos resultados se detallan en los párrafos siguientes.

4.3.5.1 Superóxido dismutasa

Recordemos que esta enzima cataliza la conversión del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). Es usualmente considerada un buen biomarcador de contaminación por su relativamente rápida respuesta a los estresantes ambientales.

La actividad de superóxido dismutasa en bahía Brown a tiempo cero en la branquia fue: $8,39 \pm 2,28$ U/mg prot. en 2007 y $4,03 \pm 0,95$ U/mg prot. en 2008. La actividad de esta enzima en la glándula digestiva en 2007 fue $2,17 \pm 0,61$ U/mg prot. y en 2008 fue $29,24 \pm 2,02$ U/mg prot. Es decir, fue unas tres veces más alta en la branquia que en la glándula digestiva en invierno de 2007 y siete veces mayor en la glándula digestiva que en la branquia en el 2008.

Branquia. Los resultados obtenidos de superóxido dismutasa en la branquia se presentan en la **Figura 40**. En invierno de 2007 (**Fig. 40A**), se halló un efecto significativo de los sitios y los tiempos de exposición sobre la actividad de esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$), pero la interacción de ambos factores no fue significativa (ANOVA II factores, $p > 0,05$). En los mejillones de club Náutico y península Ushuaia, se midió una actividad de superóxido dismutasa significativamente mayor que en los de zona industrial. En cuanto al efecto del tiempo, se halló una disminución significativa en las semana 4 con posteriores ascensos en la semana 6, pero alcanzando valores menores a los de la semana 2. Al comparar la actividad de superóxido dismutasa encontrada en todos los sitios de bahía Ushuaia con la inicial medida en bahía Brown, en zona industrial, caleta Aspirante y península Ushuaia se pudo observar un descenso en la semana 4; por el contrario, en península Ushuaia en la semana 2 la actividad duplicó la de bahía Brown.

En invierno de 2008 (**Fig. 40B**), el ANOVA de II factores evidenció que solo los sitios ejercieron un efecto significativo sobre la actividad de la superóxido dismutasa ($p < 0,05$). La actividad medida en los mejillones de club Náutico fue mayor a la medida en caleta

Aspirante, zona industrial y península Ushuaia; mientras que en planta Orión fue superior que en zona industrial y península Ushuaia. En términos generales, la actividad de superóxido dismutasa en la branquia en invierno de 2008 resultó más baja que la medida en invierno de 2007. Sólo en club Náutico en la semana 2 se midió una actividad bastante mayor a la encontrada en bahía Brown.

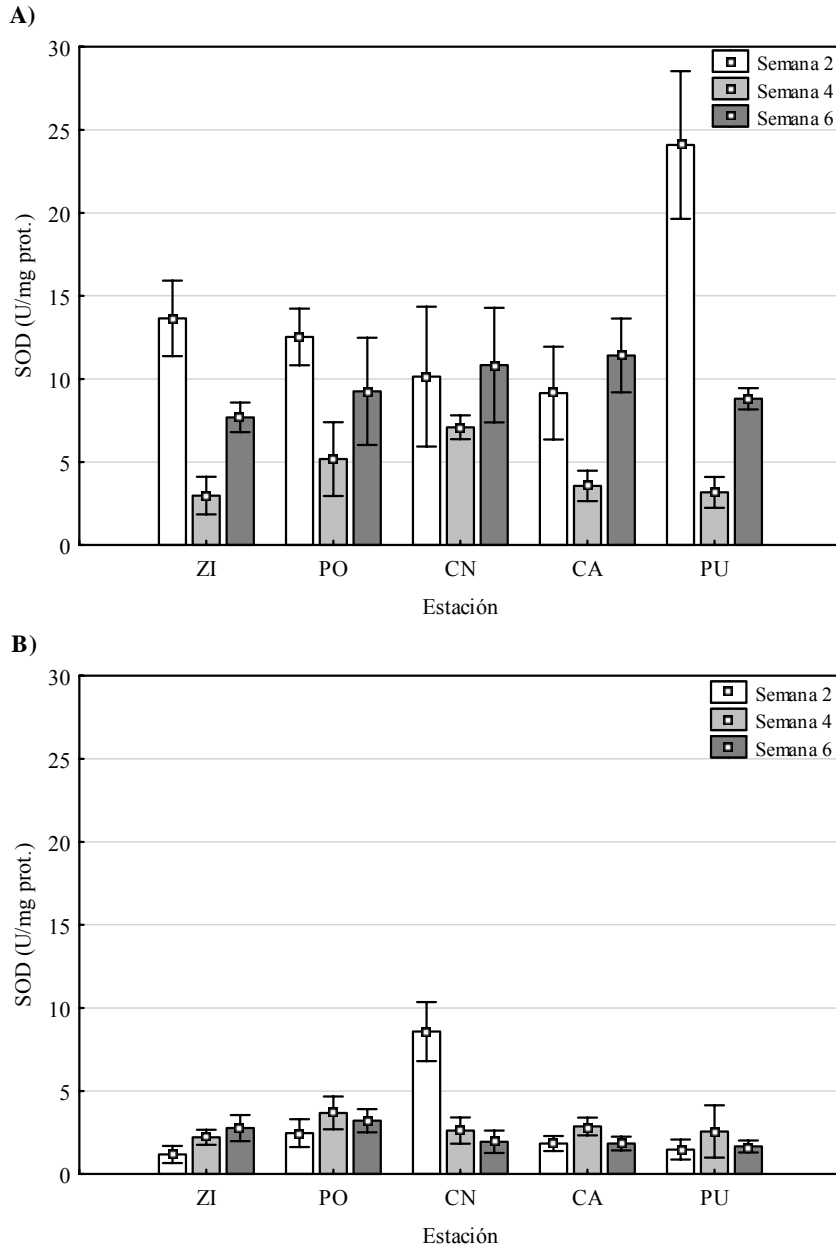


Figura 40. Actividad de superóxido dismutasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Invierno 2007 y **B)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva se presenta en la **Figura 41**. En invierno de 2007 (**Fig. 41A**), se encontró que la interacción entre tiempos de experimentación y sitios fue significativa para la actividad de esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al evaluar los efectos simples, se halló en los cinco sitios estudiados un efecto significativo del tiempo de exposición. Sólo en península Ushuaia y caleta Aspirante se observó el mismo tipo de respuesta, un descenso significativo en la semana 6 respecto de las semanas 2 y 4. En los demás sitios, las respuestas fueron disímiles. El efecto de los sitios resultó significativo en las semanas 2 y 4. En el primer caso, se encontró en zona industrial y club Náutico una actividad de la enzima superóxido dismutasa significativamente menor que en el resto de los sitios evaluados. En el segundo caso, la actividad de dicha enzima medida en los mejillones de zona industrial y planta Orión fue menor a la registrada en los organismos transplantados a península Ushuaia. A su vez, la actividad correspondiente a zona industrial fue menor que en caleta Aspirante. Excepto la actividad medida en zona industrial y club Náutico en la semana 2 y en planta Orión en la semana 4 que fueron semejantes a la registrada en el tiempo cero, los demás casos presentaron actividades mayores que la de bahía Brown.

En invierno de 2008 (**Fig. 41B**), se encontró que la actividad de superóxido dismutasa en glándula digestiva varió en función de los tiempos de experimentación y de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$), pero la interacción entre ambos factores no resultó significativa ($p > 0,05$). La actividad resultó significativamente mayor en la semana 6 respecto de las semanas 2 y 4 y, a su vez, la actividad en la semana 4 fue menor a la de la semana 2. En cuanto a los sitios, se encontró la menor actividad en zona industrial. En los mejillones de caleta Aspirante y planta Orión, la actividad fue mayor a la registrada en aquéllos provenientes de club Náutico y península Ushuaia. Las máximas actividades medidas en bahía Ushuaia correspondientes a caleta Aspirante y península Ushuaia en la semana 6 y a club Náutico en la semana 2 resultaron semejantes a la de bahía Brown, mientras que en los casos restantes se observó una disminución de la actividad enzimática.

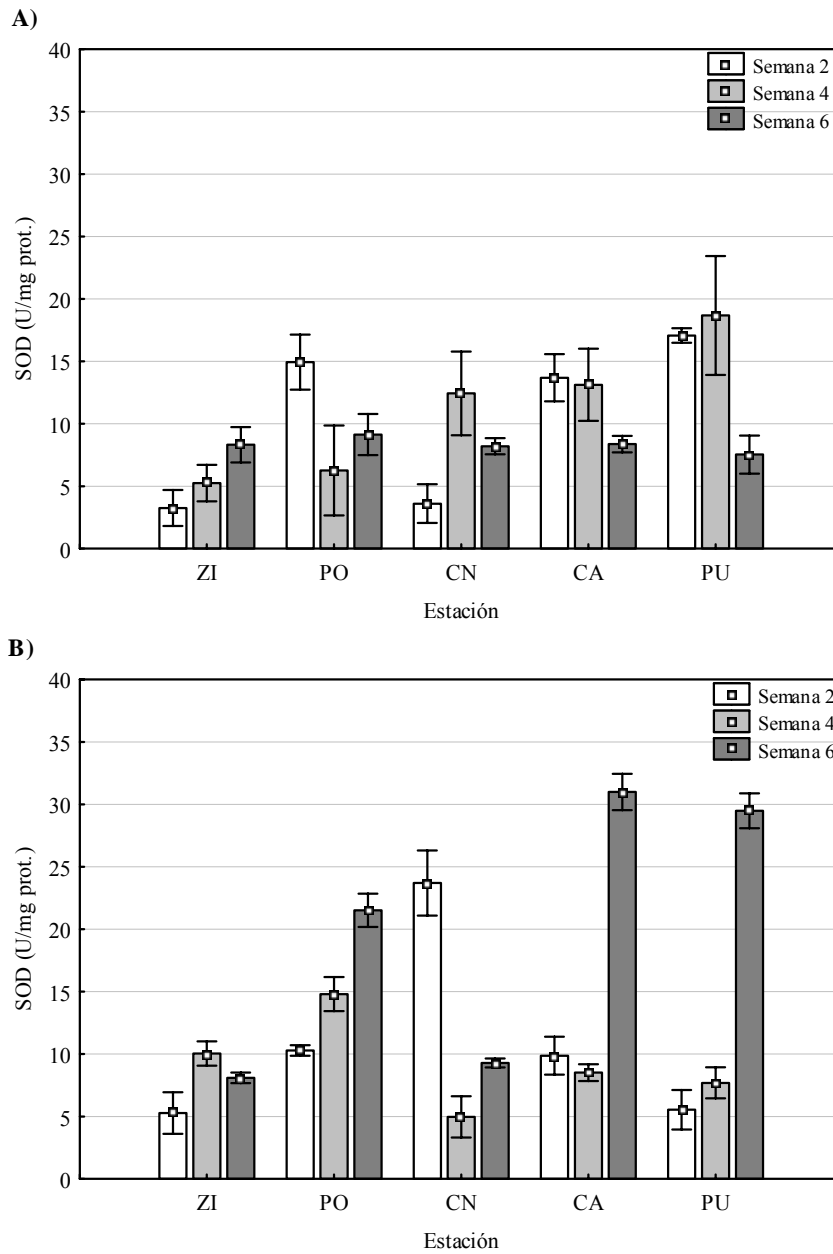


Figura 41. Actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Invierno 2007 y **B)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

4.3.5.2 Catalasa

Esta enzima cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2). Tiene una importante función protectora contra los efectos tóxicos de los peróxidos generados en los peroxisomas y los remueve con alta eficacia.

En la branquia, la actividad de catalasa en bahía Brown a tiempo cero en invierno fue: $4,12 \pm 0,75$ U/mg prot. en 2006, $4,81 \pm 0,88$ U/mg prot. en 2007 y $1,20 \pm 0,40$ U/mg prot. en 2008. En glándula digestiva, dicha actividad fue más alta en 2006 ($9,58 \pm 1,53$ U/mg prot) en comparación con el 2007 ($5,15 \pm 1,39$ U/mg prot) y el 2008 ($2,20 \pm 0,24$ U/mg prot).

Branquia. Las actividades de catalasa en la branquia en los sitios de bahía Ushuaia se observan en la **Figura 42**. En invierno de 2006 (**Fig. 42A**), el ANOVA de II mostró que solo el factor temporal ejerció un efecto significativo sobre la catalasa ($p < 0,05$), siendo la actividad mayor en la semana 4 con respecto a la 2. Las actividades medidas en todos los sitios de bahía Ushuaia resultaron de la misma magnitud que la obtenida en el tiempo cero.

En invierno de 2007 (**Fig. 42B**), el ANOVA de II factores reveló un efecto significativo de la interacción entre sitios y tiempos de exposición ($p < 0,05$). El efecto del tiempo fue igual en todos los sitios estudiados, encontrándose una disminución significativa en la actividad de catalasa en las semanas 4 y 6. Los sitios influenciaron la actividad de dicha enzima en las semanas 2 y 6. En el primer caso, se encontró una disminución significativa en club Náutico y planta Orión respecto a zona industrial y península Ushuaia. En el segundo caso, se halló que la actividad de catalasa en los mejillones de planta Orión fue significativamente menor que la medida en península Ushuaia, club Náutico y caleta Aspirante. Al comparar la actividad medida en los mejillones transplantados a bahía Ushuaia con la del tiempo cero, se observó un incremento de la actividad en todos los sitios en la semana 2 y un descenso en las semanas 4 y 6 respecto de bahía Brown.

En invierno de 2008 (**Fig. 42C**), el ANOVA de II factores evidenció un efecto significativo de los tiempos de experimentación y de los sitios sobre la actividad de catalasa ($p < 0,05$), no encontrándose interacción entre los factores. Se encontró una disminución progresiva en la actividad de la catalasa al incrementarse el tiempo de exposición. Por otro lado, la actividad en club Náutico fue significativamente mayor que en península Ushuaia y caleta Aspirante. En zona industrial, planta Orión y club Náutico en la semana 2 y en club Náutico y caleta Aspirante en la semana 4, la actividad aumentó respecto de bahía Brown en el tiempo cero.

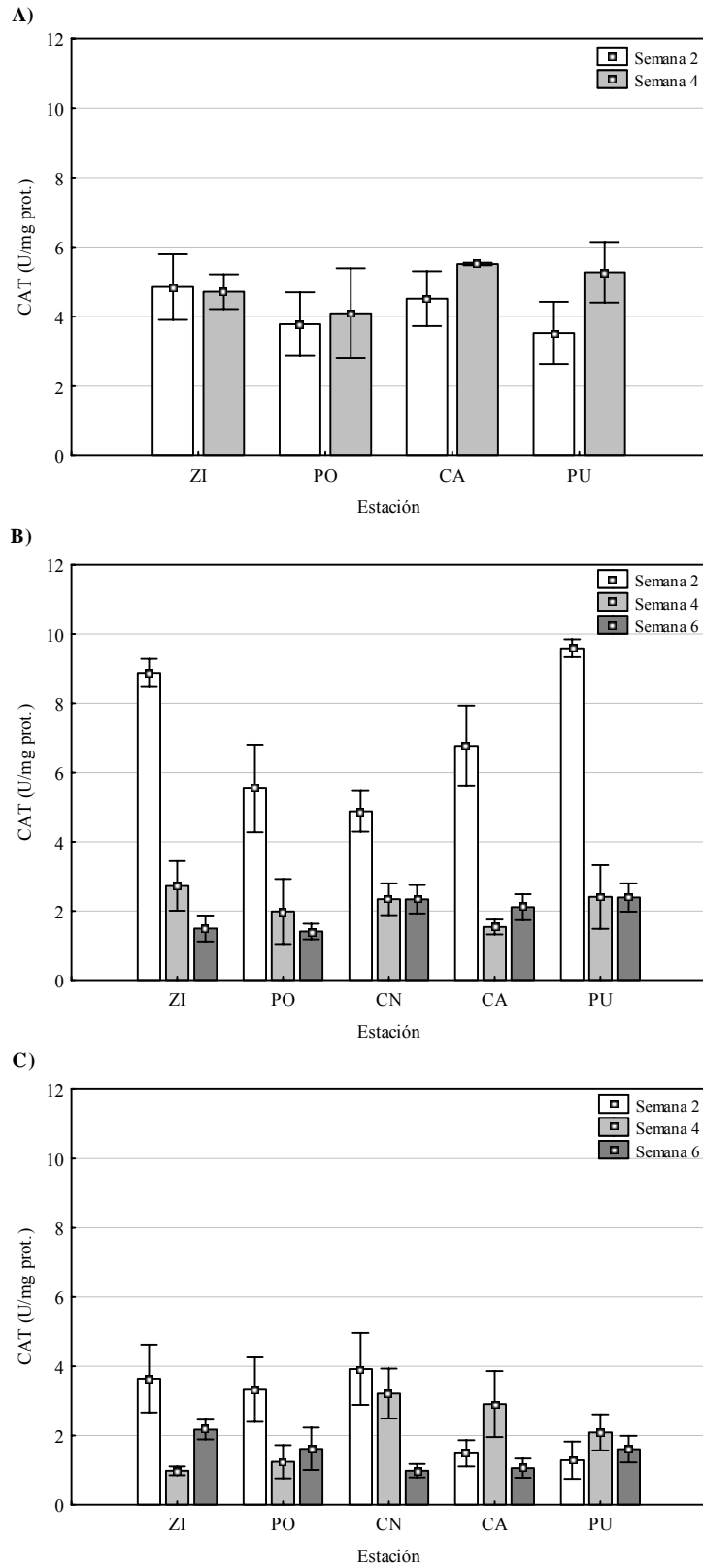


Figura 42. Actividad de catalasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La **Figura 43** muestra la actividad de catalasa en la glándula digestiva en los sitios de bahía Ushuaia. En invierno de 2006 (**Fig. 43A**), la actividad resultó dependiente de los tiempos de exposición y de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$), no encontrándose interacción entre dichos factores ($p > 0,05$). Al igual que en la branquia, la actividad de catalasa en la semana 4 se incrementó en relación a la semana 2. En relación a los sitios, se encontró en zona industrial una actividad significativamente menor que en planta Orión. La actividad registrada en todos los sitios de bahía Ushuaia en ambas semanas de exposición resultó mayor a la correspondiente al tiempo cero.

En invierno de 2007 (**Fig. 43B**) la actividad de catalasa en la glándula digestiva fue dependiente del tiempo de exposición así como de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Se encontró una disminución significativa y progresiva al incrementarse el tiempo de exposición. Con respecto a los sitios, se halló en península Ushuaia mayor actividad que en caleta Aspirante y zona industrial. En todos los sitios en la semana 2 así como en planta Orión en la semana 4, la actividad de catalasa aumentó respecto de la situación inicial medida en bahía Brown.

En invierno de 2008 (**Fig. 43C**), también se halló una dependencia de la actividad de la catalasa con los tiempos de experimentación y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En concordancia con los resultados encontrados en 2007, se encontró una disminución significativa en esta enzima en las semanas 4 y 6 de exposición. En cuanto al efecto de los sitios, la actividad en planta Orión fue significativamente menor que en península Ushuaia y club Náutico. Actividades superiores a la correspondiente al tiempo cero fueron las medidas en zona industrial y planta Orión en la semana 2, en caleta Aspirante y península Ushuaia en las semanas 4 y 6, y en club Náutico en las semanas 2 y 4.

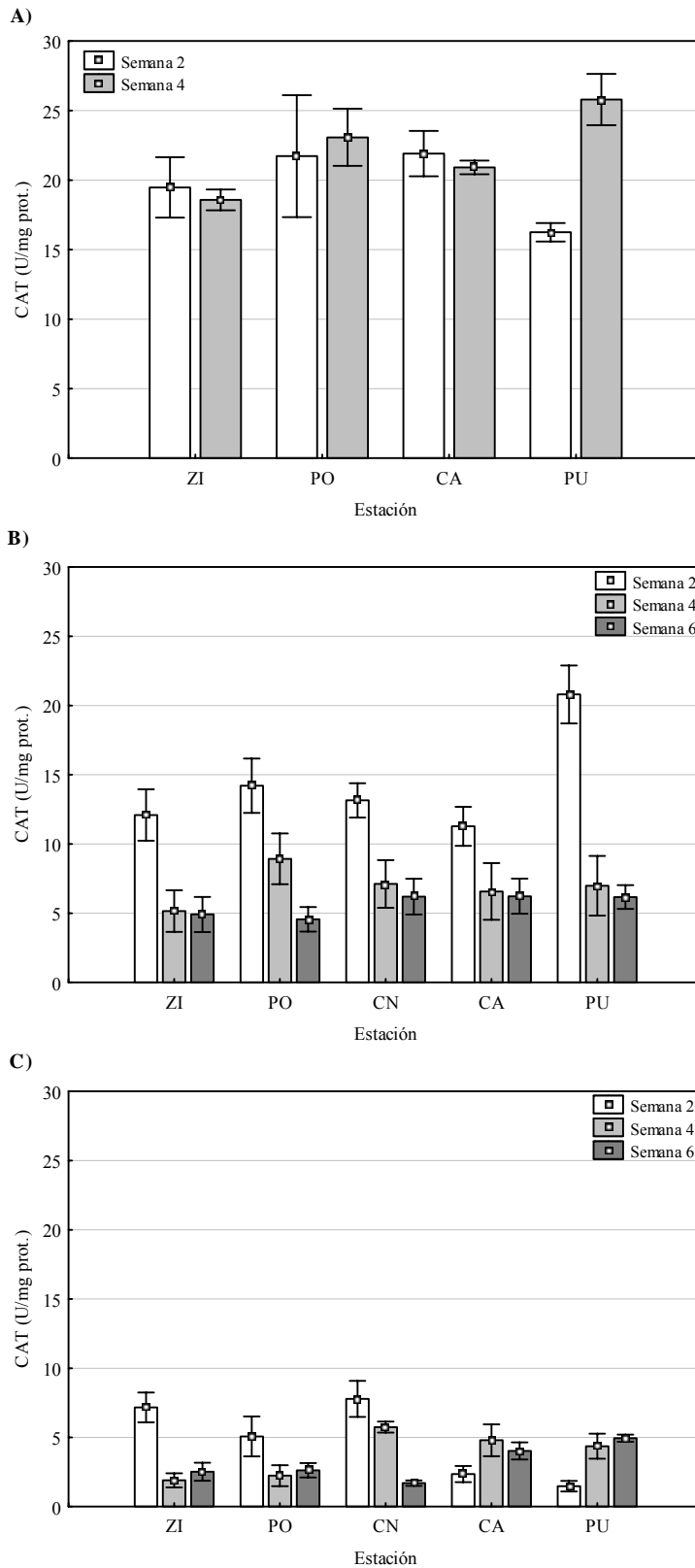


Figura 43. Actividad de catalasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 semanas en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

4.3.5.3 *Glutación-S-transferasa*

Esta enzima actúa en la conjugación de compuestos hidrofóbicos con el glutatión (GSH) disminuyendo la toxicidad de esos compuestos y aumentando su solubilidad a través de la membrana para facilitar su expulsión de la célula.

La actividad invernal de glutatión-S-transferasa en bahía Brown, a tiempo cero, en la branquia fue: $0,25 \pm 0,04$ U/mg prot. en 2007 y $0,09 \pm 0,01$ U/mg prot. en 2008. La actividad de esta enzima en la glándula digestiva en 2007 fue $0,12 \pm 0,03$ U/mg prot. y en 2008 fue $0,08 \pm 0,02$ U/mg prot. Es decir, la actividad fue más alta en la branquia en invierno de 2007, mientras que en 2008 no se observaron diferencias entre órganos.

Branquia. La **Figura 44** muestra la actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia correspondiente a los experimentos invernales. La actividad de esta enzima en 2007 (**Fig. 44A**), se vio afectada por la interacción de los tiempos de experimentación y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En concordancia con los resultados hallados para catalasa, se encontró en los cinco sitios monitoreados una disminución significativa de la actividad en las semanas 4 y 6 de exposición. Efecto de los sitios se halló únicamente en la semana 2, siendo la actividad medida en los mejillones de caleta Aspirante significativamente menor que en aquéllos provenientes de zona industrial, club Náutico y península Ushuaia. Al comparar la actividad de los sitios de bahía Ushuaia con la de bahía Brown, puede observarse un gran incremento en la semana 2 en zona industrial, club Náutico y península Ushuaia, así como una notable disminución en todos los sitios en las semanas 4 y 6.

En la **Figura 44B** se observa la actividad de glutatión-S-transferasa en invierno de 2008. Solamente el tiempo de experimentación tuvo un efecto significativo en la actividad de esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al igual que en el experimento de 2007, se observó una disminución de la actividad enzimática en las semanas 4 y 6, siendo en este caso un descenso progresivo con el aumento del período de exposición. La actividad medida en zona industrial y península Ushuaia en la semana 6, en planta Orión en las semanas 2 y 4, en club Náutico y caleta Aspirante en las semanas 4 y 6 resultaron menores que la correspondiente a bahía Brown en tiempo cero, mientras que el resto de los casos de bahía Ushuaia no fueron diferentes de la condición inicial.

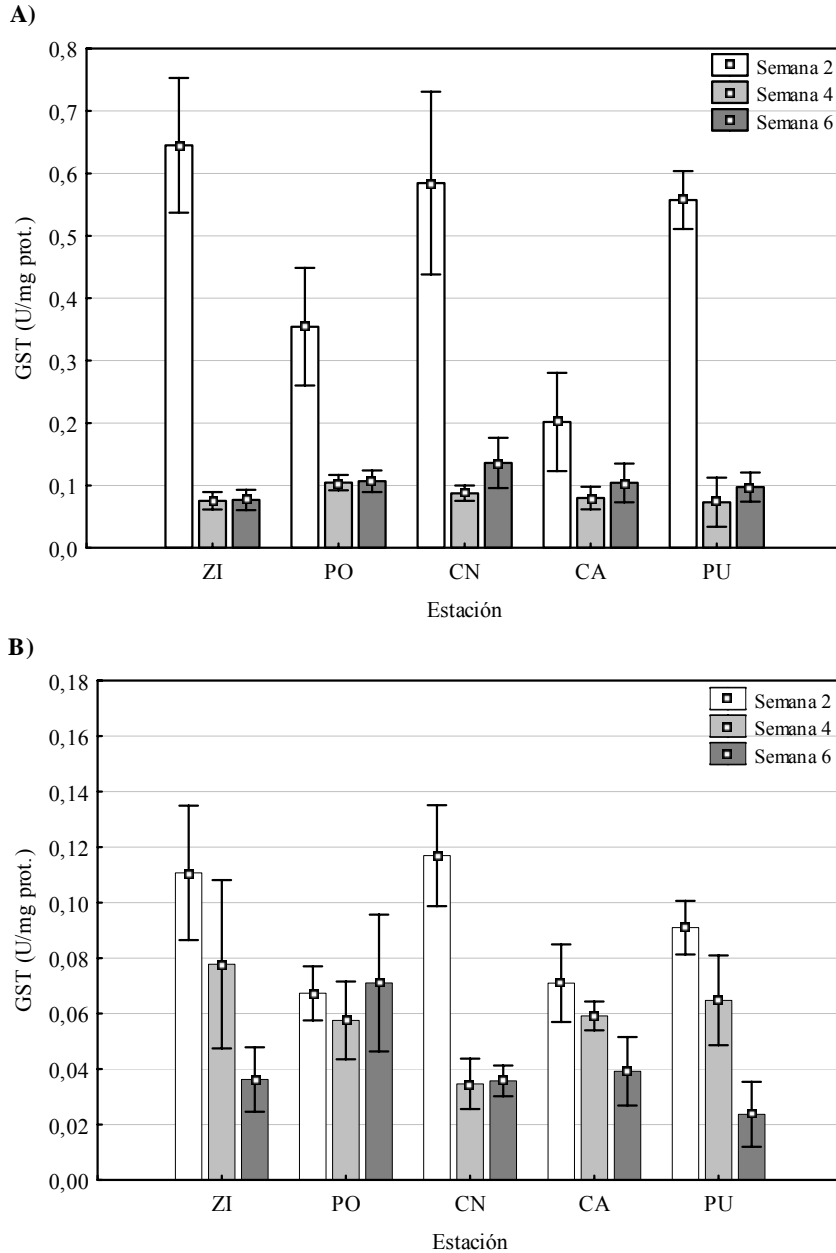


Figura 44. Actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Invierno 2007 y **B)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. Los resultados de actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva se muestran en la **Figura 45**. En invierno de 2007 (**Fig. 45A**), la respuesta fue muy homogénea entre los sitios. El ANOVA de II factores evidenció un efecto significativo de los tiempos de experimentación y de los sitios en la actividad de esta enzima ($p < 0,05$). Al igual que en la branquia, se encontró un descenso significativo de la actividad

enzimática en las semanas 4 y 6 de experimentación. La actividad de glutatión-S-transferasa en caleta Aspirante resultó significativamente menor que en club Náutico, península Ushuaia y planta Orión. Puede observarse que las actividades registradas en bahía Ushuaia variaron respecto de la medida en bahía Brown. En zona industrial, planta Orión y caleta Aspirante, en las semanas 4 y 6, y en península Ushuaia, en la semana 4, la actividad disminuyó respecto del tiempo cero. Por el contrario, en planta Orión y península Ushuaia, la actividad se incrementó en la semana 2.

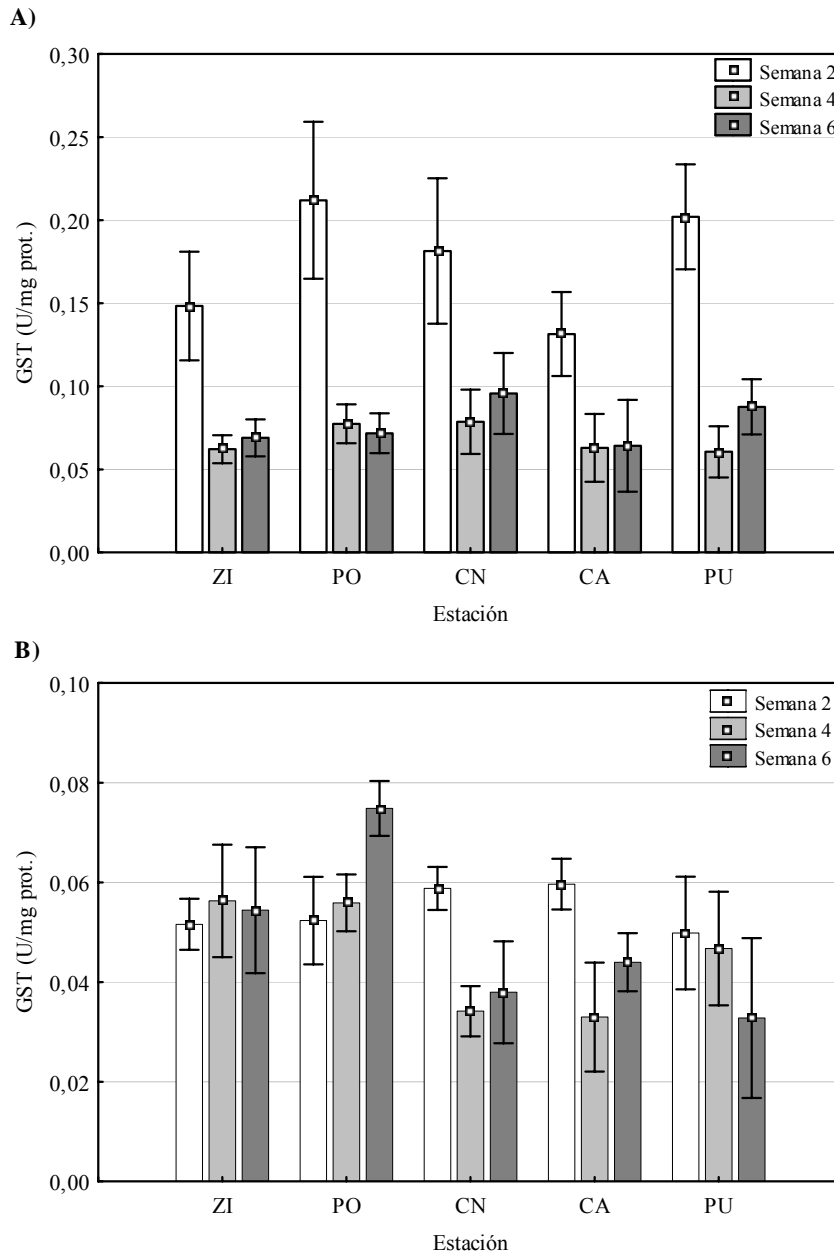


Figura 45. Actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Invierno 2007 y **B)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En invierno de 2008 (**Fig. 45B**), el tiempo de exposición como los sitios influyeron en la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (ANOVA II factores, $p < 0,05$), pero no su interacción ($p > 0,05$). En cuanto al efecto temporal, se halló una disminución significativa en la semana 4 respecto de la 2. Con respecto al efecto espacial, las actividades medidas en los mejillones de península Ushuaia y club Náutico resultaron menores a las registradas en los organismos transplantados a zona industrial y planta Orión. En comparación con la actividad medida en bahía Brown al inicio del experimento, en club Náutico y caleta Aspirante en las semanas 4 y 6 y en península Ushuaia en la semana 6 la actividad decayó. En ninguno de los experimentos se observó actividad diferencial de la glutatión-S-transferasa según los órganos analizados en este estudio.

4.3.5.4 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos es la oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados, considerada una consecuencia del estrés oxidativo. El proceso incluye una reacción en cadena que demuestra la habilidad de ciertas especies radicales para propagar reacciones bioquímicas potencialmente deletéreas y puede medirse indirectamente a través del producto secundario malondialdehído (MDA).

Los niveles de peroxidación lipídica en la branquia en bahía Brown a tiempo cero en los experimentos de invierno fue de $5,10 \pm 0,50$ $\mu\text{mol/mg prot.}$ en 2006, $5,22 \pm 0,98$ $\mu\text{mol/mg prot.}$ en 2007 y $4,95 \pm 0,83$ $\mu\text{mol/mg prot.}$ en 2008. En la glándula digestiva fue $4,30 \pm 1,22$ $\mu\text{mol/mg prot.}$ en 2006, $1,79 \pm 0,85$ $\mu\text{mol/mg prot.}$ en 2007 y $4,76 \pm 0,96$ $\mu\text{mol/mg prot.}$ en 2008. Los resultados correspondientes a la branquia fueron bastante parecidos en los tres inviernos sucesivos, mientras que en la glándula digestiva la peroxidación fue menor en 2007 con respecto a 2006 y 2008. Sólo en el muestreo de 2007 se observó una respuesta diferencial según el órgano analizado, resultando la peroxidación de lípidos mayor en la branquia.

Branquia. La peroxidación de lípidos en la branquia de los mejillones transplantados a la bahía Ushuaia se muestra en la **Figura 46**. Mediante ANOVA de II factores se encontró efecto significativo de los tiempos de exposición y de los sitios en este parámetro en el experimento de 2006 (**Fig. 46A**), no siendo significativa su interacción. En cuanto al tiempo de exposición, se halló un incremento en la semana 4. La peroxidación lipídica medida en los mejillones de caleta Aspirante resultó menor a la registrada en los organismos transplantados a península Ushuaia y zona industrial. Cuando se compararon los niveles de malondialdehído de los sitios de bahía Ushuaia con el de bahía Brown, se observó que en zona industrial y

península Ushuaia en las semanas 2 y 4 y en planta Orión y caleta Aspirante en la semana 4 el nivel se incrementó.

En el experimento de invierno de 2007 (**Fig. 46B**), la interacción entre los tiempos de exposición y los sitios resultó significativa sobre los niveles de peroxidación lipídica (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En los cinco sitios estudiados se halló un efecto significativo del tiempo. En los mejillones de club Náutico se encontró una disminución en la semana 4 respecto de las semanas 2 y 6. En los cuatro sitios restantes se registró un descenso significativo de los niveles de peroxidación lipídica en las semanas 4 y 6, con respecto a la semana 2. Efecto de los sitios se encontró en las semanas 4 y 6 de experimentación. En el primer caso, los niveles de malondialdehído en club Náutico resultaron mayores a los de zona industrial. En el segundo caso, la peroxidación de lípidos en club Náutico fue significativamente superior que en los demás lugares. En zona industrial, planta Orión y club Náutico en la semana 2 se observó un aumento de la peroxidación lipídica respecto del tiempo cero, mientras que en el resto de los casos exceptuando club Náutico en la semana 6 se registró un descenso.

En la **Figura 46C** se presentan los niveles de malondialdehído medidos en la branquia en invierno de 2008. El resultado del ANOVA de II factores indicó un efecto significativo de los tiempos de experimentación y de los sitios sobre este parámetro ($p < 0,05$). En cuanto al primer factor, se registró un incremento significativo en los niveles de peroxidación en la semana 4 y un posterior descenso en la semana 6, hasta niveles inferiores a los de la semana 2. Respecto al factor espacial, caleta Aspirante y península Ushuaia registraron niveles de peroxidación lipídica significativamente mayores que zona industrial, planta Orión y club Náutico. La peroxidación lipídica medida en zona industrial, planta Orión y club Náutico en las tres semanas de exposición resultó menor a la registrada en bahía Brown al inicio del experimento.

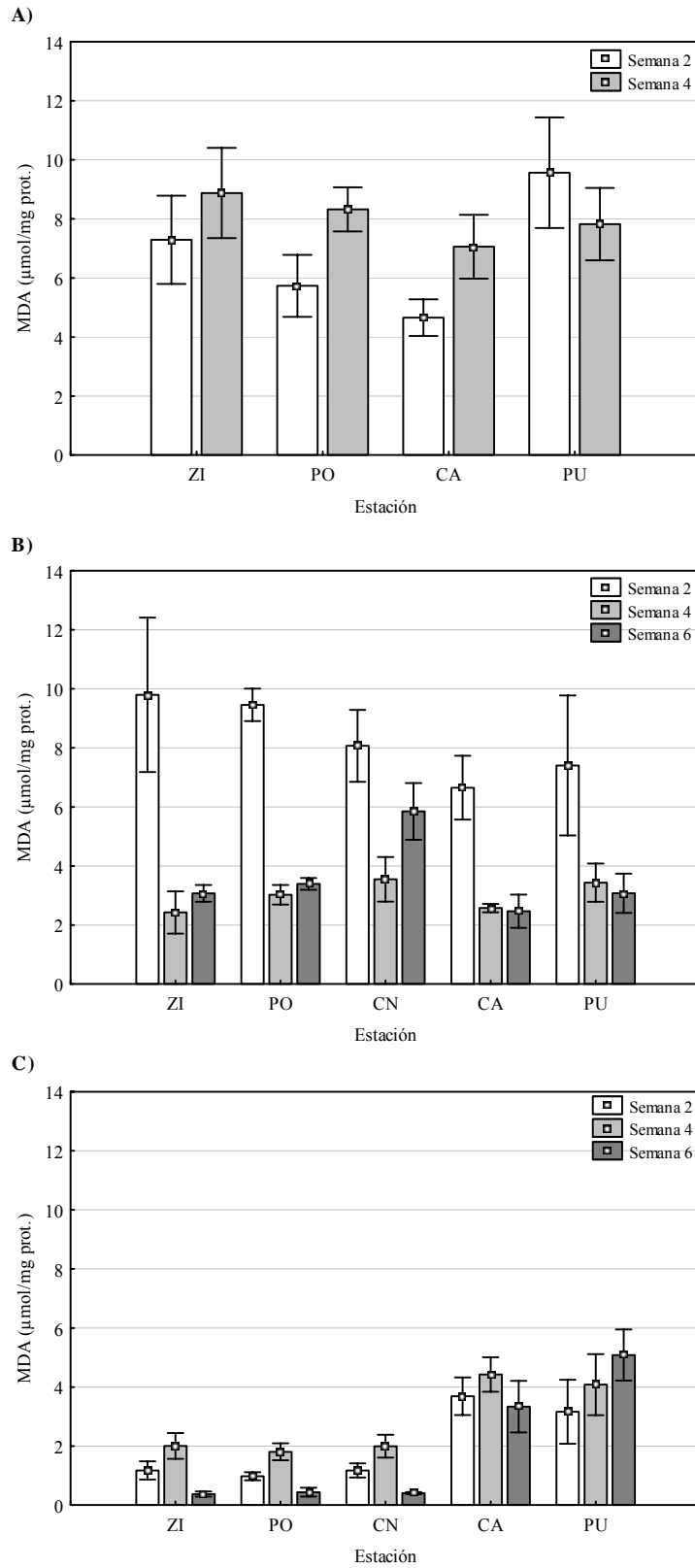


Figura 46. Niveles de malondialdehído en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media ± DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La peroxidación lipídica en la glándula digestiva se muestra en la **Figura 47**. En invierno de 2006 (**Fig. 47A**), el factor espacial que el único que afectó significativamente este parámetro (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Se hallaron en caleta Aspirante niveles de peroxidación de lípidos significativamente inferiores a los tres sitios restantes. Cuando se compara la peroxidación lipídica medida en los sitios de bahía Ushuaia con la de bahía Brown, puede observarse un incremento en zona industrial, en la semana 2, y en planta Orión y península Ushuaia, en las semanas 2 y 4.

En el experimento de invierno de 2007 (**Fig. 47B**), al igual que en la branquia, se encontró interacción significativa entre tiempos de exposición y sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al estudiar los efectos simples, en las tres semanas de exposición se observó un efecto espacial, siendo los resultados heterogéneos. En cuanto al efecto temporal, los mejillones de zona industrial y caleta Aspirante fueron los únicos que no se vieron afectados por este factor. Al igual que con el primer factor, los resultados fueron diferentes en cada uno de los casos. Sólo en club Náutico en la semana 4 y en península Ushuaia en la semana 6 los niveles de malondialdehído fueron semejantes a los encontrados en bahía Brown, mientras que en el resto de los casos de bahía Ushuaia los niveles se incrementaron.

En invierno de 2008 (**Fig. 47C**), el ANOVA de II factores reveló un efecto significativo de los tiempos de experimentación y los sitios sobre la peroxidación de lípidos ($p < 0,05$), pero no la interacción de dichos factores. Al igual que en la branquia, se registró un incremento significativo en los niveles de peroxidación en la semana 4. Con respecto al efecto espacial, se hallaron en caleta aspirante los mayores niveles malondialdehído, seguido por los registrados en península Ushuaia; ambos casos fueron significativamente superiores a los correspondientes a zona industrial, planta Orión y club Náutico. En concordancia con lo hallado en la branquia, se encontró una disminución del malondialdehído en zona industrial, planta Orión y club Náutico en los tres tiempos de exposición con respecto al tiempo cero medido en bahía Brown.

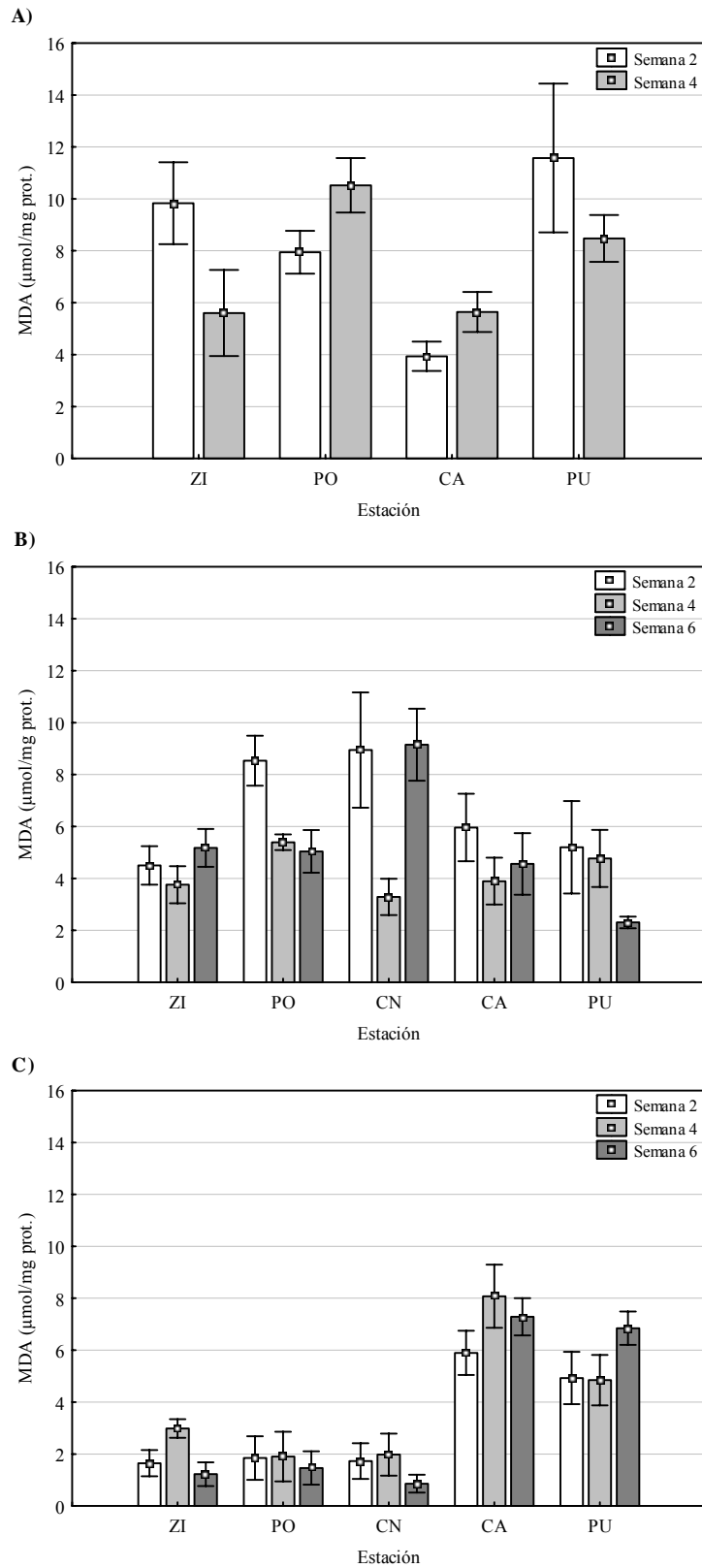


Figura 47. Niveles de malondialdehído en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2 y 4 en **A)** Invierno 2006 y por 2, 4 y 6 semanas en **B)** Invierno 2007 y **C)** Invierno 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

4.4 Relación entre parámetros físicos, químicos y biológicos

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con los datos de los inviernos de 2007 y 2008. No se incluyeron los datos correspondientes al invierno de 2006 debido a que no se cuenta con la totalidad de los parámetros. El ACP reveló que los cuatro primeros componentes principales (CP) explican el 63,91 % de la varianza total. El aporte de las variables originales en cada componente se presenta en la **Tabla 17**. El CP1 estuvo representado por los biomarcadores con signo positivo; mientras que la ceniza, el Cu, Zn y Fe en la branquia y la glándula digestiva con signo negativo. El CP2 mostró el aporte de los nutrientes y la materia orgánica particulada, ambos con signo negativo. La salinidad y el Cd

Tabla 17. Análisis de componentes principales llevado a cabo con los datos correspondientes a los inviernos de 2007 y 2008. Aporte de las variables originales a los cuatro primeros componentes. Branquia (B), Glándula digestiva (GD)

VARIABLES	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
CAT B	0,74	-0,05	-0,44	-0,04
CAT GD	0,84	-0,10	-0,31	-0,07
GST B	0,81	-0,25	-0,37	-0,13
GST GD	0,87	-0,12	-0,27	-0,16
SOD B	0,78	-0,03	-0,14	-0,29
SOD GD	-0,20	0,24	-0,34	-0,02
LPO B	0,82	-0,08	-0,22	-0,31
LPO GD	0,50	-0,16	0,03	-0,36
LIP M	0,21	0,13	-0,03	0,00
LIP GD	0,64	-0,23	-0,11	-0,06
Índice Condición	0,37	0,02	-0,32	0,03
Ceniza	-0,71	0,07	-0,46	0,05
Cu B	-0,61	-0,40	-0,23	-0,44
Zn B	-0,53	0,03	0,06	-0,46
Fe B	-0,60	-0,51	-0,10	-0,12
Cd B	0,36	0,27	-0,03	0,37
Cu GD	-0,75	-0,38	-0,26	-0,31
Zn GD	-0,63	-0,20	0,04	-0,37
Fe GD	-0,78	-0,22	-0,22	-0,43
Cd GD	-0,33	0,06	-0,60	0,34
Nitrito	0,16	-0,95	0,03	0,13
Nitrato	-0,19	-0,72	-0,13	0,16
Fosfato	0,29	-0,88	0,08	0,06
Silicato	0,24	-0,92	-0,06	0,12
Amonio	0,40	-0,76	0,04	0,02
Clorofila	0,10	0,10	0,64	-0,31
MOP	0,02	-0,72	0,37	0,10
pH	0,57	0,39	0,35	-0,29
Temperatura	-0,19	0,14	-0,45	-0,38
Oxígeno disuelto	0,54	0,49	-0,22	-0,31
Salinidad	-0,32	0,16	-0,65	0,31
Eigenvalue	9,27	5,58	2,92	2,05
% Varianza total	29,89	17,99	9,42	6,61

en la glándula digestiva (con signo negativo) y la clorofila (con signo positivo) explicaron el CP3. El CP4 estuvo representado por el Cu y el Zn en la branquia y el Fe en la glándula digestiva, todos con signo negativo.

La ubicación de los sitios según el ACP se muestra en la **Figura 48**. Se pudo observar un desplazamiento de todos los sitios correspondientes a la semana 2 del experimento de 2007 sobre el lado positivo del eje 1, lo que indica que tuvieron mayores actividades de los biomarcadores y menores concentraciones de metales pesados. En los experimentos de 2007 y 2008 se observó un desplazamiento de club Náutico (CN2, CN4, CN6) sobre la parte negativa del eje 2. En este caso se asocia a las mayores concentraciones de nutrientes y de materia orgánica particulada que recibe club Náutico desde el pluvial y la bahía Encerrada. El posicionamiento de los sitios según los ejes 3 y 4 mostraron poca variabilidad. Dos sitios correspondientes al experimento de 2007 se separaron según el eje 3: club Náutico en las semanas 4 y 6 (en la parte positiva) presentó mayores concentraciones de clorofila y menores salinidades, mientras que península Ushuaia en la semana 2 (sobre la parte negativa) fue el sitio donde los mejillones acumularon mayor cantidad de Cd en la glándula digestiva.

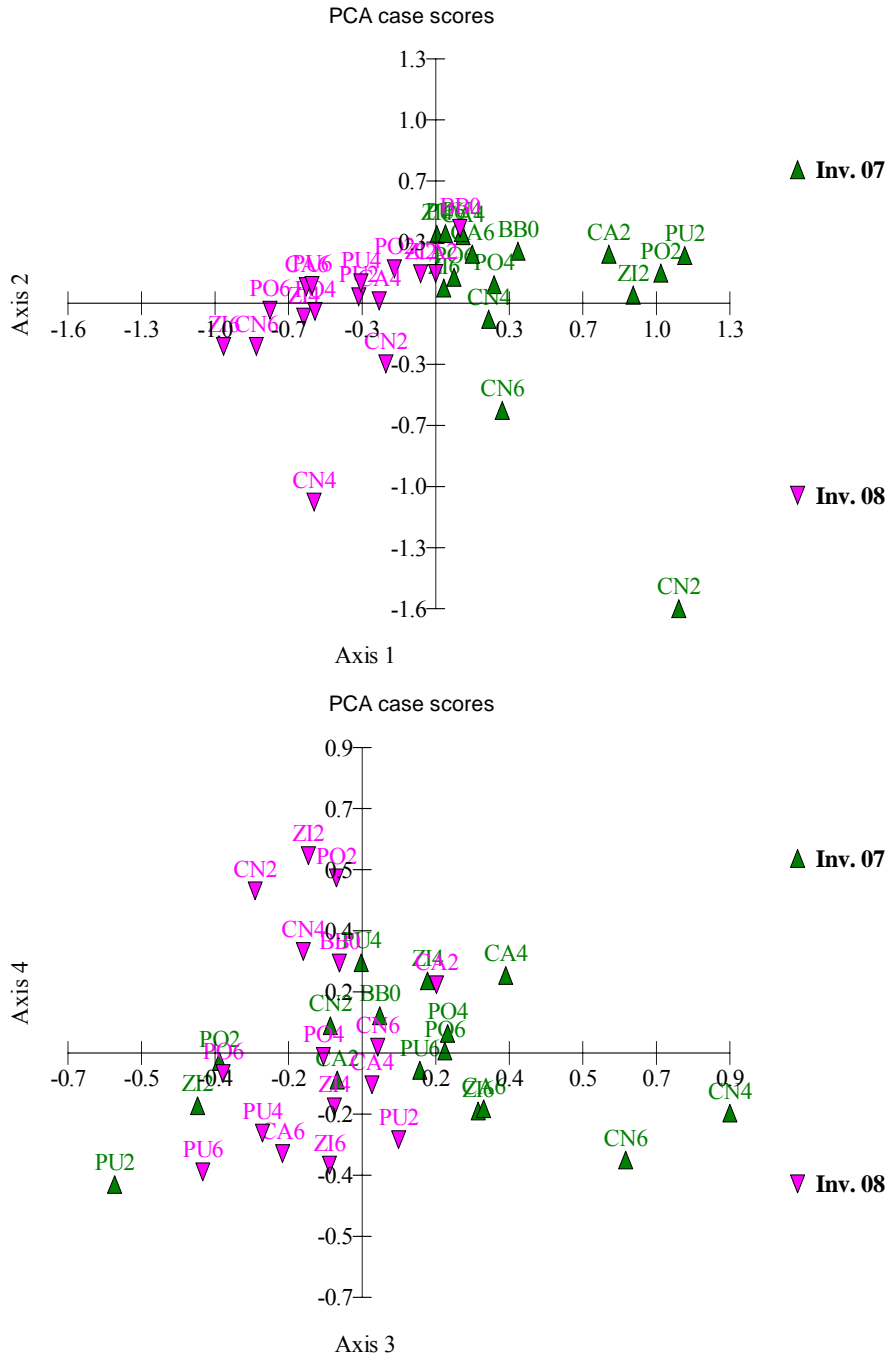


Figura 48. Ubicación de los sitios de muestreo según el análisis de componentes principales.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson con el fin de explorar asociaciones entre las variables ambientales y los parámetros físicos y químicos con una base estadística. Los resultados se presentan en la **Tabla 18**. Se hallaron numerosas correlaciones que evidencian la complejidad del sistema en estudio, siendo de interés en el presente trabajo las que se encuentran dentro del recuadro. Con la única excepción de la enzima superóxido

dismutasa en la glándula digestiva, se hallaron correlaciones positivas altamente significativas ($p < 0,01$) entre los biomarcadores enzimáticos entre sí y con la peroxidación lipídica en la branquia y los lípidos totales en la glándula digestiva. Además se hallaron las siguientes correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre:

- Las actividades enzimáticas y la peroxidación lipídica con el oxígeno disuelto.
- Las actividades de catalasa y glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva evidenciaron correlación negativa con la concentración de Cu, Zn y Fe en dicho órgano y con el contenido de Zn en branquia.
- La actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva sólo evidenció correlación positiva con la concentración de Cd en ese órgano.
- La peroxidación lipídica presentó correlación negativa con el contenido de Cu y Fe en la branquia.
- La actividad de glutatión-S-transferasa y la peroxidación de lípidos, en ambos órganos, mostraron correlación positiva con la concentración de amonio.
- Las actividades de catalasa y glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva, superóxido dismutasa en la branquia y la peroxidación lipídica en ambos órganos correlacionaron positivamente con el pH.
- Por último, se halló que el contenido de ceniza correlacionó positivamente con los metales.

Tabla 18. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables físicas, químicas y biológicas.

	CAT B	CAT GD	GST B	GST GD	SOD B	SOD GD	LPO B	LPO GD	LIP M	LIP GD	IC	Cenizas	Cu B	Zn B	Fe B	Cd B	Cu GD	Zn GD	Fe GD	Cd GD	Nitratos	Fosfatos	Silicatos	Amonio	Clorofila	MOP	pH	Temp.	OD	Salin.							
CAT B	1,00																																				
CAT GD	0.86	1,00																																			
GST B	0.85	0.81	1,00																																		
GST GD	0.78	0.84	0.88	1,00																																	
SOD B	0.75	0.82	0.77	0.82	1,00																																
SOD GD	-0.18	-0.06	-0.22	-0.11	-0.09	1,00																															
LPO B	0.68	0.69	0.79	0.80	0.64	0.64	1,00																														
LPO GD	0.15	0.37	0.33	0.39	0.28	0.13	0.70	1,00																													
LIP M	0.08	0.13	0.05	0.23	0.29	0.11	0.08	0.07	1,00																												
LIP GD	0.52	0.61	0.60	0.65	0.49	-0.08	0.61	0.41	0.04	1,00																											
IC	0.36	0.34	0.41	0.42	0.22	-0.16	0.36	0.22	0.02	0.24	1,00																										
Cenizas	-0.38	-0.43	-0.46	-0.51	-0.50	0.33	-0.50	-0.30	-0.19	-0.39	-0.15	1,00																									
Cu B	-0.25	-0.29	-0.22	-0.30	-0.22	0.03	-0.36	-0.24	-0.17	-0.13	-0.10	0.43	1,00																								
Zn B	-0.55	-0.47	-0.40	-0.41	-0.29	0.23	-0.32	0.05	-0.11	-0.19	-0.28	0.37	0.51	1,00																							
Fe B	-0.33	-0.42	-0.24	-0.36	-0.28	0.06	-0.42	-0.24	-0.16	-0.19	-0.30	0.45	0.62	0.51	1,00																						
Cd B	0.11	0.19	0.18	0.24	0.10	0.02	0.20	0.21	0.14	0.44	0.21	-0.13	-0.45	0.06	-0.22	1,00																					
Cu GD	-0.37	-0.48	-0.37	-0.44	-0.45	0.10	-0.42	-0.24	-0.16	-0.22	-0.17	0.59	0.86	0.39	0.65	-0.50	1,00																				
Zn GD	-0.42	-0.51	-0.39	-0.47	-0.51	-0.01	-0.43	-0.21	-0.17	-0.47	-0.19	0.63	0.78	0.60	0.71	-0.45	0.85	1,00																			
Fe GD	-0.42	-0.55	-0.43	-0.51	-0.42	0.12	-0.43	-0.21	-0.17	-0.47	-0.19	0.63	0.78	0.60	0.71	-0.45	0.85	0.66	1,00																		
Cd GD	0.07	-0.11	-0.08	-0.22	-0.23	0.36	-0.19	-0.32	-0.20	-0.14	-0.04	0.48	0.21	0.09	0.31	0.22	0.21	-0.03	0.26	1,00																	
Nitratos	0.08	0.18	0.30	0.19	0.07	-0.21	0.17	0.25	-0.05	0.30	-0.02	0.17	0.18	-0.08	0.35	-0.12	0.16	-0.01	0.01	-0.11	1,00																
Fosfatos	-0.01	-0.02	-0.03	-0.13	-0.16	-0.12	-0.09	-0.06	0.06	0.02	-0.15	0.10	0.35	-0.17	0.28	-0.36	0.44	0.27	0.21	0.11	0.68	1,00															
Silicatos	0.13	0.26	0.40	0.31	0.17	-0.22	0.28	0.38	-0.05	0.24	0.03	-0.27	0.05	-0.16	0.27	-0.11	0.01	-0.08	-0.06	-0.19	0.93	0.50	1,00														
Amonio	0.16	0.31	0.50	0.41	0.21	-0.23	0.36	0.42	-0.08	0.33	0.12	-0.33	-0.03	-0.08	0.18	0.05	-0.09	-0.16	-0.15	-0.23	0.85	0.72	0.92	1,00													
Clorofila	-0.02	-0.08	-0.06	0.02	0.15	-0.20	0.05	-0.02	-0.19	0.00	-0.17	-0.41	-0.09	0.08	-0.14	-0.06	-0.18	0.11	-0.09	-0.32	-0.12	-0.20	-0.10	-0.15	-0.08	1,00											
MOP	-0.03	0.04	0.03	-0.06	0.04	-0.29	-0.08	0.04	-0.08	0.16	-0.06	-0.19	0.17	-0.07	0.38	-0.12	0.08	0.08	0.01	-0.12	0.67	0.49	0.62	0.61	0.44	0.20	1,00										
pH	0.19	0.38	0.25	0.35	0.51	-0.22	0.39	0.37	0.26	0.07	0.03	-0.46	-0.50	-0.08	-0.50	0.20	-0.64	-0.43	-0.45	-0.50	-0.27	-0.43	-0.10	-0.20	0.03	0.25	-0.19	1,00									
Temp.	0.01	-0.01	-0.03	-0.08	-0.01	0.16	-0.02	-0.07	0.04	-0.25	-0.10	0.35	0.25	0.26	0.06	-0.21	0.18	0.06	0.30	0.19	-0.18	0.06	-0.16	-0.09	-0.12	-0.22	-0.18	0.07	1,00								
OD	0.43	0.37	0.40	0.42	0.36	0.05	0.63	0.41	0.19	0.19	0.22	-0.29	-0.48	-0.20	-0.58	0.18	-0.49	-0.28	-0.34	-0.12	-0.37	-0.40	-0.24	-0.27	-0.08	0.03	-0.45	0.52	0.35	1,00							
Salin.	-0.01	-0.20	-0.06	-0.19	-0.28	0.17	-0.24	-0.30	-0.02	-0.34	0.17	0.52	0.04	0.02	0.06	-0.02	0.24	0.11	0.22	0.42	0.08	-0.23	-0.08	-0.15	-0.47	-0.47	-0.38	0.29	0.04	1,00							

Abreviaciones: Branquia (B), Glándula digestiva (GD), Índice de condición (IC), Materia orgánica particulada (MOP), Temperatura (Temp.), Oxígeno disuelto (OD), Salinidad (Salin.).

Los valores en rojo corresponden a correlaciones altamente significativas (p<0,01) y los que están en negra a correlaciones significativas (p<0,05).

Capítulo 5

Resultados

TRANSPLANTES DE

VERANO

5.1 Determinaciones en agua

Para todas las variables medidas, los datos corresponden a bahía Brown a tiempo cero y a cada uno de los sitios seleccionados dentro de bahía Ushuaia en las semanas 1, 3 y 5 en los veranos de 2007 y de 2008.

5.1.1 Parámetros físicos

pH. Los valores de pH mostraron una notable homogeneidad entre los sitios y a lo largo del tiempo de duración de cada experimento, resultando el valor promedio de 2008 ($8,35 \pm 0,10$) más alto que el de 2007 ($7,91 \pm 0,06$) (**Fig. 49**). En 2008, este parámetro tendió a disminuir al incrementarse el período de experimentación.

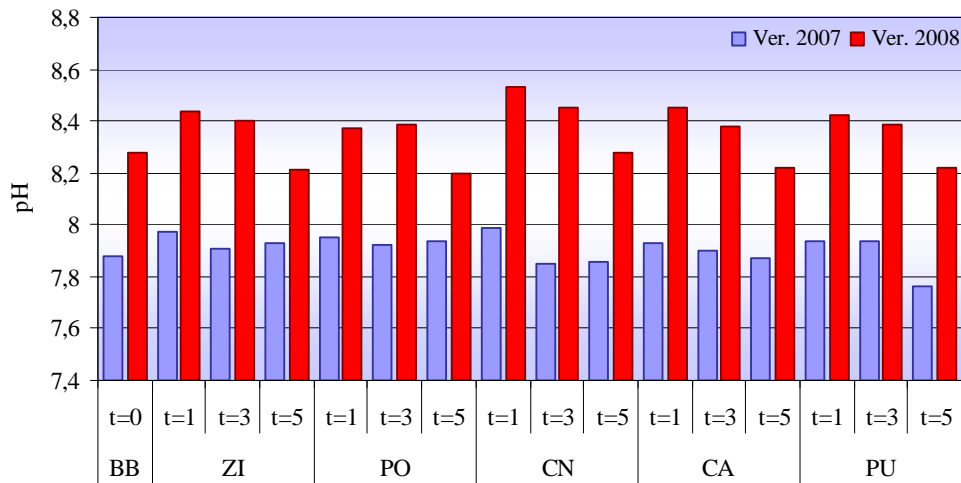


Figura 49. pH medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Temperatura. La distribución en el tiempo de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (**Fig. 50**) mostró diferencias interanuales muy marcadas en las semanas 1 de muestreo resultando más altas en 2007. Los incrementos observados fueron de $4,6^{\circ}\text{C}$ en zona industrial, $4,0^{\circ}\text{C}$ en planta Orión, $3,3^{\circ}\text{C}$ en club Náutico y $3,1^{\circ}\text{C}$ en caleta Aspirante, mientras que en bahía Brown y península Ushuaia la diferencia fue de 1°C . Para la misma fecha, la estación meteorológica del CADIC (SIAG) midió variaciones en la temperatura del aire de 10°C en menos de 24 hs, lo que da cuenta de lo cambiante que puede ser el clima en el área bajo estudio. En la semana 3, en promedio la temperatura fue parecida entre los sitios para cada año pero levemente mayor en 2007 ($0,8^{\circ}\text{C}$). En la semana 5, pueden observarse valores de temperatura muy similares entre sitios y en ambos años. En 2007, se observó un gran descenso de la temperatura en todos los

sitios de bahía Ushuaia en las semanas 3 y 5, siendo menos marcado en la península Ushuaia. Contrariamente, en 2008 se produjo un incremento de la temperatura en la semana 5 en todos los sitios y también en la semana 3 en zona industrial.

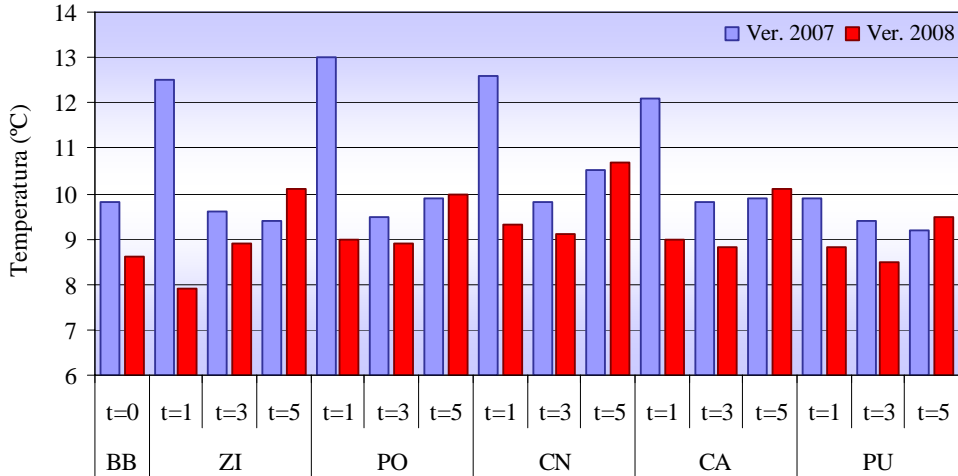


Figura 50 Temperatura medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Oxígeno disuelto. Este parámetro mostró valores cercanos al de saturación en ambos muestreos en todos los sitios (**Fig. 51**). Los valores promedio obtenidos fueron más altos y más variables en 2007 ($11,09 \pm 0,64$ mg/L) que en 2008 ($9,43 \pm 0,37$ mg/L). El sitio con menor oxígeno disuelto fue club Náutico, principalmente en 2008 ($8,87 \pm 0,06$ mg/L).

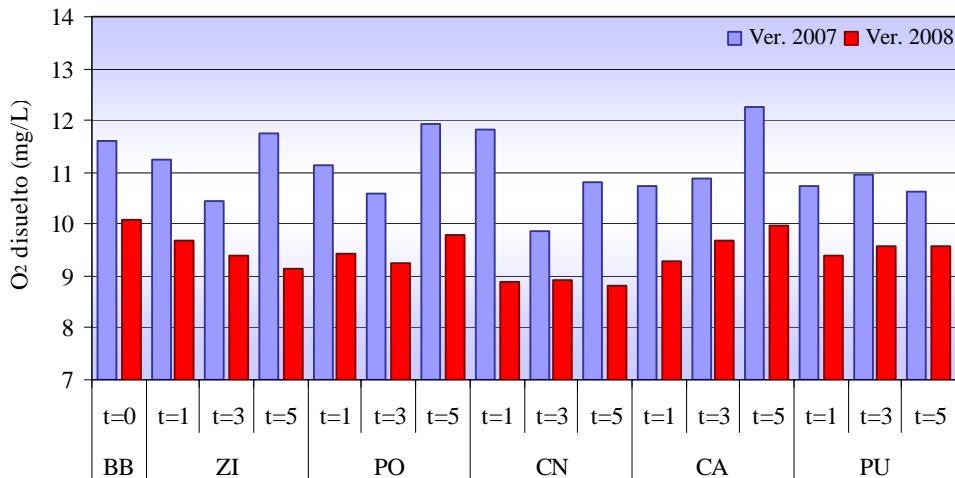


Figura 51. Oxígeno disuelto medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Salinidad. La salinidad (g/L) presentó un comportamiento muy similar en ambos años de muestreo (**Fig. 52**), manteniéndose la concentración en $31,34 \pm 1,54$ g/L sin considerar zona industrial en la semana 1 (23,60 g/L) en el experimento de 2008. Ese valor bajo de este parámetro evidencia un aporte de agua dulce de importancia desde los pluviales y/o del arroyo Grande.

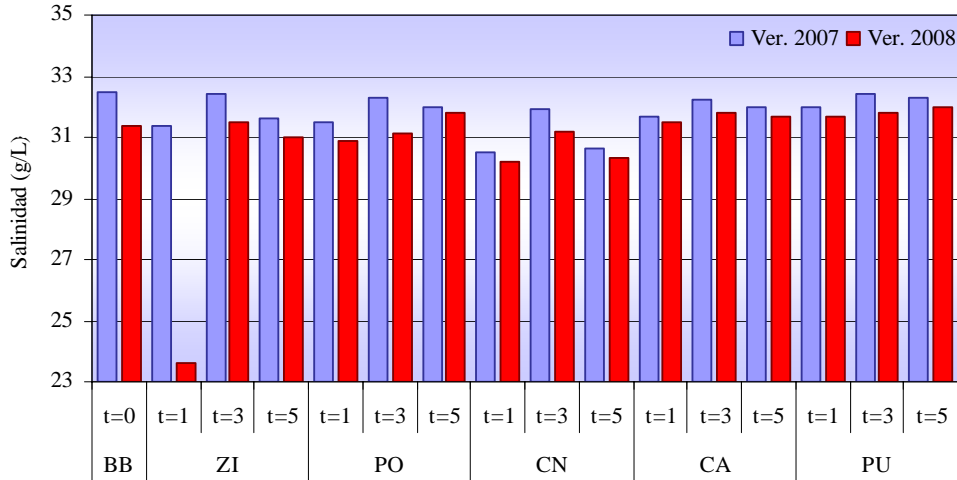


Figura 52. Salinidad medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

5.1.2 Parámetros químicos

5.1.2.1 Nutrientes inorgánicos disueltos

Nitrato. La **Figura 53** muestra las variaciones de este parámetro en escala logarítmica para una mejor representación gráfica. En club Náutico en 2008, se observaron valores muy altos en las semanas 3 (155,1 μM) y 5 (240,0 μM), comparados con el resto de los sitios. Igualmente, en zona industrial en la semana 3 se midió una concentración de 238,0 μM . Esos valores evidencian un impacto antropogénico en esos dos sitios. En general, las concentraciones tendieron a ser mayores en 2008.

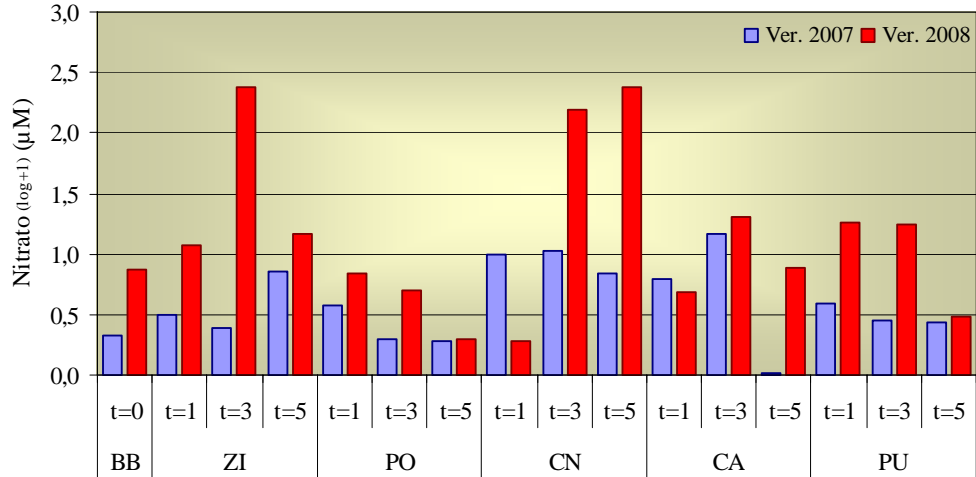


Figura 53. Concentración de nitrato, en escala logarítmica, medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Nitrito. Las concentraciones más elevadas de nitrito se registraron en el año 2007, principalmente en caleta Aspirante en la semana 3 (4,2 µM), en zona industrial en la semana 5 (2,1 µM) y en club Náutico en la semana 1 (1,8 µM). En el resto de los casos de 2007 y en todas las muestras de 2008, el nitrito presentó valores menores a 1 µM (**Fig. 54**). En 2007, se observó en club Náutico una disminución gradual en la concentración del nitrito al aumentar el tiempo de experimentación, mientras que en 2008 el mismo sitio presentó una tendencia de aumento.

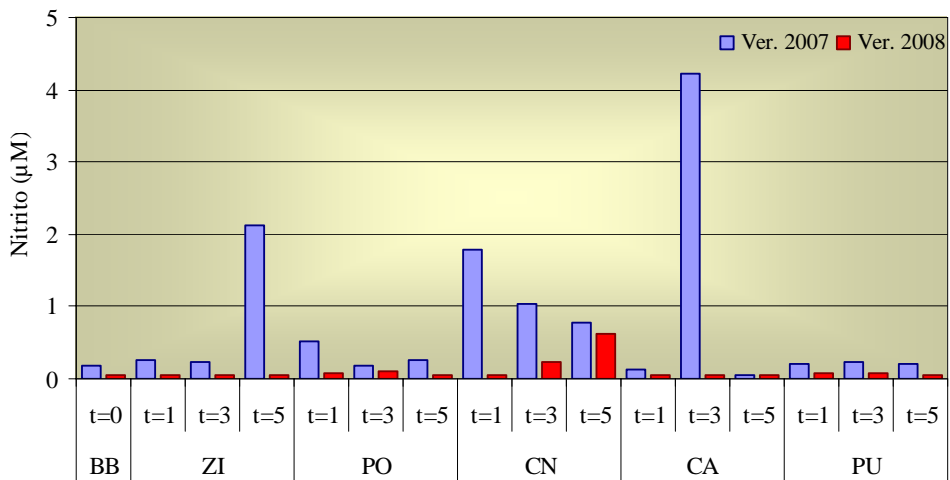


Figura 54. Concentración de nitrito medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Amonio. La **Figura 55** muestra la concentración de amonio (μM) en escala logarítmica. Se encontró que en los tres muestreos de 2007, club Náutico presentó concentraciones de amonio entre 94,8 y 167,8 μM , mientras que en el resto de los sitios los valores oscilaron entre no detectable y 1,6 μM , como fue el caso de península Ushuaia en la semana 3. En el 2008, club Náutico registró un máximo en la semana 5 (141,0 μM), seguido por zona industrial en la semana 3 donde la concentración fue 11,0 μM . En los casos restantes, las concentraciones fueron menores a 2 μM e incluso no detectables como en club Náutico y caleta Aspirante en la semana 3 y en península Ushuaia en la semana 1. De la misma manera que para el nitrato, club Náutico y zona industrial han sido los sitios más afectadas por impacto antrópico.

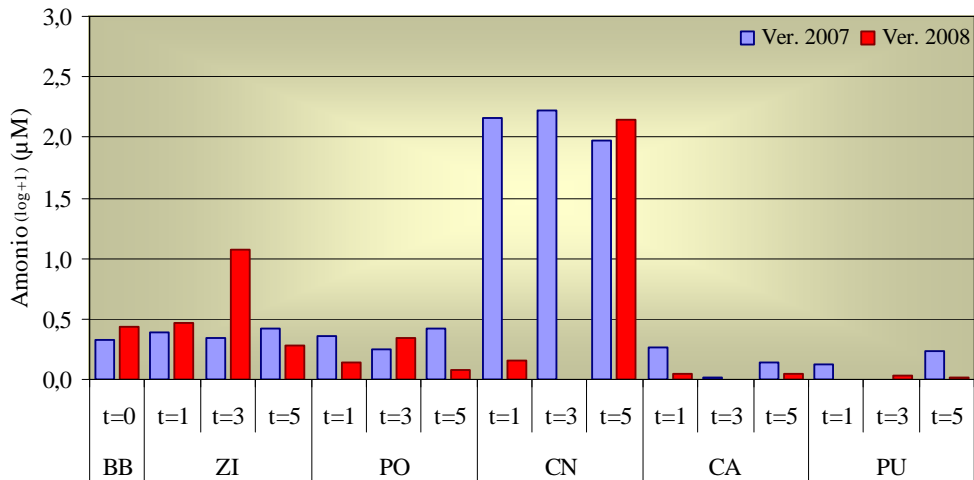


Figura 55. Concentración de amonio, en escala logarítmica, medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Fosfato. La **Figura 56** muestra las concentraciones observadas de fosfato en escala logarítmica. Puede observarse que en 2007 los valores más elevados se encontraron en bahía Brown (11,3 μM), club Náutico en la semana 1 (14,1 μM) y planta Orión en las semanas 3 y 5 (12,1 y 5,0 μM , respectivamente). En el resto de los casos las concentraciones variaron entre 0,3 y 0,8 μM . En 2008, comparando todos los sitios a lo largo de los tiempos de exposición, los valores fueron muy similares en el rango de $1,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$, excepto en club Náutico en la semana 5 que se registró un máximo de 25,1 μM .

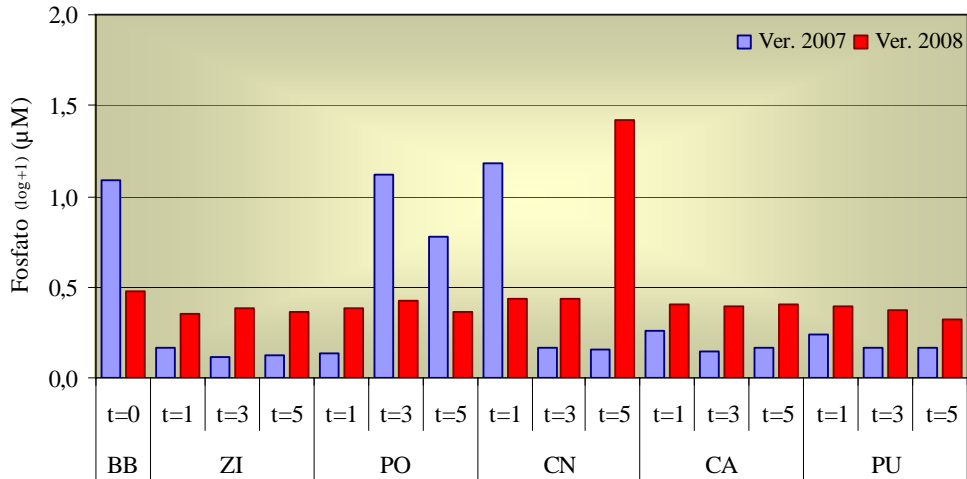


Figura 56. Concentración de fosfato, en escala logarítmica, medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) a las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Silicato. Los valores más elevados de silicato se registraron en 2007 en club Náutico, siendo el promedio de los tres tiempos de exposición de $28,3 \pm 5,9 \mu\text{M}$. En el resto de los sitios, en cambio, las concentraciones de silicato variaron entre 1,8 y $6,7 \mu\text{M}$ (**Fig. 57**). En el 2008, la mayor concentración nuevamente se registró en club Náutico en la semana 5 ($32,6 \mu\text{M}$), seguida por una concentración menor en zona industrial en la semana 1 ($17,3 \mu\text{M}$). En concordancia con los resultados de los demás nutrientes, club Náutico evidenció la influencia de efluentes urbanos y de la bahía Encerrada.

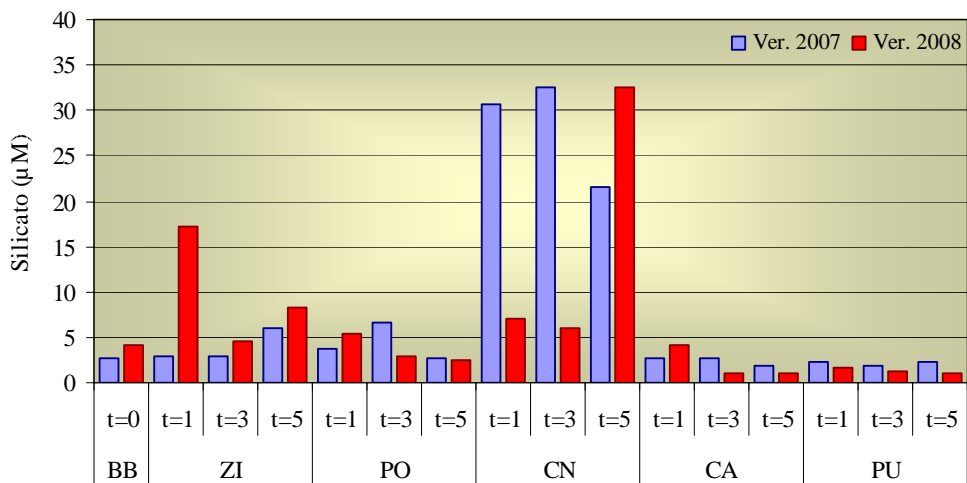


Figura 57. Concentración de silicato medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

5.1.2.2 Clorofila a

Las concentraciones de clorofila a encontradas variaron entre 0,09 y 0,73 µg/L en 2007 y entre 0,04 y 0,36 µg/L en 2008. Las concentraciones más altas se registraron en 2007 en caleta Aspirante en las semanas 1 y 5 (0,73 y 0,60 µg/L respectivamente) (**Fig. 58**).

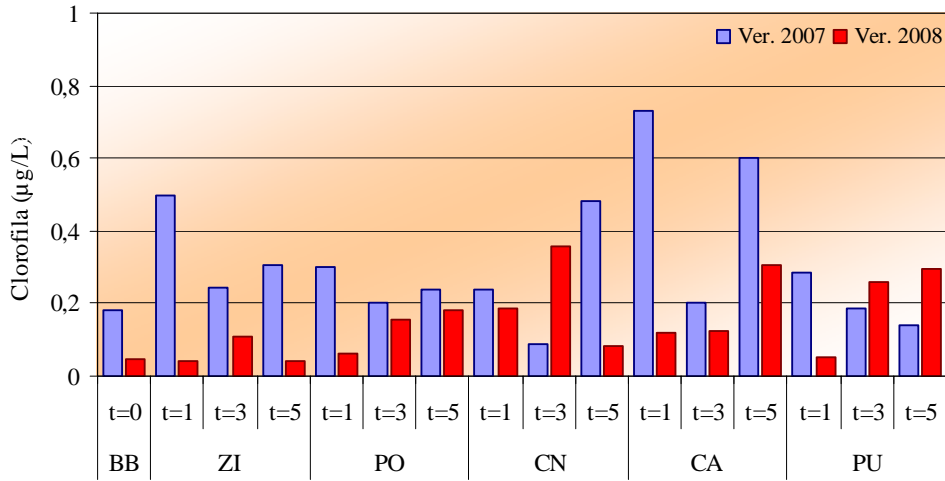


Figura 58. Concentración de clorofila a medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

5.1.2.3 Materia orgánica particulada

Los valores de materia orgánica particulada oscilaron en un rango de concentraciones parecidos en los años analizados: 630,0 - 2155,5 mg/m³ en 2007 y 423,1 - 2265,9 mg/m³ en 2008. Club Náutico presentó los valores más altos en cada semana de muestreo, tanto en 2007 como en 2008 (**Fig. 59**).

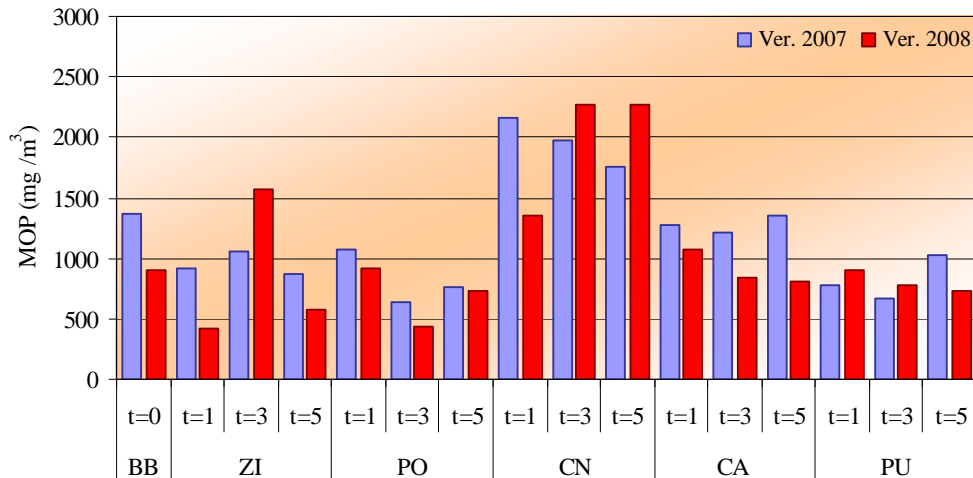


Figura 59. Concentración de materia orgánica particulada medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1, 3 y 5 en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

5.2 Determinaciones en sedimento

5.2.1 Granulometría del sedimento

La **Figura 60** muestra la granulometría de los sedimentos de los diferentes sitios de estudio. Tanto en 2007 como en 2008, bahía Brown fue el sitio con mayor proporción de grava (>70 %) en su composición granulométrica y el menor contenido de fango (<0,3 %). Los sedimentos de zona industrial y península Ushuaia estuvieron caracterizados principalmente por arena, los de planta Orión y caleta Aspirante se caracterizaron por arena y grava en proporciones variables en los dos años estudiados. Los sedimentos de club Náutico presentaron mayormente arena, pero fue el sitio con mayor proporción de fango (>29 %).

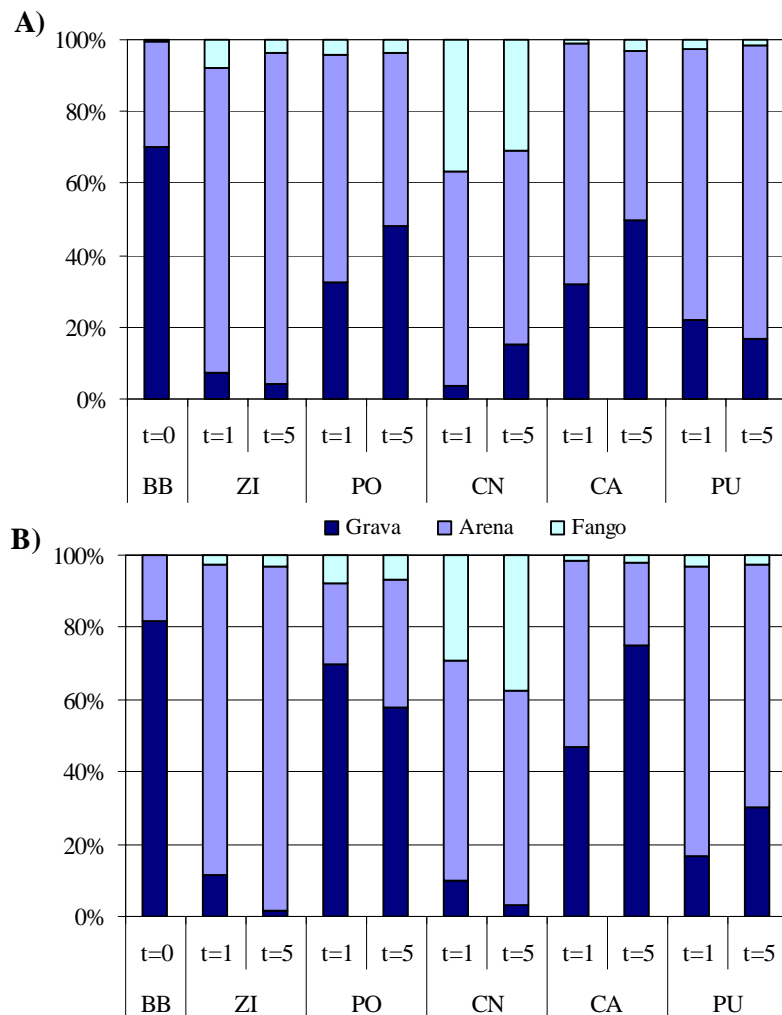


Figura 60. Porcentaje de fracciones granulométricas (fango, arena y grava) de los sedimentos de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en las semanas 1 y 5 del experimento **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008.

Con la finalidad de agrupar la información, se calculó el promedio de cada fracción granulométrica obtenida en los dos años de experimentación para cada sitio de estudio (**Tabla 19**). Bahía Brown presentó la mayor proporción de grava y el menor contenido de fango. Los sedimentos de club Náutico se caracterizaron por alto contenido de arena y la mayor proporción de fango. Zona industrial y península Ushuaia se caracterizaron por alto contenido de arena en sus sedimentos, mientras que planta Orión y caleta Aspirante presentaron proporciones similares de grava y arena. Estos dos últimos sitios fueron los que presentaron mayor variación interanual.

Tabla 19. Media y desvío estándar de las fracciones granulométricas de los tres años de experimentación y los diferentes tiempos analizados de los sedimentos de los sitios estudiados.

Sitio	Grava (%)	Arena (%)	Fango (%)
Bahía Brown	75,84 ± 8,17	23,83 ± 8,20	0,27 ± 0,04
Zona Industrial	6,21 ± 4,21	89,50 ± 5,06	4,29 ± 2,37
Planta Orión	52,17 ± 15,78	42,23 ± 17,45	5,60 ± 1,88
Club Náutico	7,94 ± 5,78	58,38 ± 3,11	33,67 ± 4,25
Caleta Aspirante	51,02 ± 17,90	47,03 ± 18,14	1,95 ± 0,74
Península Ushuaia	21,43 ± 6,40	76,25 ± 6,58	2,32 ± 0,66

5.2.2 Metales pesados totales en sedimentos

En la **Figura 61** se presentan las concentraciones totales de los metales pesados Cu, Zn, Cd y Pb expresada en µg/g (peso seco) y Fe en mg/g (peso seco), en la fracción <62µm del sedimento de todos los sitios estudiados en los veranos de 2007 y 2008.

En cuanto a la distribución espacial, bahía Brown presentó las concentraciones más altas de Cu, Zn y Fe. El promedio de ambos años de muestreo fue de 85,91 µg/g para Cu, 166,38 µg/g para Zn, 1,41 µg/g para Cd, 19,75 para Pb y 30,11 mg/g para Fe. En este sitio el Cu fue el único metal cuya concentración disminuyó de un año a otro (30 %). Por su parte, los metales que aumentaron de 2007 a 2008 fueron Zn en un 33 %, Pb en un 54 %, Cd en un 300 %, mientras que el Fe se mantuvo constante.

Cobre. Comparando las concentraciones de este metal en los sitios de bahía Ushuaia, se encontró que en zona industrial se mantuvo estable en los dos años (11,48 ± 0,10 µg/g). Planta Orión y club Náutico presentaron valores similares de este metal en 2007 (12,27 y 12,99 µg/g, respectivamente), y disminuyeron en un 24 y 27 % respectivamente en 2008. En caleta Aspirante y península Ushuaia se registraron los valores más bajos de Cu en ambos

años ($<5,53 \mu\text{g/g}$) y también presentaron una disminución de 70 y 55 % respectivamente en el 2008 respecto del año anterior.

Zinc. Considerando todos los sitios de bahía Ushuaia, este metal presentó la mayor concentración en club Náutico en 2007 ($99,09 \mu\text{g/g}$) y en 2008 ($125,97 \mu\text{g/g}$), mientras que las menores concentraciones en 2007 y 2008 se registraron en península Ushuaia siendo $31,25 \mu\text{g/g}$ y $47,79 \mu\text{g/g}$, respectivamente. En club Náutico, caleta Aspirante y península Ushuaia se registraron incrementos de 2007 a 2008 que fueron de 25, 18 y 52 % respectivamente. En zona industrial y planta Orión las concentraciones interanuales de Zn se mantuvieron estables en $67,41 \pm 1,79$ y $74,49 \pm 0,62 \mu\text{g/g}$, respectivamente.

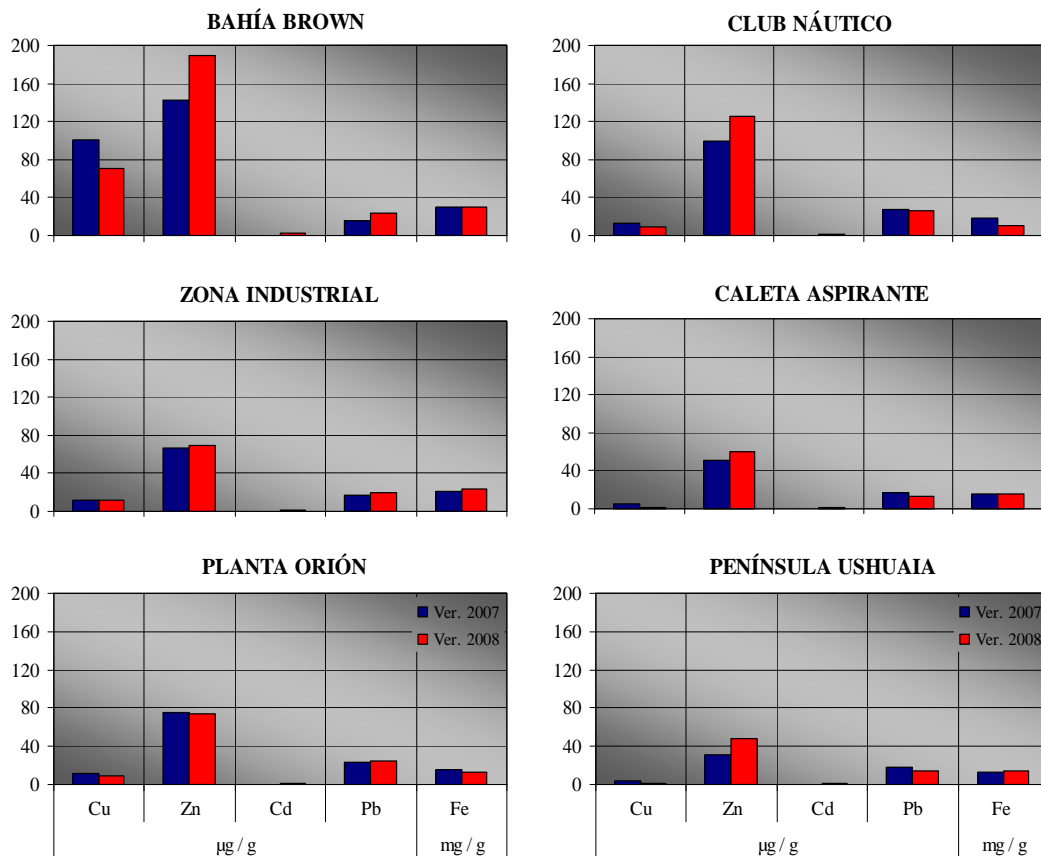


Figura 61. Concentración de Cu, Zn, Cd, Pb y Fe en la fracción fina ($<62\mu\text{m}$) del sedimento para cada uno de los sitios en estudio en Verano de 2007 (azul) y Verano de 2008 (rojo) al inicio del experimento (semana 1). Los resultados están expresados en $\mu\text{g/g}$, excepto el hierro en mg/g .

Cadmio. Evaluando los sitios de bahía Ushuaia, en 2007 el Cd sólo fue detectable en caleta Aspirante presentando una concentración de $0,62 \mu\text{g/g}$. En 2008, en todos los sitios se registraron concentraciones por encima del límite de detección. Las mayores concentraciones se registraron en caleta Aspirante ($1,46 \mu\text{g/g}$) y en península Ushuaia ($1,11 \mu\text{g/g}$), mientras

que los tres sitios restantes presentaron valores muy similares entre sí ($0,71 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$). En todos los sitios se registraron incrementos de 2007 a 2008.

Plomo. Este metal se mantuvo con muy poca variación en los dos muestreos y se acumuló en mayor proporción en los sedimentos de club Náutico ($27,29 \pm 0,94 \mu\text{g/g}$), planta Orión ($23,55 \pm 1,07 \mu\text{g/g}$) y zona industrial ($18,76 \pm 1,58 \mu\text{g/g}$). Caleta Aspirante y península Ushuaia presentaron las menores concentraciones de este metal, las cuales disminuyeron de 2007 a 2008 en un 22 %.

Hierro. Como era de esperar, el Fe fue el metal más abundante en todos los sitios. Zona industrial registró la mayor concentración ($22,24 \pm 1,17 \text{mg/g}$) que fue 53 % más alta que el promedio de los sitios restantes de bahía Ushuaia. Planta Orión, club Náutico, caleta Aspirante y península Ushuaia presentaron valores semejantes entre si ($14,52 \pm 2,26 \text{mg/g}$), con diferencias en general menores a 16 %.

5.2.2.1 Factores de enriquecimiento

Los factores de enriquecimiento para el Cu, Zn, Cd y Pb se muestran en la **Figura 62**. En verano de 2007 (**Fig. 62A**) el factor más elevado para el Cu se registró en bahía Brown siendo de 4,31, mientras que en los cinco sitios de bahía Ushuaia los factores fueron mucho más bajos oscilando entre 0,42 y 1,03. Contrariamente, para el caso del Pb, bahía Brown fue el sitio con el menor factor de enriquecimiento (1,33). Para el Zn los factores resultaron muy semejantes en todos los sitios, incluyendo bahía Brown, estando entre 0,79 y 1,81. Para el Cd sólo se pudo calcular este factor para caleta Aspirante (7,77) y bahía Brown (3,85) ya que en los casos restantes este metal se halló por debajo del límite de detección.

En verano de 2008 (**Fig. 62B**), nuevamente en bahía Brown se halló el factor de enriquecimiento para Cu más elevado (3,01) en comparación con los sitios de bahía Ushuaia, los cuales variaron entre 0,16 y 1,14. Para el caso del Zn y el Pb, club Náutico presentó los mayores factores siendo de 3,81 y 6,39, respectivamente. El Cd presentó factores notablemente más altos que los otros metales, siendo el menor el registrado en zona industrial (5,94). Los demás sitios, incluyendo bahía Brown, variaron entre 11,03 y 18,85 lo cual evidenciaría el ingreso de este metal desde alguna fuente antrópica o natural.

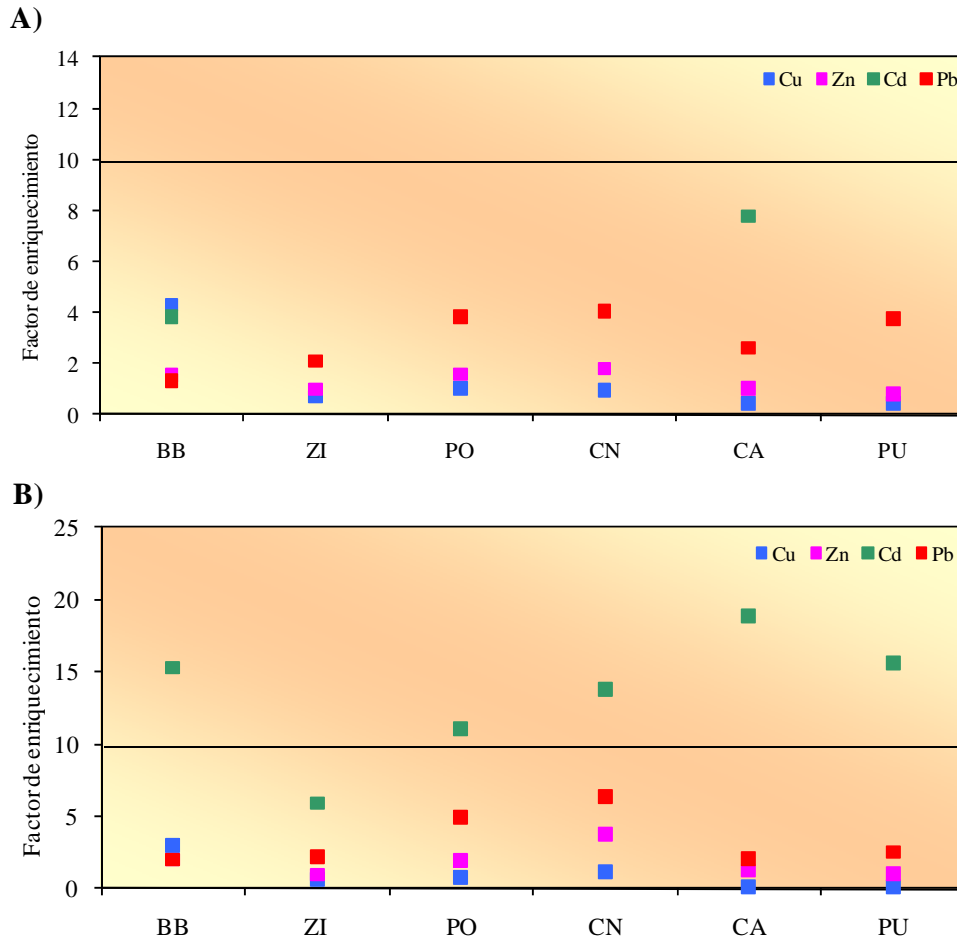


Figura 62. Factores de enriquecimiento de Cu, Zn, Cd y Pb para los sedimentos de bahía Brown (BB), zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) en los experimentos de **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008.

5.3 Determinaciones en organismos

Para evaluar el estado general de los mejillones de bahía Brown y de aquellos transplantedos a los cinco sitios dentro de bahía Ushuaia, se monitorearon varios parámetros fisiológicos y bioquímicos cuyos resultados se detallan en los párrafos siguientes. El largo de los mejillones empleados fue de $57,89 \pm 6,15$ mm. Lamentablemente en la semana 6 de exposición de verano 2008 no se halló el dispositivo en península Ushuaia, por lo cual no hay información biológica de ese sitio para ese período de exposición.

5.3.1 Contenido de agua, ceniza y materia orgánica

Los porcentajes de agua, ceniza y materia orgánica de los mejillones de bahía Brown, promediando los años 2007 y 2008, fueron de $73,15 \pm 2,25$ %, $1,87 \pm 0,10$ % y $24,98 \pm 2,15$ %.

%, respectivamente. En 2008, la ceniza y la materia orgánica aumentaron un 7,8 y 12,9 % respectivamente, contrariamente el contenido de agua descendió un 4,2 %.

El contenido de agua, ceniza y materia orgánica se midió en todos los sitios con la misma frecuencia de muestreo, es decir, en las semanas 2, 4 y 6. El porcentaje de agua, a lo largo de los dos años y en todos los muestreos de los diferentes sitios, se encontró en el orden del 72 ± 2 % (**Fig. 63**). Mediante ANOVA de II factores se encontró que en 2007 el contenido de agua dependió de los tiempos de exposición y de los sitios ($p < 0,05$). Club Náutico, planta Orión y península Ushuaia presentaron porcentajes de agua más altos que zona industrial. Respecto al efecto temporal, se halló un incremento significativo en la semana 6 de experimentación. En 2008, solamente el tiempo de exposición ejerció un efecto significativo sobre este parámetro, registrándose un descenso en la semana 4 (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al comparar los sitios de bahía Ushuaia para cada tiempo de exposición, sólo se hallaron diferencias significativas en la semana 6, presentando zona industrial y planta Orión valores de agua significativamente más altos que club Náutico y caleta Aspirante (ANOVA I vía, $p < 0,05$).

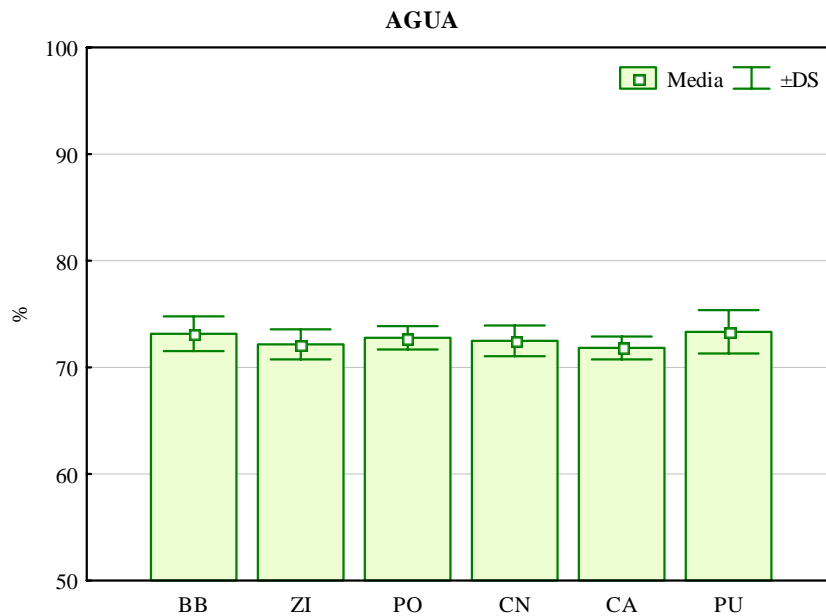


Figura 63. Contenido de agua expresado en porcentaje en el mejillón *M. edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) promediando años y tiempos de exposición. Los resultados se expresan como la Media \pm DS.

Analizando el conjunto de los sitios y los tiempos, el porcentaje de ceniza fue levemente más alto y más variable en 2007 ($3,01 \pm 1,12$ %) respecto de 2008 ($2,18 \pm 0,23$ %). En 2007, se encontró un efecto significativo del tiempo de exposición y los sitios sobre el

contenido de ceniza (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En todos los sitios se registró un descenso significativo en la semana 6 (**Fig. 64**). Península Ushuaia, club Náutico y zona industrial presentaron porcentajes de ceniza significativamente más altos que planta Orión y caleta Aspirante. En 2008 no se hallaron variaciones significativas (ANOVA II factores, $p < 0,05$).

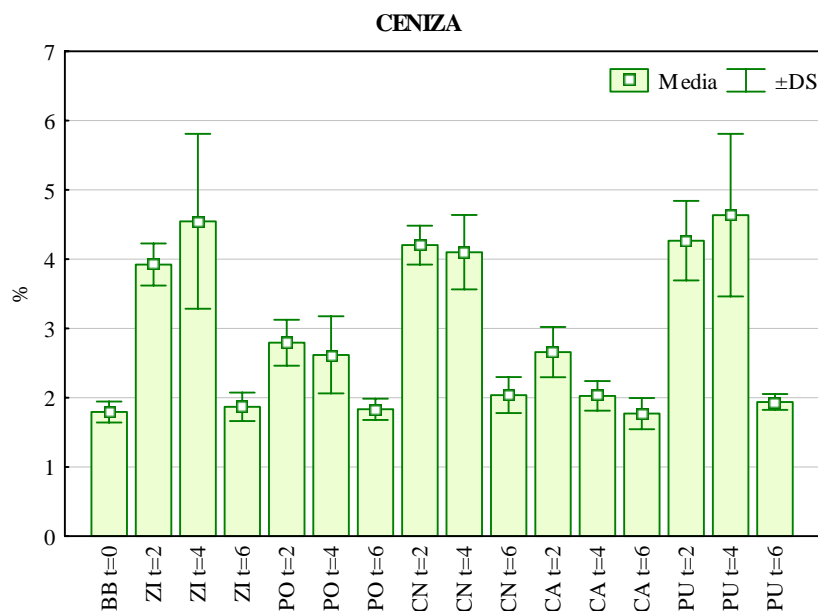


Figura 64. Contenido de ceniza expresado en porcentaje en el mejillón *M. edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantedos a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Verano 2007. Los resultados se expresan como la Media \pm DS para 5 determinaciones.

La materia orgánica mostró porcentajes del orden del 25 ± 2 %. En el experimento de 2007 se encontraron diferencias entre los sitios, presentando los mejillones de caleta Aspirante y zona industrial mayor proporción de materia orgánica que los de península Ushuaia y club Náutico (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En 2008, sólo se registró un efecto del tiempo con un aumento significativo en la semana 4 respecto de la semana 2 (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En la **Figura 65** se presenta el promedio de materia orgánica de los tres tiempos de exposición para cada sitio y para cada año.

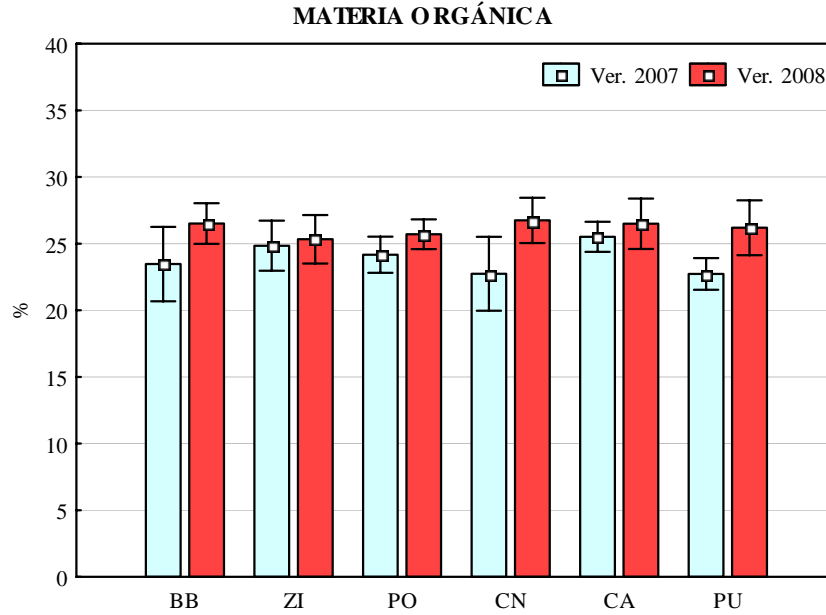


Figura 65. Contenido de materia orgánica expresado en porcentaje en el mejillón *M. edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantedos a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) promediando los tres tiempos en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo). Los resultados se expresan como la Media \pm DS.

Diferencias espacio-temporales en el contenido de agua, ceniza y materia orgánica fueron encontradas en ambos experimentos. Sin embargo, luego de integrar la información correspondiente a cada lugar descartando como variable el factor tiempo, los porcentajes de agua, ceniza y materia orgánica resultaron muy homogéneos sin diferenciarse entre sitios (**Tabla 20**). Las variaciones entre sitios fueron pequeñas, sin importancia relativa desde el punto de vista biológico.

Tabla 20. Media y desvío estándar de las fracciones granulométricas del sedimento correspondiente a los tres analizados para cada sitio estudiado.

Sitio	Agua (%)	Ceniza (%)	Materia orgánica (%)
Bahía Brown	73,15 \pm 2,25	1,87 \pm 0,10	24,98 \pm 2,15
Zona Industrial	72,15 \pm 0,84	2,77 \pm 1,17	25,08 \pm 0,38
Planta Orión	72,75 \pm 1,12	2,39 \pm 0,34	24,86 \pm 0,98
Club Náutico	72,50 \pm 1,59	2,75 \pm 1,09	24,76 \pm 2,54
Caleta Aspirante	71,82 \pm 1,41	2,19 \pm 0,37	26,00 \pm 1,25
Península Ushuaia	72,86 \pm 1,78	3,03 \pm 1,31	24,11 \pm 2,04

5.3.2 Lípidos totales

El contenido de lípidos totales en bahía Brown, a tiempo cero, en verano de 2007 y de 2008 en manto fue muy similar ($12,55 \pm 2,57$ y $15,30 \pm 4,64$ mg/g tejido fresco, respectivamente). La concentración en la glándula digestiva tampoco varió considerablemente entre los dos años muestreados, siendo en promedio de $81,00 \pm 4,57$ mg/g (tejido fresco) en 2007 y $76,75 \pm 14,62$ mg/g (tejido fresco) en 2008. En los dos veranos, el contenido total de lípidos en manto fue 82-84 % menor que el de la glándula digestiva. Los resultados correspondientes al experimento de 2008, de ambos órganos, presentaron mayor variación que los de 2007.

Manto. El contenido de lípidos totales en manto se muestra en la **Figura 66**. En 2007 (**Fig. 66A**), la interacción entre los tiempos de exposición y los sitios tuvieron un efecto significativo sobre este parámetro (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al evaluar los efectos simples se encontró en las semanas 2 y 4 que los mejillones transplantados a club Náutico presentaron la mayor concentración de lípidos en el manto. En la semana 6, se halló un contenido de lípidos más elevado en los mejillones de planta Orión, en comparación con los de club Náutico y caleta Aspirante. Un efecto temporal se halló en los mejillones de zona industrial, planta Orión y club Náutico, siendo los resultados diferentes en cada uno de los casos. En comparación con el valor inicial de lípidos totales medido en bahía Brown, sólo el de zona industrial y planta Orión en la semana 6 como el de club Náutico en la semana 4 resultaron mayores.

En verano de 2008 (**Fig. 66B**), sólo se encontró un efecto significativo de los sitios sobre los niveles de lípidos totales en el manto (ANOVA II factores, $p < 0,05$). El contenido de lípidos totales en los mejillones de caleta Aspirante fue mayor que en zona industrial, club Náutico y península Ushuaia, y en planta Orión mayor que en club Náutico. Los valores medidos en todos los sitios de bahía Ushuaia fueron de la misma magnitud que el de bahía Brown, resultando menos variables en 2008 que en 2007.

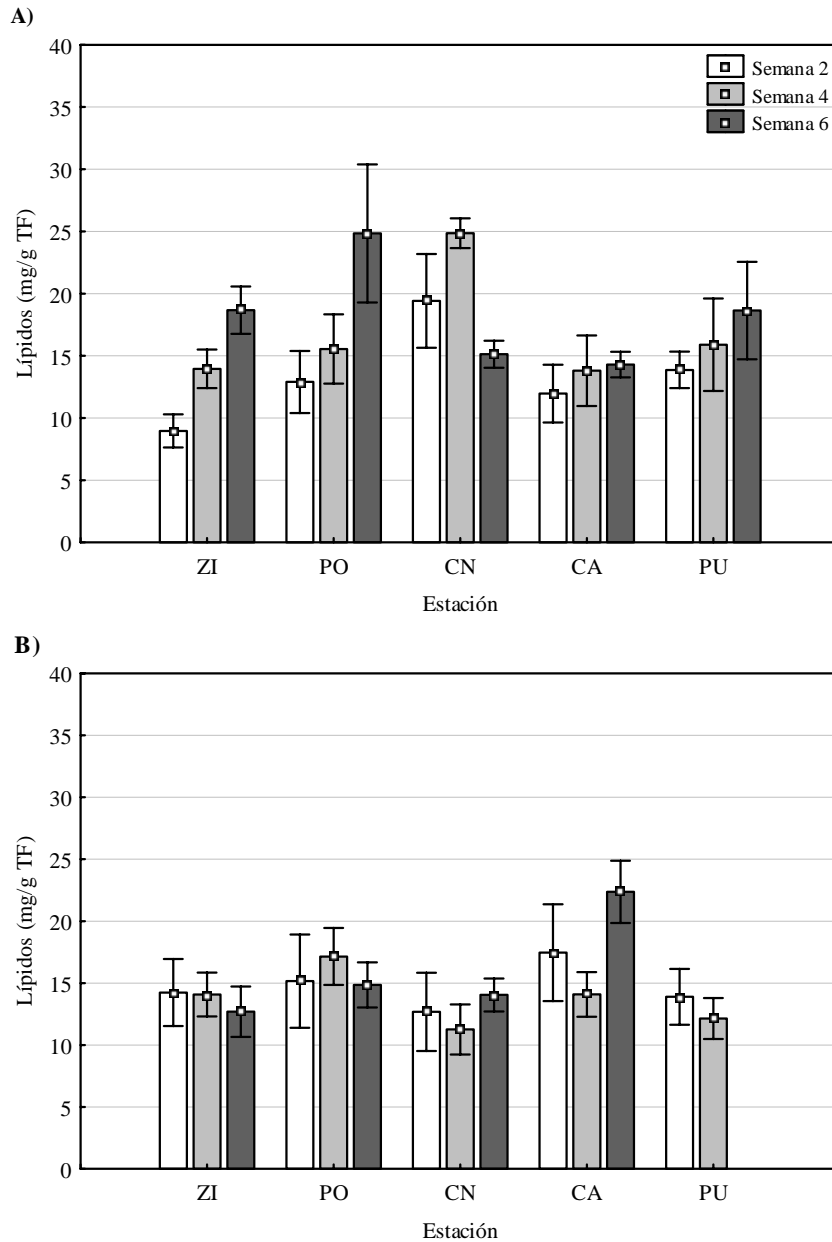


Figura 66. Contenido de lípidos totales en el manto del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 4 determinaciones.

Glándula digestiva. El contenido de lípidos totales en la glándula digestiva (**Fig. 67**) fue tres veces mayor que en manto y la respuesta resultó muy heterogénea en el verano de 2007 (**Fig. 67A**). En concordancia con los datos correspondientes a la branquia, los niveles de lípidos estuvieron afectados por la interacción de los factores estudiados (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En el caso del efecto de los sitios en la semana 2, los lípidos totales medidos en planta Orión fueron significativamente mayores que en zona industrial; en la semana 4, en

club Náutico fueron significativamente menores que en península Ushuaia, zona industrial y planta Orión; mientras que en la semana 6, en caleta Aspirante se registró un contenido significativamente mayor que en península Ushuaia. Con respecto al tiempo de exposición, se halló un efecto diferente en cada uno de los cinco sitios estudiados. Los lípidos totales medidos en zona industrial (semana 2), club Náutico (semana 4), península Ushuaia (semana 6), planta Orión (semanas 4 y 6) y caleta Aspirante (semanas 2 y 4) descendieron respecto de la condición inicial en el tiempo cero.

En verano de 2008 el contenido de lípidos totales fue menos variable a lo largo del experimento en comparación con el 2007 (**Fig. 67B**). El único efecto significativo encontrado fue el de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$), en concordancia con los resultados reportados para la branquia. Con respecto a dicho efecto, se encontró en los mejillones de península Ushuaia mayor contenido de lípidos totales que en planta Orión, club Náutico y zona industrial. Al comparar los lípidos totales medidos en bahía Ushuaia con el valor medido en bahía Brown, se encontró que fueron menores en zona industrial en la semana 4, caleta Aspirante en la semana 6, planta Orión en las semanas 2 y 4 y en club Náutico en las semanas 2 y 6.

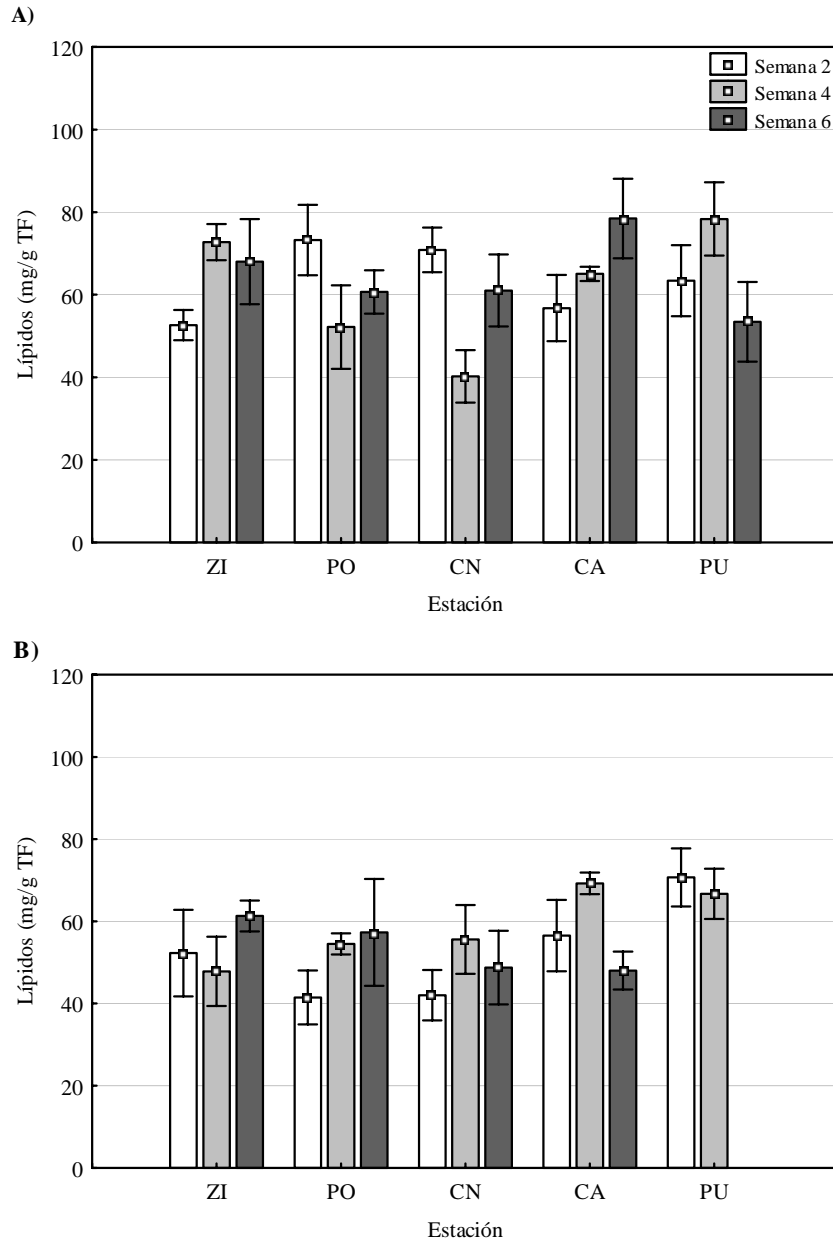


Figura 67. Contenido de lípidos totales en glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 4 determinaciones.

5.3.3 Bioacumulación de metales pesados

Cobre. La **Figura 68** muestra la concentración de Cu ($\mu\text{g/g}$) en la branquia y la glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis*. Este metal presentó poca oscilación espacio-temporal en los dos tejidos en el experimento de 2007. Con respecto a la acumulación en la branquia en 2007, en planta Orión se hallaron las mayores concentraciones que, promediando los tres tiempos de exposición, fueron $3,86 \pm 0,69 \mu\text{g/g}$; mientras que los

valores más bajos se encontraron en caleta Aspirante ($2,39 \pm 0,47 \mu\text{g/g}$). En la semana 2 del experimento de 2008, las concentraciones fueron muy parecidas entre los sitios ($3,03 \pm 0,33 \mu\text{g/g}$). Se registraron incrementos de más del 200 % en la semana 4 en todos los sitios y posteriores descensos en la semana 6, hasta valores superiores a los iniciales siendo esos valores mayores a los de 2007.

Los niveles de Cu en la glándula digestiva en verano de 2007 presentaron poca variación espacio-temporal, siendo club Náutico el sitio con mayor concentración en los tres tiempos de exposición ($4,83 \pm 0,51 \mu\text{g/g}$). En el 2008, se observó un incremento de más del 200 % en la semana 4 en todos los sitios, seguido de una disminución hasta valores mayores a los de la semana 2, en concordancia con los resultados encontrados en la branquia. En los tres tiempos, en caleta Aspirante se midieron las menores concentraciones de Cu. No se observó preferencia en la acumulación de este metal según los órganos analizado.

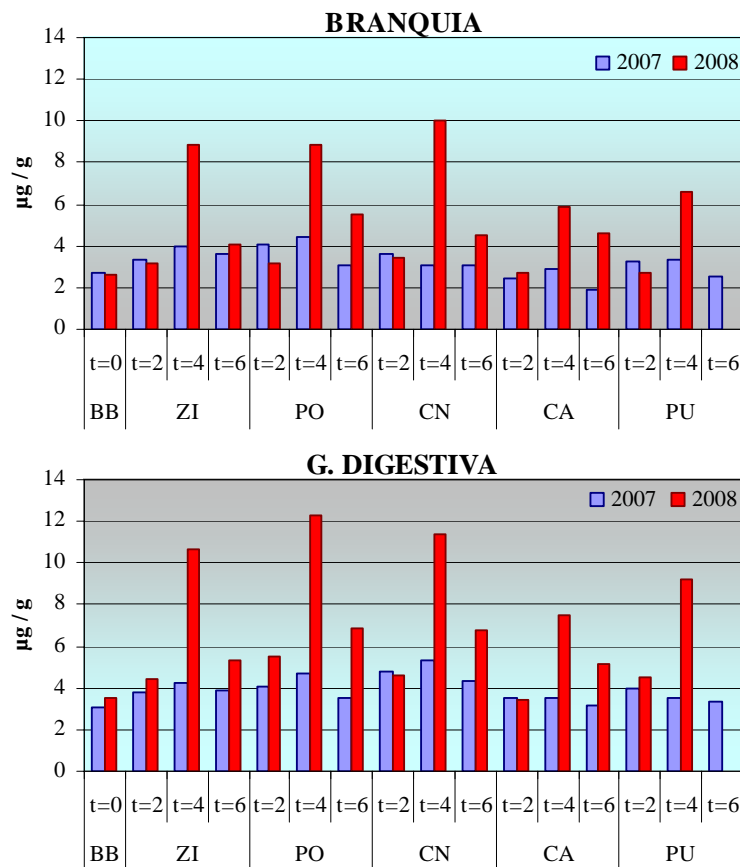


Figura 68. Concentración de Cu expresada en $\mu\text{g/g}$ en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantedos a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Zinc. La bioacumulación de Zn en la branquia y la glándula digestiva se presenta en la **Figura 69**. Las concentraciones medidas en la branquia, en el verano de 2007, resultaron homogéneas a lo largo del tiempo de exposición y entre los sitios. En caleta Aspirante se registró una disminución en la semana 2 respecto del estado inicial, pero aumentó en las semanas siguientes igualando la concentración medida en el tiempo cero. En 2008, las concentraciones tendieron a ser mayores que en el experimento del año anterior. Incrementos del 125 % se registraron en club Náutico y en caleta Aspirante en la semana 6.

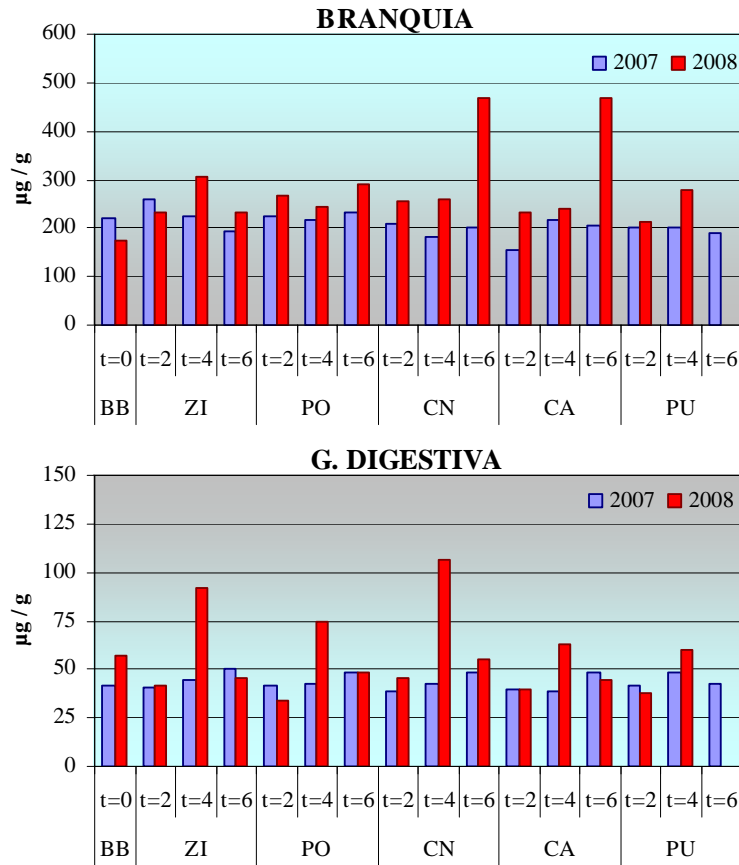


Figura 69. Concentración de Zn expresada en µg/g en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Con respecto al Zn en la glándula digestiva, las concentraciones fueron entre dos y diez veces menor que la medida en la branquia. En concordancia con los resultados obtenidos en la branquia, en el experimento de 2007 las concentraciones en la glándula digestiva fueron similares en tiempo y espacio siendo el promedio de todos los sitios y tiempos de $43,60 \pm 3,94$ µg/g. En el experimento de 2008, un incremento de Zn se produjo en la semana 4 en los

cinco sitios de bahía Ushuaia, siendo las mayores concentraciones las registradas en zona industrial (91,89 µg/g), planta Orión (74,80 µg/g) y club Náutico (106,45 µg/g).

Hierro. La concentración de Fe en la branquia y la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* se presenta en la **Figura 70**. En 2007, considerando los cinco sitios de bahía Ushuaia, la concentración de este metal en la branquia se mantuvo con poca variación en la semana 2 ($65,92 \pm 5,03$ µg/g) y resultó semejante al valor registrado en bahía Brown (73,94 µg/g). En las semanas 4 y 6, se registraron las mayores concentraciones en zona industrial (140,34 y 148,53 µg/g) y en club Náutico (120,42 y 127,20 µg/g). Con la única excepción de la acumulación en la branquia de los mejillones transplantados a zona industrial por 6 semanas, las concentraciones en 2008 fueron mayores que las del año anterior. Las máximas acumulaciones se produjeron en club Náutico (561,90 – 367,14 µg/g), las cuales descendieron a medida que se incrementó el tiempo de exposición.

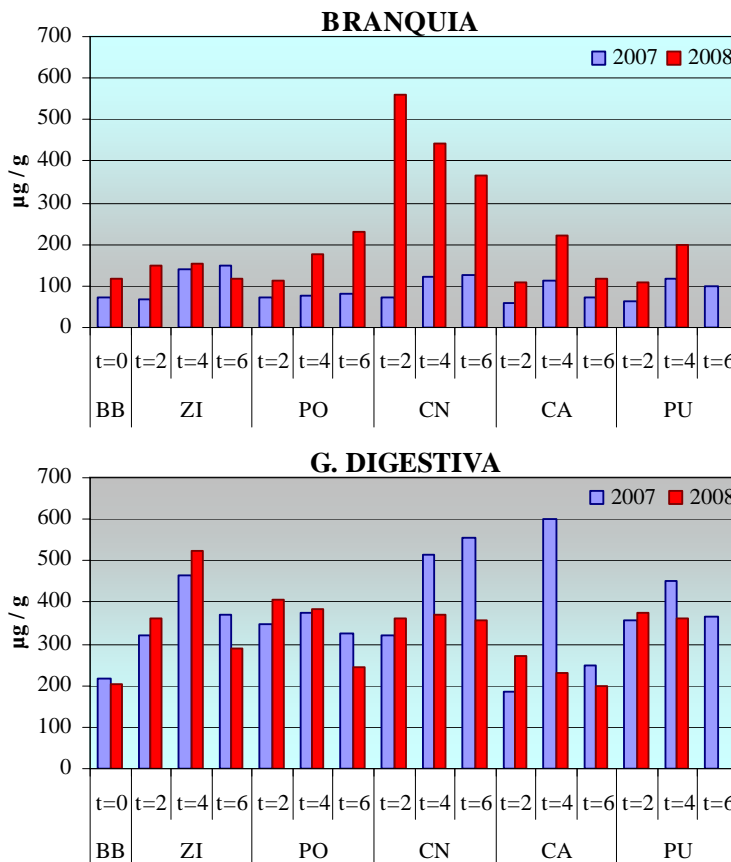


Figura 70. Concentración de Fe expresada en µg/g en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantados a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Variaciones interanuales en la concentración de Fe en la glándula digestiva se observaron en club Náutico (semanas 4 y 6) y en caleta Aspirante (semana 4), resultando notablemente mayores en 2007 y constituyendo esos casos los máximos registrados (515,64 – 601,64 $\mu\text{g/g}$). Con la excepción de algunos casos en 2008, la concentración de este metal en la glándula digestiva resultó entre dos y cinco veces mayor a la registrada en la branquia.

Cadmio. Las concentraciones de Cd en la branquia, incluyendo los dos años de experimentación, variaron entre 0,72 y 2,76 $\mu\text{g/g}$ en la branquia y entre 0,80 y 1,79 $\mu\text{g/g}$ en la glándula digestiva (**Fig. 71**). Dicha información evidencia que este metal no se acumuló diferencialmente según alguno de los órganos analizados. En 2007, las máximas acumulaciones en la branquia se midieron en planta Orión en las semanas 2 (2,76 $\mu\text{g/g}$) y 4 (2,21 $\mu\text{g/g}$) y en caleta Aspirante en la semana 6 (2,14 $\mu\text{g/g}$). En el experimento de 2008, las concentraciones fueron menores que las de 2007, registrándose los mayores valores en caleta Aspirante en la semana 6 (1,95 $\mu\text{g/g}$), en club Náutico en las semanas 2 y 4 (1,66 \pm 0,02) y en zona industrial en la semana 4 (1,59 $\mu\text{g/g}$).

Los niveles de Cd en la glándula digestiva fueron muy variables en tiempo y espacio. En 2007, las máximas concentraciones se registraron en club Náutico en las semanas 2 y 6 (1,78 $\mu\text{g/g}$) y en caleta Aspirante en la semana 2 (1,73 $\mu\text{g/g}$). En 2008, al igual que en la branquia, las concentraciones igualaron o resultaron menores a las medidas en 2007 y variaron entre 0,80 y 1,50 $\mu\text{g/g}$.

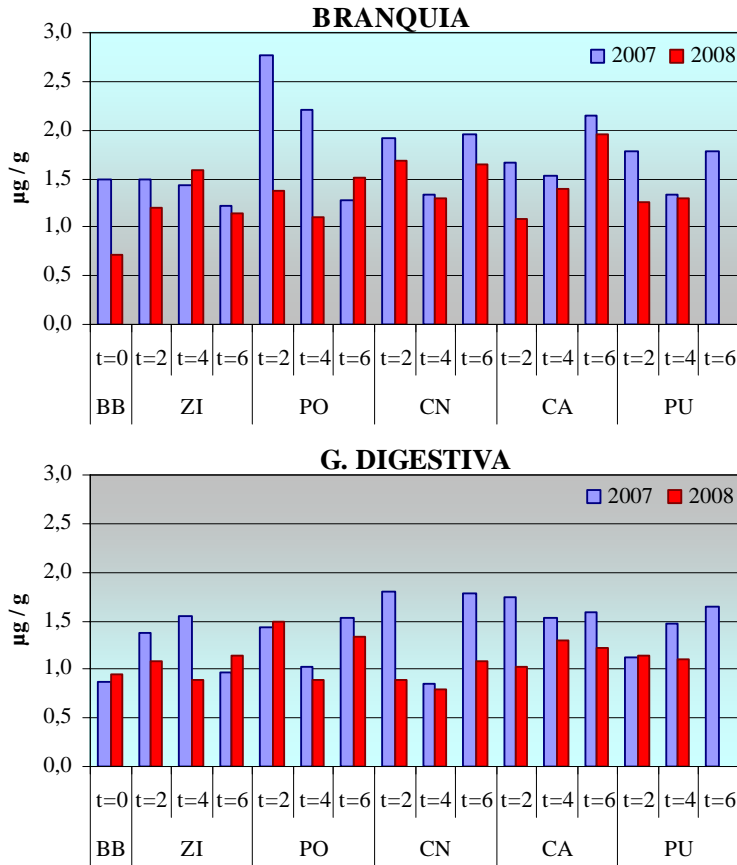


Figura 71. Concentración de Cd expresada en µg/g en branquia y glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Brown (BB) a tiempo cero y de los transplantes a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en Verano 2007 (celeste) y Verano 2008 (rojo).

Plomo. Los niveles de Pb fueron no detectables (<2,15 µg/g) en la mayoría de los casos en los dos años de experimentación, tanto en la branquia como en la glándula digestiva, por lo cual no se presentan resultados gráficos. Sólo se encontraron valores superiores al límite de detección en la branquia en el experimento de 2007 en bahía Brown (3,25 µg/g), caleta Aspirante en la semana 4 (2,56 µg/g) y zona industrial en la semana 6 (3,48 µg/g).

5.3.3.1 Bioconcentración de metales pesados

La bioconcentración de Cu, Zn, Fe y Cd en la branquia y glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* se presenta en la **Tabla 21**. Aquéllos casos en donde la concentración del Cd resultó no detectable en el sedimento, no se pudieron calcular factores de bioconcentración. En general, el Zn fue el metal más bioconcentrado particularmente en la branquia. El Cd fue el metal que le siguió, el cual se bioconcentró en proporciones semejantes en ambos órganos en 2007 y 2008 pero presentando factores más bajos en 2008. El Cu se bioconcentró en mayor

proporción en ambos tejidos en relación con el sedimento en los mejillones de caleta Aspirante y península Ushuaia en el experimento de 2008. El Fe resultó ser el metal menos bioconcentrado, presentando en todos los casos factores uno o dos órdenes de magnitud menores que para los metales restantes. Para todos los metales, todos los sitios de bahía Ushuaia presentaron factores más altos que el de bahía Brown en ambos años de experimentación.

Tabla 21. Factores de bioconcentración en branquia y glándula digestiva de *M. edulis chilensis* proveniente de bahía Brown (BB) y de los cinco sitios de bahía Ushuaia (BU): zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia. Promedio de los tres tiempos con su desvío para los sitios de BU.

Sitio	Cu		Zn		Fe		Cd	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
Branquia								
BB	0,03	0,04	1,54	0,93	0,002	0,004	2,63	0,32
ZI	0,32±0,03	0,47±0,27	3,42±0,47	3,73±0,61	0,006±0,002	0,006±0,001	---	1,96±0,36
PO	0,31±0,06	0,80±0,39	2,99±0,09	3,62±0,31	0,005±0,000	0,014±0,005	---	1,99±0,31
CN	0,25±0,03	0,63±0,37	2,00±0,14	2,60±0,96	0,006±0,002	0,043±0,009	---	2,15±0,30
CA	0,43±0,09	2,63±0,96	3,76±0,63	5,20±2,23	0,005±0,002	0,009±0,004	2,89±0,52	1,01±0,30
PU	0,72±0,10	2,49±1,48	6,33±0,23	5,12±0,99	0,007±0,002	0,007±0,007	---	1,15±0,03
Glándula digestiva								
BB	0,03	0,05	0,29	0,30	0,007	0,007	1,55	0,43
ZI	0,34±0,02	0,60±0,30	0,68±0,08	0,87±0,41	0,018±0,003	0,017±0,005	---	1,56±0,19
PO	0,33±0,05	1,12±0,49	0,59±0,05	0,70±0,28	0,023±0,002	0,028±0,007	---	1,86±0,47
CN	0,37±0,04	0,80±0,36	0,43±0,05	0,55±0,26	0,026±0,007	0,034±0,001	---	1,29±0,21
CA	0,61±0,04	3,21±1,21	0,83±0,10	0,81±0,20	0,021±0,014	0,015±0,002	2,62±0,17	0,80±0,10
PU	0,86±0,08	3,69±1,81	1,41±0,13	1,02±0,33	0,031±0,004	0,017±0,015	---	1,00±0,03

5.3.4 Índice de Condición

Para analizar el estado general de salud de los mejillones transplantados se midió el índice de condición. El índice de los mejillones provenientes de bahía Brown, a tiempo cero, prácticamente no varió entre los años de muestreo: $0,21 \pm 0,06$ en 2007 y $0,29 \pm 0,02$ en 2008 expresados en g tejido seco/g valva seca.

En verano de 2007 (**Fig. 72A**), promediando los tres tiempos de exposición, zona industrial presentó las medias más altas ($0,27 \pm 0,03$ g tejido seco/g valva seca) de este índice evidenciando un mejor estado de salud. En contraposición, club Náutico y península Ushuaia resultaron ser los sitios con los menores valores del índice de condición ($0,19 \pm 0,03$ g tejido seco/g valva seca para ambos lugares). Solamente se halló un efecto significativo de los sitios sobre este índice (ANOVA II factores, $p < 0,05$), siendo los valores medidos en zona industrial significativamente mayores que los de club Náutico. Los índices medidos en todos los sitios de bahía Ushuaia no resultaron diferentes del medido en bahía Brown.

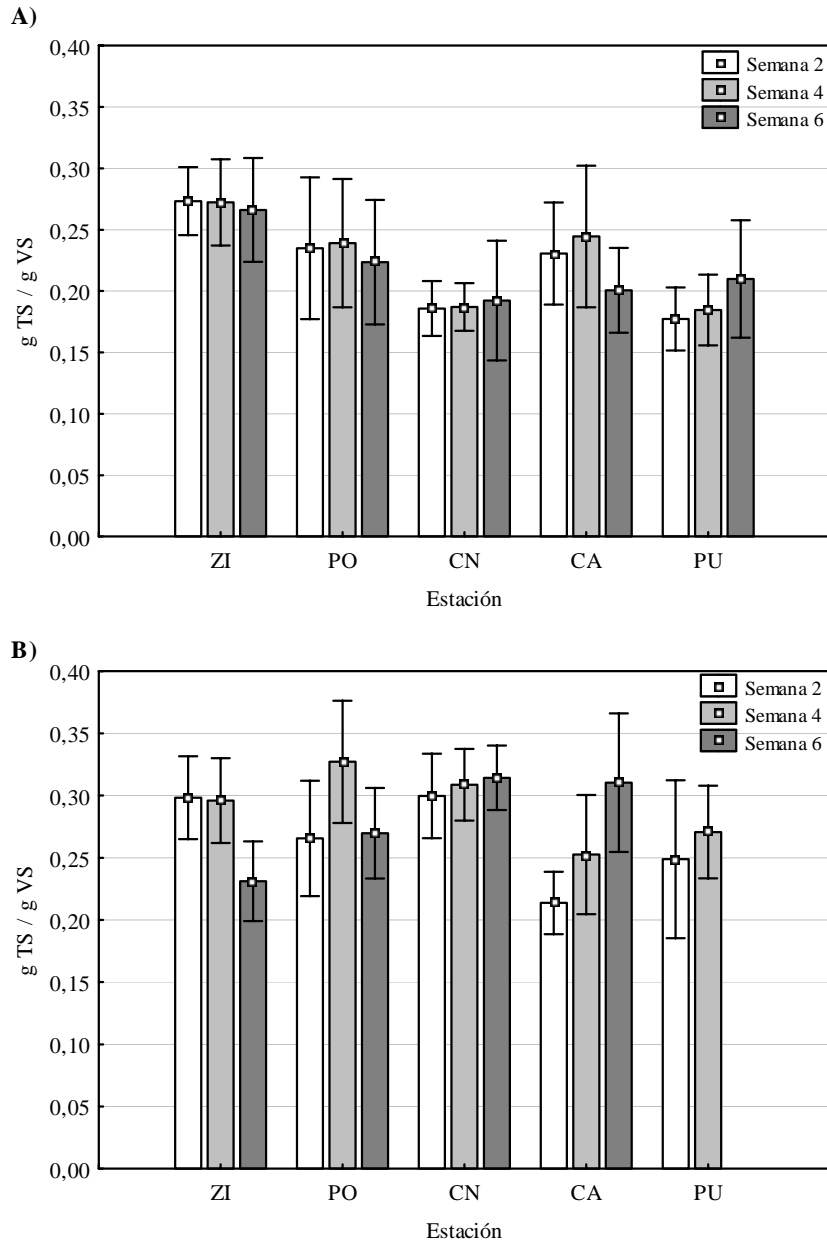


Figura 72. Valores de los índices de condición calculados para el mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en A) Verano 2007 y B) Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Los valores medios de los índices de condición de verano de 2008 (**Fig. 72B**), también se vieron afectados por los sitios únicamente (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Se encontró un mayor índice en los mejillones transplantados a club Náutico en relación a aquéllos de caleta Aspirante. Sólo en caleta Aspirante, en la semana 2, se observó una disminución de este índice respecto al tiempo cero, mientras que los demás casos de bahía Ushuaia no variaron respecto de bahía Brown.

5.3.5 Biomarcadores

5.3.5.1 Superóxido dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa en bahía Brown, a tiempo cero, en verano de 2007 en la branquia fue de $13,07 \pm 3,32$ U/mg prot., mientras que en 2008 fue de $4,04 \pm 0,35$ U/mg prot. La actividad en la glándula digestiva en 2007 fue $24,25 \pm 2,91$ U/mg prot., mientras que en el mismo órgano en el año 2008 fue $0,79 \pm 0,35$ U/mg prot. Se observó una disminución de la actividad en ambos órganos en el 2008, en referencia al 2007; siendo en la branquia de 69 % mientras que en glándula digestiva fue de 97 %.

Branquia. La actividad de superóxido dismutasa en branquia se presenta en la **Figura 73**. La actividad en el verano de 2007 (**Fig. 73A**), promediando todos los sitios y todos los tiempos fue de $1,12 \pm 0,71$ U/mg prot., un orden de magnitud menor que la registrada en bahía Brown. Se halló un efecto significativo de los tiempos de exposición y de los sitios sobre la actividad de la superóxido dismutasa (ANOVA II factores, $p < 0,05$), no encontrándose interacción entre los mismos ($p > 0,05$). En relación a los tiempos de experimentación, se registró un descenso significativo en la semana 4 respecto de la semana 2, produciéndose un posterior aumento hasta niveles semejantes a los de la semana 2. En cuanto a los sitios, la actividad medida en los mejillones transplantados a zona industrial fue mayor a la registrada en península Ushuaia, caleta Aspirante y planta Orión; mientras que en club Náutico fue mayor que en planta Orión.

En verano de 2008 (**Fig. 73B**) la actividad de superóxido dismutasa en la branquia tendió a ser más alta que en 2007, llegando a duplicar la actividad en varios casos. La interacción de los tiempos de exposición y los sitios resultó significativa sobre esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Excepto en península Ushuaia, la actividad de la superóxido dismutasa estuvo influenciada por los tiempos de exposición, encontrándose en los cuatro sitios diferente tipo de respuesta. Los sitios afectaron significativamente la actividad en los tres tiempos experimentales. En la semana 2, la actividad medida en los mejillones de península Ushuaia y zona industrial fue superior a la medida en club Náutico y planta Orión. En la semana 4, se registró menor actividad en los mejillones de caleta Aspirante y planta Orión que en el resto de los sitios. En la semana 6, en club Náutico se encontró la mínima actividad de superóxido dismutasa. Comparando la actividad medida en bahía Ushuaia respecto de la de bahía Brown se observó menor actividad en planta Orión (semana 2), club Náutico (semanas 2 y 6) y en caleta Aspirante (semanas 2 y 4), mientras que en la semana 6 en planta Orión la actividad se incrementó.

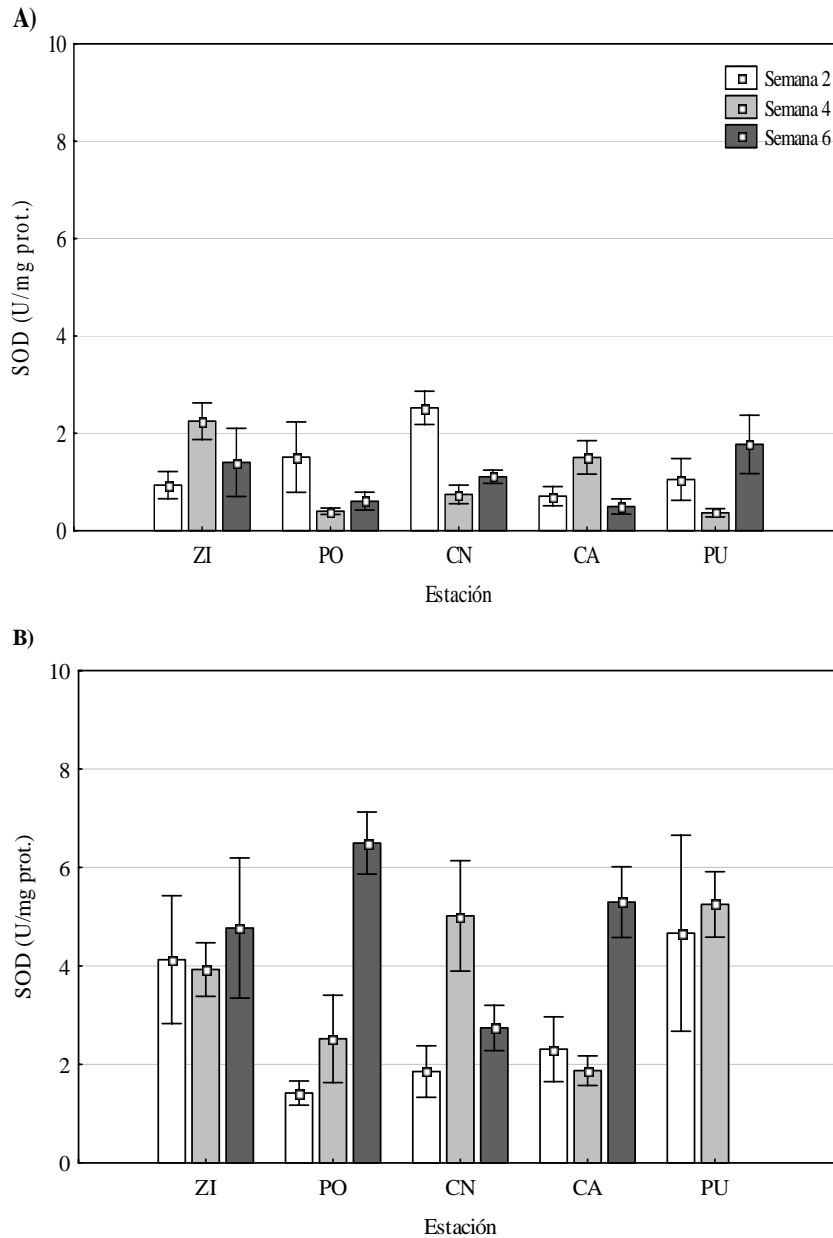


Figura 73. Actividad de superóxido dismutasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de la enzima superóxido dismutasa en glándula digestiva se muestra en la **Figura 74**. Promediando todos los sitios y los tres tiempos de exposición en 2007 (**Fig. 74A**) la actividad fue de $1,38 \pm 0,75$ U/mg prot., 94 % menor a la registrada en bahía Brown. Al igual que en la branquia, se halló un efecto significativo de los tiempos de exposición y los sitios sobre la actividad de esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Los mejillones transplantados a caleta Aspirante y planta Orión presentaron una

menor actividad que los de península Ushuaia y club Náutico. La actividad registrada en caleta Aspirante fue también a la medida en zona industrial. Con respecto al efecto del tiempo, se observó una disminución significativa en la semana 6, respecto de la semana 4.

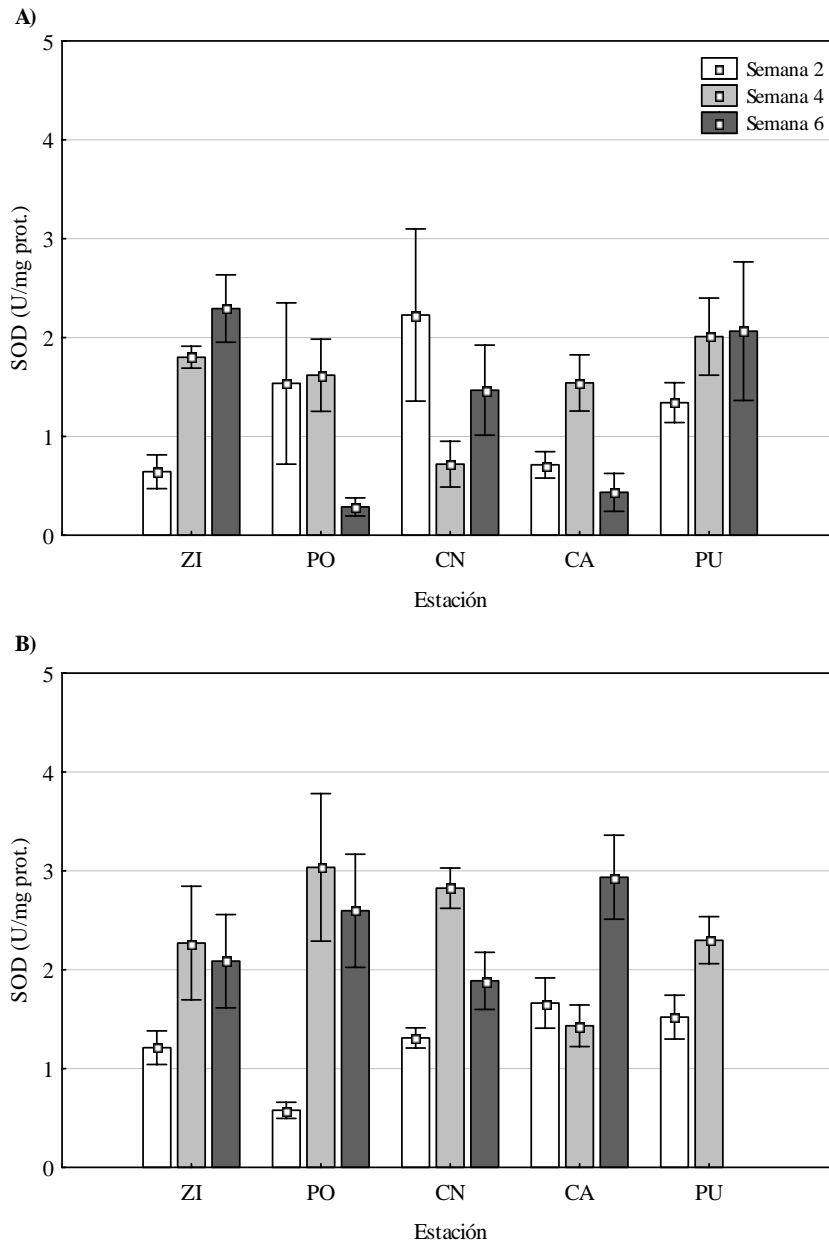


Figura 74. Actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En 2008 (**Fig. 74B**) la actividad en glándula digestiva fue del mismo orden de magnitud que en 2007 y tendió a ser menor a la medida en la branquia. La actividad de esta enzima estuvo influenciada por la interacción de los tiempos de exposición y los sitios

(ANOVA II factores, $p < 0,05$). En los cinco sitios estudiados se encontró un efecto significativo del tiempo de experimentación. En zona industrial, planta Orión y Club Náutico se halló un incremento significativo en las semanas 4 y 6 respecto de la semana 2. En caleta Aspirante el aumento se produjo en la semana 6, mientras que en península Ushuaia fue en la semana 4. Los sitios tuvieron efectos en todas las semanas de exposición, variando la respuesta en cada uno de los casos. En la semana 2, se registró en planta Orión la menor actividad de superóxido dismutasa. Además en zona industrial y club Náutico, la actividad resultó menor a la medida en los mejillones de caleta Aspirante. En la semana 4, los mejillones de caleta Aspirante presentaron actividad significativamente menor que en los demás sitios. En la semana 6, la actividad en club Náutico fue menor que en caleta Aspirante.

5.3.5.2 Catalasa

La actividad estival de catalasa en bahía Brown, a tiempo cero, en la branquia fue de $17,17 \pm 1,24$ U/mg prot. en 2007 y $2,10 \pm 0,88$ U/mg prot. en 2008. La actividad en la glándula digestiva en 2007 fue $30,16 \pm 2,88$ U/mg prot., mientras que en el mismo órgano en el año 2008 fue $3,25 \pm 1,54$ U/mg prot. Tanto en la branquia como en la glándula digestiva, la actividad de catalasa en 2008 fue 88 % menor que la medida en 2007.

Branquia. En la **Figura 75** se muestra la actividad de catalasa en la branquia. En 2007 (**Fig. 75A**) se encontró la actividad de dicha enzima dependía de los tiempos de exposición como de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Con respecto al tiempo, se registró un incremento significativo en la semana 4, con un posterior descenso hasta niveles inferiores a los de la semana 2. En cuanto a los sitios, la actividad medida en zona industrial resultó ser significativamente la más alta. Los mejillones de club Náutico y península Ushuaia presentaron mayor actividad de catalasa que los de planta Orión. La actividad medida en todos los sitios de bahía Ushuaia fue notablemente menor a la correspondiente a tiempo cero en bahía Brown.

En verano de 2008 (**Fig. 75B**), solamente el tiempo de exposición tuvo un impacto significativo sobre la actividad de la catalasa (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Se encontró un descenso progresivo al incrementarse el período de exposición. La magnitud de la actividad en 2008 fue del mismo orden que en el año anterior, sin considerar el pico máximo de zona industrial en el 2007, y mayor que la actividad correspondiente al tiempo cero en bahía Brown.

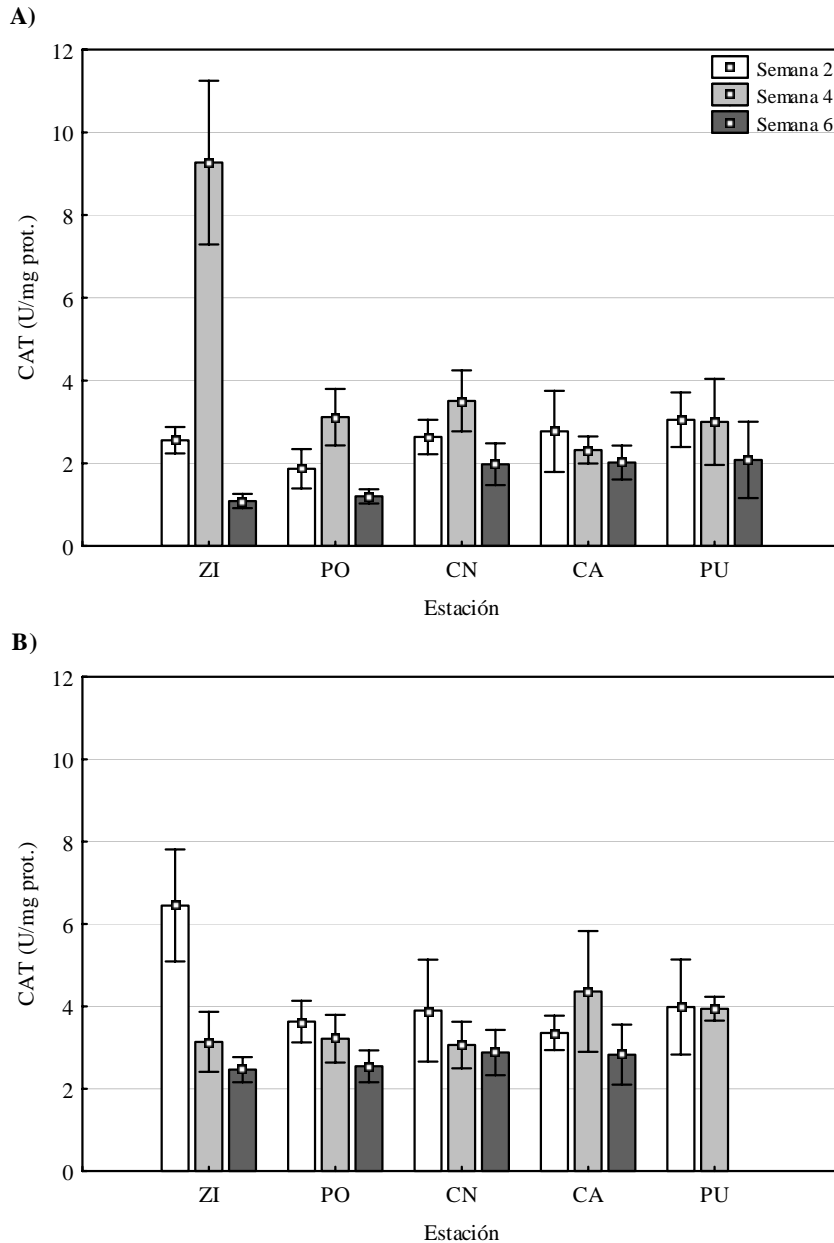


Figura 75. Actividad de catalasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de catalasa en la glándula digestiva en ambos veranos (**Fig. 76**) tendió a duplicar la actividad medida en la branquia. En 2007 (**Fig. 76A**), el ANOVA de II factores reveló un efecto significativo de los tiempos de exposición y de los sitios sobre la catalasa. Al igual que en la branquia, la mayor actividad de midió en los mejillones transplantados a zona industrial. La actividad medida en los organismos transplantados a península Ushuaia fue mayor que la que presentaron los organismos de club

Náutico y planta Orión. La respuesta temporal en la glándula digestiva fue igual que en la branquia: un aumento significativo en la semana 4, seguido de un descenso en la semana 6 hasta niveles menores a los registrados en la semana 2. Sin considerar el pico de actividad medido en zona industrial, la actividad de catalasa registrada en bahía Ushuaia fue mucho menor a la de bahía Brown.

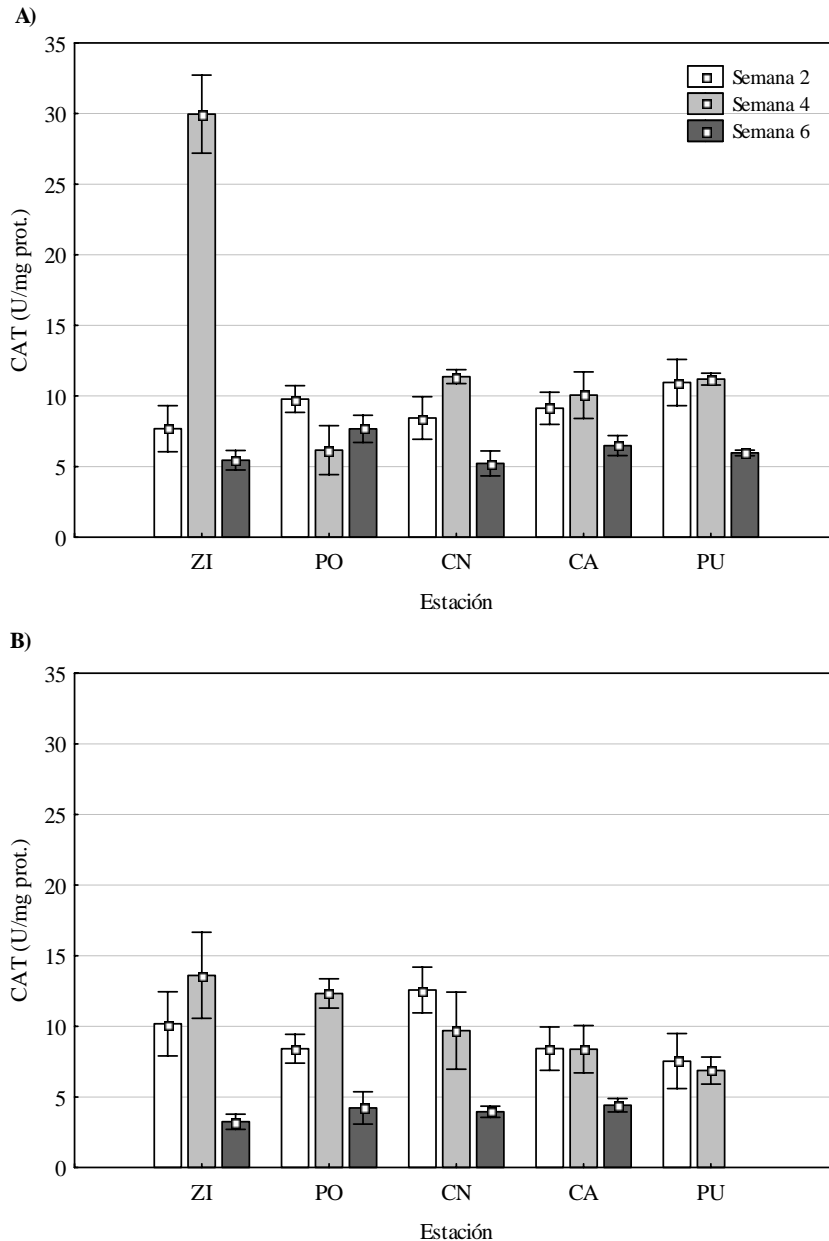


Figura 76. Actividad de catalasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En verano de 2008 (**Fig. 76B**), también se halló un efecto significativo del tiempo sobre la actividad de la catalasa. En la semana 6 se registró una disminución significativa en

la actividad de dicha enzima, con respecto a las semanas 2 y 4. Las actividades medidas en los cinco sitios estudiados, en las semanas 2 y 4, fueron superiores a la de bahía Brown.

5.3.5.3 Glutación-S-transferasa

La actividad de glutación-S-transferasa en bahía Brown, a tiempo cero, en 2007 en la branquia fue de $0,96 \pm 0,16$ U/mg prot., mientras que en 2008 fue de $0,14 \pm 0,02$ U/mg prot. La actividad en la glándula digestiva en 2007 fue $0,41 \pm 0,09$ U/mg prot., mientras que en el mismo órgano en el año 2008 fue $0,08 \pm 0,03$ U/mg prot. En la branquia como en la glándula digestiva, la actividad de glutación-S-transferasa fue menor en 2008 en un 85 y 81 % respectivamente. En ambos años de experimentación, la actividad de glutación-S-transferasa en la branquia fue mayor que en la glándula digestiva.

Branquia. La **Figura 77** muestra la actividad de la enzima glutación-S-transferasa en la branquia. En el año 2007 (**Fig. 77A**), se pudo observar que los tiempos de exposición y los sitios afectaron la actividad de esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al igual que en la catalasa, se encontró en los mejillones transplantados a zona industrial mayor actividad que en sitios restantes. La actividad medida en club Náutico resultó superior a la de planta Orión. En cuanto al efecto temporal, se registró un incremento significativo en la semana 4, que estuvo seguido de una disminución significativa, siendo ambas actividades mayores a la correspondiente a la semana 2. Todos los sitios de bahía Ushuaia mostraron actividad de glutación-S-transferasa notablemente menores a la de tiempo cero en bahía Brown.

En el año 2008 (**Fig. 77B**), la actividad de glutación-S-transferasa estuvo afectada por los tiempos de exposición y por los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Respecto al factor temporal, se registró un aumento significativo de la actividad enzimática en la semana 4 que estuvo seguido por una disminución hasta valores significativamente superiores a los de la semana 2. En cuanto a los sitios, los mejillones transplantados a club Náutico presentaron la menor actividad. Contrariamente, los organismos de zona industrial y planta Orión mostraron actividades significativamente más altas que los provenientes de los tres sitios restantes. Al momento de comparar las actividades medidas en bahía Ushuaia con la de bahía Brown, diferencias se encontraron en club Náutico en las semanas 2 y 6 donde hubo un descenso, mientras que en zona industrial (semanas 4 y 6) y en planta Orión (semana 4) la actividad se incrementó.

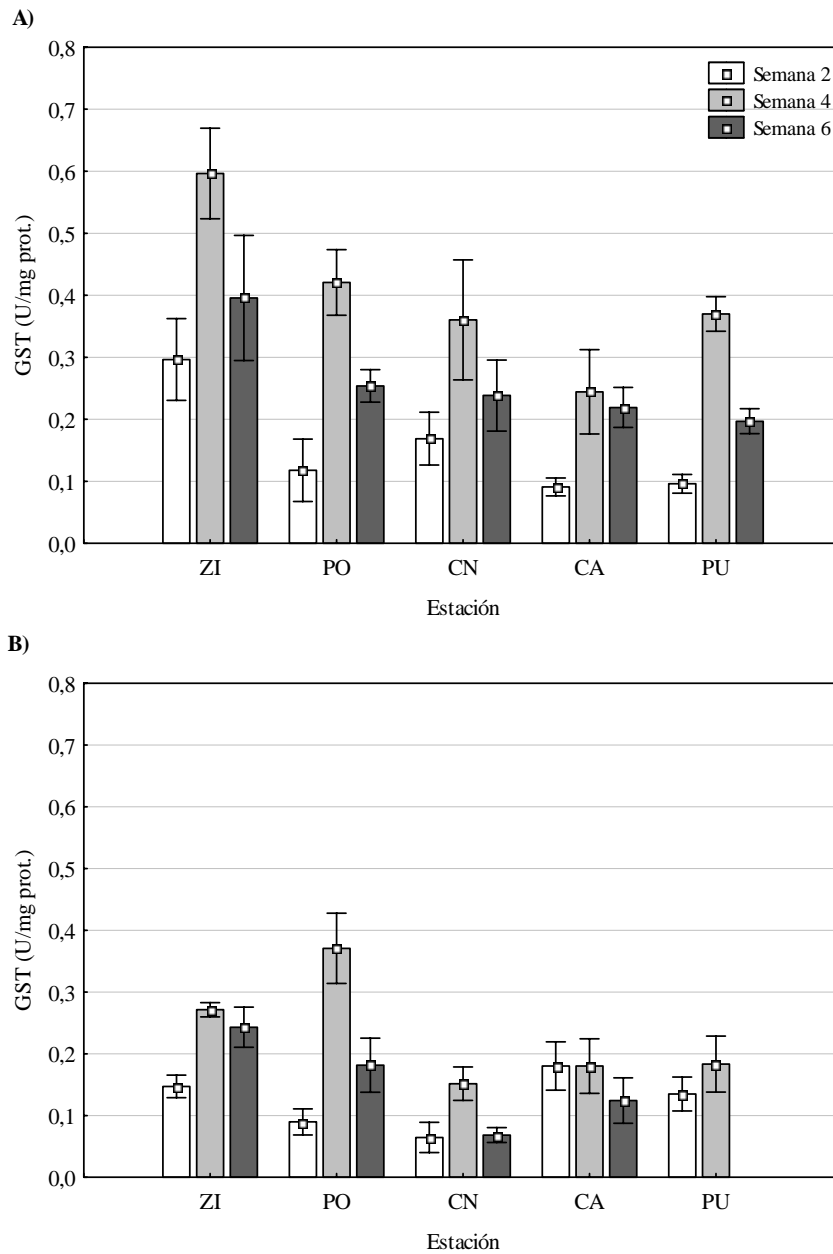


Figura 77. Actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva (**Fig. 78**) fue mucho menor que la medida en la branquia en todos los sitios. En 2007 (**Fig. 78A**), se encontró una interacción significativa entre los tiempos de experimentación y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Con la única excepción de los mejillones transplantados a club Náutico, en el resto de los casos se halló un efecto significativo del tiempo sobre la actividad de esta enzima. La tendencia fue de mayor actividad en la semana 4, excepto en

península Ushuaia, donde la actividad en la semana 6 fue mayor a la registrada en las semanas anteriores. En cuanto a los sitios, se observó el mismo tipo de respuesta en las semanas 2 y 4: la mayor actividad en los mejillones de zona industrial y la menor, en caleta Aspirante y península Ushuaia. No se halló efecto de los sitios en la actividad medida en la semana 6. En concordancia con los resultados correspondientes a la branquia, la actividad en glándula digestiva de todos los sitios de bahía Ushuaia resultaron menores a la de bahía Brown.

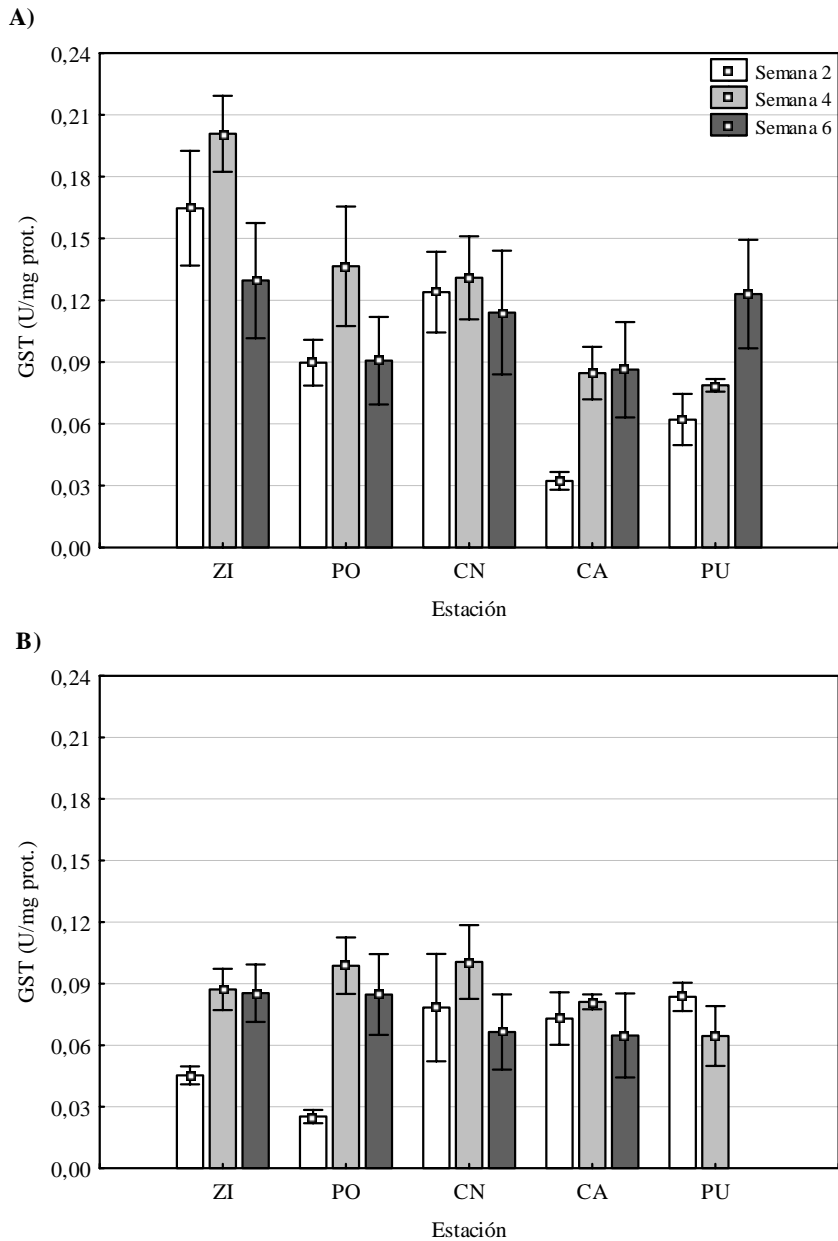


Figura 78. Actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En 2008 (**Fig. 78B**) la actividad de glutatión-S-transferasa fue menor que en 2007, en concordancia con los resultados obtenidos en la branquia. El tiempo de exposición fue el único factor que ejerció un efecto significativo sobre esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En las semanas 4 y 6 se produjo un incremento significativo de la actividad de glutatión-S-transferasa, en comparación con la semana 2 de exposición. Con la única excepción de la actividad medida en planta Orión en la semana 2, que resultó menor a la de bahía Brown, el resto de los sitios de bahía Ushuaia no se diferenciaron del tiempo cero.

5.3.5.4 Peroxidación de lípidos

En bahía Brown, a tiempo cero, los niveles de peroxidación lipídica en la branquia en verano de 2007 fueron de $13,33 \pm 2,06 \mu\text{mol/mg prot.}$, mientras que en 2008 fueron de $5,34 \pm 1,33 \mu\text{mol/mg prot.}$ En la glándula digestiva, la peroxidación registrada en 2007 fue $4,25 \pm 0,40 \mu\text{mol/mg prot.}$, mientras que en 2008 fue $5,88 \pm 1,25 \mu\text{mol/mg prot.}$ En la branquia, se registró un descenso del 60 % en este parámetro en 2008 en relación al 2007. En la glándula digestiva se registró un aumento del 38 % en 2008, respecto del 2007. La peroxidación lipídica fue mayor en la branquia que en la glándula digestiva en 2007, mientras que en 2008 no hubo diferencias.

Branquia. En la **Figura 79** se presentan los resultados de peroxidación lipídica en la branquia. En verano de 2007 (**Fig. 79A**), se halló un efecto significativo de la interacción entre tiempos y sitios sobre este parámetro. El efecto del tiempo fue significativo en los mejillones transplantados a club Náutico y caleta Aspirante. En el primer caso, hubo un aumento significativo en la semana 4 respecto de la semana 2. En el segundo caso, el aumento se produjo en la semana 6, siendo los niveles mayores a los medidos en las semanas 2 y 4. El efecto de los sitios fue significativo en los tres tiempos pautados. En la semana 2, los niveles más bajos de malondialdehído se midieron en los mejillones de zona industrial. Los niveles de peroxidación lipídica medidos en península Ushuaia resultaron mayores a los de planta Orión. En la semana 4, también se midieron los menores niveles de peroxidación de lípidos en zona industrial. Los niveles de malondialdehído medidos en club Náutico fueron superiores a los correspondientes a caleta Aspirante y planta Orión. En la semana 6, la peroxidación lipídica medida en zona industrial fue menor a la medida en caleta Aspirante, club Náutico y península Ushuaia. La peroxidación lipídica medida en todos los sitios de bahía Ushuaia fue menor en comparación con el valor de bahía Brown.

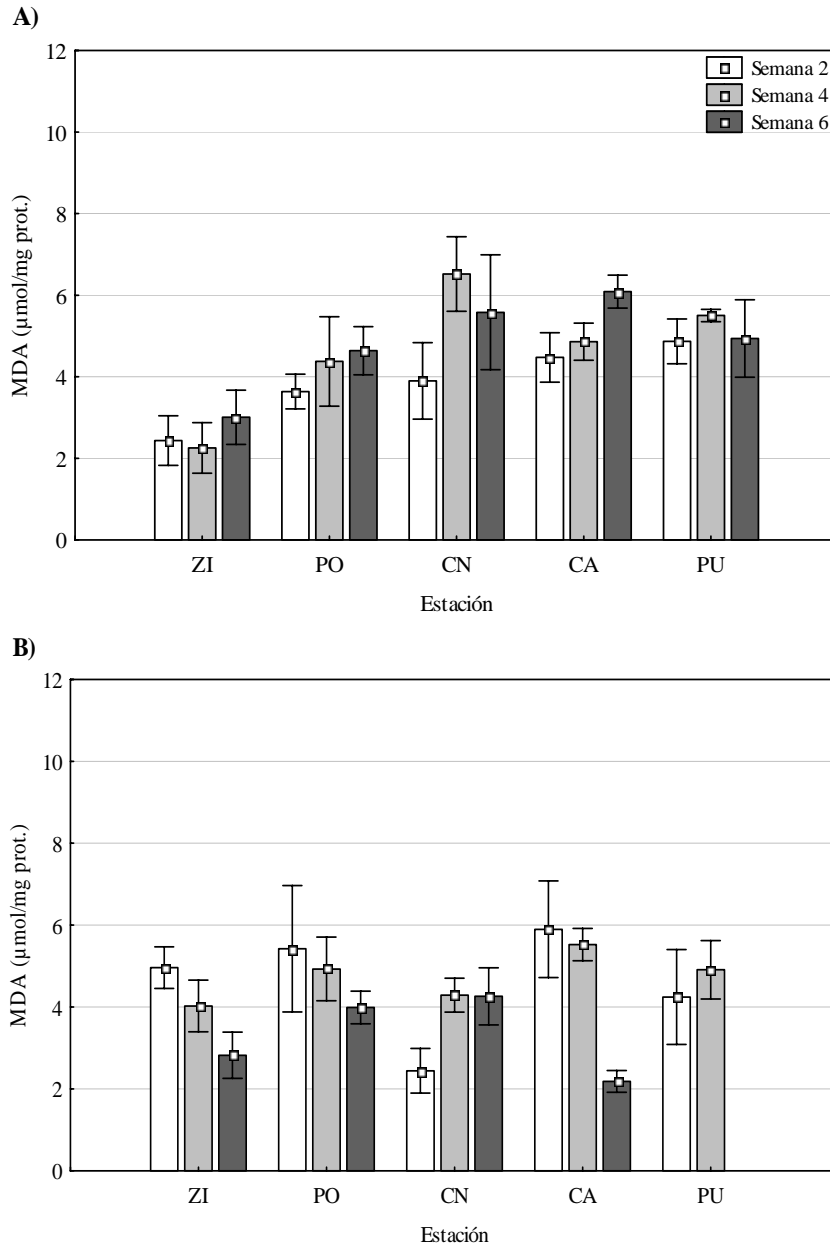


Figura 79. Niveles de malondialdehído en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantedo a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En verano de 2008 (**Fig. 79B**) los niveles de peroxidación lipídica estuvieron en el mismo orden de magnitud que en 2007. El ANOVA de II factores evidenció un efecto significativo de los tiempos como de los sitios ($p < 0,05$) sobre este parámetro. En cuanto al factor temporal, se halló una disminución significativa en los niveles de malondialdehído en los mejillones transplantedos a planta Orión, en comparación con los de zona industrial y club Náutico. En cuanto al efecto de los tiempos de experimentación, se registró una disminución

significativa de la peroxidación lipídica en la semana 6, respecto de las semanas 2 y 4. Al comparar la peroxidación lipídica registrada en bahía Ushuaia con la de bahía Brown, se observó un descenso de la concentración de malondialdehído en zona industrial y caleta Aspirante en la semana 6 y en club Náutico en la semana 2.

Glándula digestiva. La **Figura 80** muestra los niveles de peroxidación de lípidos en la glándula digestiva. En 2007 (**Fig. 80A**), al igual que en la branquia, se encontró un efecto significativo de la interacción entre los tiempos y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En los mejillones de zona industrial fue el único caso donde no se halló efecto del tiempo sobre la peroxidación. En los cuatro casos restantes, la respuesta no mostró una tendencia definida. Con respecto a los sitios, el efecto fue significativo en las semanas 2 y 4. En la semana 2, los niveles de peroxidación medidos en planta Orión fueron mayores a los cuatro sitios restantes. La peroxidación medida en los mejillones de península Ushuaia y club Náutico fue superior a al valor registrado en zona industrial. En la semana 4, los mejillones de zona industrial presentaron los menores niveles de malondialdehído. En península Ushuaia se encontraron mayores niveles de peroxidación de lípidos que en caleta Aspirante. Cuando se compararon los resultados obtenidos en bahía Ushuaia con el correspondiente a bahía Brown, se observó que en zona industrial (semanas 2, 4 y 6) y en club Náutico (semana 6) las concentraciones de malondialdehído disminuyeron. Sin embargo, en planta Orión, club Náutico y península Ushuaia (semana 4) y en planta Orión (semana 2), los niveles de peroxidación resultaron mayores al tiempo cero.

En cuanto a los resultados obtenidos en glándula digestiva en 2008 (**Fig. 80B**), se encontró un efecto significativo de los tiempos de exposición y de los sitios sobre la peroxidación de lípidos (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Con respecto al tiempo, se observó un incremento significativo en la semana 4, seguido de un gran descenso en la semana 6, hasta valores menores a los de la semana 2. En cuanto a los sitios, en los mejillones transplantados a club Náutico se midieron los niveles más bajos de malondialdehído; contrariamente, en península Ushuaia se registraron los valores más altos. Cuando se comparan los niveles de peroxidación lipídica medidos en bahía Ushuaia con los de bahía Brown, en la mayoría de los casos se observó un descenso, aumentando sólo en península Ushuaia en la semana 4. Comparando los resultados obtenidos en ambos años de muestreo en la branquia y la glándula digestiva, los valores de malondialdehído fueron del mismo orden de magnitud.

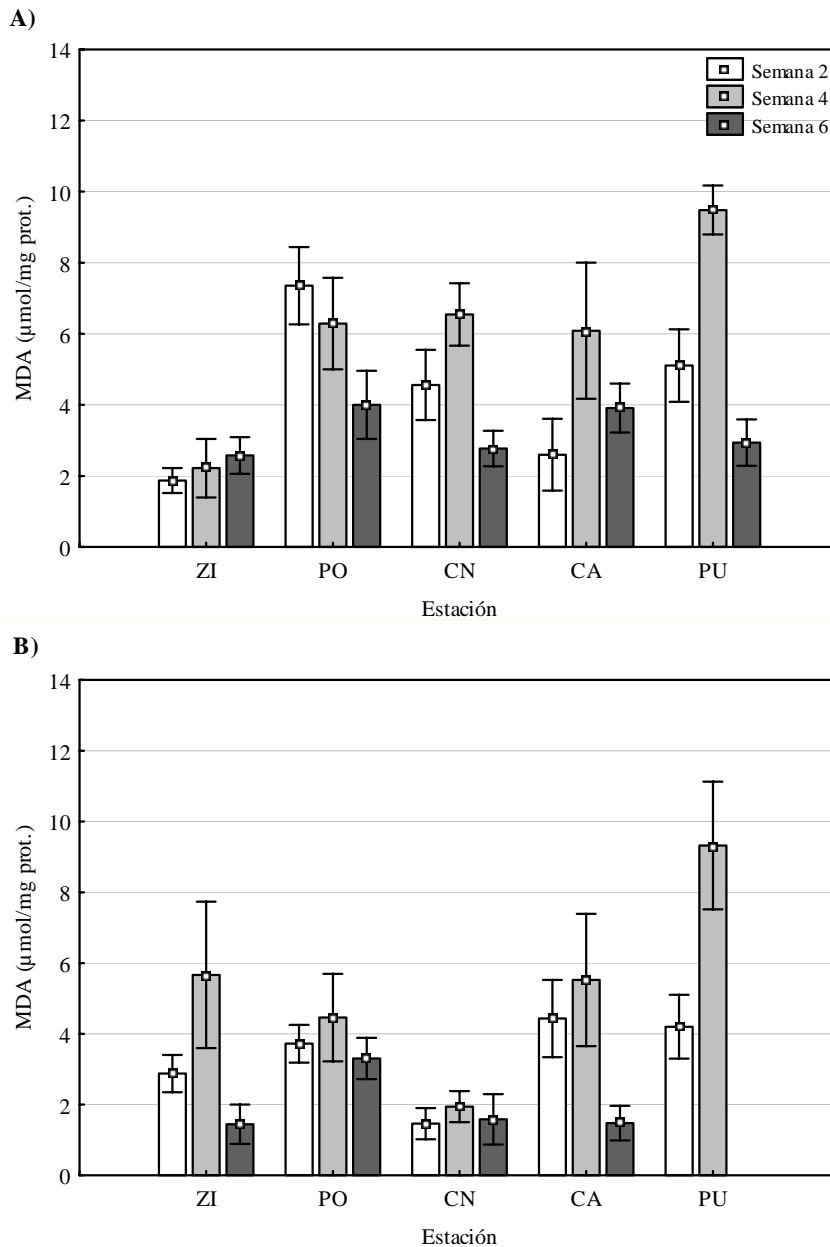


Figura 80. Niveles de malondialdehído en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO), club Náutico (CN), caleta Aspirante (CA) y península Ushuaia (PU) por 2, 4 y 6 semanas en **A)** Verano 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

5.4 Relación entre parámetros físicos, químicos y biológicos

Un análisis de componentes principales (ACP) reveló que los cuatro primeros componentes explican el 60,43 % de la varianza total. La **Tabla 22** contiene el aporte de las variables originales a cada componente. El CP1 estuvo representado, con signo negativo, por: el pH, el índice de condición, el contenido de Cu (en la branquia y la glándula digestiva) y el Fe (en la branquia); y con signo positivo, por el oxígeno disuelto. El CP2 estuvo explicado

por los biomarcadores, con signo positivo. El CP3 estuvo representado por el fosfato, silicato, amonio y materia orgánica particulada, con signo positivo. La clorofila, con signo negativo, explicó el CP4.

Tabla 22. Análisis de componentes principales llevado a cabo con los datos correspondientes a los inviernos de 2007 y 2008. Aporte de las variables originales a los cuatro primeros componentes. Branquia (B), Glándula digestiva (GD)

VARIABLES	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4
CAT B	0,22	0,89	0,10	0,11
CAT GD	0,27	0,70	0,12	-0,13
GST B	0,44	0,75	0,11	-0,06
GST GD	0,45	0,77	0,26	-0,10
SOD B	-0,15	0,82	0,02	0,06
SOD GD	0,26	0,89	0,17	-0,02
LPO B	0,35	0,68	0,13	0,21
LPO GD	0,22	0,04	-0,14	-0,01
LIP M	0,19	-0,25	0,16	0,39
LIP GD	0,54	0,29	-0,21	-0,21
Índice Condición	-0,79	0,12	-0,11	-0,11
Ceniza	0,35	-0,18	0,23	-0,08
Cu B	-0,71	0,21	0,06	-0,49
Zn B	-0,56	0,02	0,29	-0,06
Fe B	-0,71	0,08	0,20	-0,07
Cd B	0,34	-0,29	0,29	-0,43
Cu GD	-0,77	0,17	0,09	-0,34
Zn GD	-0,66	0,23	0,07	-0,49
Fe GD	-0,03	-0,17	0,31	0,01
Cd GD	0,56	-0,49	0,02	-0,18
Nitrito	0,27	-0,21	0,32	0,02
Nitrato	-0,63	0,08	0,51	-0,26
Fosfato	-0,07	0,18	0,69	0,13
Silicato	-0,07	-0,22	0,84	0,39
Amonio	0,04	-0,22	0,88	0,26
Clorofila	0,37	-0,27	0,00	-0,65
MOP	-0,09	-0,03	0,84	-0,20
pH	-0,85	0,13	-0,22	0,18
Temperatura	0,44	-0,34	0,40	-0,41
Oxígeno disuelto	0,85	-0,07	0,04	-0,22
Salinidad	0,34	0,09	-0,05	-0,46
Eigenvalue	7,05	5,46	3,87	2,35
% Varianza total	22,74	17,60	12,49	7,59

En la **Figura 81** puede observarse la ubicación de los sitios de estudio según el ordenamiento del ACP. Considerando los ejes 1 y 2, en el experimento de 2007 se separó bahía Brown del resto de los casos con mayor actividad de los biomarcadores y con valores de oxígeno disuelto levemente mayores. Los demás casos se presentaron relativamente agrupados para cada experimento sin alejarse del promedio. Según el eje 3, pudo observarse que club Náutico se alejó del resto de los sitios por las mayores concentraciones de fosfato,

silicato, amonio y materia orgánica. Según el eje 4, se observó el desplazamiento de zona industrial y club Náutico por la mínima salinidad presentada en el experimento de 2008. Estos dos últimos ejes evidencian el aporte de agua dulce desde los pluviales, el arroyo Grande y la bahía Encerrada.

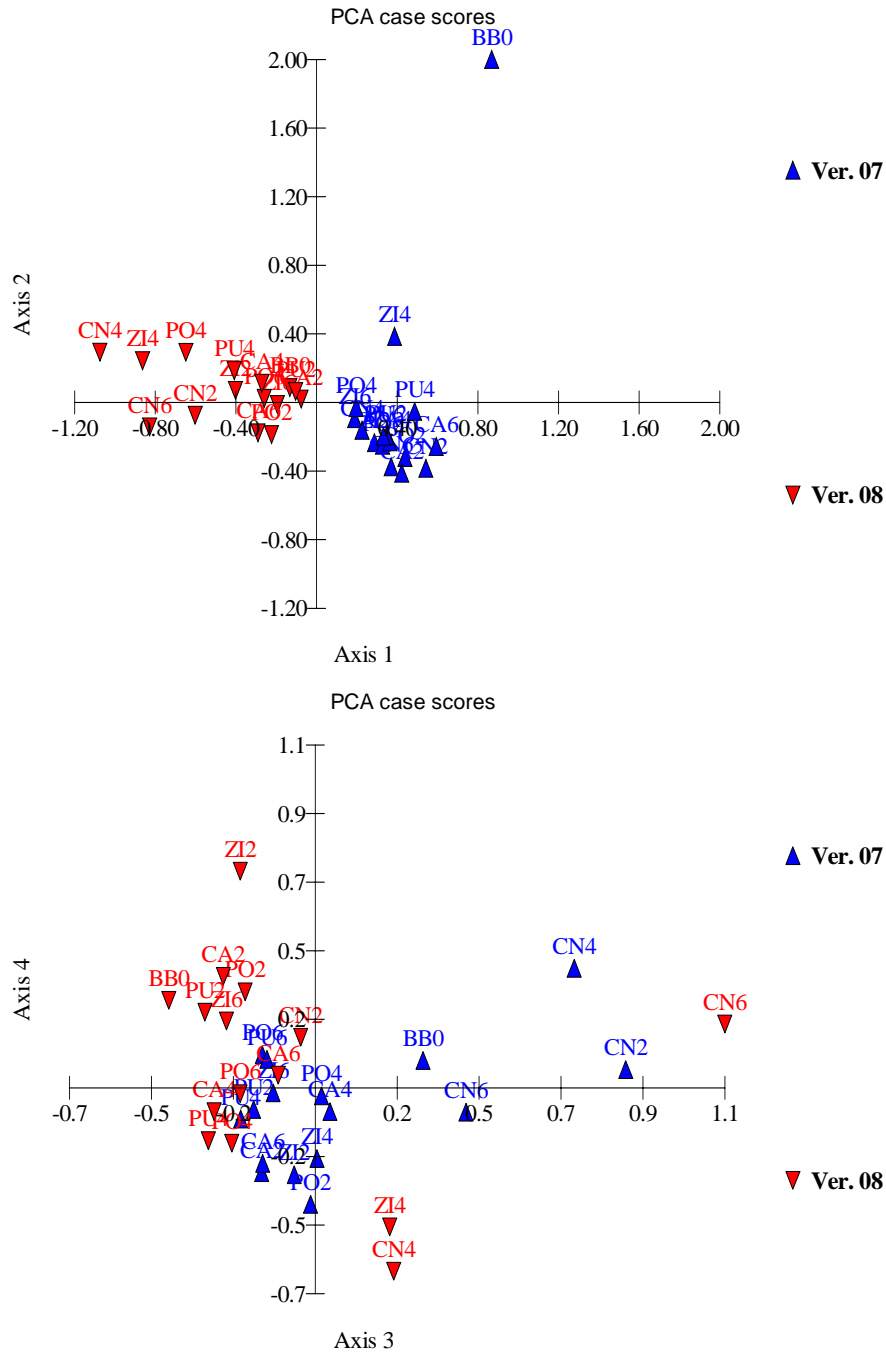


Figura 81. Ubicación de los sitios de muestreo según el análisis de componentes principales.

Se efectuó un análisis de correlación de Pearson con el fin de detectar relaciones entre las variables ambientales y los parámetros físicos y químicos con una base estadística. En la **Tabla 23** se presentan los coeficientes de correlación, siendo de especial interés en este estudio los que se encuentran dentro del recuadro. Correlaciones altamente positivas se encontraron en los biomarcadores enzimáticos entre sí y con la peroxidación lipídica en la branquia. La enzima glutatión-S-transferasa, en ambos órganos, correlacionó positivamente con los niveles de lípidos en la glándula digestiva y con el oxígeno disuelto y, de manera negativa, con el pH. El índice de condición presentó correlaciones negativas con la mayoría de los metales pesados y con el oxígeno disuelto, y correlaciones positivas, con el pH y el nitrito.

Tabla 23. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables físico-químicas y biológicas.

	CAT B	CAT GD	GST B	GST GD	SOD B	SOD GD	LPO B	LPO GD	LIP M	LIP GD	IC	Cenizas	Cu B	Zn B	Fe B	Cd B	Cu GD	Zn GD	Fe GD	Cd GD	Nitratos	Fosfatos	Silicatos	Amonio	Clorofila	MOP	pH	Temp.	OD	Salin.	
CAT B	1,00																														
CAT GD	0.84	1,00																													
GST B	0.74	0.73	1,00																												
GST GD	0.78	0.70	0.90	1,00																											
SOD B	0.69	0.36	0.42	0.55	1,00																										
SOD GD	0.85	0.61	0.74	0.80	0.80	1,00																									
LPO B	0.65	0.42	0.56	0.58	0.49	0.76	1,00																								
LPO GD	-0,03	0,04	0,10	-0,06	-0,10	0,00	0,31	1,00																							
LIP M	-0,25	-0,18	0,02	-0,07	-0,24	-0,15	0,03	0,07	1,00																						
LIP GD	0,26	0,25	0.36	0.36	0,21	0,32	0,32	0.37	-0,16	1,00																					
IC	-0,03	-0,07	-0,20	-0,21	0,22	-0,12	-0.40	-0,35	-0,26	-0.38	1,00																				
Cenizas	0,05	0,31	0,14	0,09	-0,32	-0,16	-0,20	0,24	0,06	0,09	-0,32	1,00																			
Cu B	-0,06	0,03	-0,03	-0,09	0,22	-0,01	-0,19	0,06	-0,19	-0,23	-0.57	-0,11	1,00																		
Zn B	-0,03	-0,17	-0,22	-0,16	0,26	0,01	-0,26	-0,30	0,03	-0.40	-0.58	-0,15	0.36	1,00																	
Fe B	-0,10	0,00	-0,03	-0,16	0,12	-0,07	-0,23	-0,30	-0,25	-0.36	-0.56	-0,23	0.45	0.38	1,00																
Cd B	-0,12	-0,03	-0,11	0,03	-0,23	-0,03	-0,11	0,03	-0,02	0,01	-0,28	0,15	-0,12	0,12	-0,14	1,00															
Cu GD	-0,09	-0,04	-0,11	-0,18	0,19	-0,06	-0,13	0,06	-0,15	-0,31	-0.57	-0,16	0.96	0.37	0.46	-0,20	1,00														
Zn GD	-0,10	0,00	-0,03	-0,07	0,17	-0,01	-0,06	0,03	-0,17	-0,09	-0.49	-0,23	0.88	0,21	0.48	-0,22	0.83	1,00													
Fe GD	-0,13	0,16	0,09	-0,04	-0,35	-0,23	-0,11	0,25	0,04	-0,21	-0,09	0,23	0,13	-0,12	0,06	0,05	0,15	0,12	1,00												
Cd GD	-0,24	-0,11	-0,18	-0,15	-0.41	-0,27	-0,15	-0,03	0,08	0,25	-0.45	0,21	-0.44	-0,21	-0.43	0.41	-0.44	-0.45	0,06	1,00											
Nitratos	-0,18	-0,04	0,06	0,05	-0,20	-0,05	-0,04	0,12	0,13	0,12	-0,16	0,05	-0,17	-0,15	-0,10	0,06	-0,19	-0,17	0.49	0,21	1,00										
Nitratos	-0,07	-0,04	-0,16	-0,12	0,13	-0,02	-0,09	-0,13	-0,20	-0,29	0.43	-0,17	0.56	0.54	0.44	-0,02	0.56	0.66	0.22	-0,33	-0,03	1,00									
Fosfatos	0,20	0,01	0,11	0,24	0,20	0,30	0,20	-0,12	0,03	-0,04	0,06	-0,02	0,00	0.43	0,16	0,17	0,03	-0,04	-0,13	-0,08	0,06	0.44	1,00								
Silicatos	-0,07	-0,14	-0,11	-0,02	-0,12	-0,10	0,02	-0,13	0,28	-0,20	-0,12	0,22	-0,09	0,14	0,15	0,08	0,02	-0,09	0,29	0,00	0,25	0,30	0.55	1,00							
Amonio	-0,10	-0,11	-0,06	0,04	-0,15	-0,08	0,07	-0,01	0.36	-0,22	-0,24	0,31	-0,09	0,14	0,07	0,13	0,03	-0,08	0,29	0,08	0,28	0.52	0.94	1,00							
Clorofila	-0,17	-0,03	-0,04	0,01	-0,28	-0,09	-0,10	-0,18	-0,16	0,16	-0,21	0,12	-0,11	-0,17	-0,16	0.44	-0,18	-0,02	-0,17	0.46	0,04	-0,16	-0,19	-0,17	-0,08	1,00					
MOP	0,02	0,08	-0,06	0,15	0,02	0,09	0,13	-0,17	0,03	-0,14	-0,10	0,06	0,12	0,15	0,35	0,22	0,14	0,28	0,23	0,02	0,26	0.56	0.43	0.64	0.71	0,19	1,00				
pH	-0,02	-0,16	-0.42	-0.41	0,27	-0,14	-0,19	-0,10	-0,27	-0,32	0.67	-0.37	0.50	0.40	0.58	-0.44	0.58	-0.44	0.43	-0,16	-0.53	-0,36	0,35	-0,01	-0,08	-0,20	-0.45	-0,09	1,00		
Temp.	-0,17	-0,06	-0,08	0,11	-0,21	-0,03	-0,19	-0,13	-0,09	0,09	-0,29	0.37	-0,23	0,00	-0,27	0.59	-0.38	-0.59	-0,07	0.53	0,33	-0,43	-0,01	-0,10	-0,01	0.52	-0,03	-0.81	0.46	1,00	
OD	0,03	0,14	0.37	0.38	-0,19	0,18	0,22	0,15	0,25	0.55	-0.59	0,23	-0.49	-0.42	-0.61	0.38	-0.59	-0.38	-0,07	0.53	0,33	-0,43	-0,01	-0,10	-0,01	0.52	-0,03	-0.81	0.46	1,00	
Salin.	-0,04	0,12	0,29	0,28	-0,05	0,15	0,11	0,26	0,11	0,28	-0,33	0,10	0,01	-0,11	-0,20	0,15	-0,05	0,03	-0,02	0,12	0,09	-0,09	-0,06	-0.39	-0,11	0,21	0,07	-0.41	0,18	0,26	1,00

Abreviaciones: Branquia (B), Glándula digestiva (GD), Índice de condición (IC), Materia orgánica particulada (MOP), Temperatura (Temp.), Oxígeno disuelto (OD), Salinidad (Salin.).

Los valores en rojo corresponden a correlaciones altamente significativas ($p < 0,01$) y los que están en negrita a correlaciones significativas ($p < 0,05$).

Capítulo 6

Resultados

TRANSPLANTES

INTENSIVOS

Considerando que en el experimento de verano de 2007 se observó una disminución de todos los biomarcadores en la semana 2 respecto de la condición inicial, se decidió incluir además del experimento de 6 semanas de duración correspondiente al invierno de 2007, muestreos en los días 2, 5, 8 y 11 para explorar qué ocurría en tiempos más cortos de exposición. Los mismos fueron denominados “*transplantes intensivos*”. Se acotó el monitoreo a tres sitios de bahía Ushuaia y en las muestras se determinó actividad enzimática y peroxidación lipídica. En el verano de 2008, se repitió el transplante intensivo. El largo promedio de los individuos empleados fue de $56,72 \pm 5,15$ mm.

6.1 Determinaciones en agua

Para todas las variables medidas, los datos corresponden a bahía Brown a tiempo cero y a tres sitios seleccionados dentro de bahía Ushuaia: zona industrial, planta Orión y club Náutico a 2, 5, 8 y 11 días de transplantedados, en invierno de 2007 y en verano de 2008.

6.1.1 Parámetros físicos

pH. La **Figura 82** muestra los datos de pH. En bahía Brown el pH fue de 7,87 en invierno y 8,46 en verano. Puede observarse una notable homogeneidad entre los sitios de bahía Ushuaia y a lo largo del tiempo de duración de cada experimento: $7,82 \pm 0,07$ en invierno y $8,37 \pm 0,05$ en verano. En ambos experimentos, en club Náutico se registraron valores levemente más bajos de pH. La diferencia entre 0,42 y 0,65 unidades de pH entre verano e invierno, puede deberse a la mayor actividad fotosintética en verano en esta zona.

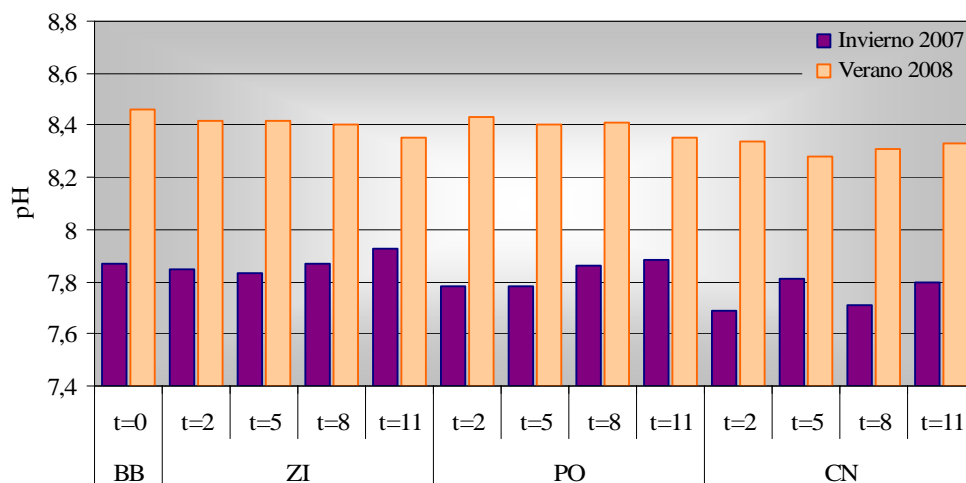


Figura 82. pH medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y en zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) en los días 2, 5, 8 y 11 en Invierno 2007 (violeta) y Verano 2008 (naranja).

Temperatura. La distribución en el tiempo de la temperatura (°C) se muestra en la **Figura 83**. Pueden observarse marcadas diferencias entre verano ($8,5 \pm 1,0$ °C) e invierno ($4,9 \pm 0,4$ °C). En el experimento de verano, se registró un incremento de temperatura en los tres sitios de bahía Ushuaia de más de 2 °C desde el día 5 al día 11 del experimento. En invierno, se observó un aumento leve y gradual de la temperatura en la zona industrial, mientras que en planta Orión y club Náutico se mantuvo casi constante.

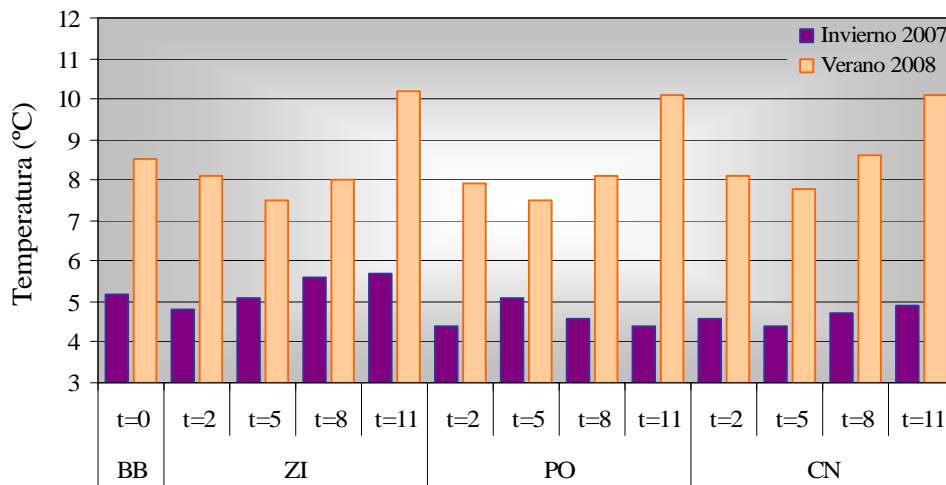


Figura 83. Temperatura medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y en zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) en los días 2, 5, 8 y 11 en Invierno 2007 (violeta) y Verano 2008 (naranja).

Oxígeno disuelto. El oxígeno disuelto (mg/L) mostró valores cercanos al de saturación, en ambos muestreos en todos los sitios (**Fig. 84**), resultando los valores más altos en el experimento de invierno. En ambos experimentos, las máximas concentraciones de oxígeno disuelto se midieron en bahía Brown: 11,93 mg/L en invierno y 10,33 mg/L en verano. Los valores promediados de los tres sitios de bahía Ushuaia fueron $10,41 \pm 0,75$ mg/L en invierno y $9,21 \pm 0,51$ mg/L en verano. Club Náutico fue el lugar con menor oxígeno disuelto en ambos experimentos: $9,63 \pm 0,17$ mg/L en invierno y $8,74 \pm 0,40$ mg/L en verano.

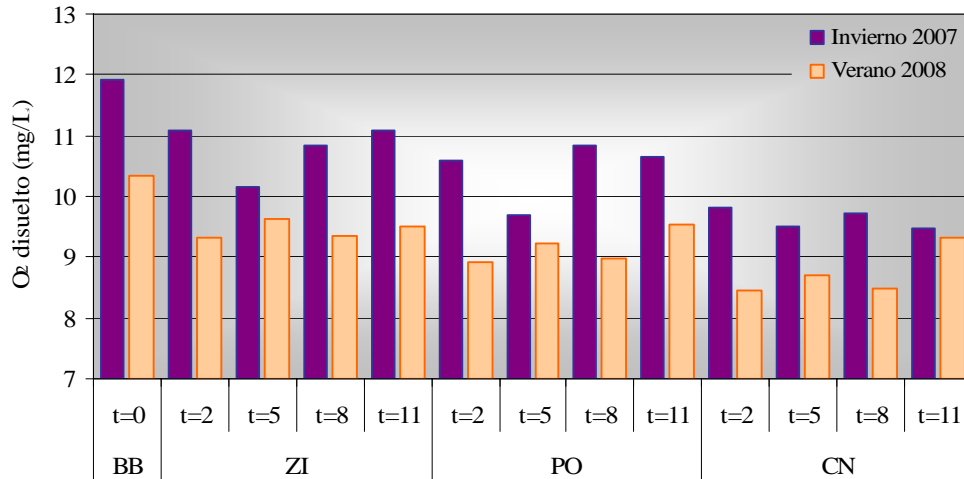


Figura 84. Oxígeno disuelto medido en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y en zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) en los días 2, 5, 8 y 11 en Invierno 2007 (violeta) y Verano 2008 (naranja).

Salinidad. La **Figura 85** muestra los valores de salinidad (g/L). Se encontraron valores similares en cada experimento en todos los sitios, levemente más altos en invierno ($32,42 \pm 0,44$ g/L) en comparación con los de verano ($30,75 \pm 0,96$ g/L). Valores de salinidad de entre 2,5 y 3,4 g/L más bajos en verano pudieron registrarse en bahía Brown y en club Náutico en los días 5 y 11 respectivamente. Tal disminución puede deberse a un mayor aporte de agua dulce proveniente de deshielo y, en el caso particular de club Náutico, por el incremento de caudal del pluvial que desemboca allí.

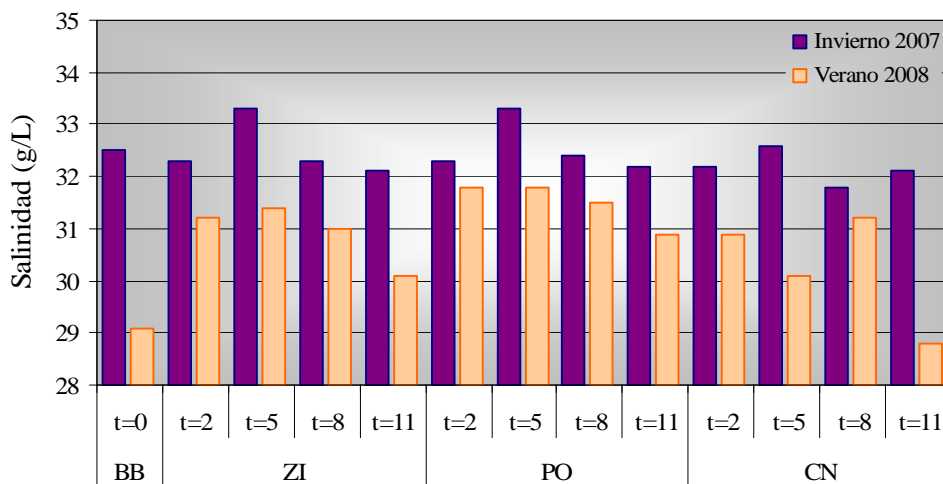


Figura 85. Salinidad medida en el agua de mar de bahía Brown (BB) a tiempo cero y en zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) en los días 2, 5, 8 y 11 en Invierno 2007 (violeta) y Verano 2008 (naranja).

6.2 Determinaciones en organismos

6.2.1 Biomarcadores

6.2.1.1 Superóxido dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa en bahía Brown, a tiempo cero, en la branquia fue: $9,21 \pm 1,03$ U SOD/mg prot. en invierno y $1,75 \pm 0,25$ U SOD/mg prot. en verano; es decir, unas cinco veces mayor en la estación invernal. La actividad de esta enzima en la glándula digestiva en invierno fue $6,47 \pm 1,68$ U SOD/mg prot., mientras que en verano fue $9,99 \pm 2,20$ U SOD/mg prot, no evidenciando una marcada variación estacional. La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue más alta en la glándula digestiva que en la branquia en el experimento de verano, mientras que en el experimento de invierno ocurrió lo contrario.

Branquia. En la **Figura 86** se presentan los resultados correspondientes a la actividad de la enzima superóxido dismutasa en la branquia. En invierno (**Fig. 86A**), se halló sólo un efecto significativo del tiempo de exposición sobre esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En los días 8 y 11, se registró un incremento significativo de la superóxido dismutasa, en relación a la actividad medida el día 2. Cuando se comparó lo actividad medida en bahía Ushuaia con la de bahía Brown, se observó un descenso en los días 5 y 11 en zona industrial, 2 y 5 en planta Orión, 2 y 11 en club Náutico, mientras que en el día 11 en planta Orión se registró el único caso de incremento.

La actividad de superóxido dismutasa en la branquia medida en verano se presenta en la **Figura 86B**. Al igual que en el experimento de invierno, se halló únicamente efecto de los días de exposición (ANOVA II factores, $p < 0,05$) sobre esta enzima. En este caso, se registró un incremento significativo de la superóxido dismutasa el día 11, respecto de los tres tiempos anteriores. Solamente la actividad medida el día 8 en club Náutico se diferenció de la medida en tiempo cero en bahía Brown, por un leve descenso. Al igual que en bahía Brown, la actividad en invierno tendió a ser mayor que en verano.

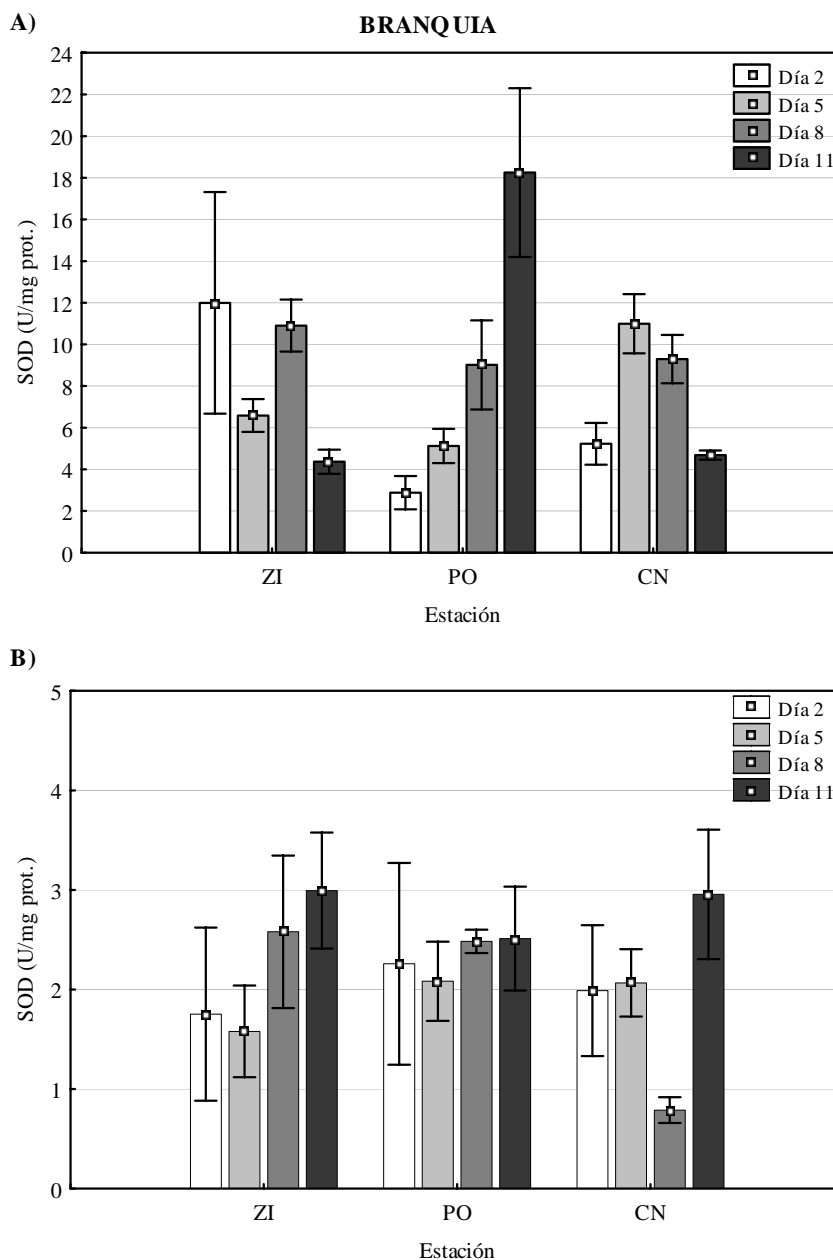


Figura 86. Actividad de superóxido dismutasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva se presenta en la **Figura 87**. En invierno (**Fig. 87A**), se encontró un efecto significativo de la interacción entre los días de exposición y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En relación al efecto temporal, fue diferente en cada sitio. En zona industrial, se midió un incremento en los días 8 y 11, respecto de los días 2 y 5. En planta Orión, el incremento se registró en los días 5 y 11. Por el contrario, en club Náutico se encontró un descenso significativo en los días

5 y 11 de exposición. El efecto de los sitios, fue significativo en los cuatro tiempos monitoreados. En los días 5 y 11 se encontró la misma respuesta, mayor actividad en los mejillones transplantados a planta Orión que en club Náutico y zona industrial. En el día 2 de exposición, se midió la máxima actividad en los mejillones de club Náutico, seguido por la de planta Orión y, en menor medida, la de zona industrial. En cuanto al día 8, la actividad de superóxido dismutasa medida en los organismos transplantados a club Náutico, fue significativamente mayor que la correspondiente a planta Orión. Al momento de comparar la actividad registrada en los sitios de bahía Ushuaia con la de bahía Brown, excepto en zona industrial en los días 2 y 5 y en club Náutico en el día 5 donde los valores resultaron semejantes, en los casos restantes la actividad en bahía Ushuaia fue superior.

En la **Figura 87B** se muestra la actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva correspondiente al experimento de verano. En concordancia con los resultados de invierno, se encontró un efecto significativo de los días de experimentación y de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). La actividad enzimática sufrió una disminución significativa en los días 5, 8 y 11 de exposición, respecto del día 2. Asimismo, las actividades medidas en los días 8 y 11, fue menor a la correspondiente al día 5. En cuanto al efecto espacial, la actividad medida en los mejillones transplantados a planta Orión fue significativamente mayor que la medida en club Náutico y zona industrial. Al igual que en la branquia, la actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva tendió a ser más elevada en el experimento de invierno. La actividad registrada en planta Orión el día 2 fue mayor que el valor medido en bahía Brown; contrariamente en club Náutico, en los días 8 y 11, la actividad resultó menor.

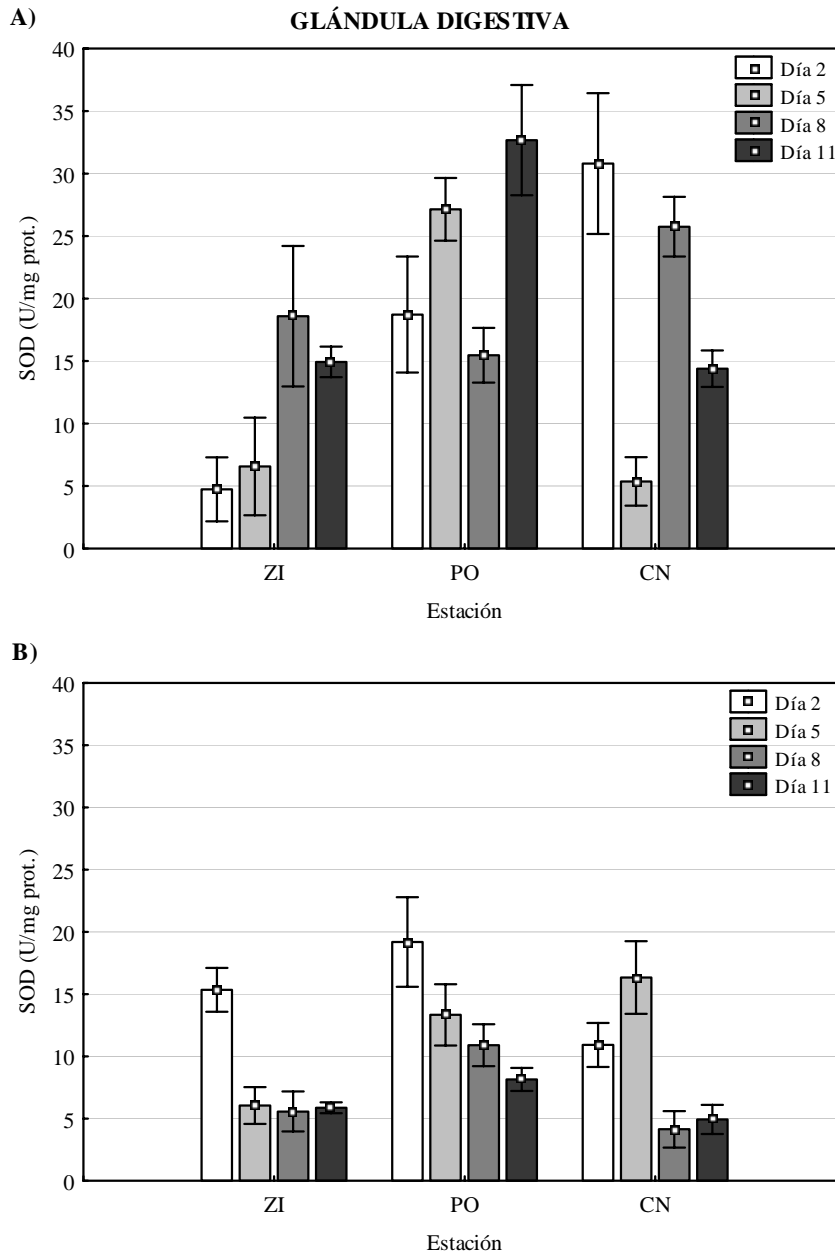


Figura 87. Actividad de superóxido dismutasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

6.2.1.2 Catalasa

La actividad de catalasa en bahía Brown, en tiempo cero, en la branquia fue: $0,35 \pm 0,21$ U CAT/mg prot. en invierno y $1,04 \pm 0,19$ U CAT/mg prot. en verano. En la glándula digestiva, en invierno fue $0,38 \pm 0,12$ U CAT/mg prot. y en verano fue $1,33 \pm 0,23$ U CAT/mg prot. La actividad de catalasa fue más alta en verano y no se observaron diferencias entre órganos para ninguno de los experimentos.

Branquia. La **Figura 88** muestra la actividad de catalasa en la branquia en los tres sitios de bahía Ushuaia. En invierno (**Fig. 88A**), se encontró que la interacción entre los días de exposición y los sitios ejercieron un efecto significativo sobre esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Cuando se evaluó el efecto del tiempo, en los mejillones de zona industrial y planta Orión se registró una disminución significativa de la catalasa en los días 5 y 11. En club Náutico se encontró una disminución el día 11 respecto del día 5. En cuanto al efecto de los sitios, sólo fue significativo el día 5 de exposición, siendo la actividad medida en club Náutico mayor que en los dos sitios restantes. La actividad de catalasa en planta Orión (días 2 y 8) y en club Náutico (día 5) fue mayor que la medida en bahía Brown, mientras que los casos restantes de bahía Ushuaia no se diferenciaron del tiempo cero.

En verano (**Fig. 88B**), el ANOVA de II factores ($p < 0,05$) reveló un efecto significativo del tiempo de exposición sobre la actividad de la catalasa. Se registró un descenso significativo de la actividad enzimática en los días 8 y 11, respecto del día 5. Sólo las actividades medidas en zona industrial (día 2) y, en planta Orión y club Náutico (día 5) se diferenciaron de bahía Brown superando el valor allí registrado. La poca variación encontrada en esta enzima en la branquia dentro de los 11 días de exposición, aunque con mayor desviación que en 2007, indica que no manifiesta una respuesta tan rápida como, por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa.

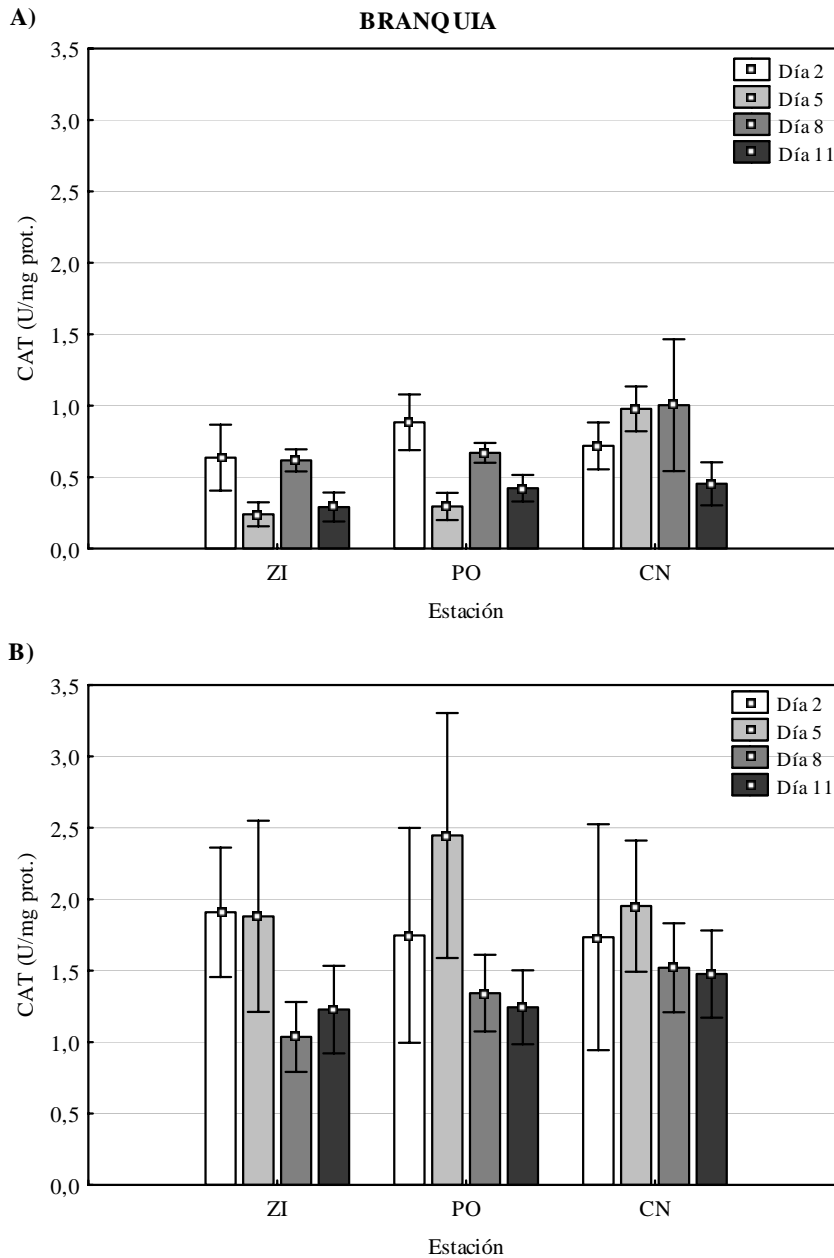


Figura 88. Actividad de catalasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de catalasa en la glándula digestiva se presenta en la **Figura 89**. En el experimento de invierno (**Fig. 89A**), en concordancia con los resultados encontrados en la branquia, se halló un efecto significativo de la interacción entre los días de exposición y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$) sobre la actividad de esta enzima. En cuanto al efecto temporal, se registró en zona industrial un descenso significativo de la actividad el día 8 en relación al día 2. En club Náutico y planta Orión, se midió una actividad

mayor que en el resto de los tiempos en los días 5 y 8, respectivamente. El efecto de los sitios fue significativo en los días 2, 5 y 8 de experimentación. En el día 2, la actividad medida en los mejillones de zona industrial fue superior a la de planta Orión. En el día 5, se registró en club Náutico mayor actividad que en zona industrial y planta Orión. Por último, en el día 8, la actividad de catalasa en los organismos transplantados a zona industrial fue significativamente menor que en los dos sitios restantes. Las actividades medidas en todos los tiempos en club Náutico, en los días 2 y 5 en zona industrial y en los días 8 y 11 en planta Orión fueron superiores al valor correspondiente al tiempo cero en bahía Brown.

En verano (**Fig. 89B**), se halló un efecto significativo del tiempo de exposición (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Al igual que en la branquia, se encontró una disminución significativa de la actividad de la enzima catalasa en los días 8 y 11, en relación al día 5. En varios casos se halló un incremento de la catalasa, en comparación con los valores observados en bahía Brown: en los días 2 y 5 en zona industrial, en el día 5 en planta Orión y en los días 5, 8 y 11 en club Náutico. En concordancia con los resultados correspondientes a la branquia en el mismo período, prácticamente no se encontraron variaciones en la actividad de esta enzima. Ello probablemente se deba a la dispersión de los datos.

En los sitios de bahía Ushuaia, al igual que en bahía Brown, no se encontró una actividad diferencial de la catalasa según alguno de los órganos analizados. La actividad de esta enzima, en branquia y en glándula digestiva, resultó más variable en el verano que en invierno. Se halló en la branquia, una respuesta diferencial entre invierno y verano, llegando a ser la actividad en el verano hasta cuatro veces mayor que la medida en invierno. En la glándula digestiva, sólo en algunos casos, se observó mayor actividad de esta enzima en el período estival.

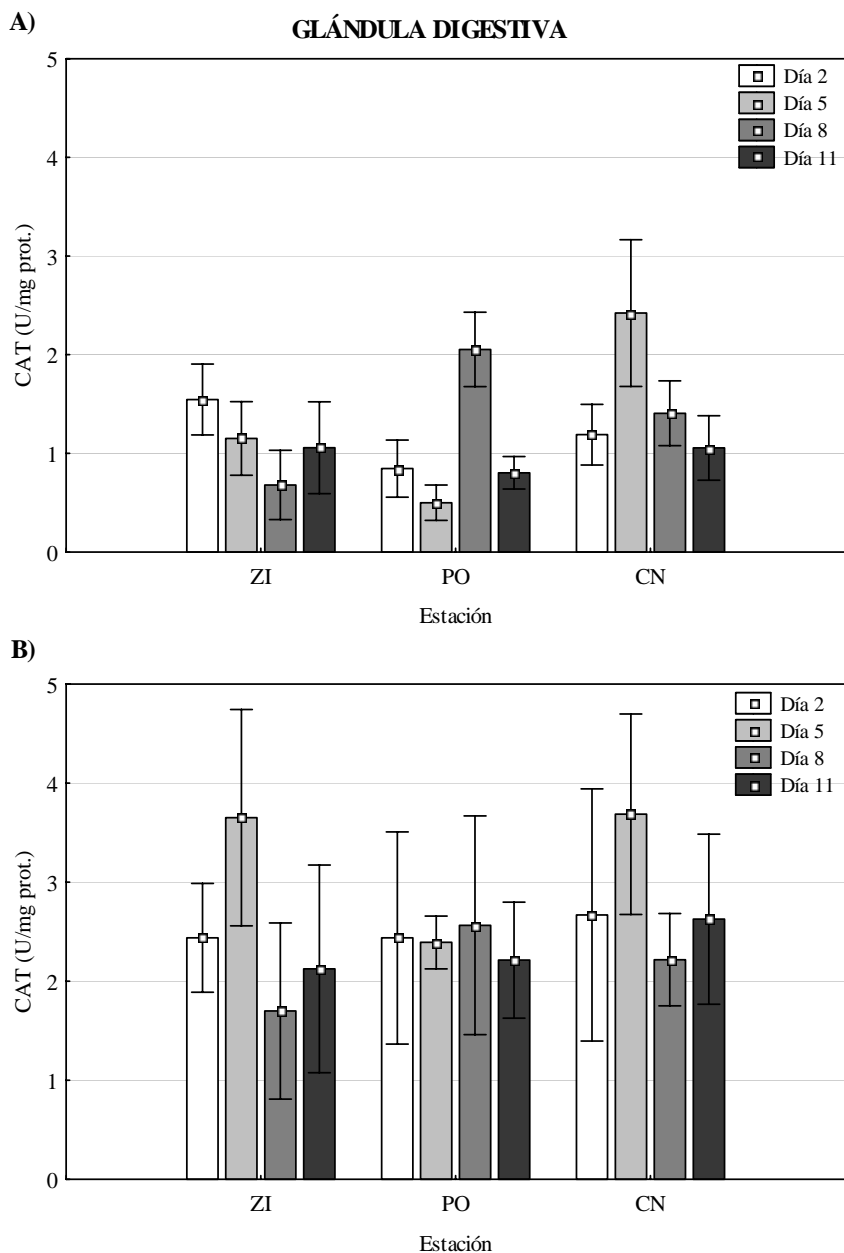


Figura 89. Actividad de catalasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

6.2.1.3 Glutación-S-transferasa

La actividad de glutación-S-transferasa en bahía Brown, a tiempo cero, en la branquia fue: $0,13 \pm 0,02$ U GST/mg prot. en invierno y $0,16 \pm 0,02$ U GST/mg prot. en verano. En la glándula digestiva, en invierno, la actividad fue $0,043 \pm 0,013$ U GST/mg prot. y, en verano, fue $0,022 \pm 0,010$ U GST/mg prot. La actividad de esta enzima fue notablemente más alta en

la branquia en ambos experimentos, mientras que no se observaron diferencias entre invierno y verano para ninguno de los dos órganos estudiados.

Branquia. La **Figura 90** muestra la actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia. En el experimento de invierno (**Fig. 90A**), el tiempo de exposición y los sitios ejercieron un efecto significativo sobre esta enzima (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Se registró un ascenso significativo de la actividad de glutatión-S-transferasa en los días 5, 8 y 11, respecto del día 2. En el día 8, la actividad también superó a la medida en los días 5 y 11. En cuanto a los sitios, los mejillones transplantedos a club Náutico presentaron actividades mayores que los de planta Orión. Los picos de actividad medidos el día 8, en planta Orión y club Náutico, fueron los únicos casos que superaron la actividad de glutatión-S-transferasa correspondiente al valor encontrado en bahía Brown.

La actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia, medida en el experimento de verano se presenta en la **Figura 90B**. Al igual que los resultados hallados en el invierno, la actividad de esta enzima estuvo influenciada por los días de exposición (ANOVA II factores, $p < 0,05$). También se halló un incremento significativo en los días 5, 8 y 11, respecto del día 2. Incluso en el día 11, la actividad fue mayor a la medida en los días 5 y 8. En comparación con la actividad registrada en tiempo cero (bahía Brown), la actividad medida en club Náutico el día 2 descendió, mientras que el día 11 aumentó en ese mismo sitio.

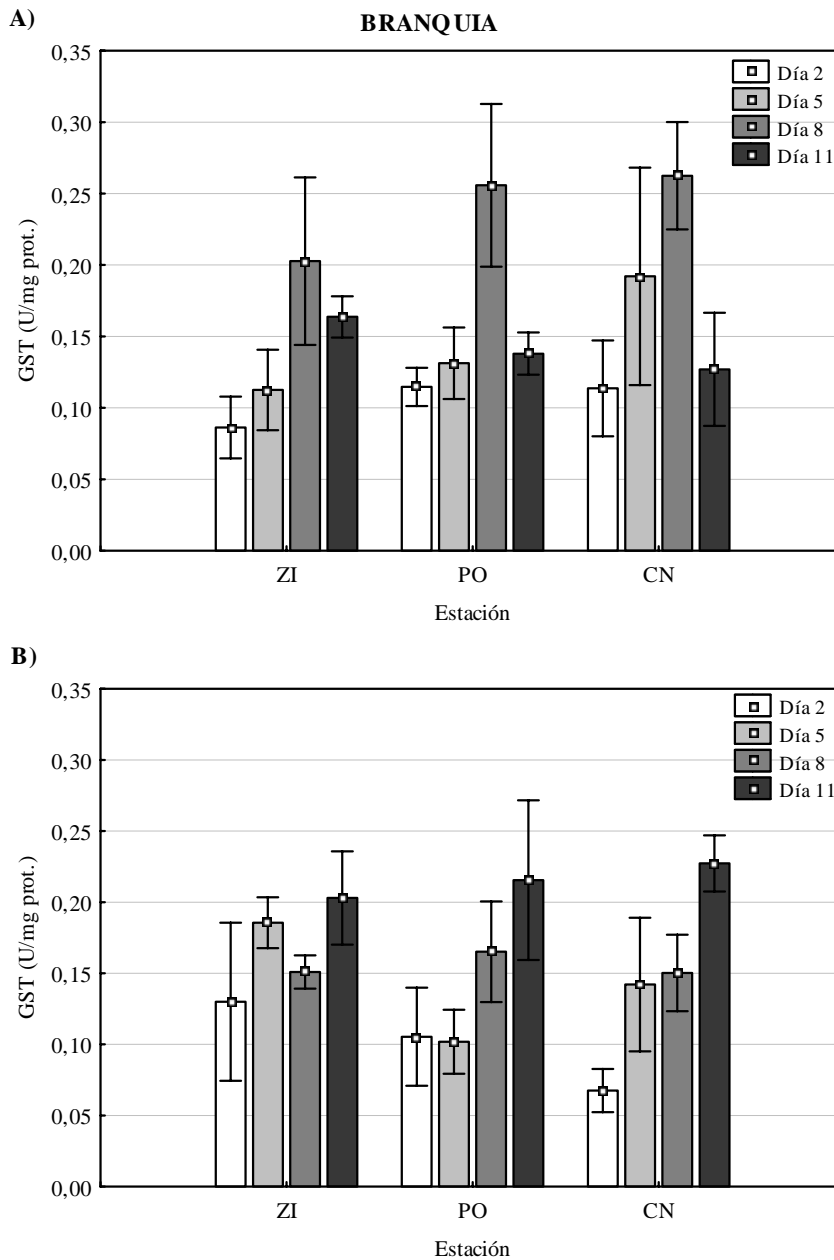


Figura 90. Actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva se muestra en la **Figura 91**. En invierno (**Fig. 91A**), se encontró un efecto significativo del tiempo de exposición (ANOVA II factores, $p < 0,05$) sobre esta enzima. La actividad correspondiente al día 8 fue significativamente mayor que la registrada el día 2. Las actividades medidas en planta Orión y club Náutico (día 8) fueron mayores que el valor correspondiente a bahía Brown, al inicio del experimento.

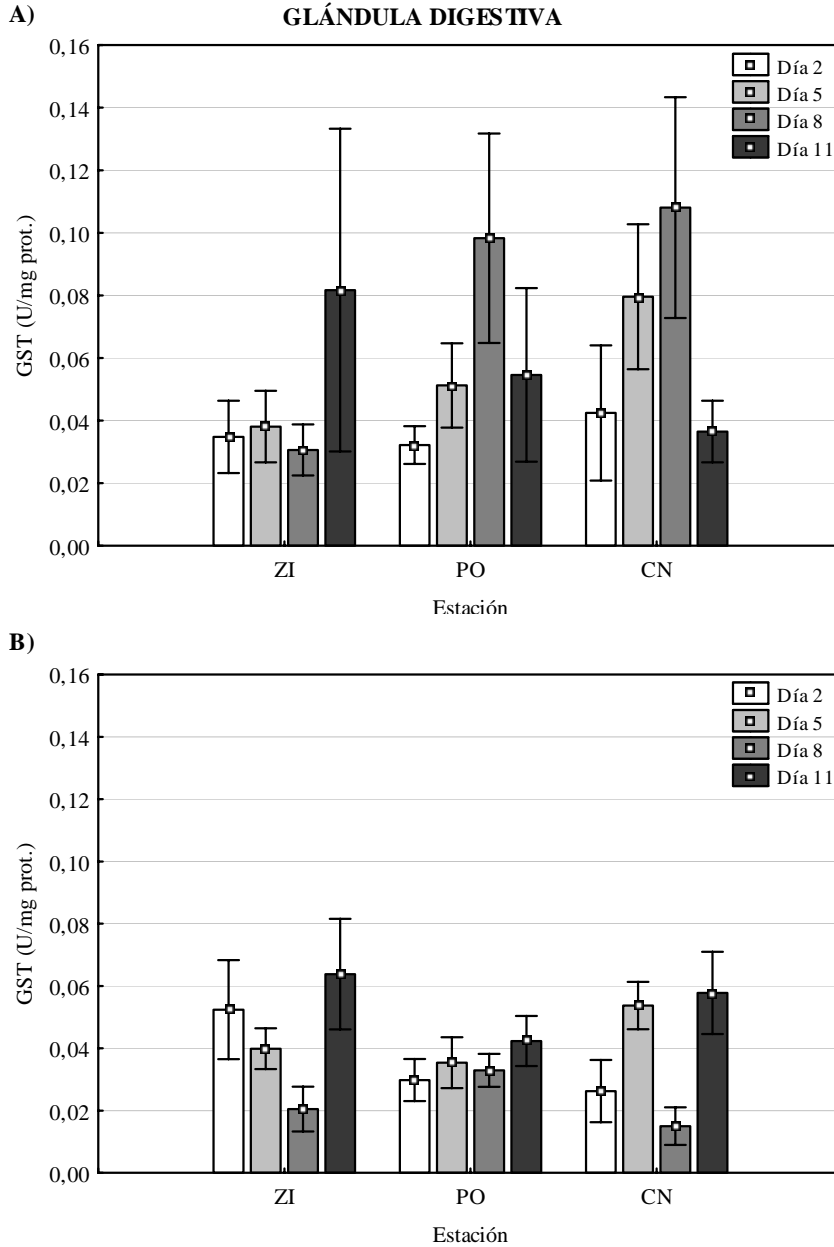


Figura 91. Actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En verano (**Fig. 91B**), la actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva estuvo influenciada por la interacción entre los tiempos de exposición y los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). El efecto temporal fue significativo en los mejillones transplantados a zona industrial y planta Orión. En el primer caso, se encontró un aumento significativo el día 11, en relación a los días 5 y 8. Además, la actividad bajó significativamente el día 8 en comparación a la correspondiente al día 2. En el segundo caso, se registró un aumento significativo en la

actividad de esta enzima en los días 5 y 11, respecto de los días 2 y 8. En cuanto al efecto de los sitios, no resultó significativo únicamente en el día 11 de exposición. En los días 2, 5 y 8, la actividad medida en zona industrial, club Náutico y planta Orión respectivamente, fue significativamente mayor que en el resto de los casos. Comparando los sitios de bahía Ushuaia con bahía Brown, se pudo observar un aumento de la actividad de esta enzima en zona industrial en los días 2, 5 y 11 y en club Náutico los días 5 y 11.

La enzima glutatión-S-transferasa no mostró grandes diferencias en su actividad, en la branquia ni en la glándula digestiva, entre verano e invierno. Se halló una clara diferenciación de la actividad en función del órgano analizado, resultando más alta en la branquia.

6.2.1.4 Peroxidación de lípidos

Los niveles de peroxidación lipídica en bahía Brown, a tiempo cero, en invierno en la branquia fueron de $0,56 \pm 0,17$ $\mu\text{mol MDA/mg prot.}$, mientras que en verano fueron de $1,53 \pm 0,54$ $\mu\text{mol MDA/mg prot.}$ En la glándula digestiva en invierno fueron de $1,27 \pm 0,29$ $\mu\text{mol MDA/mg prot.}$, mientras que en el mismo órgano en el verano fueron de $4,55 \pm 0,61$ $\mu\text{mol MDA/mg prot.}$ En ambos experimentos, la peroxidación lipídica fue mayor en la glándula digestiva. Se observó una diferenciación estacional, siendo los niveles de peroxidación mayor en verano en ambos órganos analizados.

Branquia. Los resultados correspondientes a la peroxidación lipídica en la branquia se presentan en la **Figura 92**. En invierno (**Fig. 92A**), la peroxidación fue dependiente de los tiempos de exposición y de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). El día 5 se registraron los menores niveles de este parámetro, mientras que el día 8 los niveles de peroxidación superaron los del día 2. En relación al efecto de los sitios, los mejillones transplantados a club Náutico presentaron niveles de malondialdehído mayores que en los otros sitios. Con la única excepción de zona industrial y planta Orión (día 5), la peroxidación lipídica medida en bahía Ushuaia superó la medida en bahía Brown.

En verano (**Fig. 92B**), el ANOVA de II factores también reveló un efecto significativo de los días de exposición y de los sitios ($p < 0,05$). Al igual que en el experimento de invierno, en el verano se registró un descenso significativo de los niveles de lípidos peroxidados el día 5 respecto de los días 2, 8 y 11. En este caso, también se observó un aumento el día 11 respecto del día 5, pero los niveles fueron significativamente menores a los medidos en los días 2 y 8. Al momento de comparar los sitios de bahía Ushuaia con bahía Brown, solamente los niveles de malondialdehído medidos en club Náutico el día 8 se diferenciaron siendo superiores.

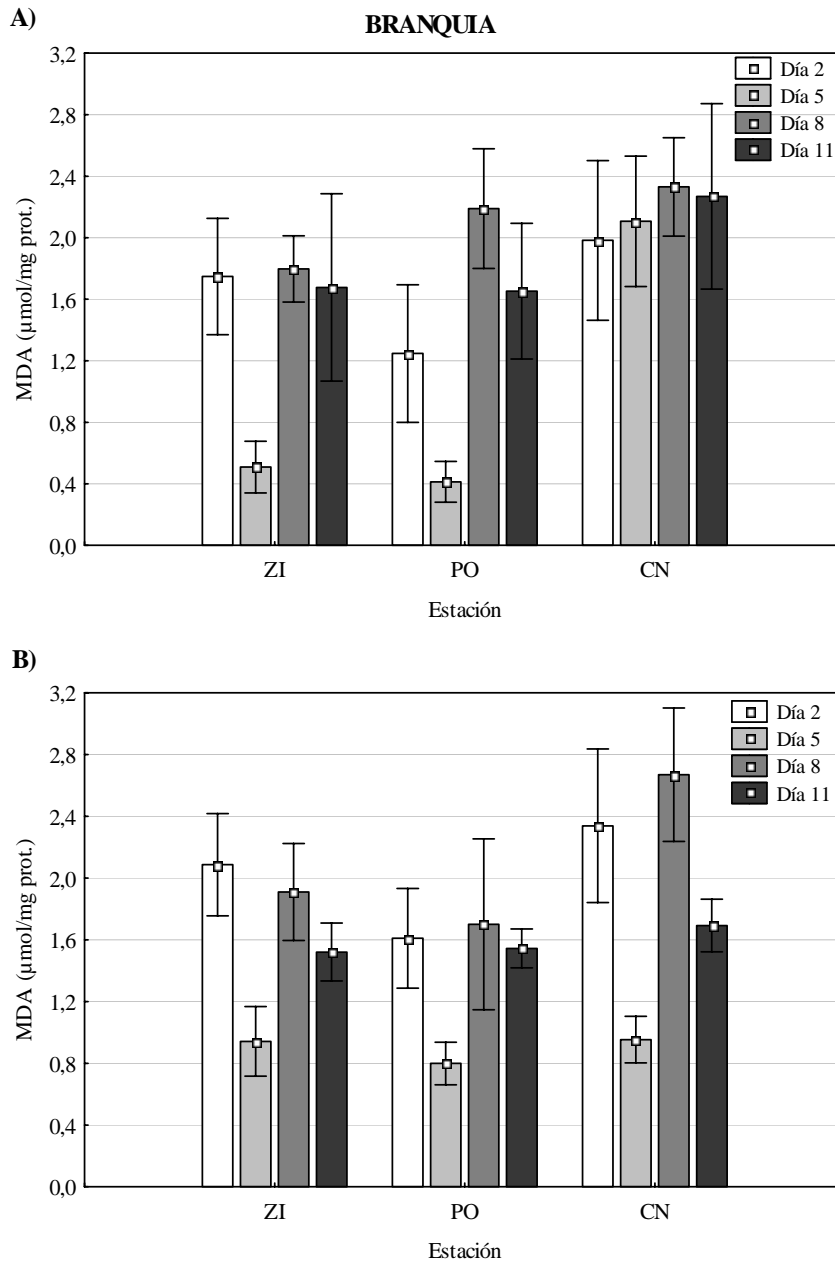


Figura 92. Niveles de malondialdehído en la branquia del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

Glándula digestiva. La **Figura 93** muestra los niveles de peroxidación en la glándula digestiva. En invierno (**Fig. 93A**), también se halló un efecto significativo del tiempo de exposición y de los sitios (ANOVA II factores, $p < 0,05$). En concordancia con los resultados obtenidos en la branquia, se registró un descenso significativo de la concentración de malondialdehído el día 5, respecto de los otros tres tiempos. El efecto temporal también fue el mismo que en la branquia, registrándose en los mejillones de club Náutico los mayores

niveles de malondialdehído. Con la única excepción de zona industrial y planta Orión (día 5), la peroxidación lipídica medida en bahía Ushuaia superó la de bahía Brown. El mismo resultado se obtuvo en la branquia.

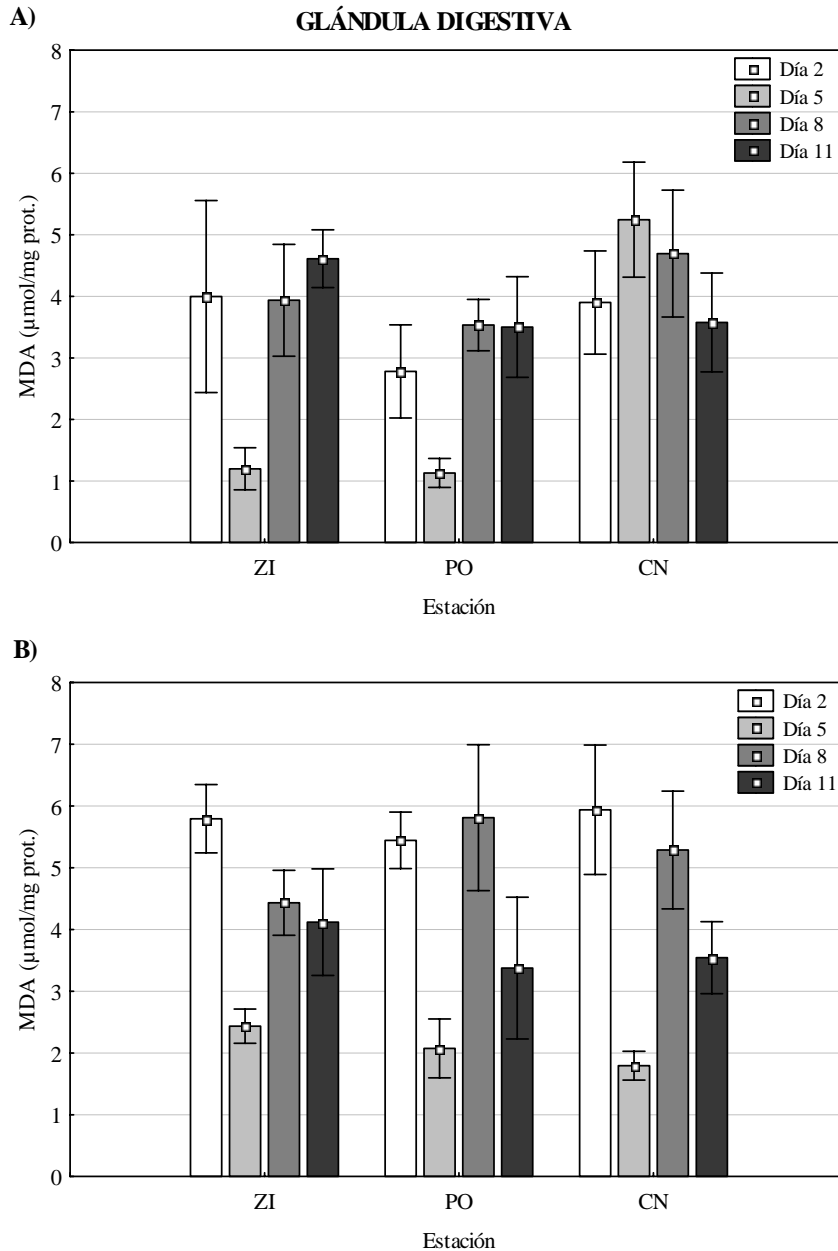


Figura 93. Niveles de malondialdehído en la glándula digestiva del mejillón *M. edulis chilensis* transplantado a zona industrial (ZI), planta Orión (PO) y club Náutico (CN) por 2, 5, 8 y 11 días en **A)** Invierno 2007 y **B)** Verano 2008. Los resultados se expresan como Media \pm DS para 5 determinaciones.

En verano (**Fig. 93B**), se encontró el mismo efecto temporal que en la branquia (ANOVA II factores, $p < 0,05$). Se registró una disminución significativa de los niveles de peroxidación lipídica en el día 5, respecto de los tres tiempos restantes de experimentación.

Además, se observó una reducción de los niveles de lípidos peroxidados el día 11 respecto de los días 2 y 8, pero hasta niveles superiores que los del día 5. En los tres sitios de bahía Ushuaia, se encontró menor peroxidación lipídica el día 5 respecto del tiempo cero medido en bahía Brown.

Ni en la branquia ni en la glándula digestiva se observaron diferencias notables entre los niveles de peroxidación medidos en verano e invierno. En cuanto al órgano blanco, la peroxidación lipídica tendió a ser mayor en la glándula digestiva.

6.3 Relación entre parámetros físicos y biológicos

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson, para cada experimento, entre todos los datos obtenidos de los tres sitios de bahía Ushuaia. En la **Tabla 24** se presentan todos los coeficientes que resultaron significativos ($p < 0,05$) y altamente significativos ($p < 0,01$).

Al igual que en los experimentos de seis semanas, en el invierno se encontró mayor número de correlaciones. En dicho período, correlaciones positivas altamente significativas se hallaron entre las actividades de glutatión-S-transferasa ($r = 0,79$) en branquia y glándula digestiva; ocurriendo lo mismo con los niveles de peroxidación lipídica ($r = 0,90$). La actividad de la enzima catalasa, medida en la branquia y en la glándula digestiva, se correlacionó positivamente ($r = 0,60$). Correlaciones positivas también se hallaron entre la catalasa, en la branquia, y la peroxidación de lípidos, en ambos órganos. La catalasa en la glándula digestiva correlacionó de manera directa con la peroxidación lipídica, en ambos órganos, y con la glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva. La actividad de catalasa en la branquia presentó una correlación inversa con la temperatura ($r = -0,62$); mientras que la peroxidación, en la branquia y en la glándula digestiva, evidenció correlación negativa con la salinidad.

Menor número de correlaciones se hallaron en el experimento de verano de 2008. La actividad de catalasa en la branquia presentó una correlación positiva con la actividad de dicha enzima en la glándula digestiva ($r = 0,60$). Se halló correlación positiva entre los niveles de peroxidación lipídica medidos en ambos órganos ($r = 0,83$). Las enzimas glutatión-S-transferasa y superóxido dismutasa, medidas en la branquia, mostraron correlación positiva con la temperatura ($r = 0,72$ y $r = 0,60$, respectivamente). Correlación negativa se halló entre la actividad de la enzima superóxido dismutasa en la glándula digestiva y la glutatión-S-transferasa en la branquia ($r = -0,62$).

Tabla 24. Coeficientes de correlación de Pearson altamente significativos representados con ** ($p < 0,01$) y significativos representados con * ($p < 0,05$) entre todas las variables medidas en los tres sitios de bahía Ushuaia en Invierno de 2007 y en Verano de 2008. B: Branquia GD: Glándula digestiva

Variables	Invierno 2007	Verano 2008
CAT B - CAT GD	0,60 *	0,60 *
CAT B - LPO B	0,62 *	
CAT B - LPO GD	0,63 *	
CAT GD - GST GD	0,58 *	
CAT GD - LPO B	0,57 *	
CAT GD - LPO GD	0,60 *	
GST B - GST GD	0,79 **	
SOD GD - GST B		-0,62 *
LPO B - LPO GD	0,90 **	0,83 **
CAT B - Temperatura	-0,62 *	
GST B - Temperatura		0,72 **
SOD B - Temperatura		0,60 *
LPO B - Salinidad	-0,78 **	
LPO GD - Salinidad	-0,72 **	
Salinidad - Temperatura		-0,60 *
pH - O ₂ disuelto	0,68 **	

Capítulo 7

DISCUSIÓN

7.1 Determinaciones en agua

Variaciones estacionales, incluso interanuales en los inviernos y en los veranos, pudieron observarse en varios parámetros medidos en el agua de mar. El **pH** presentó gran homogeneidad entre los sitios y a lo largo del tiempo de duración de cada experimento, encontrándose dentro del rango esperado de 7,4-8,6 para el agua de mar. No se observaron diferencias entre los inviernos; mientras que en los veranos, los valores de pH correspondientes al experimento de 2008 resultaron mayores a los de 2007 en 0,4 unidades aproximadamente. Según Dore *et al.* (2009), la variabilidad interanual observada en el pH está principalmente relacionada a factores que gobiernan los flujos de entrada y salida del carbono inorgánico disuelto. El intercambio atmósfera-mar, el mezclado, el transporte horizontal y el depósito y remoción de material biológico contribuyen al equilibrio neto del carbono inorgánico disuelto. Cuando se analiza la evolución temporal a lo largo del experimento del 2008, se observó un descenso gradual de 0,2 unidades en todos los sitios de la bahía Ushuaia. No debería descartarse aquí la influencia de factores locales tales como precipitación, corrientes de marea en el canal Beagle, aportes continentales, etc. El promedio de verano, encontrado en este estudio en bahía Ushuaia ($8,13 \pm 0,24$), es levemente más alto que el reportado por Solís *et al.* (2004b) para el verano de 2001 (7,55), pero se encuentra dentro del rango encontrado por Gil *et al.* (datos inéditos).

La **temperatura** superficial del agua se ha caracterizado por una marcada variación estacional. En el verano los máximos alcanzaron los 13 °C, mientras que en el invierno la mínima fue de 4 °C. Con algunas excepciones en el verano, los datos encontrados están dentro del rango anual de 3-10 °C reportado por Iturraspe *et al.* (1989) y Santana *et al.* (2006) para aguas superficiales del canal Beagle. Luchini & Wicki (2002) publicaron un rango anual de temperatura de 4,3-8,9 °C para la bahía Ushuaia, siendo la temperatura de verano levemente más baja que la encontrada en el presente estudio.

El canal Beagle presenta una corriente fría, con trayectoria oeste-este. Su temperatura media anual en superficie es de 6,5 °C. En julio, la temperatura media mensual del agua es 4,5 °C, aproximadamente 3 °C superior a la del aire (Iturraspe *et al.*, 1989). El Servicio de Información Ambiental y Geográfica (SIAG) del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC) midió en la estación meteorológica de Almanza, en agosto de 2005, una temperatura promedio del aire de 2,9 °C. La misma resultó 2,6 °C menor que la medida en el agua de mar, información que reafirma la diferencia establecida por Iturraspe *et al.* (1989) entre la temperatura del aire y la del agua de mar en invierno. En concordancia, Hernando *et*

al. (2008) también midieron valores cercanos a 4,5 °C en agua de mar en julio del 2005 en la misma zona de estudio.

El **oxígeno disuelto** se ha encontrado saturado a sobresaturado. En invierno en promedio, fue levemente más bajo en 2006 alcanzando los 8,9 mg/L, mientras que tanto en verano como en invierno de 2007, la sobresaturación registrada (>10 mg/L) podría asociarse a la existencia de bosques de macroalgas, con intensa actividad fotosintética generadora de oxígeno disuelto (Solís *et al.*, 2004a). Los vientos mezclan la columna de agua y aportan por difusión turbulenta oxígeno al agua. En club Náutico, se registraron valores de oxígeno levemente menores al resto de los sitios, siendo el mínimo de 8,6 mg/L. Esteves & Amin (2004) reportaron insaturaciones de 6,5 mg/L en club Náutico, posiblemente asociadas a descargas pluvio-cloacales. El resto de los sitios de bahía Ushuaia presentaron concentraciones similares a los valores informados para aguas superficiales costeras de la bahía Ushuaia (Luchini & Wicki, 2002; Esteves & Amin, 2004) e indican una situación ambiental normal. Lo mismo ocurrió con el oxígeno disuelto medido en bahía Brown, el cual se mantuvo cercano al nivel de saturación durante todo el experimento, en concordancia con los niveles obtenidos por Hernando *et al.* (2008).

En bahía Brown, la **salinidad** resultó similar a los valores registrados por Hernando *et al.* (2008). En los sitios de bahía Ushuaia, la salinidad no registró variaciones estacionales. Solamente en la zona industrial, en la semana 1 de exposición del verano de 2008, se registró una salinidad muy baja de 23,6 g/L asociado al aporte de agua dulce desde el arroyo Grande. Gil *et al.* (datos inéditos) hallaron importantes cambios de salinidad en la costa norte de bahía Ushuaia, entre el puerto comercial y el arroyo Grande, asociados a la descarga de la mayoría de las aguas de tormenta. La estratificación de la columna de agua, por la presencia de agua dulce en esta zona, prevendría el transporte vertical y la sedimentación de las partículas finas y la materia orgánica asociada. Debido a la morfología abierta de la costa norte y la corriente anti-horaria, el agua dulce sufriría transporte horizontal hacia áreas de acumulación en el sector oeste-noroeste de la Bahía como club Náutico. En el canal Beagle se han registrado valores máximos de salinidad durante el invierno (31 a 31,5 g/L), disminuyendo en primavera y verano hasta valores próximos a 23 g/L, por efecto del deshielo. Como es de esperar, en esta época se observa mayor variabilidad, principalmente en sectores próximos a la costa por un incremento en el caudal de los numerosos cursos de agua que vierten en el Canal. Según Iturraspe *et al.* (1989), los mismos presentan sus mayores crecidas en noviembre y diciembre.

Gran parte del **nitrito** resulta de la nitrificación, proceso por el cual el amonio es primeramente convertido a nitrito y subsecuentemente a nitrato por las bacterias aeróbicas

autotróficas (Pierce & Weeks, 1993). En condiciones de saturación de oxígeno disuelto, el nitrato es la forma estable del nitrógeno inorgánico disuelto. Sin embargo, puede ser un potencial problema de eutroficación cuando sus niveles aumentan (Frías-Espericueta & Páez-Osuna, 2001). La toxicidad del nitrato sobre los organismos acuáticos pareciera radicar en la conversión de los pigmentos transportadores de oxígeno (Cheng & Chen, 2002). En invierno de 2006, las concentraciones fueron muy similares entre sitios y entre los tiempos de exposición. En los inviernos de 2007 y 2008, la distribución del nitrato en el tiempo como la variación entre sitios, no siguió un modelo definido. Las máximas concentraciones se registraron en club Náutico. Como cabía esperar, las concentraciones de nitrato de ambos veranos fueron mucho más bajas que las de invierno. Este comportamiento es lógico ya que el nitrato es la forma de nitrógeno más utilizada por muchas especies de fitoplancton. En verano, con fotosíntesis intensas, el nitrato disminuye su concentración pudiendo llegar a valores no detectables. Esto sucede en varias zonas del mar patagónico (Paparazzo *et al.*, 2010). También para la zona costera de bahía Ushuaia en verano, Solís *et al.* (2004b) encontraron el valor más alto en zona industrial, el cual se encuentra en el mismo rango o aún por debajo del medido para la misma zona en el presente estudio. La concentración elevada cercana a la costa puede atribuirse a un aporte exógeno desde escurrimientos terrestres y descargas municipales.

El **nitrito** es un compuesto intermediario entre el nitrato y el amonio en los procesos de oxidación-reducción. Su concentración es dependiente del pH del agua (a medida que el pH se incrementa, también lo hace la concentración de nitrito), del estado de óxido reducción, del amonio, del nitrato y del oxígeno disuelto presente (Russo, 1985). La presencia de concentraciones importantes de nitrito es indicadora de un estado inestable del medio acuático. Se produce la reducción de nitrato por depleción del oxígeno disuelto o por la oxidación de amonio, en caso de un medio que se va saturando de oxígeno disuelto (Esteves *et al.*, 1986). Entre los factores ambientales que pueden afectar la toxicidad del nitrito para los organismos acuáticos, la concentración de cloruros en el agua parece ser el más importante (Jensen, 2003). Las concentraciones más bajas de nitrito se registraron en bahía Brown y coinciden con los valores medidos en 2006 y 2007 por Hernando *et al.* (2008). En los inviernos de 2007 y de 2008, se midieron en club Náutico las mayores concentraciones de este compuesto lo cual evidencia un ingreso desde una fuente antrópica. En verano de 2007, el nitrito fue más alto que en 2008, alcanzando los máximos valores en caleta Aspirante (semana 3), en zona industrial (semana 5) y club Náutico (semana 1) aunque resultaron menores a los máximos encontrados por Gil *et al.* (datos inéditos) para las bahías Ushuaia y Golondrina. Aunque en verano de 2008 se registraron concentraciones más bajas, nuevamente

club Náutico presentó concentraciones mayores a los demás sitios. Solís *et al.* (2004b) encontraron en verano, en la zona costera de bahía Ushuaia, valores menores a $0,06 \mu\text{M}$ de nitrito; mientras que el valor máximo también lo registraron en club Náutico ($1,93 \mu\text{M}$), como consecuencia del efluente pluvio-cloacal que descarga en ese lugar.

El **amonio** es uno de los compuestos inorgánicos del nitrógeno que es estable a potenciales de óxido reducción negativos; es decir, en ausencia de oxígeno disuelto. Sin embargo, la elevada concentración medida en zonas con saturación de oxígeno disuelto es una manifestación de la inestabilidad del sistema (Esteves *et al.*, 1986). La toxicidad del amonio para la biota depende del pH, la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad (Environment Canada, 2001; Augspurger *et al.*, 2003). Además, mezclas de amonio con otros compuestos como el Cu, cianuro, fenol, Zn y cloro pueden causar una toxicidad aditiva o incluso tener efectos sinérgicos (Environment Canada, 2001; Russo, 1985). En el amonio también se observó estacionalidad, siendo las concentraciones más altas las de invierno, aunque los valores encontrados fueron muy variables entre sitios así como también entre los años muestreados. En 2006 y 2008 se encontraron concentraciones más bajas que en 2007, incluso en bahía Brown. Valores altos de amonio se midieron en 2007 en club Náutico que resultaron semejantes a los encontrados por Gil *et al.* (datos inéditos) en los efluentes pluvio-cloacales que desembocan en dicha zona. En zona industrial también se midieron valores altos, aunque menores a los de club Náutico. Los valores de amonio medidos en los experimentos de verano también fueron muy variables, aunque menores a los de invierno. Club Náutico, en los tres muestreos del 2007, presentó valores dos órdenes de magnitud superiores al resto de los sitios. En el 2008, las máximas concentraciones también se midieron en club Náutico y en zona industrial ($141 \mu\text{M}$ y $111 \mu\text{M}$, respectivamente). En el resto de los sitios, las concentraciones fueron menores a $2 \mu\text{M}$, lo cual concuerda con la información publicada por Solís *et al.* (2004b). En caleta Aspirante y península Ushuaia se midieron los valores más bajos de amonio, tanto en verano como en invierno. Esto era lo esperado, ya que no hay ningún tipo de actividad antrópica allí, sumado a que son los sitios analizados más alejados de la ciudad de Ushuaia.

De los tres compuestos nitrato, nitrito y amonio, éste último sobresale por ser generalmente el más tóxico y el que se encuentra frecuentemente en mayor concentración en las aguas de desecho de origen doméstico, industrial y de la acuicultura. En adición a su presencia en el agua como un producto natural del metabolismo de las proteínas de los organismos acuáticos, el amonio es frecuentemente descargado a través de los efluentes municipales industriales y en la agricultura. Es por ello que no es sorprendente que sea

considerado comúnmente un contaminante acuático (Frías-Espericueta & Páez-Osuna, 2001). Tal es el caso de club Náutico, donde las concentraciones halladas provendrían del efluente pluvio-cloacal.

Muchos ecosistemas costeros, estuarinos y marinos, están limitados probablemente por el nitrógeno. Sin embargo, el **fósforo** también puede limitar la producción y durante ciertas estaciones del año, puede limitar secundariamente la producción primaria en combinación con el nitrógeno (Howarth, 1988). Un pequeño incremento en el nivel de este nutriente, especialmente de la forma inorgánica disuelta, puede producir un florecimiento algal. Cuando la biomasa algal muere, el proceso de descomposición consume el oxígeno disuelto, a menudo a una tasa mucho más rápida de la que puede ser generado (Mesner & Geiger, 2005). Las concentraciones de fosfato medidas en invierno fueron más bajas que las medidas en el mismo período por Hernando *et al.* (2008). Entre los sitios de bahía Ushuaia, nuevamente en club Náutico se registraron las máximas concentraciones de este nutriente, tanto en 2007 como en 2008. El fosfato evidenció los valores más altos en bahía Brown, en club Náutico y en planta Orión; mientras que en el resto de los casos, las concentraciones fueron notablemente menores. El alto valor registrado en bahía Brown podría deberse al escurrimiento de aguas con residuos de detergentes que utilizan los pescadores en cercanías a la costa. En club Náutico, este nutriente sería aportado desde el efluente. En el caso de planta Orión es posible que sea transportado desde el punto de descarga del arroyo Grande, ubicado hacia el oeste, por la corriente antihoraria. Sin tener en cuenta los máximos de concentración, en este nutriente no se observaron diferencias entre verano e invierno. Los máximos valores encontrados en el presente trabajo son más altos que los reportados por Solís *et al.* (2004b), pero claramente menores a las concentradas medidas por Gil *et al.* (datos inéditos) directamente en los efluentes. Esto evidencia el aporte de fosfato desde los efluentes, pero también el efecto de dilución a medida que se aleja del punto de descarga. Teniendo en cuenta las concentraciones medidas, el fósforo no limita la producción primaria en esta zona ya que valores superiores a $0,5 \mu\text{M}$ son indicios de una concentración no limitante de la producción primaria (Esteves & Varela, 1991).

El **silicato** es un elemento químico que dependiendo del pH, puede reaccionar naturalmente con Ca, Mg, Fe y Al formando silicatos insolubles (CEES, 2008). Localmente, incrementos en la concentración de silicato disuelto disminuyen las relaciones N:Si y P:Si, lo que podría favorecer el crecimiento de diatomeas que lo requieren para su estructura. El silicato no tiene efectos adversos sobre los sistemas acuáticos (van Dokkum *et al.*, 2004). Los ríos y arroyos suelen aportar concentraciones del orden de los cientos de micromoles a la zona

costera (Santinelli & Esteves, 1993). El agua oceánica profunda es también un proveedor de silicato a las capas superiores, en donde es activamente utilizado en procesos de fotosíntesis de especies con estructuras silícicas como las diatomeas y los coccolitofóridos (Paparazzo *et al.*, 2010). El valor medido en bahía Brown en invierno de 2006 fue levemente menor al medido por Hernando *et al.* (2008) en el mismo año, mientras que en 2007 las concentraciones fueron coincidentemente mayores en ambos trabajos. En los sitios de bahía Ushuaia, tanto en verano como en invierno, los niveles de silicato variaron en tiempo y espacio sin seguir un patrón definido. Las concentraciones en invierno resultaron mayores a las de verano. Las máximas concentraciones fueron registradas en club Náutico, en ambas estaciones, lo cual nuevamente refleja un impacto antrópico desde las descargas pluvio-cloacales.

La **clorofila a** medida en los tres inviernos consecutivos fue muy baja ($<0,22 \mu\text{g/L}$), mientras que en verano llegó a $0,73 \mu\text{g/L}$. Los datos encontrados en el presente trabajo son bajos comparados con los reportados para bahía Ushuaia en verano por Esteves *et al.* (2003). La clorofila *a* como índice de biomasa de fitoplancton, puede relacionarse con la variación de los nutrientes inorgánicos analizados, por ser éstos el sustrato para su crecimiento. Los valores elevados se asocian a una alta producción primaria que conlleva a bajos valores de nutrientes, mientras que sus bajos valores pueden asociarse de una manera no excluyente al pastoreo por parte del zooplancton o a la filtración de los moluscos bivalvos (Solís *et al.*, 2004a). A juzgar por los bancos naturales de moluscos a lo largo de todo el Canal, la productividad secundaria de esta zona asociada a la producción de moluscos bivalvos es elevada y requiere densidades elevadas de fitoplancton para su sostenibilidad. Los niveles de clorofila *a* fueron muy bajos en los períodos analizados en bahía Brown ($0,02$ - $0,35 \mu\text{g/L}$). En concordancia con los datos encontrados en el presente trabajo, Hernando *et al.* (2008) encontraron que la biomasa algal, medida como clorofila *a*, se encuentra en sus valores más bajos ($0,05$ y $0,8 \mu\text{g/L}$) entre los meses de febrero y agosto. Dichos autores encontraron en bahía Brown máximos valores de clorofila que no superan los 3 o 4 días de permanencia en primavera y luego decaen como consecuencia del pastoreo o, eventualmente, agotamiento de nutrientes. Los mismos autores reportaron un segundo aumento de clorofila *a*, significativamente menor, a finales del verano. Probablemente debido a la corta duración de los picos de clorofila y a los períodos seleccionados en este estudio para realizar los experimentos, no fue posible medir aumentos en los niveles de este parámetro.

El contenido de **materia orgánica particulada** fue muy variable entre sitios y entre años, tanto en verano como en invierno. En invierno de 2006 se registraron los menores

valores llegando, ocasionalmente, a ser detectables. En 2007 y 2008 los valores fueron muy heterogéneos, tanto en verano como en invierno. El mayor contenido de materia orgánica particulada se halló en club Náutico, en ambas estaciones. La disminución del oxígeno disuelto en dicho lugar, efecto más notorio en invierno, indicaría que los altos niveles de materia orgánica en el agua estarían creando condiciones favorables para el desarrollo de descomponedores, que aumentarían la demanda biológica de oxígeno.

Las frecuencias de muestreo pautadas en el presente trabajo no permitieron dilucidar un patrón temporal de descargas hacia el mar, aunque muy probablemente sean vertidos episódicos. Sin embargo, las características físicas y químicas del agua de club Náutico permiten identificar la llegada de efluentes que vierten líquidos cloacales en ese sector, caracterizados por concentraciones menores de oxígeno disuelto y máximos de nutrientes desmejorando la calidad del agua. Los valores encontrados en este trabajo son del mismo orden de magnitud, o incluso mayores, a los esperados para aguas residuales sin tratamiento (Metcalf & Eddy, 1991). Esta información concuerda con información previa sobre efluentes que vierten en la bahía Ushuaia (Solís *et al.*, 2004a). Club Náutico se encuentra muy próximo a la bahía Encerrada, la cual constituye un sistema semi-cerrado que recibe las descargas de tres pluviales que actúan como efluentes urbanos (Onas, Beban y Guarani) y del arroyo Buena Esperanza. Este último transporta agua de deshielo proveniente del glaciar Martial, así como también escorrentías y aguas residuales provenientes de la ciudad de Ushuaia. La bahía Encerrada está separada de la bahía Ushuaia por una pasarela artificial. Dos aberturas de 4,5 m de largo cada una fueron construidas para permitir el intercambio de agua entre ambas Bahías en cada ciclo de marea. Torres *et al.* (2009) encontraron que del total de las descargas que recibe la bahía Encerrada, un promedio mensual del 30 % del nitrógeno y 18 % del fosfato se exportaría a la bahía Ushuaia. En síntesis, dada la cercanía de club Náutico a las conexiones provenientes de la bahía Encerrada, es muy probable que en primer lugar, la mayor parte de los nutrientes medidos en club Náutico provengan de la bahía Encerrada y en segundo lugar, del efluente pluvio-cloacal que desemboca precisamente en ese punto de muestreo.

Niveles altos de amonio, aunque menores a los registrados en club Náutico, se observaron en zona industrial asociados muy probablemente a la descarga del arroyo Grande que se ubica en cercanía a ese sitio. En un estudio realizado en marzo de 2003, Solís *et al.* (2004b) caracterizaron los efluentes que llegan a la bahía Ushuaia. Dichos autores también hallaron altos niveles de nutrientes en club Náutico y, en menor medida, en el pluvial del Parque Industrial. Sin embargo, Gil *et al.* (datos inéditos) encontraron en el arroyo Grande

niveles tan altos de nutrientes como en el pluviál de club Náutico. Los niveles de nitrato, amonio y silicato fueron mayores en invierno que en verano, mientras que no se observó una estacionalidad en el fosfato y el nitrito. Las menores concentraciones medidas en verano estarían explicadas por la fotosíntesis y por el hecho de que en esa época anual hay un gran aporte de agua de deshielo que actúa como diluyente. La estacionalidad encontrada para el nitrato y el silicato coincide con los ciclos bien marcados encontrados por Hernando *et al.* (2008), quienes tampoco encontraron un patrón definido para el nitrito y el fosfato.

7.2 Determinaciones en sedimento

El primer paso en el estudio de los metales traza en los sedimentos es usualmente la corrección por el tamaño de grano, ya que existe una relación inversa entre éste y la concentración de metales pesados. Por lo tanto, una de las formas de explicar los efectos de la reducción del tamaño de grano es la separación de la fracción limo-arcillosa menor a 63 μm (Klamer *et al.*, 1990).

Varios autores postulan que los metales pesados de origen antropogénico se concentran en la fracción fina del sedimento (<63 μm) debido a que la mayor área superficial del grano fino resulta en una mayor capacidad de intercambio catiónico y la consecuente adsorción de los metales (Horowitz & Elrick, 1986; Lee *et al.*, 1998). Por ello la fracción menor a 63 μm es considerada la fracción geoquímicamente más activa de las partículas del sedimento y es sumamente conveniente para evaluar la potencial contaminación por metales pesados en los sedimentos (Idris *et al.*, 2007). De esta forma, los sedimentos con una mayor proporción de fracción fina tenderán a retener más cantidad de contaminantes como los metales pesados. Salomons & Förstner (1984) y Klamer *et al.* (1990) han sugerido usar esa fracción, ya que la misma ofrece un método práctico y económico para evaluar los modelos de distribución de elementos traza en una determinada área.

Integrando los resultados obtenidos en invierno y en verano, a partir de los porcentajes obtenidos de grava, arena y fango en el presente estudio, los sitios pueden clasificarse como: bahía Brown el lugar con mayor porcentaje de grava (70-80 %) y menor porcentaje de fracción fina (<0,37 %) siendo muy homogéneos los resultados en los diferentes muestreos, mientras que los cinco sitios de bahía Ushuaia se caracterizaron por grava y arena en diferentes proporciones. Excepto en uno de los experimentos, los sedimentos de zona industrial y península Ushuaia se caracterizaron por arena presentando entre 75-95 % y 60-81 %, respectivamente. Planta Orión y caleta Aspirante presentaron proporciones parecidas de

arena y grava, en algunos casos fue más abundante el porcentaje de grava y en otros, el de arena. Los sedimentos de club Náutico resultaron con mayor contenido de arena y fango, siendo el sitio con mayor proporción de partículas menores a $62 \mu\text{m}$ (28-38 %). Este lugar fue el que presentó mayor heterogeneidad entre experimentos, asociado posiblemente a las partículas sedimentarias que contienen las aguas residuales que recibe desde el pluvial y desde la bahía Encerrada. Commendatore & Esteves (2004) caracterizaron los sedimentos de club Náutico con mayor proporción de arena que la encontrada en el presente trabajo, alcanzando resultados similares en cuanto a lo encontrado en el presente trabajo en planta Orión. A partir de los porcentajes determinados y de cuánto representa cada fracción sobre el total, se han clasificado los sedimentos de bahía Brown como gravosos, los de zona industrial y península Ushuaia como arenosos, los de planta Orión y caleta Aspirante como arenoso-gravosos y los de club Náutico como limo-arenosos.

Los estudios de partición geoquímica de sedimentos permiten la discriminación de los metales según la matriz que los contiene (Marcovecchio & Ferrer, 2005). Estos consisten en extracciones secuenciales para obtener básicamente cinco fracciones: F_I metales adsorbidos intercambiables, F_{II} metales en complejos oxidables, F_{III} metales en carbonatos, F_{IV} metales en complejos reducibles y F_V metales residuales. La suma de las fracciones I + II es la considerada como la potencialmente biodisponible. Estos autores realizaron estudios en el estuario de Bahía Blanca y encontraron que el Fe se presentaba mayoritariamente en la F_V (93-97 %), lo que significa que se halla en la matriz mineralógica del sedimento y que no está disponible para la biota. Estos resultados concuerdan con los datos de partición geoquímica reportados por Amin *et al.* (1996b) para sedimentos costeros de Ushuaia y por Dezileau *et al.* (2007) para sedimentos marinos de Chile. En el caso del Cu, encontraron un alto porcentaje en la $F_I + F_{II}$ (19-59 %) que involucra los metales adsorbidos intercambiables con alto potencial de ser incorporados por los sistemas biológicos (Amin *et al.*, 1997; Marcovecchio *et al.*, 1998) y también en la F_V (22-53 %). El Zn encontrado en las fracciones $F_I + F_{II}$ representó entre 3-25 %, mientras que la mayor parte se halló en la fracción F_V (40-67 %). El Cd se halló en una alta proporción en lo que representa la fracción potencialmente biodisponible (13-40 %) y en la fracción F_V (26-66 %). En el caso del Pb, se encontró prioritariamente en la fracción F_V (62-76 %) y en las fracciones $F_I + F_{II}$ entre 4,5-15 %.

Actualmente se cuenta con un único antecedente de metales en sedimentos para bahía Brown (Esteves *et al.*, 2006a) que corresponde a la fracción biodisponible de los metales. Es por ello que no se puede efectuar una comparación directa con las concentraciones totales medidas en el presente estudio. Si se considera la proporción que estaría biodisponible del

sedimento total según Marcovecchio & Ferrer (2005), las concentraciones encontradas en este trabajo no serían diferentes de las reportadas por Esteves *et al.* (2006a).

Bahía Brown fue considerada *a priori* como una zona de referencia, con bajo impacto antrópico. Sin embargo, las mayores concentraciones de Cu, Zn y Fe se midieron en dicha Bahía. En la zona de Almanza se encuentran los destacamentos de la Prefectura Naval y de la Armada Argentina, una dotación de 10 personas como máximo. Sumando a éstos los pescadores y acuicultores, con asentamientos permanentes y esporádicos, la población actual de Almanza es de unas 30 personas. La navegación está restringida casi exclusivamente a las embarcaciones de pequeño y mediano tamaño afectadas a los cultivos (Hernando *et al.*, 2008). Por este motivo y por no existir actividades antrópicas que liberen metales en la zona, es muy probable que el mayor aporte provenga de la cordillera de los Andes, a través de los chorrillos de variado caudal asociados al deshielo y por el material aportado por el río Almanza. En sitios de altas latitudes, argentinas como chilenas, varios trabajos han reportado a la cordillera de los Andes como una fuente no sólo de Fe (Lamy *et al.*, 2001; Dezileau *et al.*, 2007), sino también de Cu, Zn y Pb (Márquez, 1988; Oyarzún, 2000). El origen de estos metales escapa a los objetivos de esta tesis y serán necesarios estudios geológicos en bahía Brown para detectar las fuentes.

Los niveles de Cu, Zn Cd y Pb en los sedimentos de bahía Brown, como los de todos los sitios de bahía Ushuaia, se encontraron por debajo de los límites propuestos por la Guía Canadiense de calidad de sedimento con posibles efectos sobre la vida acuática (**Tabla 25**). En todos los sitios el Fe fue el metal más concentrado, tres órdenes de magnitud superior al resto de los metales. No se encontraron niveles guía para este último metal. Los altos niveles de Fe en los sedimentos son de origen natural en la cordillera de los Andes y más del 90 % se encuentra en la fracción residual del sedimento formando parte de la estructura cristalina (Dezileau *et al.*, 2007).

Tabla 25. Concentraciones de metales pesados ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en sedimento marino con efectos probables sobre la vida acuática (CCME, 1999).

Cu	Zn	Cd	Pb
108	271	4,2	112

Los resultados de metales pesados en sedimento se presentan comparativamente en la **Tabla 26** junto a datos informados previamente para la misma área de estudio, como también a los reportados para otros sitios de Argentina y diferentes zonas costeras del mundo. Dentro

de bahía Ushuaia, zona industrial, planta Orión y club Náutico resultaron los sitios con mayor contenido de Cu, Zn y Pb, tanto en verano como en invierno. Las concentraciones de metales medidas en esas tres zonas resultaron comparables con los datos reportados para una zona con niveles bajos a moderados de metales pesados, como lo es el estuario de Bahía Blanca (Botté, 2004; Marcovecchio & Ferrer, 2005). A la luz de dicha información, especial atención merecen el pluvial que desemboca en la zona industrial y los tres efluentes que desembocan cerca de club Náutico, que fueran sugeridos como de alto impacto en el estudio realizado por Solís *et al.* (2004b). Asimismo, el “chorillo del este”, adyacente al muelle de combustibles planta Orión que fue considerado en ese mismo estudio como de impacto intermedio, debería ser monitoreado. Es importante destacar que las máximas concentraciones de algunos metales en zona industrial y planta Orión resultaron mucho menores a las reportadas por Amin *et al.* (1996b; 1997): el Cu entre 65-95 %, el Zn entre 27-71 %, el Pb entre 69-86 % y el Fe entre 53-67 %, siendo en este último caso sólo en planta Orión. Estos descensos evidencian un cierto recupero de la calidad de los sedimentos. Es probable que esa disminución esté asociada a un menor ingreso de desechos industriales como consecuencia del cierre de numerosas fábricas luego de la crisis económica del 2001 (INDEC, 2005) y a un mejor manejo en las maniobras realizadas en la planta de combustible planta Orión.

Los valores de Cu y Zn medidos en caleta Aspirante y península Ushuaia resultaron menores a los reportados por Botté (2004), mientras que el Pb se encontró en el mismo rango. Esto resulta llamativo ya que en el estuario de Bahía Blanca son esperables valores relativamente altos de Pb, como resultado de la gran actividad petroquímica. Una posible explicación es que el Pb esté llegando hasta caleta Aspirante y península Ushuaia, desde la zona urbana, por transporte atmosférico. Los valores de los metales Cu, Zn y Pb encontrados en caleta Aspirante y península Ushuaia resultaron menores a los informados para los fiordos del sur de Chile (Ahumada & Contreras, 1999) y el puerto de Montevideo (Muniz *et al.*, 2004).

Cuando se comparan las concentraciones de Cu, Zn y Pb de todos los sitios de bahía Ushuaia con los reportados por Usero *et al.* (2005), para la costa de España, los valores son semejantes a los sitios con descargas de ríos pero menores a los que reciben los desechos de la ciudad de Huelva. Para el caso particular del Cd, los valores medidos en caleta Aspirante, península Ushuaia y bahía Brown, sitios *a priori* considerados de bajo impacto antrópico, resultaron mayores a los reportados por Ahumada & Contreras (1999) para Chile y por Usero *et al.* (2005), incluyendo los sitios más impactados de dichos trabajos. La presencia de Cd en los ambientes costeros y estuarinos, puede deberse a fuentes naturales como antrópicas

(Roesijadi, 1996). Entre las primeras se destacan: el aporte desde ríos, lixiviados desde lechos rocosos, surgencias desde fondos marinos y material producido por erosión glaciaria (Turekian, 1971). Las segundas están relacionadas a contaminación urbana, actividades portuarias y transporte atmosférico (Huse, 1999; Sokolova *et al.*, 2005).

Tabla 26. Concentraciones medias y rangos de metales en la fracción fina (<63µm) de los sedimentos correspondientes a otras zonas costeras del país y del mundo, en comparación a datos previos y a los resultados obtenidos en el presente estudio. ZI: zona industrial - PO: planta Orión - CN: club Náutico - CA: caleta Aspirante - PU: península Ushuaia.

Lugar	Fracción		Cu (µg/g PS)	Zn (µg/g PS)	Cd (µg/g PS)	Pb (µg/g PS)	Fe (mg/g PS)	Referencias
Bahía Brown (verano)	Biodisponible		20	40	<0,5	7,4	6,7	Esteves <i>et al.</i> , 2006
Bahía Ushuaia (verano)	Biodisponible	PO	54	130	<0,5	70	8,6	Esteves & Amin, 2004
		CN	26	49	<0,5	24	4,6	
Bahía Ushuaia	Total	ZI		163,63			15,82	Amin <i>et al.</i> , 1996b
		PO		260,7			39,28	
Bahía Ushuaia	Total	ZI	124,6			82,46		Amin <i>et al.</i> , 1997
		PO	285,77			209,14		
Costa Patagónica 16 estaciones	Biodisponible		2,4 - 20,1	6,8 - 160	<0,03	<1,8 - 33	--	Gil <i>et al.</i> , 1999
Estuario Blanca Blanca 3 estaciones	Total		16,2 - 17,7	60,7 - 65,9	1,2 - 1,5	13,9 - 21,3	24,4 - 26,6	Botté, 2004
Puerto de Montevideo (Uruguay - 8 estaciones)	Total		58 - 135	174 - 491	<1 a 1,6	44 - 128	--	Muniz <i>et al.</i> , 2004
Fiordos del sur de Chile	Total		16 - 22	91 - 122	0,1 - 0,5	26 - 29	--	Ahumada & Contreras, 1999
Costa Atlántica del sur de España (11 estaciones)	Total		6 - 92	18 - 460	0,26 - 0,72	2 - 46	--	Usero <i>et al.</i> , 2005
Bahía Brown (invierno)	Total		36,2 - 94,2	105,6 - 198	nd - 3	12,1 - 22,9	24,9 - 29,7	Este estudio
Bahía Ushuaia (invierno)	Total	ZI	7 - 42,9	55,6 - 117,9	0,4 - 2,2	14,9 - 24,9	19,8 - 26,7	Este estudio
		PO	5,9 - 21,8	57,9 - 95,1	nd - 1,1	20,7 - 28,8	13,5 - 18,2	
		CN	21,8 - 33,2	93,8 - 119	nd - 1,6	22,9 - 24,9	15,8 - 18,3	
		CA	5,4 - 14,3	50,6 - 65,4	0,6 - 1,8	9,4 - 13,1	12,8 - 21,4	
		PU	6,2 - 11,7	43,3 - 58,8	0,5 - 1,2	9,4 - 11,7	13,3 - 17,9	
Bahía Brown (verano)	Total		70,8 - 100,9	142,8 - 189,8	0,5 - 2,2	15,6 - 23,9	30	Este estudio
Bahía Ushuaia (verano)	Total	ZI	11,4 - 11,5	66,1 - 68,8	nd - 0,67	17,6 - 19,9	21,4 - 23,1	Este estudio
		PO	9,3 - 12,3	74 - 74,9	nd - 0,74	22,8 - 24,3	13 - 15,3	
		CN	9,4 - 13	99,1 - 126	nd - 0,72	26,6 - 27,9	10,7 - 17,7	
		CA	1,7 - 5,5	51,1 - 60,2	0,6 - 1,4	13,1 - 16,6	15,9 - 16,3	
		PU	1,8 - 4,2	31,2 - 47,8	nd - 1,1	14,4 - 18,7	12,8 - 14,5	

El valor de Fe medido en el sedimento de zona industrial resultó levemente mayor al reportado previamente por Amin *et al.* (1996b), mientras que en planta Orión se encontró una reducción del 50 % en este trabajo respecto de la concentración reportada por esos mismos autores doce años atrás. Al no existir un monitoreo periódico del área, con series de datos que permitan observar algún tipo de tendencia, no es posible aseverar una causa de la disminución registrada. Una de las recomendaciones de esta tesis es el monitoreo periódico de estos elementos.

El factor de enriquecimiento fue aplicado para analizar el nivel de contaminación y el posible impacto antrópico en los sedimentos de las bahías Brown y Ushuaia, utilizando el Fe como elemento conservativo. Varios autores han utilizado el Fe como elemento normalizador, con el fin de observar la dispersión de otros metales (Schiff & Weisberg, 1999; Trojanowski *et al.*, 2000; Mucha *et al.*, 2003; Ghrefat & Yusuf, 2006). Este factor demostró que los sedimentos de todos los sitios, incluidos los de bahía Brown, estuvieron enriquecidos en mayor proporción por Cd presentando factores de enriquecimiento mayores a 10 en la mayoría de los casos en los experimentos de 2008, en invierno y verano. Factores mayores a 1 indican que ese elemento está enriquecido en relación a su nivel en la corteza terrestre y que su concentración no está directamente controlada por los procesos naturales de erosión, disolución y sedimentación (Szefer *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Nolting *et al.*, 1999). En la zona de estudio no hay una fuente conocida de Cd que permita explicar los factores encontrados, por lo cual se requieren estudios más profundos para conocer el origen de este metal.

En el caso particular del Cu, en caleta Aspirante y Península Ushuaia en todos los experimentos, presentó valores menores a 1 indicando una movilización respecto del Fe. En zona industrial y planta Orión, también se hallaron factores menores o iguales a la unidad excepto en invierno de 2008 que sufrieron un incremento. En bahía Brown y club Náutico se hallaron factores por encima de la unidad en los experimentos de invierno, alcanzando factores de 3 y 4,3 en los experimentos de verano solamente en bahía Brown. El Zn presentó factores de enriquecimiento menores a 3,81 y el Pb alcanzó valores levemente más altos llegando hasta 6,39. Para este último metal los mayores valores fueron siempre los medidos en planta Orión y club Náutico, donde podría haber un aporte antrópico desde los pluviales. Sin embargo, considerando que la cordillera de los Andes presenta depósitos de Cu, Zn y Pb entre otros metales (Márquez, 1988), sería interesante realizar otros estudios para poder distinguir cuál es el aporte natural desde ese cordón montañoso. Las variaciones intra e interanuales encontradas podrían deberse a cambios en los parámetros físicos del ambiente que modifican la movilidad de los metales (Luoma & Rainbow, 2005).

7.3 Determinaciones en organismos

Los seres vivos están compuestos fundamentalmente por agua, la cual facilita las reacciones químicas, enzimáticas y el crecimiento microbiano. Las cenizas representan los

elementos minerales como los metales pesados que están contenidos en los tejidos (Cabello *et al.*, 2004). La materia orgánica representa una fuente de energía y almacenamiento de calorías. Los contenidos de agua, ceniza y materia orgánica varían considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de la misma especie, dependiendo de la edad, el sexo, el tamaño, el ambiente, época del año y también están estrechamente relacionados con la alimentación (Kodaira, 1991).

En ese sentido, se hallaron correlaciones positivas entre el porcentaje de ceniza y la mayoría de los metales acumulados en el tejido (**Tabla 18, Cap. IV**), aunque sólo en los experimentos de invierno. La fluctuación en el peso del individuo puede dar información acerca de la acumulación o pérdida de materia orgánica, lo cual depende de la disponibilidad de alimento pero también del estadio de desarrollo gonadal (Benninger & Lucas, 1984). En este trabajo se encontraron diferencias estacionales en los niveles de materia orgánica, resultando mayores en los experimentos de verano, acoplado a menores contenidos de agua. Las mayores temperaturas, intensidades lumínicas y disponibilidades de nutrientes permiten el desarrollo del fitoplancton que sería incorporado por los mejillones, y explicaría la mayor materia orgánica encontrada en verano. En los experimentos de invierno de 2006 y 2008, no se observaron cambios en el contenido de materia orgánica; mientras que en el experimento de 2007 se registró un descenso de materia orgánica a las semanas 4 y 6 en caleta Aspirante y península Ushuaia. Ese descenso no se manifestó en el índice de condición pero sí en los lípidos totales en la glándula digestiva. Ello podría deberse a una menor disponibilidad de alimento, factor que determinaría un mayor consumo de los lípidos endógenos, almacenados como fuente de energía. Los valores encontrados de contenido de agua, materia orgánica y ceniza concuerdan con los reportados para varias especies de bivalvos (López, 1989; Cabello *et al.*, 2004).

La concentración de lípidos totales tendió a ser mayor en glándula digestiva que en manto en todos los experimentos, en invierno como en verano. En el período estival, la concentración de lípidos en glándula digestiva tendió a ser más alta que en la época invernal, no presentándose un patrón estacional bien marcado en el manto. El contenido de lípidos totales resultó muy variable en tiempo y espacio. En los bivalvos existe una relación funcional entre el sistema digestivo y el desarrollo gonadal, coincidiendo el desarrollo de las gónadas con los períodos de abundancia de alimento (Mackie & Ansell, 1993), más que con los incrementos de temperatura (Kautsky, 1982). El mejillón *Mytilus edulis* almacena glucógeno en manto y glándula digestiva durante el período de disponibilidad de alimento para ser utilizado durante la gametogénesis (Zandee *et al.*, 1980). Variaciones del contenido de lípidos

han sido principalmente asociadas al desarrollo de gametas, niveles más altos de lípidos durante el período en el que las gónadas están inmaduras (Martínez, 1991). En este estudio, se observó en verano de 2007 una tendencia de incremento en los lípidos totales en el manto; mientras que en la glándula digestiva, los niveles se mantuvieron o bajaron, siendo zona industrial la única excepción aumentando los lípidos totales en ambos órganos. Contrariamente, en invierno de 2007, los lípidos se mantuvieron en el manto y descendieron en la glándula digestiva. Esta movilización de energía hacia el manto en verano coincide con la maduración de gametas previo al período de desove reportado por Tortorelli (1987) para la población de *M. edulis chilensis* de la bahía Ushuaia, donde el pico de intensidad de desove se produciría en mayo-junio. En los experimentos de invierno (julio-agosto) se encontró un menor contenido de lípidos totales que correspondería al período posterior al desove. En el experimento de invierno de 2008, se registró una disminución de los lípidos tanto en manto como en glándula digestiva en península Ushuaia evidenciando la utilización de este recurso energético para algún otro proceso metabólico. Las diferencias estacionales encontradas para el mejillón *Mytilus edulis chilensis* concuerdan con las encontradas para otro bivalvo del canal Beagle, la almeja *Eurhomalea exalbida* (Lomovasky *et al.*, 2004). Tal variación estacional también fue reportada para bivalvos de otras regiones, tales como la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* proveniente de Túnez (Dridi *et al.*, 2007) y los mejillones *Mytilus edulis* y *Mytilus trossulus* de Canadá (Hellou & Law, 2003), donde las variaciones en el contenido de lípidos estuvieron asociadas a la emisión y maduración de gametas.

La calidad comercial y el estado fisiológico de los moluscos bivalvos puede ser descrita mediante el índice de condición (Orban *et al.*, 2002). El descenso en el índice de condición a partir de la semana 6 en bahía Brown, en el experimento de 18 semanas, podría estar asociado a la baja disponibilidad de nutrientes que puede verse en la **Tabla 7 (Cap. III)**, lo cual se vió reflejado en la disminución de lípidos totales en manto y glándula digestiva. El índice de condición de los mejillones provenientes de bahía Brown, para su posterior trasplante a bahía Ushuaia, no varió entre los años de muestreo en los experimentos de invierno ni en los de verano. Estacionalmente, el índice medido en verano de 2008 fue más alto que el de invierno del mismo año, muy probablemente asociado a la mayor disponibilidad de alimento y al ciclo reproductivo.

El índice de condición medido en los sitios de bahía Ushuaia para los experimentos de invierno no varió entre tiempos para cada lugar, así como tampoco entre sitios para la misma semana de muestreo. Este índice no mostró correlaciones significativas con ninguno de los parámetros físicos o químicos, pero sí con la actividad de catalasa, glutatión-S-transferasa y

peroxidación lipídica en la branquia, y la actividad de glutatión-S-transferasa en la glándula digestiva (**Tabla 18, Cap. IV**). El hecho de no registrarse variaciones en este parámetro indicaría condiciones de disponibilidad de alimento muy parecidas en todos los sitios y a lo largo del tiempo de duración de los experimentos, no reflejándose en este índice las diferencias de nutrientes medidas en el agua, principalmente en club Náutico. En los experimentos de verano, en ninguno de los sitios se registraron diferencias en el índice de condición entre los tiempos de exposición para cada lugar, aunque sí entre algunos sitios para iguales tiempos de exposición. Esas diferencias estarían explicadas por las asociaciones encontradas entre algunas variables, como las correlaciones negativas significativas entre dicho índice y el oxígeno disuelto y los metales pesados acumulados en la branquia y en la glándula digestiva. En cambio, presentó correlaciones positivas con el pH y el nitrato. En los ecosistemas acuáticos, el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH son variables ambientales que afectan a los procesos oxidativos (Parihar *et al.*, 1997). Los metales pesados también son capaces de inducir procesos de estrés oxidativo (Santovito *et al.*, 2005) que pueden afectar el estado general de los organismos. Mubiana *et al.* (2006) encontraron correlaciones negativas entre el índice de condición y varios metales en el tejido del mejillón *Mytilus edulis*. Los resultados muestran la importancia del índice de condición para explicar la variabilidad natural observada entre los individuos de tamaño corporal similar dentro del mismo hábitat. Generalmente, la condición fisiológica es considerada uno de los principales factores con potencial para controlar la distribución interna y retención de los contaminantes en los mejillones (Widdows & Donkin, 1992).

En el presente trabajo se encontraron diferencias estacionales en el índice de condición en los experimentos de 2008, presentando valores más altos en verano que podrían estar asociados a varios factores como el período de maduración de las gametas previo al desove, la mayor disponibilidad de alimento y el incremento de temperatura. En este sentido, en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Dridi *et al.*, 2007) encontraron variaciones en el índice de condición asociadas a la actividad reproductiva a lo largo de todo el año. Para el mejillón *Mytilus galloprovincialis* fueron reportadas diferencias en este índice asociadas a la disponibilidad de nutrientes (Nesto *et al.*, 2004) y al ciclo reproductivo (Regoli, 1998). Por otro lado, en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* de la costa sur de Portugal (Bebiano *et al.*, 2007) y en la ostra *Crassostrea rhizophorae* de tres estuarios de Brasil (Valdez Domingos *et al.*, 2007) no se encontraron diferencias estacionales en el índice de condición.

La tendencia decreciente de bioacumulación de los metales pesados por *Mytilus edulis chilensis* fue Fe>Zn>Cu>Cd>Pb. La misma secuencia de acumulación para los cinco metales

fue hallada por Olavarría Contreras (2007) en el mejillón *M. chilensis* y por O'Leary & Breen (1998) en el mejillón *M. edulis* para los metales Fe, Zn y Cu. La única excepción se registró en el experimento de invierno de 2006, donde se acumuló el Pb en mayor proporción que el Cd en los dos órganos analizados (branquia y glándula digestiva).

En este trabajo se hallaron correlaciones positivas entre Cu-Zn-Fe y negativas entre dichos metales y el Cd. Según Rainbow (1990), metales esenciales como el Fe, Cu y Zn participan formando parte de cofactores enzimáticos y las posibles correlaciones entre esos metales pueden deberse a similares requerimientos bioquímicos, y/o el secuestro pasivo de los metales a ligandos intracelulares, según sus concentraciones relativas. Cuando metales no esenciales como el Cd entran en la célula, se produce una inevitable competencia con los metales esenciales existentes (Amiard *et al.*, 2006), lo cual se confirma con las correlaciones negativas halladas.

Los resultados demostraron que el mejillón *Mytilus edulis chilensis* de bahía Ushuaia, acumuló Zn principalmente en la branquia, mientras que el Cu y el Fe se concentraron en la glándula digestiva. La única excepción la constituyeron los mejillones transplantados a club Náutico en el experimento de verano de 2008, donde no se observó una acumulación de Fe diferencial según el tejido. El Pb y el Cd no mostraron un órgano preferencial de acumulación. La branquia y la glándula digestiva son los principales órganos de acumulación de metales pesados (Gagnon *et al.*, 2006), y se ha sugerido que la concentración de metales puede ser utilizada para estimar la exposición a metales por las vías disuelta y particulada en la branquia y glándula digestiva, respectivamente (Fisher *et al.*, 1996). De esta manera, el Fe y el Cu serían incorporados unidos a material particulado y el Zn en forma soluble. La misma distribución tisular del Fe, Cu y Zn fue hallada en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* por Regoli & Principato (1995), quienes además encontraron altas concentraciones de Pb en la branquia. También en *M. galloprovincialis*, Irato *et al.* (2003) midieron mayores concentraciones de Fe y Cd en la glándula digestiva, mientras que no encontraron patrones selectivos de acumulación para el Cu y el Zn. Regoli (1998) encontró altos niveles de Fe y Cu en la glándula digestiva, mientras que el Pb y el Zn no evidenciaron un órgano blanco específico. Las magnitudes de Cd y Cu acumulados por *M. edulis chilensis* fueron similares a los reportados por Gil *et al.* (2006) para el mejillón *Mytilus edulis* de varios lugares de la Patagonia Argentina (entre Caleta Córdova en Chubut hasta Punta Loyola en Santa Cruz). Los valores de Zn medidos en branquia superaron en varios casos los máximos valores reportados por Gil *et al.* (2006), correspondientes a caleta Córdova y Comodoro Rivadavia (Provincia del Chubut, Argentina). Los valores de metales encontrados en este trabajo resultaron similares a

los reportados para *Mytilus edulis* de Noruega (Airas, 2003) y para otros bivalvos de España (Usero *et al.*, 2005). Varias investigaciones se han llevado a cabo para evaluar la bioacumulación de metales pesados en diferentes bivalvos alcanzando diversos resultados en los distintos órganos y especies. Los resultados son difíciles de comparar y muy complejos dado que las respuestas son especie-específicas, varían dependiendo de la cantidad y tipo de metal y están afectadas por los cambios ambientales (Luoma & Rainbow, 2005).

La bioacumulación registrada en el período invernal fue mucho más variable en relación al periodo estival. Por otra parte, se ha observado una clara diferenciación estacional en la acumulación de Cu, Fe y Zn en la glándula digestiva, siendo mayor en el invierno de 2008 respecto al verano del mismo año. Varios trabajos han reportado mayores niveles de metales en invierno (Soto *et al.*, 1995, Regoli, 1998; Avelar *et al.*, 2000), lo cual podría deberse a las etapas del ciclo reproductivo que influyen la incorporación, almacenamiento y/o excreción de los metales y a los cambios estacionales en el peso fresco durante el desarrollo de los tejidos gonadales (Regoli & Orlando, 1994). Regoli (1998) también encontró en el mejillón *M. galloprovincialis* que la glándula digestiva acumuló concentraciones mayores de metales en el invierno. Dicho autor argumentó que, en comparación con las branquias, este resultado no estaría primariamente relacionado con una biodisponibilidad diferente de los metales pesados durante este período, sino a una mayor infiltración de los tejidos gonadales en la glándula digestiva durante el verano. Al igual que en este trabajo, Regoli (1998) encontró correlaciones negativas entre el índice de condición y la concentración de metales pesados en la glándula digestiva.

La bioacumulación de metales pesados presentó una gran variabilidad en tiempo y espacio, en concordancia con los resultados publicados por O'Leary & Breen (1998) para el mejillón *M. edulis*. A pesar de que las máximas concentraciones de Cu, Zn y Fe en sedimento se hallaron en bahía Brown, las mayores bioacumulaciones se registraron en los mejillones transplantados a zona industrial, planta Orión y club Náutico. Los mejillones incorporan los metales disueltos de la columna de agua a través de las branquias y los particulados, a través de la ingestión de alimento. Las concentraciones de metales pesados en sedimento son habitualmente más altas que las encontradas en el agua, razón por la cual los sedimentos son ampliamente utilizados como indicadores de la contaminación que ha sufrido el ecosistema marino. Los metales que son inmovilizados en los sedimentos constituyen un riesgo potencial en la calidad del agua y la biota, debido a que pueden ser liberados de nuevo a la fase acuosa (Soto, 2001). Sin embargo, la determinación de los metales acumulados en los tejidos de los organismos da información acerca de la biodisponibilidad de estos elementos en el ambiente

(Rainbow & Phillips, 1993) y del posible impacto de los mismos en la estructura trófica. El hecho de que no exista una relación directa entre los niveles de metales en los sedimentos y en los organismos, indica que el cambio en la carga metálica de los sedimentos no es el único factor que influencia la biodisponibilidad de los metales para los organismos (Yap *et al.*, 2002). Entre otros factores que modulan la biodisponibilidad figuran:

- las condiciones hidrológicas (flujo de agua, propiedades hidrodinámicas), geoquímicas (granulometría y composición del sedimento) y ambientales (temperatura, pH y salinidad), que pueden influenciar la bioacumulación de los metales al modificar su grado de biodisponibilidad (Guha, 2004; Ruus *et al.*, 2005).
- la contaminación intrínseca por metales en sitios determinados.
- la eficiencia de los mecanismos de detoxificación de la especie, peso corporal y estado reproductivo (Burger & Gochfeld, 2006).

Es decir, todo el metal retenido en el sedimento no está necesariamente disponible para ser incorporado por la biota (O'Leary & Breen, 1998), tal como ocurrió en bahía Brown. Las características físicas y químicas medidas en el agua de zona industrial, planta Orión y club Náutico, sitios que evidenciaron cierto deterioro en la calidad del agua, estarían modulando la disponibilidad de los metales para su incorporación por *M. edulis chilensis*.

Comparativamente con los demás sitios, el mayor valor de Cd se midió en los mejillones de península Ushuaia (3,25 µg/g) en el experimento de invierno de 2006. Considerando que no hay ninguna fuente puntual conocida de Cd en las proximidades de península Ushuaia, el Cd podría ser de origen natural o bien podría ser transportado desde las zonas con alta influencia antrópica por la corriente antihoraria descrita por Balestrini *et al.* (1998). Sin embargo, son necesarias otras investigaciones para poder establecer la procedencia del Cd encontrado en la península Ushuaia. En relación a dicho metal, es importante resaltar que en varios casos donde resultó no detectable en el sedimento, se hallaron valores positivos en la branquia y la glándula digestiva de los mejillones. Esta alta bioacumulación de Cd se ha dado igualmente en moluscos de la zona norte de Patagonia (Pérez *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2007), donde también resultaron no detectables los niveles de este metal en el sedimento. Este tipo de relación entre ambos sustratos ha sido citado por otros autores (Berrow, 1991) y estaría relacionado con una mayor solubilidad de este elemento en sistemas oxidados, respecto de los otros metales. Bajo condiciones aeróbicas, el Cd es un débil competidor en la adsorción sobre oxihidróxidos metálicos (Bewers *et al.* 1987) y, por lo tanto, es factible que predominen las formas disueltas, con mayor disponibilidad para la biota. La fuente de este metal aún es incierta.

Con respecto al Pb, valores por encima del límite de detección sólo se hallaron en el experimento de invierno de 2006 en los dos órganos estudiados y en el experimento de verano de 2007, en la branquia de los mejillones de bahía Brown (3,25 µg/g), caleta Aspirante en la semana 4 (2,56 µg/g) y zona industrial en la semana 6 (3,48 µg/g). La máxima concentración se halló en el experimento de invierno de 2006 en la branquia de los mejillones transplantados a zona industrial (15,57 µg/g), valor que supera ampliamente a los reportados para mejillones de Comodoro Rivadavia en la provincia del Chubut (Argentina), zona con gran actividad petroquímica y a los de otras zonas costeras de la Patagonia (Gil *et al.*, 2006). Es importante remarcar que, en los experimentos posteriores, los valores de Pb fueron en su mayoría no detectables sugiriendo una disminución del aporte de dicho metal en concordancia con la disminución registrada en los niveles de Pb en el sedimento de zona industrial con respecto a datos previos (Amin *et al.*, 1996b; 1997). Como se ha comentado previamente, dicha disminución estaría asociada a un menor vertido de efluentes desde las industrias debido al cierre de numerosas fábricas en la zona industrial de la ciudad de Ushuaia producto de la crisis económica del año 2001.

Los biomarcadores pueden ser considerados como herramientas complementarias para los análisis químicos y ecológicos clásicamente utilizados en monitoreos en campo (Sanchez *et al.*, 2008). Las mediciones a niveles bioquímicos o fisiológicos detectan más rápida y específicamente la presencia de varios compuestos tóxicos, permitiendo la identificación temprana de algún cambio, antes que los efectos deletéreos alcancen un nivel mayor de organización (Monserrat *et al.*, 2003). Debido a que numerosos contaminantes pueden modificar directa o indirectamente el balance entre la concentración de pro-oxidantes y antioxidantes, la determinación de estrés oxidativo a través de peroxidación lipídica, daño a ADN, oxidación de proteínas y/o las respuestas antioxidantes en las especies acuáticas son comúnmente utilizadas como biomarcadores no específicos (Geracitano *et al.*, 2004a; 2004b).

Es importante resaltar que además de los factores fisiológicos y ambientales, la contribución del desarrollo ontogénico es también un factor determinante de los niveles de antioxidantes en los mejillones (Filho *et al.*, 2001; Sheehan & Power, 1999; Rudneva, 1999). Esto concuerda con el hecho de que las funciones fisiológicas en los mejillones están influenciadas por el tamaño (Sukhotin *et al.*, 2002). Varios autores encontraron un descenso de la actividad enzimática a medida que aumentaba la edad en el mejillón *Mytilus edulis* (Viarengo *et al.*, 1991b). Sukhotin *et al.* (2002) encontraron un descenso en la catalasa dependiente del peso dentro de clases separadas de edades en el mejillón *Mytilus edulis*. Estos hallazgos indican que en aquellos estudios donde se reportó un descenso de la actividad

enzimática relacionado con el incremento de edad, podría ser debido en realidad al incremento en tamaño de los mejillones de mayor edad y no debido el efecto de la edad *per se*. Teniendo en cuenta lo mencionado, es importante destacar que en el presente estudio los organismos utilizados pertenecían a la misma cohorte, por lo cual se consideró que presentaban la misma edad y también se seleccionaron de igual tamaño. De esta manera, las variaciones encontradas no podrían ser atribuidas a diferencias en edad y/o tamaño.

En el presente estudio se evaluó la actividad de la enzima superóxido dismutasa con la finalidad de analizar su potencial uso como biomarcador en la especie *Mytilus edulis chilensis* en la zona de bahía Ushuaia. La actividad de esta enzima en la branquia de dicha especie en bahía Brown, a tiempo cero, fue mayor en 2007 que en 2008 en verano y en invierno, no observándose diferencias estacionales. Se observaron diferencias en la actividad enzimática entre órganos sólo en invierno de 2008, donde la actividad de superóxido dismutasa resultó mayor en la glándula digestiva. En los mejillones *M. galloprovincialis* (Box *et al.*, 2007) y *M. edulis* (Manduzio *et al.*, 2004) se encontró mayor actividad de esta enzima en glándula digestiva, mientras que Regoli & Principato (1995) no hallaron tal diferenciación en *M. galloprovincialis*. En el mejillón *Unio tumidus* tampoco se encontraron diferencias en la actividad de la enzima superóxido dismutasa entre la branquia y la glándula digestiva (Cossu *et al.*, 1997). En la literatura se reportan distintos tipos de respuestas cuando se compara la actividad de esta enzima entre tejidos. No se han hallado aún las causas de tales discrepancias (Abele & Puntarulo, 2004).

En los sitios de bahía Ushuaia la actividad de superóxido dismutasa en la branquia, en invierno de 2007, resultó mayor que en verano de ese mismo año, mientras que en 2008 no se observaron cambios estacionales en la branquia. En la glándula digestiva, se observó un efecto claro de la estacionalidad siendo la actividad de superóxido dismutasa mayor en los dos experimentos de invierno. La misma tendencia estacional fue registrada en el mejillón *M. galloprovincialis* por Borković *et al.* (2005). Lau *et al.* (2004) registraron, en el mejillón *Perna viridis*, variación estacional en la actividad de la enzima superóxido dismutasa siendo mayor en invierno y otoño, respecto de la primavera y verano. Por el contrario, en un estudio realizado en la glándula digestiva del mejillón *Perna perna* (Filho *et al.*, 2001) se observó mayor actividad de esta enzima en verano. En la lapa *Nacella magellanica* del canal Beagle (Malanga *et al.*, 2007) no se encontró efecto de la estacionalidad sobre la actividad de la superóxido dismutasa. Respecto de la actividad de esta enzima en los órganos analizados, se

registró en el experimento de invierno de 2008 mayor actividad en la glándula digestiva; mientras que en el verano de ese mismo año la actividad tendió a ser mayor en la branquia.

La bibliografía muestra resultados disímiles en cuanto a la variación estacional de la enzima superóxido dismutasa. Las variaciones encontradas en invierno estarían relacionadas al ciclo reproductivo y a cambios, asociados a la temperatura, en los patrones de almacenamiento y acumulación de alimento. Ello puede causar cambios en el estatus nutricional y hormonal que afectaría los niveles de actividad enzimática (Orbea *et al.*, 1999). En verano se podría deber a un aumento de la temperatura que, en conjunción con mayores disponibilidades de alimento, inducirían consumo de oxígeno generando radicales de oxígeno celulares. Esta situación sería compensada aumentando las actividades antioxidantes (Filho *et al.*, 2001).

En los experimentos de corto plazo la actividad de superóxido dismutasa también tendió a ser más alta en invierno y en la glándula digestiva. En invierno, en los tres sitios estudiados se observó una rápida respuesta de esta enzima. En este sentido, Nasci *et al.* (2002) han enfatizado la importancia de medir esta enzima por su rápida respuesta a los estresantes ambientales. En verano, en la branquia, la actividad prácticamente no varió; mientras que en la glándula digestiva se registró una clara disminución en los tres sitios estudiados. Doyotte *et al.* (1997) no registraron cambios en la actividad de esta enzima en exposiciones en laboratorio ni en estudios a campo.

Un papel fundamental le ha sido otorgado a la enzima catalasa en la inhibición de la reacción de Fenton reduciendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno (Regoli & Principato, 1995; Regoli *et al.*, 1998). Aunque la actividad de dicha enzima no responde específicamente a un grupo de contaminantes, sino al estrés oxidativo en general, es considerada una defensa primaria (Damiens *et al.*, 2007) y fue evaluada en este estudio con el fin de conocer su evolución. En bahía Brown, a tiempo cero, en invierno y en verano la actividad fue más alta en glándula digestiva. En branquia como en glándula digestiva, la actividad de esta enzima fue mayor en el año 2007, incluyendo verano e invierno en concordancia con los resultados obtenidos en la enzima superóxido dismutasa. Con respecto a los sitios de bahía Ushuaia, la actividad de catalasa también fue mayor en la glándula digestiva en invierno y en verano. En los mejillones *Mytilus galloprovincialis* (Box *et al.*, 2007; Santovito *et al.*, 2005; Roméo *et al.*, 2003), *Mytilus edulis* (Power & Sheehan, 1996), *Perna viridis* (Verlecar *et al.*, 2008; De Luca-Abbott *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2004) y *Unio tumidus* (Cossu *et al.*, 1997), también se observó mayor actividad de catalasa en la glándula digestiva. Diferencias estacionales se registraron en los experimentos de 2008, midiéndose

mayor actividad de catalasa en verano en la glándula digestiva, mientras que el efecto de la estacionalidad no fue tan marcado en la branquia. En la lapa *Nacella magellanica* (Malanga *et al.*, 2007) también se halló mayor actividad de catalasa en verano, en comparación con el invierno. En este mismo sentido, son varios los trabajos que han encontrado esta diferencia estacional en diferentes bivalvos alegando un incremento de la actividad metabólica en relación directa con el aumento de temperatura del agua (Santovito *et al.*, 2005; Borković *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2002; Cancio *et al.*, 1999; Power & Sheehan, 1996).

En invierno de 2006, sólo en península Ushuaia se observó un incremento en la catalasa en la semana 4 respecto de la 2 en ambos órganos estudiados. En los tres sitios restantes la actividad se mantuvo en valores similares. Las correlaciones negativas entre catalasa y los metales Cu, Zn y Fe (**Tabla 18, Cap. IV**), indicaron que estos metales inhibieron la actividad de esta enzima. En invierno de 2007, en todos los sitios se registró un gran descenso de actividad de catalasa a las semanas 4 y 6 en branquia y en glándula digestiva. La misma tendencia se observó en invierno de 2008, en zona industrial, planta Orión y club Náutico. En este sentido, Frenzilli *et al.* (2004) también registraron en mejillones *M. galloprovincialis* transplantados, un aumento en la catalasa durante las primeras 3 semanas con una posterior inhibición en la semana 4 como respuesta a la presión oxidativa ejercida en el sitio al que fueron transplantados. En *Perna perna* (De Luca-Abbott *et al.*, 2005), se halló el mismo patrón que el descrito para *M. edulis chilensis* en este estudio y los autores propusieron que podía ser la respuesta a una descarga puntual de contaminación. Según Bebianno *et al.* (2005), las enzimas antioxidantes son inducidas por varios contaminantes ambientales bajo condiciones pro-oxidantes. Inicialmente sus concentraciones se incrementan para contrarrestar el estrés oxidativo pero exposiciones prolongadas pueden causar su disminución, llevando a daño oxidativo irreversible con pérdida de la funcionalidad celular y posterior muerte de los organismos.

Las actividades de catalasa, en la branquia como en la glándula digestiva, presentaron poca variación intranual en los veranos. En concordancia con los resultados de invierno, la actividad de esa enzima tendió a bajar con el tiempo de exposición en ambos órganos evaluados. En el período estival su actividad no se asoció con los niveles de metales pesados. Esto podría deberse a que los metales se hallaron en concentraciones más bajas en el verano, no siendo suficientes para desencadenar una respuesta en esta enzima. La inhibición de la catalasa también podría estar relacionada a la producción de un exceso de anión superóxido, el cual podría no haber sido convertido en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa (Halliwell & Gutteridge, 1999). Sin embargo, no se puede asegurar que la inhibición

encontrada responde específicamente a esta situación. Es necesario realizar estudios complementarios del papel de las distintas especies oxidantes en este escenario.

En verano de 2007 se registró un gran incremento de la catalasa en la semana 4 en zona industrial en ambos órganos. Dicho incremento podría ser una respuesta a una condición puntual que genere estrés oxidativo en los mejillones de dicho lugar. Sin embargo, no parecería estar directamente asociado a ninguno de los parámetros físicos o químicos evaluados en el presente trabajo, ya que no resultaron muy diferentes de los otros sitios monitoreados. Esta variabilidad confirma que pueden ocurrir respuestas opuestas localmente, aún bajo la influencia de los mismos factores pro-oxidantes (Bocchetti & Regoli, 2006). Además de los factores medidos, la zona industrial está afectada por el aporte del arroyo Grande que podría estar modulando en parte, la respuesta antioxidante.

En los experimentos intensivos, los tres sitios estudiados mostraron niveles de actividad semejantes tanto en verano como en invierno. En concordancia con los experimentos de seis semanas, en invierno la actividad de la catalasa en la branquia también bajó significativamente en zona industrial y planta Orión, mientras que en club Náutico tendió a bajar aunque no se encontró diferencia estadística. En la glándula digestiva se registraron algunas variaciones pero no hubo diferencias entre el inicio y el final del experimento. En verano, la actividad tendió a ser mayor, pero presentó mayor variabilidad y se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo de experimentación.

La enzima glutatión-S-transferasa pertenece a una familia de proteínas multifuncionales involucradas en la conjugación de compuestos tóxicos con sustratos endógenos hidrosolubles como el glutatión (GSH) para formar metabolitos menos tóxicos y más fáciles de ser eliminados por las células (Sheehan *et al.*, 2001). Es por ello que la actividad de dicha enzima ha sido propuesta como un biomarcador para muchas especies acuáticas de peces, crustáceos y moluscos (van der Oost *et al.*, 2003; Bebianno *et al.*, 2007) y por lo cual fue seleccionada para ser estudiada en este trabajo.

La actividad de glutatión-S-transferasa en bahía Brown, a tiempo cero, en branquia fue mayor que en la glándula digestiva en los dos experimentos de verano; mientras que en los experimentos de invierno esa diferencia entre órganos sólo se observó en el experimento de 2007. En la branquia y en la glándula digestiva, la actividad tendió a ser mayor en los experimentos de 2007, en verano como en invierno. En los sitios de bahía Ushuaia se observó mayor actividad de glutatión-S-transferasa en la branquia que en la glándula digestiva en los experimentos de verano; mientras que en los experimentos de invierno no se observó una tendencia marcada respecto a un órgano blanco. Mayor actividad de esta enzima en la

branquia fue reportada para *M. edulis* (Fitzpatrick & Sheehan, 1993) y para *M. galloprovincialis* (Regoli & Principato, 1995). Sobre esta última especie, Bebianno *et al.* (2007) evaluaron la actividad de glutatión-S-transferasa en los diferentes órganos y la mayor actividad la registraron en la branquia (58 %) y en la glándula digestiva (17 %), en menor medida en el manto (10 %), pie (8 %) y gónadas (7 %). Esto se debe a que las branquias y la glándula digestiva son los principales órganos de contacto con las sustancias tóxicas que se incorporan del ambiente. En el mismo estudio encontraron que la actividad de esta enzima se incrementa a medida que disminuye la salinidad y aumenta la temperatura, mientras que su actividad no se ve afectada por el pH. En este trabajo también se halló en los experimentos cortos correlación positiva de la enzima con la temperatura, mientras que en los experimentos de seis semanas se hallaron correlaciones con el oxígeno disuelto y también con el pH.

Al comparar la actividad de glutatión-S-transferasa en branquia entre verano e invierno, la actividad resultó mayor en verano, excepto en la semana 2 de exposición del experimento de invierno de 2007. En este sentido, varios autores (Roméo *et al.*, 2003; Borković *et al.*, 2005) encontraron que la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa, así como de la enzima catalasa, está bajo un importante control estacional resultando mayor en la estación de verano (Filho *et al.*, 2001). Al igual que la catalasa, en invierno de 2007 la glutatión-S-transferasa presentó máximos de actividad en la semana 2, tanto en branquia como en glándula digestiva, descendiendo hasta 88 % y 70 % respectivamente en las semanas 4 y 6 en todos los sitios de bahía Ushuaia. Ello se debería a la inhibición ejercida por el Cu, Zn y Fe (**Tabla 18, Cap. IV**).

En los experimentos intensivos no se observó variación estacional en la branquia ni en la glándula digestiva. Tanto en verano como en invierno la actividad fue mayor en la branquia, tendencia que sólo se observó en verano en los experimentos de seis semanas. En invierno, en los dos órganos estudiados, se registró un pico de actividad al día 8 de exposición con un posterior descenso en planta Orión y en club Náutico. En verano la actividad también varió en el tiempo en los tres sitios monitoreados no evidenciando una clara tendencia.

La alteración de los fosfolípidos de la membrana a través de la peroxidación lipídica es considerada uno de los sucesos claves en el daño oxidativo (Doyotte *et al.*, 1997; Cossu *et al.*, 2000). Un incremento en los niveles de malondialdehído puede relacionarse a un deterioro de la calidad ambiental de un determinado lugar (Charissou *et al.*, 2004). Varios trabajos han informado que la peroxidación de lípidos se incrementa en los tejidos de diferentes especies de organismos acuáticos como resultado de la exposición a contaminantes en el ambiente (Winston & Di Giulio, 1991). En este estudio, se observó que en los experimentos de invierno

la peroxidación lipídica en branquia y glándula digestiva estuvo influenciada por parámetros químicos como el amonio, el pH y el oxígeno disuelto. Sólo en los experimentos de invierno se halló una correlación negativa entre la peroxidación de lípidos y los niveles de Fe y Cu en la branquia. En los experimentos intensivos de invierno se halló correlación positiva entre la peroxidación de lípidos y la actividad de la enzima catalasa, tanto en la branquia como en la glándula digestiva, y correlación negativa con la salinidad. En los experimentos de verano y de invierno, se hallaron correlaciones positivas entre la peroxidación lipídica en branquia y los biomarcadores enzimáticos. En la glándula digestiva, la peroxidación lipídica sólo correlacionó positivamente con las actividades de catalasa y glutatión-S-transferasa en los experimentos de invierno. Aumentos conjuntos en las actividades antioxidantes y los niveles de peroxidación en otros mejillones han sido reportados (Torres *et al.*, 2002; Vlahogianni *et al.*, 2007). La sensibilidad de las enzimas antioxidantes como biomarcadores ha sido considerada mayor que la determinación de los productos de la peroxidación lipídica (Box *et al.*, 2007). En este sentido, contrariamente a lo encontrado en el presente estudio, numerosos autores han encontrado una correlación negativa entre los niveles de peroxidación lipídica y las actividades de las enzimas antioxidantes, demostrando que reducciones en las defensas antioxidantes se correspondían con aumentos del índice de peroxidación en la glándula digestiva de *Mytilus edulis* (Viarengo *et al.*, 1991a; Power & Sheehan, 1996). Es importante considerar que distintas especies de moluscos, incluso organismos de la misma especie, pueden presentar diferente susceptibilidad y distinto tipo de respuesta. Ello no sólo debido a las diferencias locales en las condiciones ambientales, sino por diferencias en los ritmos biológicos, los ciclos reproductivos y en los propios mecanismos antioxidantes de cada individuo (Livingstone *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2007).

Con respecto a la respuesta en función del tejido analizado, en bahía Brown se observó una peroxidación lipídica tres veces mayor en la branquia que en la glándula digestiva, tanto en verano como en invierno de 2007. Contrariamente, en los transplantes intensivos se halló entre dos y tres veces más peroxidación lipídica en la glándula digestiva que en la branquia. La glándula digestiva posee mayores niveles de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) que las branquias (Ribera *et al.*, 1991) y esto podría explicar parcialmente la mayor peroxidación lipídica observada en la glándula digestiva de los experimentos intensivos. Box *et al.* (2007) no encontraron diferencias en los niveles de este biomarcador entre glándula digestiva y branquia en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

Una diferenciación estacional se registró solamente en los mejillones de bahía Brown que presentaron mayor peroxidación en verano de 2007, respecto del invierno del mismo año.

En los mejillones transplantados a bahía Ushuaia no se encontró una clara diferenciación estacional. Tampoco encontraron diferencias estacionales en los mejillones *Perna viridis* (Lau *et al.*, 2004) y *Mytilus edulis* (Shaw *et al.*, 2004), mientras que en los mejillones *Perna perna* (Filho *et al.*, 2001) y *Mytilus galloprovincialis* (Moukrim *et al.*, 1997) han encontrado la existencia de un perfil estacional en los niveles de peroxidación. Bocchetti & Regoli (2006) hallaron importante variabilidad en los niveles de peroxidación en el mejillón *M. galloprovincialis* durante el invierno y fue asociada al desove, con la consecuente degradación del epitelio digestivo y un incremento de los procesos autofágicos.

El peróxido de hidrógeno es capaz de reaccionar con el Fe y el Cu intracelular y producir especies reactivas de oxígeno, vía la reacción de Fenton, que pueden iniciar o propagar el proceso de peroxidación lipídica (Hermes-Lima, 2004). Considerando que la catalasa disminuye los niveles de peróxido de hidrógeno al convertirlo en agua y oxígeno molecular, algunos autores han encontrado relaciones inversas entre la actividad de catalasa y la peroxidación lipídica en mejillones (Lau & Wong, 2003; Pampanin *et al.*, 2005). Sin embargo, se han hallado correlaciones positivas entre el peróxido de hidrógeno y la peroxidación lipídica en el mejillones *Perna viridis* (Verlecar *et al.*, 2008) y *M. galloprovincialis* (Cavaletto *et al.*, 2002). El hecho de que la actividad de catalasa y los niveles de peroxidación varíen de manera conjunta sugiere que hay un exceso de peróxido de hidrógeno que difunde hacia las células causando estrés oxidativo. Aunque la catalasa remueve la mayor parte del peróxido de hidrógeno aumentando su actividad, no es suficiente para evitar la generación de radicales hidroxilos, causando un incremento en la peroxidación de los lípidos (Bebianno *et al.*, 2005).

Al analizar las respuestas de los mejillones transplantados a bahía Ushuaia pudo observarse cierta heterogeneidad en tiempo y espacio, pero la tendencia es muy similar en la branquia y la glándula digestiva. Con algunas excepciones, los niveles de peroxidación se mantuvieron o bien disminuyeron con el tiempo de exposición. En el experimento de invierno de 2008, se registraron los menores niveles de peroxidación de lípidos en la branquia y en la glándula digestiva, siendo la peroxidación lipídica medida en caleta Aspirante y península Ushuaia mayor a la registrada en zona industrial, planta Orión y club Náutico. En el experimento de invierno de 2007, pudo observarse en la branquia un incremento significativo en los niveles de peroxidación en la semana 2 con un posterior descenso en todos los sitios estudiados, en concordancia con los resultados obtenidos en las actividades de catalasa, glutatión-S-transferasa y superóxido dismutasa, ésta última sólo en zona industrial y península Ushuaia. Algunos autores han reportado en mejillones un descenso de las actividades

enzimáticas antioxidantes, luego de una exposición de corto plazo a varios contaminantes (Canesi *et al.*, 1999; Gravato *et al.*, 2005). Varios autores sugieren que los períodos de exposición cortos pueden inducir un descenso transitorio en las defensas antioxidantes, así como en otros marcadores de daño oxidativo, que puede continuarse con una inducción del sistema antioxidante. Sin embargo, si los mejillones estuvieron expuestos a un grado de contaminación intensa, los antioxidantes pueden verse sobrepasados presentando un progresivo descenso luego de un gran incremento inicial (Regoli & Principato, 1995; Frenzilli *et al.*, 2004). Esta inhibición indica la dificultad a la que se enfrentan los organismos para evitar el estrés oxidativo.

Algunos metales son utilizados por los organismos para estabilizar estructuras proteicas, facilitar reacciones de transferencia de electrones y catalizar reacciones enzimáticas (Ash & Stone, 2003). Por ejemplo, el Cu, Zn y Fe son constituyentes esenciales de los sitios catalíticos de varias enzimas (Allan, 1997). Sin embargo, debido a que los metales pueden existir con diferentes estados de oxidación, también son capaces de participar en procesos que conducen a estrés oxidativo en los moluscos (Sheehan & Power, 1999). El ejemplo más claro es la conversión de peróxido de hidrógeno en un radical hidroxilo, vía la oxidación de un catión metálico de Fe o Cu a través de la reacción de Fenton. Otros metales, como el Pb y el Cd, basan su mecanismo de acción en su capacidad para reaccionar y eliminar grupos tiol, tanto los contenidos en pequeñas moléculas como el glutatión reducido como los ligados a proteínas, lo que puede dar lugar a la producción de radicales hidroxilo y, como consecuencia, se eleva la peroxidación lipídica (Stohs & Bagchi, 1995). Como respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno, los organismos incrementan las actividades de las enzimas antioxidantes para evitar el daño oxidativo. En estudios previos se ha encontrado que los metales pesados tienen un efecto estimulador sobre la actividad enzimática (Torres *et al.*, 2002; Vlahogianni *et al.*, 2007) y sobre la peroxidación lipídica (Viarengo *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2002). Sin embargo, en el presente estudio se observó un efecto inhibitorio de los metales, como puede observarse en las correlaciones negativas halladas (**Tabla 18, Cap. IV**). Efecto inhibitorio también se ha encontrado en equinodermos (Montero Torreiro, 2000) y en invertebrados terrestres (Posthuma & van Straalen, 1993). Estos últimos autores argumentaron que los invertebrados poseen mecanismos de adaptación tales como la estabilización de las membranas (como consecuencia una menor sensibilidad al daño inducido por los metales pesados) o bien un aumento del metabolismo destructivo de los peróxidos lipídicos. En ese sentido, se ha demostrado el papel claramente protector del glutatión reducido (GSH), un antioxidante no enzimático, que previene el daño oxidativo generado por

algunos metales pesados que paralizan el ciclo de óxido reducción y la formación de especies reactivas de oxígeno (Santovito *et al.*, 2005). Se requieren nuevos estudios para poner a prueba la hipótesis sobre el poder antioxidante del glutatión reducido en el mejillón *Mytilus edulis chilensis*.

Otra posible explicación del efecto inhibitorio de los metales pesados podría estar asociada a la existencia de las metalotioneínas. Éstas son proteínas no enzimáticas de bajo peso molecular, con múltiples funciones biológicas, que contienen numerosos grupos sulfhidrilos capaces de unirse a diferentes metales. Estas proteínas se encargan de la regulación homeostática de metales esenciales como el Cu, Zn (Andrews, 2000) y Fe (Fleet *et al.*, 1990; Viarengo *et al.*, 1999; Baird *et al.*, 2006), e incluso intervienen en la detoxificación de metales no esenciales como el Cd y el Hg formando compuestos insolubles fácilmente eliminables de la células por exocitosis (Cavaletto *et al.*, 2002). El rol antioxidante de las metalotioneínas ya ha sido reportado en bivalvos (Viarengo *et al.*, 1999; Cavaletto *et al.*, 2002; Amiard *et al.*, 2006; Monserrat *et al.*, 2007), como una protección efectiva de la célula y del organismo entero contra el estrés oxidativo. En ese sentido, Viarengo *et al.* (1999) observaron un aumento de las metalotioneínas en *M. galloprovincialis* como mecanismo de defensa para incrementar la resistencia contra el Fe y el H₂O₂. En ambos casos, se encontró una reducción de las tasas de producción de especies reactivas de oxígeno. En conclusión, las metalotioneínas podrían actuar contra los efectos de los metales pesados explicando el hecho de no haber hallado en el presente trabajo correlaciones positivas entre las enzimas antioxidantes y los niveles de metales en los tejidos de los mejillones.

En los experimentos de invierno se encontró que los biomarcadores (tanto en la branquia como en la glándula digestiva) correlacionaron positivamente con el oxígeno disuelto, con la única excepción de la enzima superóxido dismutasa en la branquia (**Tabla 18, Cap. IV**). En invierno, cuando la temperatura es más baja la solubilidad del oxígeno aumenta, condición que incrementa la probabilidad de formación de especies reactivas de oxígeno. Esta asociación directa entre las actividades antioxidantes y el oxígeno también fue encontrada por Santovito *et al.* (2005), quienes sólo la hallaron en la branquia. En verano, los biomarcadores correlacionaron entre sí, pero no lo hicieron con los metales ni con las variables físicas y químicas del agua. Es posible que en este período la influencia de la etapa reproductiva en la que se encuentra el mejillón *M. edulis chilensis*, así como la mayor radiación solar, sean las variables que estén modulando las variaciones medidas en los biomarcadores, por encima de las condiciones ambientales consideradas en este trabajo. En este sentido, varios autores postularon que la actividad reproductiva y los cambios en los patrones de almacenamiento y

utilización de alimento en los bivalvos como respuesta a la variación de la temperatura (Sheehan & Power, 1999), ocasionan cambios hormonales y nutricionales que afectan los niveles de los biomarcadores.

El uso de biomarcadores para analizar el impacto biológico de un disturbio ambiental, usualmente ha revelado una relación entre la toxicidad de los contaminantes y la alteración del estado de óxido-reducción de las células. Las variaciones en la eficiencia del sistema antioxidante puede tener graves consecuencias, como ser la peroxidación de los lípidos de la membrana, daño a las proteínas, alteraciones a nivel del ADN o activación/inactivación de enzimas (Regoli *et al.*, 2004). Sin embargo, las interacciones entre los contaminantes, los factores pro-oxidantes, las respuestas oxidativas y los daños ocasionados son muy complejas, a menudo muy difíciles de predecir y potencialmente influenciadas no sólo por numerosos factores naturales tales como la disponibilidad de oxígeno (Santovito *et al.*, 2005), la temperatura (Verlecar *et al.*, 2007), la salinidad (Prevodnik *et al.*, 2007), el pH (Lima *et al.*, 2007), la disponibilidad de nutrientes (Khessiba *et al.*, 2005) y la estacionalidad (Filho *et al.*, 2000), sino también por características propias de los organismos. La edad, el estado reproductivo (Viarengo *et al.*, 1991a), la tasa de crecimiento relacionada con la estacionalidad y otros factores afectan la actividad de las enzimas de defensa antioxidante y otros biomarcadores, haciendo que fluctúen significativamente durante el año e influenciando la fisiología y bioquímica de los mejillones (Sheehan & Power, 1999; Lau & Wong, 2003).

Los biomarcadores pueden ser considerados como herramientas complementarias a los análisis químicos y ecológicos clásicos utilizados en estudios de monitoreo (Sanchez *et al.*, 2008). El análisis de los efectos biológicos debe basarse en un set de biomarcadores, ya que no existe un único biomarcador que pueda medir inequívocamente el deterioro ambiental (Galloway *et al.*, 2004; Hagger *et al.*, 2006). Los biomarcadores no específicos, como los medidos en este estudio, son recomendados en monitoreos ambientales de rutina, ya que son más fáciles de medir y también proveen un panorama de las condiciones reinantes. A pesar de que este tipo de biomarcadores responde a un amplio espectro de contaminantes y a varios factores ambientales, su aplicación proporciona información complementaria sobre la biodisponibilidad y metabolización de los contaminantes (Sanchez & Porcher, 2009). Es decir, proveen información que puede indicar una alteración ambiental, pero no el agente que lo causa. Para identificar relaciones de tipo causa-efecto, se requiere de la química analítica, de biomarcadores específicos y también la medición de un amplio rango de contaminantes. Nicholson & Lam (2005) recomiendan que la primera etapa del monitoreo se lleve a cabo con biomarcadores no específicos de bajo costo. Los sitios identificados en esa primera etapa,

donde están ocurriendo los efectos, pueden luego monitorearse mediante análisis químicos más costosos y con biomarcadores específicos que permitan identificar los contaminantes de interés. Otra razón que justifica su uso es que los organismos están indudablemente expuestos a varios contaminantes que tienen el potencial de actuar aditiva, antagonica o sinérgicamente (Nicholson & Lam, 2005). Queda claro en esta tesis la amplia variabilidad observada entre sitios, entre semanas de muestreo y entre años de experimentación en los biomarcadores aplicados tanto en branquia como en glándula digestiva. Esto constituye la base para establecer la dirección en la cual avanzar con el propósito de generar información complementaria que permita hacer una interpretación más exacta de los resultados de los estudios de biomonitoreo en la zona.

En relación a todos los factores previamente nombrados, se destaca la importancia de los estudios de biomonitoreo, particularmente de largo plazo, en áreas donde los contaminantes se hallan en concentraciones subletales (Lau & Wong, 2003). Por otro lado, para poder realizar una correcta interpretación de la información obtenida en los monitoreos relacionados con la contaminación, es de suma importancia evaluar los cambios en variables biológicas tales como la talla y el tipo de tejido, así como en diversas variables bioquímicas, frente a cambios ambientales y de disponibilidad de alimento. Este punto puede ser considerado uno de los aspectos más difíciles de la caracterización de un biomarcador *in situ* (Hansson *et al.*, 2006). Los resultados hallados en las bahías Ushuaia y Brown mostraron que las variaciones observadas en las variables biológicas no serían enteramente atribuibles a los contaminantes presentes en el agua o en el sedimento. En consecuencia, lo ideal sería tener en cuenta las variaciones a lo largo del tiempo en ambas bahías por separado cuando se trate de monitorear estos ambientes.

Capítulo 8

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

A partir de la información física, química y biológica obtenida en este estudio de las bahías Brown y Ushuaia en el canal Beagle, en invierno y verano se concluye que:

Las variables físicas y químicas del agua demostraron que club Náutico es el sitio que recibe mayor presión antrópica: máximos valores de nutrientes y mínimos valores de oxígeno disuelto producto del aporte de aguas residuales que llegan desde la bahía Encerrada y por el pluvial que descarga directamente en este punto de muestreo. En menor medida, zona industrial presentó altas concentraciones de nutrientes y un mínimo de salinidad por efecto de pluviales y del arroyo Grande.

A partir de la información granulométrica se caracterizó el sedimento de bahía Brown como gravoso, el de zona industrial y península Ushuaia como arenoso, el de planta Orión y caleta Aspirante como arenoso-gravoso y el de club Náutico como limo-arenoso. Bahía Brown resultó el sitio más estable en su composición granulométrica con el menor contenido de fango, contrariamente club Náutico fue el más variable y con la mayor proporción de fango.

Bahía Brown presentó las mayores concentraciones totales de Cu, Zn y Fe en la fracción fina del sedimento.

Dentro de la bahía Ushuaia, en el sedimento fino de zona industrial, planta Orión y club Náutico se registraron las mayores concentraciones de Cu, Zn y Pb. Esas concentraciones resultaron menores a las reportadas previamente en las mismas zonas por otros autores. Es posible que esta mejora sea el resultado del menor ingreso de desechos industriales producto del cierre de varias fábricas luego de la crisis económica de 2001 y de una mejor conducción de las actividades realizadas en la planta de combustible planta Orión.

Con respecto a los porcentajes de cenizas, materia orgánica y agua en los organismos analizados (*Mytilus edulis chilensis*), se hallaron diferencias estacionales en el verano, donde la materia orgánica fue mayor (probablemente por ser el período posterior a la primavera, cuando se produce el aumento de fitoplancton) con una consecuente disminución del contenido de agua. Las cenizas se mantuvieron estables y, como era esperado, correlacionaron positivamente con los metales acumulados en los tejidos en los experimentos de invierno.

El índice de condición de los mejillones transplantados a la bahía Ushuaia en los experimentos de invierno no presentó variaciones espacio-temporales, no reflejando necesariamente las diferencias en la calidad del agua en esta Bahía. En los experimentos de verano, el índice de condición presentó algunas variaciones que se asociaron directamente al

nivel de nitrato y pH e inversamente a los metales pesados bioacumulados y al oxígeno disuelto.

✚ Los lípidos totales tendieron a ser mayores en glándula digestiva en verano, lo cual podría estar asociado al ciclo reproductivo del mejillón.

✚ La tendencia decreciente de bioacumulación de los metales pesados por *M. edulis chilensis* fue Fe>Zn>Cu>Cd>Pb, excepto en el experimento de invierno de 2006 donde se acumuló el Pb en mayor proporción que el Cd en los dos órganos analizados.

✚ En general, el Fe y el Cu se acumularon mayoritariamente en la glándula digestiva, mientras que el Zn se acumuló en la branquia. El Cd y el Pb no se acumularon de manera diferencial en los órganos analizados. Variaciones estacionales sólo se registraron en los experimentos de 2008, siendo mayor la acumulación en el período invernal.

✚ Las máximas concentraciones de Cu, Zn y Pb se acumularon, generalmente, en los mejillones transplantados a zona industrial, planta Orión y club Náutico, coincidentemente los sitios de bahía Ushuaia que también presentaron las mayores concentraciones de metales en la fracción fina del sedimento.

✚ Los mayores valores de Cd se midieron en los mejillones de península Ushuaia y caleta Aspirante. Al no haber una fuente puntual conocida en las proximidades, el Cd podría ser de origen natural. Sin embargo, son necesarias otras investigaciones para poder establecer la procedencia de dicho metal en esos lugares.

✚ Las correlaciones positivas halladas entre los biomarcadores enzimáticos y la peroxidación lipídica mostraron la activación conjunta de varias respuestas antioxidantes que no serían suficientes para evitar el daño oxidativo a lípidos.

✚ Sólo en los experimentos de invierno, la actividad de los biomarcadores (excepto la superóxido dismutasa y la peroxidación lipídica en la glándula digestiva) fue inhibida por los metales pesados y estimulada por el oxígeno disuelto. Mientras que en los veranos, los biomarcadores no se asociaron a ninguno de los parámetros físicos ni químicos monitoreados en este trabajo. En los experimentos intensivos, se encontraron asociaciones entre las tres enzimas y la temperatura por una parte y, la peroxidación lipídica en la branquia y la glándula digestiva con la salinidad por otra.

✚ En las estaciones anuales analizadas, la actividad de catalasa en glándula digestiva fue hasta cuatro veces mayor que en la branquia; inversamente la actividad de glutatión-S-transferasa fue hasta cuatro veces mayor en la branquia que en glándula digestiva. La actividad de superóxido dismutasa y la peroxidación lipídica no mostraron diferencias según el órgano analizado.

La actividad de catalasa y glutatión-S-transferasa tendió a ser mayor en el período estival. Contrariamente, la actividad de superóxido dismutasa fue mayor en invierno, excepto en el experimento de 2008 en branquia que no hubo diferencias estacionales. La peroxidación de los lípidos no evidenció una variación estacional.

Los experimentos intensivos demostraron que los mejillones activan su sistema antioxidante en un corto plazo (días).

En los experimentos intensivos no se halló diferenciación tisular ni estacional en la actividad de la catalasa. Tampoco se encontró variación estacional en la actividad de glutatión-S-transferasa, la cual fue mayor en la branquia. La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue mayor en la glándula digestiva y, al igual que en los experimentos de seis semanas, tendió a ser mayor en invierno. La peroxidación lipídica fue mayor en la glándula digestiva pero no varió entre verano e invierno.

En los experimentos de largo plazo (6 semanas) y en los intensivos (días), se observó un patrón de respuesta espacio-temporal de los biomarcadores semejante en la branquia y la glándula digestiva.

Basados en las correlaciones halladas en invierno entre cada respuesta antioxidante con los metales pesados bioacumulados, se puede concluir que las actividades de catalasa y glutatión-S-transferasa, en la branquia y en la glándula digestiva, y la peroxidación lipídica en la branquia constituyen una herramienta efectiva para evaluar la calidad de las aguas costeras de la bahía Ushuaia en dicha época.

La asociación encontrada en invierno entre la peroxidación lipídica en glándula digestiva y los niveles de fosfato y amonio, demuestran que la peroxidación lipídica puede ser considerada un buen biomarcador para analizar la calidad del agua de la bahía Ushuaia.

La enzima superóxido dismutasa en glándula digestiva resultó de poca utilidad como biomarcador en este estudio, ya que su actividad no pudo ser relacionada con ningún parámetro físico o químico.

La actividad de los biomarcadores en el verano no pudo ser asociada a ninguno de los parámetros físicos o químicos, por lo cual podría estar asociada a factores intrínsecos del mejillón *M. edulis chilensis*, como la biología reproductiva o bien a la presencia de otros contaminantes no analizados en este estudio.

Las asociaciones entre biomarcadores y factores ambientales mostraron la importancia de integrar la información física, química y biológica para un mejor entendimiento de las complejas interacciones que ocurren en el medio acuático.

La variabilidad entre sitios, entre semanas de muestreo y entre años de experimentación fue una característica de los resultados obtenidos para las defensas antioxidantes como para la peroxidación lipídica, tanto en branquia como en glándula digestiva. Este hecho evidencia la necesidad de conocer el rango de variabilidad natural de los parámetros evaluados en organismos saludables, para poder distinguirla del efecto causado por los contaminantes. En el caso de bahía Ushuaia, sería conveniente seleccionar un sitio sin impacto antrópico como puede ser el parque nacional Lapataia, y realizar monitoreos a largo plazo, que incluyan todos los períodos estacionales, con el fin de poder establecer las variaciones naturales de los biomarcadores. Sería apropiado determinar el sexo de los organismos y conocer mejor su fisiología, factores que podrían disminuir la variabilidad encontrada en el presente estudio. Si bien los resultados hallados presentaron gran variabilidad, sirven como base para establecer la dirección en la cual avanzar con el propósito de generar información complementaria que permita hacer una interpretación más exacta de los resultados de los estudios de biomonitoreo en la zona.

Como conclusión final, el mejillón *Mytilus edulis chilensis* analizado en la bahía Ushuaia, a través del uso de biomarcadores como la catalasa, glutatión-S-transferasa y la peroxidación lipídica, ha demostrado un impacto aún leve de la contaminación por metales pesados y nutrientes en esta Bahía. Este organismo demostró una vez más su aptitud como organismo centinela.

En base a toda la información obtenida en el presente estudio se recomienda:

- Evaluar los efectos potenciales de los contaminantes en la fauna residente, incorporando al análisis la influencia estacional, así como la condición reproductiva del organismo a utilizar.
- Planificar estudios de monitoreo ambiental periódicos que incluyan la determinación de nutrientes, metales pesados y hidrocarburos.
- Regular el volumen y calidad de los efluentes vertidos en las bahías aledañas a la ciudad de Ushuaia.
- Asegurar el correcto funcionamiento del dispensor cloacal y evaluar la construcción de una planta de tratamiento que pueda captar los volúmenes cada vez mayores de desechos cloacales generados por la ciudad de Ushuaia.

- Desarrollar una estrategia para que todos los hogares de la ciudad de Ushuaia estén conectados a la red cloacal y de esta forma minimizar los vertidos clandestinos.
- Generar acciones tendientes a concientizar a la población de Ushuaia en lo referido al cuidado del ambiente.
- Respetar la Ley Provincial N° 55 de Medio Ambiente que contempla la preservación, conservación, defensa y mejoramiento del ambiente (agua, suelo, aire y biota) de la Provincia de Tierra del Fuego.

Capítulo 9

BIBLIOGRAFÍA

- Abele, D., Puntarulo, S., 2004.** Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138: 405-415.
- Ahumada, R., Contreras, S., 1999.** Contenido de metales (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, V y Zn) en sedimentos de los fiordos y canales adyacentes a Campos de Hielo Sur. *Cienc. Tecnol. Mar.* 22: 47-58.
- Airas, S., 2003.** Trace metal concentrations in blue mussels *Mytilus edulis* (L.) in Byfjorden and the coastal areas of Bergen. Master Thesis in Marine Biology. Institute for Fisheries and Marine Biology University of Bergen.
- Allan, R., 1997.** Mining and metals in the environment. *J. Geochem. Explor.* 58: 95-100.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Melo Loureiro, A.P., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Machado Garcia, C.C., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2007.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146: 588-600.
- Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2006.** Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 52: 207-213.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006.** Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76: 160-202.
- Amin, O., 1995.** Toxicidad para invertebrados marinos de metales pesados detectados en la zona costera próxima a Ushuaia, Tierra del Fuego. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA, pp. 145.
- Amin, O., Comoglio, L., 1999.** Efectos del cadmio, plomo y cinc en el desarrollo larval de la centolla (*Lithodes santolla*). Proceedings de VIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Trujillo, Perú. 884-885.
- Amin, O., Comoglio, L., 2002.** Toxicidad del petróleo diesel en el primer estadio larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 37 (2): 139-144.
- Amin, O., Comoglio, L., Rodríguez, E., 2003.** Toxicity of cadmium, lead and zinc to larval stage of *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71 (3): 527-534.
- Amin, O., Ferrer, L., Marcovecchio, J., 1996(a).** Heavy metal concentrations in littorals sediments from the Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Environ. Monitor. Assess.* 41 (3): 219-231.
- Amin, O., Comoglio, L., Ferrer, L., Marcovecchio, J., 2000.** Variación en la concentración de plomo, zinc y cadmio en el mejillón *Mytilus edulis* transplantado dentro de la Bahía de Ushuaia, Tierra del Fuego. Proc. Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, 11-14 de Septiembre de 2000, Puerto Madryn, Chubut, Argentina. pp. 31.
- Amin, O., Ferrer, L., Barral, A., Marcovecchio, J., Pucci, A., 1996(b).** Chromium, zinc and iron geochemical partitioning in marine sediments from Beagle Channel, in Argentina. *Environmental Geochemistry in Tropical Countries*. Prieto G. and L. Lesmes (eds.), pp. 1200.
- Amin, O., Ferrer, L., Barral, A., Marcovecchio, J., Pucci, A., 1997.** Geochemical distribution of trace metals in marine sediments from Beagle Channel, in Argentina. In: Zubeck, H.K., Woolard, C.R., White, D.M., Vinson, T.S. (eds), *ISCORD: Cold Region Development*, American Society of Civil Engineers, International Association of Cold Regions Development Studies, Anchorage (Alaska, USA), Ch. IX, pp. 287-296.
- Amin, O., Rodríguez, E., Hernando, M., Comoglio, L., Lopez, L., Medesani, D., 1998.** Effects of lead and cadmium on hatching of the Southern King Crab *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Invert. Reprod. Develop.* 33 (1): 81-85.
- Andrade, S., 2001.** Metales pesados en el agua de la zona interna de Bahía Blanca, y su toxicidad sobre algunas especies fitoplanctónicas. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, pp. 244.

- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004.** Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 704-712.
- Andrews, G.K., 2000.** Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59: 95-104.
- Apel, K., Hirt, H., 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Ash, C., Stone, R., 2003.** A question of dose. *Science*, 300: 925.
- Augspurger, T., Keller, A.E., Black, M.C., Cope, W.G., Dwyer, F.J., 2003.** Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2569-2575.
- Aust, S.D., 1989.** Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Diem.* 43: 266-277.
- Avelar, W.E., Mantellatto, F.L., Tomazelli, A.C., Silva, D.M., Shuhama, T., Lopes, J.L., 2000.** The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, Sao Paulo, Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 118: 65-72.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996.** Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34: 151-162.
- Baird, S.K., Kurz, T., Brunk, U.T., 2006.** Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem. J.* 394: 275-283.
- Balestrini, C., Manzella, G., Lovrich, G.A., 1998.** Simulación de corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. *Serv. Hidrog. Naval Dto. Oceanogr. Informe Técnico* 98. pp. 58.
- Balls, P.W., 1985.** Copper, lead and cadmium in coastal waters of the western North Sea. *Mar. Chem.* 15: 363-378.
- Barrett, J.C., Vainio, H., Peakall, D., Goldstein, B.D., 1997.** 12th Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*, 105 (Supl. 4): 699-737.
- Bayne, B.L., 1975.** Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. In: F.J. Vernberg (ed.), *Physiological Ecology of Estuarine Organisms*, pp. 259-277. University of South Carolina Press, Columbia.
- Bayne, B.L., Worrall, C.M., 1980.** Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 3: 317-328.
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005.** Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75: 354-373.
- Bebianno, M.J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A.M., 2007.** Glutathione-S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environ. Int.* 33: 550-558.
- Benninger, P.G., Lucas, A., 1984.** Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adam et Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.
- Benschneider K., Robinson, R.J., 1952.** A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *J. Mar. Res.* 11: 87-96.
- Berrow SD. 1991.** Heavy metals in sediments and shellfish from Cork Harbour, Ireland. *Mar. Pollut. Bull.* 22(9): 467-469.
- Beutler, E., 1982.** Catalase. In: Beutler, E. (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, Inc., pp. 105-106.
- Bewers, J.M., Barry, P.J., MacGregor, D.J., 1987.** Distribution and cycling of cadmium in the environment. En: Nriagu JO, Series Editor. *Advances in Environmental Science and Technology*. Vol. 19. Nriagu, J.O. & J.B. Sprague (eds), *Cadmium in the aquatic environment* 1: 1-18. John Wiley & Sons Inc., Nueva York.

- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006.** Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 65: 913-921.
- Boltovskoy, D., 2008.** Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino: Ushuaia. pp 7. <http://atlas.ambiente.gov.ar/>
- Borković, S.S., Šaponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milošević, S.M., Kovašević, T.B., Radojičić, R.M., Spasić, M.B., Žikić, R.V., Saičić, Z.S., 2005.** The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141: 366-374.
- Botté, S., 2004.** El rol de la vegetación en el ciclo biogeoquímico de metales pesados en humedales del estuario de Bahía Blanca. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. pp. 290.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007.** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146: 531-539.
- Bragadóttir, M., 2001.** Endogenous antioxidants in fish. Thesis Master of Science in food science. Department of Food Science, University of Iceland. pp. 64.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978.** Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52: 302-310.
- Bujalesky, G., Aliotta, S., Isla, F., 2004.** Facies del subfondo del Canal Beagle, Tierra del Fuego. *Rev. Asoc. Geol. Arg.* 59 (1): 29-37.
- Burger, J., Gochfeld, M., 2006.** Locational differences in heavy metals and metalloids in Pacific Blue Mussels *Mytilus [edulis] trossulus* from Adak Island in the Aleutian Chain, Alaska. *Sci. Tot. Environ.* 368: 937-950.
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B., 1988.** Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *Phys. Chem. Ref. Data*, 17: 513-517.
- Cabello, A.M., Villarroel Lezama, R.V., Figuera García, B.E., Ramos Marcano, M.C., Márquez Figueroa, Y.V., Vallenilla González, O.M., 2004.** Parámetros de frescura de moluscos. *Rev. Cientif.* 14 (5): 457-466.
- Camargo, J.A., Alonso, A., 2006.** Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32: 831-849.
- Cancio, I., Ibabe, A., Cajarville, M.P., 1999.** Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123: 135-144.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999.** Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46: 67-76.
- Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N., Viarengo, N., 2002.** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 447-455.
- CCME, 1999.** Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables. In: Canadian environmental quality guidelines. Canadian Council of Ministers for the Environment, Winnipeg.
- CEES, 2008.** Soluble silicates: Chemical, toxicological, ecological and legal aspects of production, transport, handling and application. Centre Européen d'Etude des Silicates. pp. 16.
- Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C., Vasseur, P., 2004.** Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Sci. Tot. Environ.* 322: 109-122.
- Cheng, S-Y., Chen, J-C., 2002.** Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquat. Toxicol.* 61: 181-193.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, S.B., Lam, P.K.S., 2004.** Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128: 393-403.

- Colizza, E., 1991.** Preliminary report on coastal morphology and seabottom sediments of the Canal Beagle, Ballenero, Brecknock, Cockburn and Magdalena. *Boll. Oceanol. Teor. Applic.* IX (2-3): 273-279.
- Commendatore, M., Esteves, J.L., 2004.** Hidrocarburos alifáticos en la bahía de Ushuaia. Anexo 4 en: "Evaluación de la Contaminación Urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina". Eds. José Luis Esteves y Oscar Amin. pp. 30-32.
- Connell, D., Lam, P., Richardson, B., Wu, R., 1999.** Introduction to Ecotoxicology, Oxford: Blackwell Science, pp. 170.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997.** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 122-131.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000.** Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus* in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 106-121.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C., 1995.** Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in methallothionein concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 690-702.
- Dalziel, J., Baker, C., 1983.** Analytical methods for measuring metals by atomic absorption spectrophotometry, *FAO Fish Tech Pap*, pp. 14.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., Salbert, V., 2007.** Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66: 574-583.
- Davies, M.J., 2005.** The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703: 93-109.
- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005.** Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51: 694-707.
- Depledge, M.H., Amaral-Mendes, J.J., Daniel, B., Halbrook, R.S., Kloeppersams, P., Moore, M.N., Peakall, D.B., 1993.** The conceptual basis of the biomarker approach. *NATO ASI Series. Vol. H 68. Biomarker*. Eds. D.B. Peakall and L.R. Shugart, pp. 15-29.
- Dezileau, L., Pizarro, C., Rubio, M.A., 2007.** Sequential extraction of iron in marine sediments from the Chilean continental margin. *Mar. Geol.* 241: 111-116.
- Di Giulio, R.T., Benson, W., Sanders, B., Van Veld, P., 1995.** Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: G.M. Rand, Editor, *Fundamental of Aquatic Toxicology-Effects, Environmental Fate and Risk Assessment* (2nd ed.), Taylor and Francis, Washington, pp. 523-561.
- Dizdaroglu, M., 1993.** Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B., Aruoma, O.I. (Eds.), *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, pp. 19-39.
- Dore, J.E., Lukas, R., Sadler, D.W., Church, M.J., Karl, D.M., 2009.** Physical and biogeochemical modulation of ocean acidification in the central North Pacific. *PNAS*. 106 (30): 12235-12240.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur P., 1997.** Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39: 93-110.
- Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmooch, H., Wu, J., Agarwal, S., Handley, M., 1993.** A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad. Biol. Med.* 15: 353-363.
- Dridi, S., Romdhane, M.S., Elcafsi, M., 2007.** Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263: 238-248.

- Eberlein, K., Kattner, G., 1987.** Automatic method for the determination of orthophosphate and total dissolved phosphorous in the marine environment. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 326: 354-357.
- Eisler, R., 2000.** Handbook of chemical risk assessment, hazard to humans, plants and animal. Lewis publishers, Boca Ratón, Florida, pp. 650.
- Elliot, N.G., Swain, R., Ritz, D.A., 1984.** The influence of cyclic exposure on accumulation of heavy metals by *Mytilus edulis planulatus* (Lamarck). *Mar. Environ. Res.* 15: 17-30.
- Environment Canada, 2001.** Priority substances assessment report: ammonia in the aquatic environment. Minister of Public Works and Government Services Canada, Ottawa, ON, Canada.
- Espina, S., Vanegas, C., 1996.** Ecotoxicología y contaminación. In A. V. Botello, J.L. Rojas Galaviz, J.A. Benítez & D. Zárate Lomelí (eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México. pp. 69-106.
- Esteves, J.L., Amin, O., 2004.** Evaluación de la Contaminación Urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina (Provincia de Tierra del Fuego, Antártica e Islas del Atlántico Sud). Consolidación e Implementación del Plan de la Zona Costera Patagónica (PMZCP) - ARG/02/G31- GEF/PNUD. CD-ROM.
- Esteves, J.L., Varela, D.E., 1991.** Nutrient dynamic of the Valdés Bay-Punta Cero pond system (Península Valdés, Patagonia) Argentine. *Oceanol. Acta* 14 (1): 51-58.
- Esteves, J.L., Solís, M.E., Rodríguez, V., Willers, V., 2003.** Bahías Ushuaia y Golondrina, calidad de aguas costeras y cursos de agua que ingresan a las mismas (Enero 2001). Poster N° 19. Abstract Book, p 104. V Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. XIII Coloquio Argentino de Oceanografía. Mar del Plata, Argentina.
- Esteves, J.L., Amin, O., Commendatore, M., Gil, M., Solís, M., 2006a.** Evaluación preliminar de la contaminación en la zona costera de la provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Consolidación e Implementación del Plan de Manejo de la Zona Costera Patagónica (PMZCP) -ARG/02/G31-GEF/PNUD.
- Esteves, J.L., Bonin, P., Blanc, F., Mille, G., Bertrand, J.C., 1986.** Réduction du nitrate dans les sédiments marins. Comparaison des activités mesurées in vitro et in situ. *IFREMER - Actes du Colloques*, 3: 319-324.
- Esteves, J.L., Commendatore M.G., Nievas, M.L., Massara Paletto, V., Amin, O., 2006b.** Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 52: 572-597.
- Farrington, J.W., Goldberg, E.D., Risebrough, R.W., Martin, J.H., Bowen, V.T., 1983.** 'U.S. "Mussel Watch" 1976-1978: An Overview of the Trace-Metal, DDT, PCB, Hydrocarbon and Artificial Radionuclide Data, *Environ. Sci. Technol.*, 17: 490-496.
- Fattman, C.L., Enghild, J.J., Crapo, J.D., Schaefer, L.M., Valnickova, Z., Oury, T.D., 2000.** Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275 (2): 542-548.
- Fernández, M.E., Comoglio, L., Amin, O., 2005.** Respuestas del mejillón *Mytilus edulis chilensis* mantenido en condiciones ambientales en la zona costera próxima a Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. VII Congreso SETAC LA. Química y Toxicología ambiental en América Latina. Santiago, Chile. 16 al 20 de octubre.
- Ferrer, L.D., 2001.** Estudio de diversos metales pesados en sedimentos del estuario de Bahía Blanca y sus efectos tóxicos sobre el cangrejo *Chasmagnathus granulata*. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, pp. 213.
- Filho, D.W., 1996.** Fish antioxidant defenses - a comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 1735-1742.
- Filho, D.W., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G., Boveris, A., 2000.** Antioxidant defenses in vertebrates-emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 7: 37-45.
- Filho, D.W., Tribess, T., Gáspari, C., Cláudio, F.D., Torres, M.A., Magalhães, A.R.M., 2001.** Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, 203: 149-158.

- Fisher, N.S., Teyssie, J.L., Fowler, S.W., Wang, W.W., 1996. Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30: 3232-3242.
- Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Xenobiotica*, 23: 851-861.
- Fleet, J.C., Andrews, G.K., McCormick, C.C., 1990. Iron-induced metallothionein in chick liver: a rapid, route-dependent effect independent of zinc status. *J. Nutr.* 120: 1214-1222.
- Förtsner, U., Wittmann, G.T.W., 1979. Metal pollution in the aquatic environment. Springer Verlag, New York, pp. 485.
- Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 232-240.
- Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Time-course evaluation of ROS mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar. Environ. Res.* 58: 609-613.
- Frías-Espericueta, M.G., Páez-Osuna, F., 2001. Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. pp. 224-242. *En: Federico Páez-Osuna (Ed.). Camaronicultura y Medio Ambiente. México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de Sinaloa, Colegio de Sinaloa y Programa Universitario de Alimentos*, pp. 450.
- Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515-18517.
- Gagnon, C., Gagné, F., Turcotte, P., Saulnier, I., Blaise, C., Salazar, M.H., Salazar, S.M., 2006. Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. *Chemosphere*, 62: 998-1010.
- Galloway, T. S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38: 1723-1731.
- Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2004a. Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.* 58: 625-630.
- Geracitano, L.A., Bocchetti, R., Monserrat, J.M., Regoli, F., Bianchini, A., 2004b. Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Mar. Environ. Res.* 58: 1-17.
- Ghrefat, H., Yusuf, N., 2006. Assessing Mn, Fe, Cu, Zn, and Cd pollution in bottom sediments of Wadi Al-Arab Dam, Jordan. *Chemosphere*, 65: 2114-2121.
- Gil, M.N., Harvey, M.A., Esteves, J.L., 1999. Heavy metals in intertidal sediments from Patagonian coast, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63: 52-58.
- Gil, M.N., Torres, A., Harvey, M., Esteves, J.L., 2006. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 41(2): 167-176.
- Goldberg, E.D., 1975. The Mussel Watch - A first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 6: 111.
- Grasshoff, K., Erhardt, M., Kremling, K., 1983. Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, Weinheim, New York. pp. 317.
- Gravato, C., Oliveira, M., Santos, M.A., 2005. Oxidative stress and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61: 221-229.
- Gray, A.P., Seed, R., Richardson, C.A., 1997. Reproduction and growth of *Mytilus edulis chilensis* from the Falkland Islands. *Sci. Mar.* 61 (2): 39-48.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312.
- Guha, H., 2004. Biogeochemical influence on transport of chromium in manganese sediments: experimental and modeling approaches. *J. Contam. Hydrol.* 70: 1-36.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and the mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15: 129-135.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakobi, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

- Hagger J. A., Jones, M. B., Leonard, D. P., Owen R., Galloway T. S., 2006.** Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2 (4): 312-329.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991.** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1992.** Biologically relevant metal ion-dependent OH[·] generation. An update. *FEBS Lett.* 307: 108-112.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999.** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford. pp. 936.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007.** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Fourth Edition, Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 704.
- Hansson, T., Lindesjoo, E., Forlin, L., Balk, L., Bignert, A., Larsson, A., 2006.** Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity. *Aquat. Toxicol.* 79: 341-355.
- Harte, J., Holdren, C., Schneider, R., Shirley, C., 1991.** *Toxics A to Z: A Guide to Everyday Pollution Hazards.* University of California Press, Berkeley.
- Heath, A.G., 1995.** *Water Pollution and Fish Physiology* 2nd ed. Florida: CRC Press, pp. 359.
- Hellou, J., Law, R.J., 2003.** Stress on stress response of wild mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, as an indicator of ecosystem health. *Environ. Pollut.* 126: 407-416.
- Hermes-Lima, M., 2004.** Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: K.B. Storey, Editor, *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons, pp. 319-368.
- Hernando, M., San Román, N., Hoffmeyer, M.S., 2005.** Monitoreo planctónico y ambiental para el desarrollo sustentable del cultivo comercial de mejillón (*Mytilus edulis chilensis*) en la zona de Almanza en el Canal Beagle, Tierra del Fuego. XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar y XXV Congreso de Ciencias del Mar de Chile, Viña del Mar, Chile, 16-20 de mayo de 2005. pág. 299.
- Hernando, M., Torres, E., San Román, N., Hoffmeyer, M., 2008.** Informe Final: "Monitoreo planctónico y ambiental para el desarrollo sustentable del cultivo comercial de mejillón (*Mytilus edulis chilensis*) en la zona de Almanza, Canal Beagle (Tierra del Fuego)." Subproyecto A-B-62, Proyecto PNUD Arg/02/018 Director: Dr. Nemesio San Román, Codirectora: Dra. Mónica S. Hoffmeyer. pp. 43.
- Holm-Hansen, O., Riemann, B., 1978.** Chlorophyll-*a* determination: Improvements in methodology. *Oikos*, 30: 438-447.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965.** Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Con. Perm. Internat. Pour L'Explor. Mer*, 30 (1): 3-15.
- Horowitz, A.J., Elrick, K.A., 1986.** An evaluation of air elutriation for sediment particle size separation and subsequent chemical analysis. *Environ. Technol. Lett.* 7: 17-26.
- Howarth, R.W., 1988.** Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. System.* 19: 898-910.
- Huse, A., 1999.** Environmentally hazardous substances in products. Data for 1997. SFT-Report 99/03. TA-1613/1999. pp. 73.
- Idris, A.M., Eltayeb, M.A.H., Potgieter-Vermaak, S.S., Van Grieken, R., Potgieter, J.H., 2007.** Assessment of heavy metals pollution in Sudanese harbours along the Red Sea Coast. *Microchem. J.* 87: 104-112.
- INDEC, 2001.** Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2001, Buenos Aires. <http://www.indec.mecon.ar/>
- INDEC, 2005.** Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Estructura productiva. Censo Nacional Económico.
- Irato, P., Santovito, G., Cassini, A., Piccinni, E., Albergoni, V., 2003.** Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequalis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 476-484.
- Iturraspe, R., Bujalesky, G., Coronado, A., 1989.** Hidrología y variables climáticas del territorio de Tierra del Fuego. Información básica. CADIC Contribución Científica, 7: 1-196.
- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., Boveris, A., 1986.** The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 703-719.

- Janero, D.R., 1990.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 515-540.
- Jensen, F.B., 2003.** Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135: 9-24.
- Johnson, T.M., Yu, Z., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., Finkel, T., 1996.** Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11848-11852.
- Jones, D.P., 2006.** Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8 (9-10): 1865-1879.
- Kasprzak, K.S., 2002.** Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* 32 (10): 958-967.
- Kautsky, N., 1982.** Quantitative studies on gonad cycle, fecundity, reproductive output and recruitment in a Baltic *Mytilus edulis* population. *Mar. Biol.* 68: 143-160.
- Khessiba, A., Roméo, M., Aïssa, P., 2005.** Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ. Pollut.* 133: 275-281.
- Klamer, J.C., Hegeman, W.J.M., Smedes, F., 1990.** Comparison of grain size correction procedures from organic micropollutants and heavy metals in marine sediments. *Hydrobiologia*, 208: 213-220.
- Kodaira, M., 1991.** Composición química y cambios post-mortem en pescado, crustáceos y moluscos. Curso-Taller. Avances en biotecnología de organismos marinos de importancia comercial. Porlamar, 4 al 15 marzo, Venezuela, pp. 31.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30: 620-650.
- Lamy, F., Hebbeln, D., Wefer, G., 2001.** Holocene rainfall variability in southern Chile: a marine record of latitudinal shifts of the Southern Westerlies. *Earth Planet. Sci. Lett.* 185, 369-382.
- Lau, P.S., Wong, H.L., 2003.** Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 1563-1572.
- Lau, P.S., Wong, H.L., Garrigues, Ph., 2004.** Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *Cont. Shelf Res.* 24: 1969-1987.
- Lee, C-L., Fang, M-D., Hsieh, M-T., 1998.** Characterization and distribution of metals in surficial sediments in Southwestern Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*, 36 (6): 464-471.
- Lesser, M.P., 2006.** Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 253-278.
- Lima, I., Moreira, S.M., Osten, J.R., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2007.** Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere*, 66: 1230-1242.
- Livingstone, D.R., 2001.** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.
- Lomovasky, B.J., Malanga, G., Calvo, J., 2004.** Seasonal changes in biochemical composition of the clam *Eurhomalea exalbida* (Bivalvia, Veneridae) from the Beagle Channel (Argentina). *J. Shell. Res.* 23 (1): 81-87.
- López, F., 1989.** Relación de algunos factores que condicionan la miticultura y posterior industrialización del mejillón. Segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina. Montevideo (Uruguay), 11 al 15 de diciembre, pp. 368.
- Loring, D.H., 1991.** Normalization of heavy-metal data from estuarine and coastal sediments. *ICES. J. Mar. Sci.* 48: 101-115.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Luchini, L., Wicki, G.A., 2002.** Evaluación del potencial para acuicultura en la Provincia de Tierra del Fuego. Información Básica. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). pp. 29.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005.** Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Critical Review. Environ. Sci. Technol.* 39 (7): 1921-1931.

- Mackie, L.A., Ansell, A.D., 1993.** Differences in reproductive ecology in natural and transplanted populations of *Pecten maximus*: evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169: 57-75.
- Malanga, G., Estevez, S., Calvo, J., Abele, D., Puntarulo, S., 2007.** Seasonality effect on oxidative metabolism in *Nacella (P.) magellanica*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146: 551-558.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004.** Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione-S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70: 83-93.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005.** Review. The point about oxidative stress in molluscs. *Invert. Surv. J.* 2: 91-104.
- Marcovecchio, J., Ferrer, L., 2005.** Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *J. Coast. Res.* 21 (4): 826-834.
- Marcovecchio, J., Moreno, V., Perez, A., 1988.** Determination of some heavy metal baselines in the biota of Bahía Blanca, Argentina. *Sci. Tot. Environ.* 75: 181-190.
- Marcovecchio, J., Ferrer, L., Barral, A., Scagliola, M., Pucci, A., 1998.** A model for geochemical partitioning of heavy metals in the Mar del Plata coastal ecosystem, Argentina. *In: Wasserman, J.C., Silva Filho, E.V., Villas-Boas, R. (eds.), Environmental Geochemistry in the Tropics*, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 10: 139-149.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978.** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- Marnett, L.J., 1999.** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424: 83-95.
- Márquez, M.J., 1988.** Mineralización polimetálica asociada al magmatismo mioceno en la Cordillera Patagónica austral, provincia de Santa Cruz, Argentina. *Proceedings V Congreso Geológico Chileno (Santiago) 1*, B237-B256.
- Martin, J.M., Meybeck, M., 1979.** Elemental mass-balance of material carried by major world rivers. *Mar. Chem.* 7: 173-206.
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002.** Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192: 1-15.
- Martínez, G., 1991.** Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *Veliger*, 34: 335-343.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., 1990.** *Biochemistry*, 1st ed. (New York: Benjamin/ Cummings) pp. 711.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A., 1992.** Metabolic products as biomarkers. *In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 5-86.
- Menzel, W., 1991.** *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 362.
- Mesner, N, Geiger, J., 2005.** Understanding your watershed: Phosphorus. Utah State University Extension. NR/WQ/2005-18. pp. 4.
- Metcalf, Eddy Inc, 1991.** *Wastewater engineering treatment disposal and reuse*. 3rd edition, revised by G. Tchobanoglous and F.L. Burton, McGraw-Hill Inc, Singapore. pp. 1334.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972.** The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Bianchini, A., 2003.** Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments Toxicol.* 9: 255-269.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Lopes Leães Pinho, G., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007.** Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146: 221-234.
- Montero Torreiro, M.F., 2000.** Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar *Paracentrotus lividus* Lmk. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. pp. 187.

- Moukrim, A., Bouhaimi, A., Lagbouri, A., Zekhnini, A., 1997.** Health state of Agadir bay ecosystems evaluated by biomarkers of pollution. Proc. Int. Symp. Environ. Pollut. Impact Assess. 9-11 October 1996, Mohammedia, Morocco, 325-337.
- Mubiana, V.K., Vercauteren, K., Blust, R., 2006.** The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. Environ. Pollut. 144 (1): 272-279.
- Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., Bordalo, A.A., 2003.** Macrobenthic community in the Doura estuary: relations with trace metals and natural sediment characteristics. Environ. Pollut. 121: 169-180.
- Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., García-Alonso, J., Medina, G., Bicego, M., 2004.** Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). Environ. Int. 29: 1019-1028.
- Murphy, J., Riley, J., 1962.** A modified single solution for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta, 27: 31-36.
- Nasci, C., Nesto, N., Monteduro, R.A., Da Ros, L., 2002.** Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). Mar. Environ. Res. 54: 811-816.
- Nesto, N., Bertoldo, M., Nasci, C., Da Ros, L., 2004.** Spatial and temporal variation of biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy. Mar. Environ. Res. 58: 287-291.
- Newell, R.I.E., Hilbish, T.J., Koehn, R.K., Newell, C.J., 1982.** Temporal variation in the reproductive cycles of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. Biol. Bull. 162: 299-310.
- Nicholson, S., 1999.** Cytological and physiological biomarker responses from green mussels, *Perna viridis* (L.) transplanted to contaminated sites in Hong Kong coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 39: 261-268.
- Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005.** Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). Environ. Int. 31: 121-132.
- Nolting, R.F., Ramkema, A., Everaarts, J.M., 1999.** The geochemistry of Cu, Cd, Zn, Ni and Pb in sediment cores from the continental slope of the Banc d'Arguin (Mauritania). Cont. Shelf Res. 19: 665-691.
- Nubi, O.A., Ajao, E.A., Oyewo, E.O., Unyimadu, J.P., 2008.** Nutrient levels in Guinea current large marine ecosystem (GC – LME) waters. Sci. World J. 3 (2): 89-94.
- Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H., 2000.** Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. Water SA, 26 (2): 269-284.
- Olavarría Contreras, Y.A., 2007.** Determinación de trazas de cadmio en cholga (*Aulacomya ater*), chorito (*Mytilus chilensis*) y ostra chilena (*Ostrae chilensis*) en la zona de Chiloé (Hueihue). Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. pp. 117.
- O'Leary, C., Breen, J., 1998.** Seasonal variation of heavy metals in *Mytilus edulis*, *Fucus vesiculosus* and sediment from the Shannon Estuary. Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy. 98b (3): 153-169.
- Orban, E., Di Lena, G., Nevigato, T., Casini, I., Marzetti, A., Caproni, R., 2002.** Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. Food Chem. 77: 57-65.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M.P., 2002.** Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquat. Toxicol. 58: 75-98.
- Orbea, A., Marigomez, I., Fernandez, C., Tarazona, J.V., Cancio, I., Cajaraville, M.P., 1999.** Structure peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two Basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36: 158-166.
- Outten, F.W., Theil, E.C., 2009.** Iron-based Redox Switches in Biology. Antioxid. Redox Signal. 11 (5): 1029-1046.

- Oyarzún, J., 2000. Andean metallogenesis: a synoptical review and interpretation. In: Cordani, U.G., Milani, E.J., Thomas Filho, A., Campos, D.A. Tectonic evolution of South America, pp. 725-753. Río de Janeiro.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). Mar. Pollut. Bull. 50: 1548-1557.
- Paparazzo, F.E., Bianucci, L., Schloss, I.R., Almandoz, G.O., Solís, M., Esteves, J.L., 2010. Cross-frontal distribution of inorganic nutrients and chlorophyll-a on the Patagonian Continental Shelf of Argentina during summer and autumn. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 45 (1): 107-119.
- Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K., Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. J. Thermal Biol. 22: 151-156.
- Pérez, A.A., Fajardo, M.A., Strobl, A.M., Pérez, L.B., Piñeiro, A., López, C.M., 2005. Contenido de plomo, cromo y cadmio en moluscos comestibles del golfo San Jorge (Argentina). Acta Toxicol. Arg. 13 (1): 20-25.
- Pierce, R.H., Weeks, J.M., 1993. Nitrate toxicity to five species of marine fish. J. World Aqua. Soc. 24: 105-107.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarpotto, E., 2004. Oxidative stress and cell signalling, Curr. Med. Chem. 11: 1163-1182.
- Porte, C., Biosca, X., Solé, M., Albaigés, J., 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). Environ. Pollut. 112: 261-268.
- Posthuma, L., van Straalen, N., 1993. Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates. A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. Comp. Biochem. Physiol. C 106: 11-38.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Comp. Biochem. Physiol. C 114: 99-103.
- Prevodnik, A., Gardeström, J., Lilja, K., Elfving, T., McDonagh, B., Petrović, N., Tedengren, M., Sheehan, D., Bollner, T., 2007. Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. Aquat. Toxicol. 82: 63-71.
- Pytharopoulou, S., Sazakli, E., Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D.L., 2008. Translational responses of *Mytilus galloprovincialis* to environmental pollution: Integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index. Aquat. Toxicol. 89: 18-27
- Rainbow, P.S., 1990. Heavy metals in marine invertebrate. In: Furness and Rainbow (ed.) Heavy metals in the marine environment, CRC press, pp. 255.
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 31: 183-192.
- Rainbow, P.S., Phillips, D., 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. Mar. Pollut. Bull. 26: 593-601.
- Rawls, H.R., Van Santen, P.J., 1970. Singlet oxygen: a possible source of the original hydroperoxides in fatty acids. J. Amer. Oil Chem. Soc. 171: 135-138.
- Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34: 48-63.
- Regoli, F., Orlando E., 1994. Seasonal variation of trace metal concentrations (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: comparison between a polluted and a non polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27: 36-43.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquat. Toxicol. 31: 143-164.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. Aquat. Toxicol. 40: 375-392.

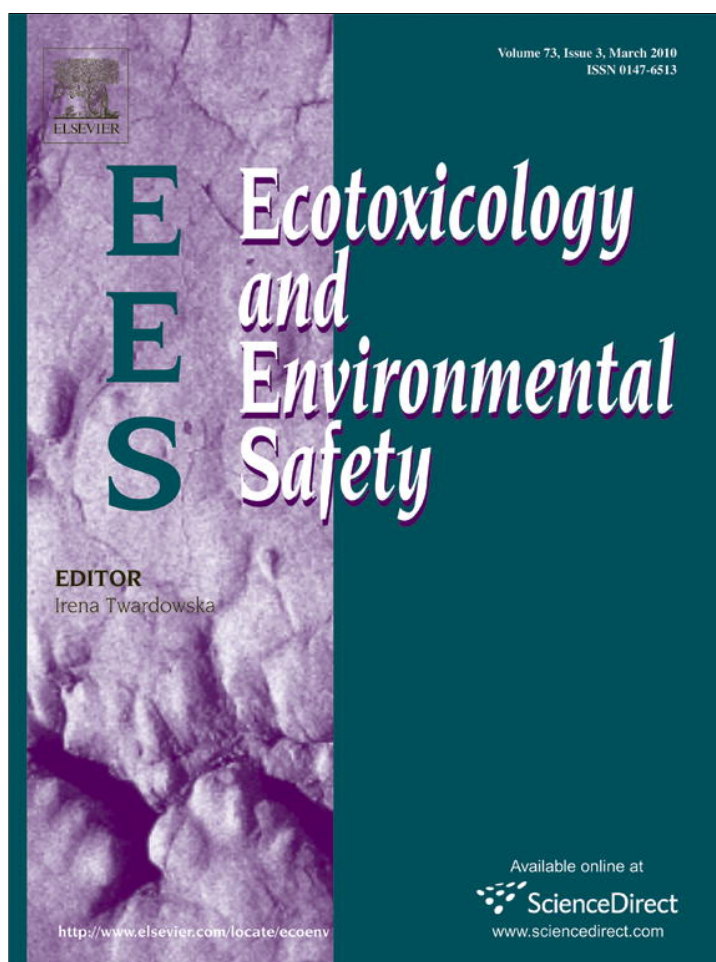
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat. Toxicol.* 68: 167-178.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R., O'hara, S., 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100: 177-181.
- Roesijadi, G., 1996. Environmental factors: response to metals. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland, pp. 515-537.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P., 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122: 369-378.
- Rudneva, I.I., 1999. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122 (C): 265-271.
- Russo, R.C., 1985. Ammonia, nitrite and nitrate. In: Rand GM, Petrocelli SR, editors. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington DC: Hemisphere Publishing Corporation. pp. 455-471.
- Ruus, A., Schaanning, M., Øxnevad, S., Hylland, K., 2005. Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquat. Toxicol.* 72: 273-292.
- Ryan, T.P., Aust, S.D., 1992. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 119-141.
- Salomons, W., Förstner, U., 1984. *Metals in the Hydrocycle*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 349.
- Sanchez, W., Porcher, J-M., 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends Analyt. Chem.* 28 (2): 150-158.
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditcher, J.M., Porcher, J.M., 2008. Biomarker responses in wild three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus L.*) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environ. Int.* 34 (4): 490-498.
- Santana, A., Porter, C., Butorovic, N., Olave, C., 2006. Primeros antecedentes climatológicos de estaciones automáticas (AWS) en el Canal Beagle, Magallanes, Chile. *Anal. Inst. Patag. (Chile)*, 34: 5-20.
- Santinelli, N., Esteves, J.L., 1993. Características químicas y biológicas del Estuario del Río Chubut, Patagonia, Argentina. *Nat. Patag.* 1: 22-34.
- Santovito, G., Piccini, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140: 321-329.
- Schäfer, S.G., Dawes, R.L.F., Elsenhans, B., Forths, W., Schümann, K., 1999. Metals. In Marquardt, H., Schäfer, S.G., McClellan, R.O. and Welsch, F. (Eds.), *Toxicology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 755-804.
- Schiff, K.C., Weisberg, S.B., 1999. Iron as a reference element for determining trace metal enrichment in Southern California coastal shelf sediments. *Mar. Environ. Res.* 48: 161-176.
- Schlenk, D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in Ecological Risk Assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 39: 48-53.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E., George, S., James, M., Kullman, S.W., van den Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in fishes. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.). *The toxicology of fishes*, CRC Press, pp. 153-234.
- Schrek, R., Baeuerle, P.A., 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.* 1: 39-42.
- Seed, R., Suchanek, T.H., 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. In: *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. E. Gosling (Ed.). Elsevier, Amsterdam. 25: 87-170.
- Servicio de Hidrografía Naval, 2009. Tablas de marea para Año 2008/2009. Puertos de la República Argentina y puertos principales de Brasil, Uruguay y Chile. Disponible online en http://www.hidro.gov.ar/Oceanografia/Tmareas/R_Mareas.asp

- Sevanian, A., Ursini, F., 2000.** Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Rad. Biol. Med.* 29: 306-311.
- Shaw, J.P., Large, A.T., Donkin, P., Evans, S.V., Staff, F.J., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Peters, L.D., 2004.** Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 67: 325-336.
- Sheehan, D., Power, A., 1999.** Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123: 193-199.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001.** Structure, function and evolution of glutathionein transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360: 1-16.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004.** Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129: 99-112.
- Sokolova, I.M., Sokolov, E.P., Ponnappa, K.M., 2005.** Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat. Toxicol.* 73: 242-255.
- Solis, M., Willers, V., Rodríguez, M.V., Amin, O.A., Esteves, J.L., 2004b.** Efluentes, ríos o arroyos que drenan a las Bahías Golondrina, Encerrada y Ushuaia. Anexo 1 en: "Evaluación de la Contaminación Urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina". Eds. José Luis Esteves y Oscar Amin. pp. 16-22.
- Solis, M., Ocariz, H., Willers, V., Rodríguez, M.V., Amin, O.A., Esteves, J.L., 2004a.** Resultados de parámetros ambientales en las bahías de Ushuaia y Golondrina. Anexo 5 en: "Evaluación de la Contaminación Urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina". Eds. José Luis Esteves y Oscar Amin. pp. 33-43.
- Soto, M., 2001.** Biodisponibilidad de Metales Pesados (Cd, Cu y Pb) en sedimentos marinos superficiales procedentes de las principales zonas ostrícolas del Estado de Sonora. Tesis, Escuela de Ingeniería Química. Universidad de Sonora. Spectrometry (ICP-EAS). Fresenius J. Anal. Chem. 348, 390-395.
- Soto, M., Kortabitarte, M., Marigómez, I., 1995.** Bioavailable heavy metals in estuarine waters as assessed by metal/shell-weight indices in sentinel mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 125: 127-136.
- Spiro, T., 2004.** Química Medioambiental. 2ª. Ed. Pearson Educación, Madrid. pp. 504.
- Stadtman, T.C., 1990.** Selenium biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 111-127.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18 (2): 321-336.
- Storey, K.B., 1996.** Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 1715-1733.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1972.** A practical handbook of seawater analysis. Bulletin 167 (2nd edition). Fish. Res. Board Can. Ottawa, pp. 310.
- Sukhotin, A., Abele, D., Pörtner, H., 2002.** Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 226: 223-234.
- Szefer, P., Szefer, K., Glasby, G.P., Pempkowiak, J., Kaliszan, R., 1996.** Heavy metal pollution in surficial sediments from the Southern Baltic Sea off Poland. *J. Environ. Sci. Health, A* 31 (10): 2723-2754.
- Technicon®, 1973.** Silicates in water and seawater. Industrial Method N° 186 – 72 W/B', pp. 2.
- Torres, A.I., Gil, M.N., Amin, O.A., Esteves, J.L., 2009.** Environmental characterization of a eutrophicated semi-enclosed system: nutrient budget (Encerrada Bay, Tierra del Fuego Island, Patagonia, Argentina). *Water Air Soil Pollut.* 204: 259-270.
- Torres, M.A., Testa, C.P., Gaspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., Almeida, E.A., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002.** Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 923-932.

- Tortorelli, M.C., 1987.** Contribución al estudio de los ciclos reproductivos del mejillón patagónico, *Mytilus chilensis* (Hupé), y de la cholga, *Aulacomya ater* (Molina), en el Canal Beagle. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA, pp. 257.
- Treguer, P., Le Corre, P., 1975.** Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'Autoanalyser II Technicon®), 2nd edition, France, pp.109.
- Trojanowski, J., Trojanowska, C., Jańczak, C., Antonowicz, J., Bruski, J., 2000.** Heavy metals in some peat soils of Middle Pomerania. Baltic Coast. Zone. 4: 45-51.
- Turekian, K.K., 1971.** In: Impingement of Man on the Oceans. D.W. Hood (ed.). Wiley Interscience. pp. 9-73.
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005.** Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. Chemosphere, 59: 1175-1181.
- Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., Silva, M.D., Randi, M.A.F., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007.** Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. Environ. Res. 105: 350-363.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005.** Metals, toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem. 12: 1161-1208.
- Valladares, A., 2004.** Cuencas varias de Tierra del Fuego. Cuenca N° 73. pp. 5.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13: 57-149.
- van Dokkum, H.P., Hulskotte, J.H.J., Kramer, K.J.M., Wilmot, J., 2004.** Emission, fate and effects of soluble silicates (waterglass) in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol. 38 (2): 515-521.
- Vázquez, N.N., Gil, M.N., Esteves, J.L., Narvarte, M.A., 2007.** Monitoring Heavy Metal Pollution in San Antonio Bay, Río Negro, Argentina. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 79:121-125.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007.** Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. Chemico-Biological Interactions, 167: 219-226.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008.** Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. Est. Coast. Shelf Sci. 76: 745-752.
- Verlecar, X.N., Pereira, N., Desai, S.R., Jena, K.B., Snigdha, 2006.** Marine pollution detection through biomarkers in marine bivalves. Curr. Sci. 91 (9): 1153-1157.
- Viarengo, A., 1985.** Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull. 16: 153-158.
- Viarengo, A., 1989.** Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level, CRC Reviews in Aquatic Sciences, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 295-317.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991a.** Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. Comp. Biochem. Physiol. C 100: 187-190.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., Orunesu, M., 1991b.** Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels: the role of the antioxidant defense systems. Experientia, 47: 454-457.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp. Biochem. Physiol. C 146: 281-300.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999.** Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Am. J. Physiol. 277: R1612-1619.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990.** Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comp. Biochem. Physiol. C 97: 37-42.
- Vidal, M.-L., Bassères, A., Narbonne, J.-F., 2002.** Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 133-151.
- Villares, R., Puente, X., Carballeira, A., 2001.** *Ulva* and *Enteromorpha* as indicators of heavy metal pollution. Hydrobiologia, 462: 221-232.

- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullas, M.J., Valavanidis, A., 2007.** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 1361-1371.
- Widdows, J., Donkin, P., 1992.** Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling, E.M. (Ed.), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 383-417.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991.** Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161.
- Yap, C.K., Ismail, A., Tan, S.G., Omar, H., 2002.** Correlations between speciation of Cd, Cu, Pb and Zn in sediment and their concentrations in total soft tissue of green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia. *Environ. Int.* 28: 117-126.
- Yeats, P., Gagné, F., Hellou, J., 2008.** Body burden of contaminants and biological effects in mussels: An integrated approach. *Environ. Int.* 34: 254-264.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001.** Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54: 176-186.
- Zagal, C., Hermosilla, C., 2001.** Guía de invertebrados marinos del litoral valdiviano. Impreso por Quebecor Wild Chile S.A., Santiago de Chile. pp. 217.
- Zakrzewski, S.F., 2002.** *Environmental Toxicology*, (3rd ed.). New York, Oxford University Press. pp. 334.
- Zandee, D.I., Kluytmans, J.H., Zurburg, W., 1980.** Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Neth. J. Sea Res.* 14: 1-29.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

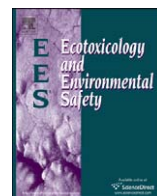
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel

Erica Giarratano*, Claudia A. Duarte, Oscar A. Amin

Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC – CONICET), Av. B. Houssay 200 (V9410BFD) Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2009

Received in revised form

12 October 2009

Accepted 19 October 2009

Available online 13 November 2009

Keywords:

Mytilus edulis chilensis

Biomarker

Transplant

Heavy metals

Coastal waters

Biomonitoring

ABSTRACT

Mussels coming from a mussel farm at Brown Bay (Beagle Channel) were transplanted to four sites inside Ushuaia Bay for 2 and 4 weeks. The objective of this study was to assess the quality of coastal waters of Ushuaia Bay by measuring catalase activity, lipid peroxidation, total lipid content, bioaccumulation of heavy metals and condition index in transplanted mussel *Mytilus edulis chilensis*. Biomarkers except condition index showed significant differences among exposure times as well as among tissues. Digestive gland presented the highest catalase activity, malondialdehyde level and total lipid content. Digestive gland also was the main target tissue of accumulation of iron and copper, while gill accumulated the highest levels of zinc. A principal component analyzes with the whole set of data allowed to separate stations based on physicochemical conditions and biochemical responses of each studied area.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Coastal waters are exposed to several mechanisms of disturbance; among them, chemical pollution associated with industrial production and high urbanization are of major concern.

Ushuaia Bay (54°48' S, 68°19' W, Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina) is not immune to decline of its environmental quality. This area has been receiving significant inputs of contaminants from the city of Ushuaia, the southernmost inhabited location on Earth, which has increased severely in the past years its urban wastewaters, industries, shipping, tourism and general urban influences. Relatively high concentrations of several metals have been found by Amin et al. (1996a, 1997, 2000) in sediments, mussels and water of Ushuaia Bay.

Bivalves, and particularly the genus *Mytilus* sp., are considered suitable bioindicators for biomonitoring studies and they are considered appropriate for caging experiments along coast lines (Viarengo et al., 2007). Transplanted mussels facilitate the investigation of areas where native specimens are absent, and/or compensatory adaptative mechanisms likely occur in native populations from chronically contaminated areas, which can attenuate the capacity of biomonitoring to discriminate different levels of environmental disturbance (Regoli and Principato, 1995; Nigro et al., 2006).

There are numerous studies showing that living organisms use free radicals and reactive oxygen species (ROS) for advantageous biological effects (Dröge, 2003). Regulated production of free radicals in higher organisms and maintenance of “redox homeostasis” are essential for the physiological health of organisms (Ames et al., 1993). Several toxic pollutants produce an imbalance in free radical reactions and the production of toxic ROS being responsible for a variety of oxidative damages that finally cause adverse health effects and diseases (Valavanidis et al., 2006). Organisms have developed mechanisms to protect themselves from the toxic effects of increased ROS production activating the antioxidant system (Young and Woodside, 2001; Sureda et al., 2006; Valavanidis et al., 2006).

The use of biological responses to contaminant exposure by sentinel species has become a useful tool in environmental quality evaluation and risk assessment. Among the numerous ecotoxicological biomarkers proposed in the last three decades, those based on responses at the molecular and cellular levels represent the earliest signals of environmental disturbance and they are commonly used for biomonitoring (Viarengo et al., 2007; Moore et al., 2004). Measuring the same biomarker in different locations simultaneously gives us information about the pollution status of the region and provides a better comprehension of the mechanisms of response of the organisms to the pollutants (Frenzilli et al., 2004). Besides, using caged mussels that belong to the same cohort, observed changes in organisms are believed to be related to the effects of toxic chemicals present in water (Box et al., 2007).

* Corresponding author. Fax: +54 2901 430644.

E-mail address: giarratanoerica@hotmail.com (E. Giarratano).

Catalase activity (CAT), although not responding specifically to a group of contaminants but to oxidative stress, was measured during this work since it has been considered as the primary defense against oxidative damage and it has been studied in bivalve molluscs around the world (Frenzilli et al., 2004; Pellerin-Massicotte, 1997). CAT is an enzymatic intracellular antioxidant involved in different defense systems against the radicals generated by the environmental oxidative pollutants. It is a peroxisomal hydroperoxidase that degrades H_2O_2 to H_2O and O_2 (Baumard et al., 1999).

Malondialdehyde (MDA) is an intermediate product of lipid peroxidation and, as reactive toxic metabolite, it is usually rapidly degraded. However, measurements of MDA are still considered a relevant biomarker of lipid peroxidation in tissue sample preparations, especially for comparative purposes (Hermes-Lima, 2004). It is used as a non-enzymatic marker of oxidation of membrane phospholipids through lipid peroxidation and it has been considered as a relevant index of chemical damage induced by toxics in mussels (Box et al., 2007). An increment in MDA level in organisms can be related to degradation of an environmental site by the diminishment of the water quality (Charissou et al., 2004).

Presence of contaminants in the environment frequently leads to the depletion of energy reserves as a compensatory mechanism to the higher demand of energy required by detoxification processes (Guerlet et al., 2006). In this sense, body condition indexes, stress response and total lipid content have been frequently evaluated in biomonitoring programs relative to exposure conditions (Smolders et al., 2004; Mubiana et al., 2006; Valdez Domingos et al., 2007; Yeats et al., 2008). These biomarkers are mainly used as an ecophysiological measure of the health status of the animals.

The purpose of this study was to try to evaluate the quality of coastal waters of Ushuaia Bay (Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina) measuring conventional biomarkers such as catalase activity, lipid peroxidation, total lipid content, condition index and bioaccumulation of heavy metals in mussel *Mytilus edulis chilensis* transplanted from a mussel farm to various sites of Ushuaia Bay. However, the main goal of the present study, besides biomonitoring coastal waters of Beagle Channel, was to detect possible relationships between biomarkers and environmental parameters in order to contribute to an overall understanding of their potential role in water quality assessment.

2. Materials and methods

The authors declare that the experiments described in this article were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of animal welfare.

2.1. Experimental design

In August 2006, mussels were brought from a mussel farm at Brown Bay (BB) located 24 nautical miles East of Ushuaia city and transported in ice-cold boxes to the laboratory located in Ushuaia city. Organisms used in the experiment belonged to the same cohort and had homogeneous shell length (61 ± 4 mm), which minimize the variability. Ushuaia Bay (UB) receives the impact of Ushuaia city through urban and industrial effluents that reaches the waterline of the bay by runoff, streams or rivers. High concentrations of nutrients and total coliforms have been registered at Industrial Zone and Fuel Dock (Esteves and Amin, 2004). Moreover, high quantities of heavy metals have been measured in sediments of the mentioned sites (Amin et al., 1996a) and in mussel tissues (Amin et al., 1996b, 2000). There is no previous published data of Aspirante Creek and Ushuaia Peninsula. Due to the long distance from Ushuaia city to these last two sites and the in-existent anthropogenic activity here (O. Amin, personal communication), Aspirante Creek and Ushuaia Peninsula were estimated as low impacted sites. Mussels were kept for 2 and 4 weeks in four sites inside Ushuaia Bay selected according the kind of anthropogenic source of contamination (Table 1). The location of the experimental sites is shown in Fig. 1.

Table 1
Sources of anthropogenic contamination at each sampling site.

Station	Human impacts	Estimated degree of impact
Industrial Zone (IZ)	Factories Population Urban wastes Industrial wastes	High
Fuel Dock (FD)	Fuel dock Military dock Intense maritime traffic	High
Aspirante Creek (AC)	Access only sailing No human use	Low
Ushuaia Peninsula (UP)	Access only sailing Diving area	Low
Brown Bay (BB)	Small fishermen community Mussel farm	Low

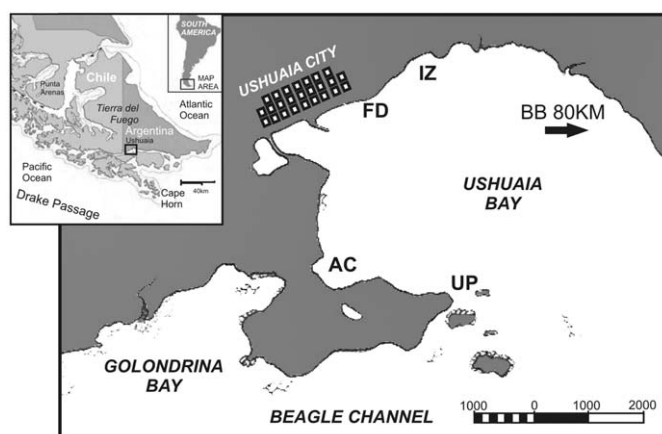


Fig. 1. Location of the cages containing the transplanted mussels inside Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Argentina).

After a first sorting, mussels were divided into sub-groups of 45 individuals and each sub-group was placed in a cage of $18 \times 12 \times 18$ cm built in polypropylene netting (1 cm^2 of mesh size) allowing free water circulation through it. Three cages were used per site, suspended in the water column at an average depth of 5 m using a rope and anchored to the bottom by a ballast weighing approximately 15 kg. The experimental devices were kept vertically straight by using a plastic buoy. Samples of mussels were taken at the beginning of the experiment ($t=0$), at weeks 2 ($t=2$) and 4 ($t=4$) of exposure, while water samples were taken at weeks 1 and 3.

2.2. Physical-chemical parameters

2.2.1. Water

Surface water temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen were recorded *in situ* by means of a HORIBA U-10 multiparameter device. Water samples for the study of dissolved inorganic nutrients were filtered through Whatman GF/C filters and then were frozen (-20°C) in plastic bottles until its analysis in the laboratory. Nitrates and nitrites were determined following the methods previously described by Treguer and Le Corre (1975) and Grasshoff (1983) respectively; while phosphates and silicates were measured following the methods described by Eberlein and Kattner (1987) and Technicon[®] (1973), respectively. A four channels automatic Technicon[®] AA-II autoanalyzer was used to perform the corresponding nutrient analyzes. Concentration of chlorophyll-*a* was measured according to Holm-Hansen et al. (1965) using a Sequoia Turner (model 450) fluorometer. Ammonia was analyzed by the indophenol method described by Strickland and Parsons (1972).

2.2.2. Sediment

At the beginning of the experiment, sediment samples at each site were obtained using a van Veen grab. These samples were stored in polyethylene bags and transported to the laboratory. Samples were dried until constant weight at 60 ± 5 °C and then were sieved through stainless steel meshes in order to separate sediment with grain size < 62 μm . About 0.5 g of that fraction was used to determine total metal concentrations (Cu, Cd, Pb, Zn and Fe) following the method described by Marcovecchio et al. (1988). Metal concentrations were measured using a Perkin Elmer AA-2380 atomic absorption spectrophotometer with air-acetylene flame and deuterium background correction (D₂BGC). Analytical-grade reagents were utilized for sediment mineralization as well as for blanks and calibration curve standards build ups. Each sample was run in duplicate obtaining a mean value for each site.

2.3. Preparation of tissue extracts for analysis of biomarkers

Even though we know that new and better techniques than those used in our experiments have been developed to evaluate cause–effect relationships in organisms exposed to contaminants, for technical reasons we were not able to use them in the present work. Nevertheless, we do think that those techniques are very useful and we are considering them for future studies in the area.

2.3.1. Catalase

Enzymatic activity was evaluated individually in gill, mantle and digestive gland of 5 mussels following the method described by Bainy et al. (1996). Catalase activity was measured in the resulting supernatant by the rate of hydrogen peroxide (H₂O₂) decomposition at 240 nm (Beutler, 1982) with an UV-1203 Shimadzu spectrophotometer. Each sample was run by duplicate.

2.3.2. Lipoperoxidation

Gill, mantle and digestive gland of 5 mussels were individually analyzed according to Buege and Aust (1978). Lipoperoxidation (LPO) was measured by the generation of thiobarbituric acid reactive species and quantified in terms of MDA equivalents. Its absorbance was measured at 532 nm with an UV-1203 Shimadzu spectrophotometer. Each sample was run by duplicate.

LPO level and CAT activity were quantified with soluble proteins content which was determined by the Markwell et al. (1978) method.

2.3.3. Total lipid content

Total lipid content was measured individually in mantle and digestive gland from 4 mussels of each station. Lipids were quantified using the gravimetric method of Bligh and Dyer (1959) as the difference between the weight of the extract placed in a pre-weighed bottle and the weight of the bottle once the solvent had evaporated.

2.3.4. Condition index

To examine the individual Condition Index (CI) of mussels, 4 specimens were taken at each exposure time. Soft tissues were separated from the shell and dried at 60 °C until constant weight. Condition index of each mussel was calculated as the dry tissue weight/dry shell weight (Couillard et al., 1995).

2.4. Metal bioaccumulation in tissue mussels

At the beginning of the experiment, after 2 and 4 weeks of exposure samples of 10 mussels at each site were collected. Gill and digestive gland were dissected out and dried at 60 °C until constant weight. Pooled samples of each tissue were homogenized with a porcelain mortar and stored in polyethylene bags until analysis. For each tissue, aliquots of about 0.5 g were taken from the well-homogenized total sample to determine total metal concentrations (Cu, Cd, Pb, Zn and Fe) following the method described by Marcovecchio et al. (1988) in Section 2.2.2. Each sample was run by duplicate.

2.5. Statistical analysis

Comparisons among tissue and exposure time for each site were made by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons with unequal numbers of samples. Spearman's rank correlation analyzes were performed to determine the degree of relationship between heavy metals in sediments. The significance level of all analyzes was set at $p < 0.05$.

For heavy metal concentrations, measured values of each analyte were divided by the average value of that analyte from all survey sites. These unitless values were then combined in various groupings by adding analyte values then dividing by the number of analytes in the group (Fisher et al., 2000). This procedure was applied for concentrations in gill, in digestive gland and in sediment resulting three new variables 'total metal in gill', 'total metal in digestive gland' and 'total metal in sediment' that were used in principal component analysis (PCA).

A PCA was conducted with physical–chemical parameters to describe the studied sites. Variables with factor co-ordinates < 0.7 were not used to analyze the relationship between biomarker responses and environmental data by PCA. Separated PCA were run for Week 2 and Week 4 of exposure. All statistical tests were undertaken with Statistica software version 6.0.

3. Results

To summarize, we mention that higher levels of nutrients were found at Ushuaia Bay than at Brown Bay, excepting silicates. We recorded the highest concentrations of Fe, Cu and Zn in sediments of BB. We measured the maximum levels of Pb in sediments of IZ and FD, while at AC and UP we found the highest concentrations of Cd. Catalase activity, lipoperoxidation levels and total lipid content at all sites of UB showed increments respect to the initial conditions. No spatial or temporal changes were registered in condition index at all sites. Catalase activity was higher in digestive gland than in the other tissues, while lipid peroxidation and total lipid content did not show a defined trend according to the organ assayed. Bioaccumulation of heavy metals was variable, both in space and in time. Fe and Cu were most accumulated in digestive gland, Zn was mainly accumulated in gill and Cd and Pb did not show a special target organ. The integral assessment of biological and physical–chemical data revealed that biomarkers were directly correlated with nutrients and inversely correlated with dissolved oxygen and total metal in sediment. This global analysis allowed us to group the sites as follow: IZ and FD together while AC and UP formed another group. Both groups were separated from the reference site according to the overall information gathered.

3.1. Physical–chemical parameters

3.1.1. Water

Similar values for both sampling times (T_1 and T_3) at all stations were registered for conductivity, pH, dissolved oxygen and temperature; while in inorganic nutrients, ammonia and chlorophyll-*a* variations were detected (Table 2).

Nitrites and nitrates concentrations kept constant along exposure time at all experimental sites of UB (0.25–0.42 and 13.34–15.93 $\mu\text{mol/L}$, respectively). Considering all stations, levels of phosphates were between 0.57 and 1.59 $\mu\text{mol/L}$, although tending to be greater at T_1 . Highest values of silicates were measured at both sampling times in IZ and FD (8.37–11.03 $\mu\text{mol/L}$). Concentration of chlorophyll-*a* was higher at T_1 than at T_3 except in AC where no change was observed. Contrarily, maximum values of ammonia were registered at T_3 (1.44–7.71 $\mu\text{mol/L}$) in all sites of UB. Except for phosphates, the others inorganic nutrients, ammonia and chlorophyll-*a* were higher in UB respect to those of BB (T_0).

3.1.2. Sediment

Heavy metal concentrations in the five studied sites are summarized in Table 3. Range concentrations expressed as $\mu\text{g/g}$ DW for each metal were as follow: Cu 5.50–36.25, Pb 9.39–25.31, Cd 0.25–1.80, Zn 51.34–105.63, while Fe ranged between 12.81 and 24.91 expressed as mg/g DW. BB was the station with the greatest values of Cu (36.25 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$ DW), Zn (105.63 ± 2.94 $\mu\text{g/g}$ DW) and Fe (24.91 ± 0.02 mg/g DW). AC was the site with the highest level of Cd (2.31 ± 0.07 $\mu\text{g/g}$ DW); while FD showed the maximum value of Pb (28.76 ± 2.81 $\mu\text{g/g}$ DW). Fe was the most abundant metal at all sites. Strong significant positive correlations ($p < 0.01$) were found for pairs Cu–Zn ($r=0.97$), for Fe–Zn ($r=0.87$) and for Cu–Fe (0.78).

Table 2
Physical–chemical characteristics of the water samples at each sampling site.

Station	Week	pH	Cond. (mS/cm)	DO (mg/L)	Temp. (°C)	Nitrites (µmol/L)	Nitrates (µmol/L)	Phosphates (µmol/L)	Silicates (µmol/L)	Chl- <i>a</i> (µg/L)	Ammonia (µmol/L)
BB	0	7.93	49.7	9.97	4.8	0.17	12.39	0.91	4.07	0.024	0.411
IZ	1	7.83	49.6	8.93	5.1	0.40	15.93	1.12	10.65	0.216	6.533
FD	1	7.85	49.5	8.70	4.8	0.40	14.62	0.57	11.03	0.067	3.333
AC	1	7.87	49.7	9.17	4.6	0.37	14.24	1.10	6.08	0.106	0.700
UP	1	7.80	49.0	9.25	5.4	0.40	14.62	1.59	6.08	0.130	0.467
IZ	3	7.75	49.2	8.72	5.3	0.40	15.27	0.76	9.89	0.096	7.713
FD	3	7.82	48.5	8.54	4.3	0.42	14.44	0.73	8.37	0.038	7.484
AC	3	7.70	49.4	8.74	4.5	0.37	13.34	0.98	7.60	0.110	1.740
UP	3	7.70	49.0	8.39	5.7	0.25	14.03	1.06	8.37	0.082	1.444

Cond. – conductivity; DO – dissolved oxygen; Temp. – temperature; Chl-*a* – chlorophyll-*a*.

Table 3
Heavy metal concentrations in sediments expressed in µg/g of dry weight.

Station	Fe ^a	Cu	Zn	Cd	Pb
BB	24.91 ± 0.02 c	36.25 ± 0.01 d	105.63 ± 2.94 b	0.25 ± 0.01 a	12.12 ± 0.85 a
IZ	19.85 ± 3.22 b	7.54 ± 0.53 a	57.83 ± 5.60 a	0.55 ± 0.13 b	14.88 ± 0.21 b
FD	14.88 ± 3.37 ab	6.38 ± 1.29 a	57.93 ± 4.97 a	0.65 ± 0.01 b	28.76 ± 2.81 c
AC	13.27 ± 1.33 a	8.73 ± 0.18 b	50.59 ± 2.96 a	2.31 ± 0.07 d	11.19 ± 1.43 a
UP	15.19 ± 1.34 a	10.53 ± 0.34 c	58.86 ± 1.99 a	1.03 ± 0.07 c	10.19 ± 2.88 a

Data are expressed as mean values ± standard deviations. For each metal, stations sharing the same lower case letter are not significantly different.

^a Concentration expressed in mg/g of dry weight.

3.2. Biomarkers

3.2.1. CAT activity

In IZ significant increment ($p < 0.05$) of activity was registered in digestive gland at T_2 (103.3%) and T_4 (93.9%) as well as in mantle at T_2 (64.8%) respect to the initial conditions. In this station there was no difference in gill at different exposure times. In FD, an increment in the activity was measured at T_2 and T_4 in digestive gland (126.7% and 140.8%, respectively) and mantle (68.1% and 183.8%, respectively), while gill activity did not show changes. Activity of CAT in AC at T_4 was significantly higher than that at the beginning of the experiment in the three organs assayed (33.8% in gill, 189.7% in mantle and 118.3% in digestive gland). However, a significant increment was also measured in digestive gland at T_2 (128.7%). In UP, activity in digestive gland was significantly higher in both sampling times than that at T_0 (69.6% at T_2 and 169.2% at T_4). In mantle an increment of 133% was registered at T_4 ; meanwhile, there were no changes in gill activity, comparing it to the initial time. At all sites, significant differences were found among tissues and exposure times. Digestive gland presented the highest catalase activity, followed by mantle and the lowest activity was registered in gill (two-way ANOVA, $p < 0.05$). Regarding the exposure time, the activity showed that $T_4 \geq T_2 \geq T_0$ except in IZ where $T_2 \geq T_4 \geq T_0$ (Fig. 2).

3.2.2. MDA

Initial levels of MDA in BB were 5.10 ± 0.50 ; 1.95 ± 0.58 and 4.30 ± 1.22 µmol MDA/mg protein in gill, mantle and digestive gland, respectively. Significant increments of MDA levels respect to T_0 were measured in IZ at T_4 in gill (74%) and mantle (350%); while in digestive gland, the highest increment was registered at T_2 (128.5%). In FD levels of MDA in mantle and digestive gland at T_2 and T_4 were significantly superior to those of T_0 . Meanwhile, in gill the increment in MDA level was recorded at T_4 (63%). AC did not show differences in mantle and digestive gland along exposure time. In gill, a significant increment was measured at T_4 (38%). In the three organs of UP, MDA levels were higher at T_2

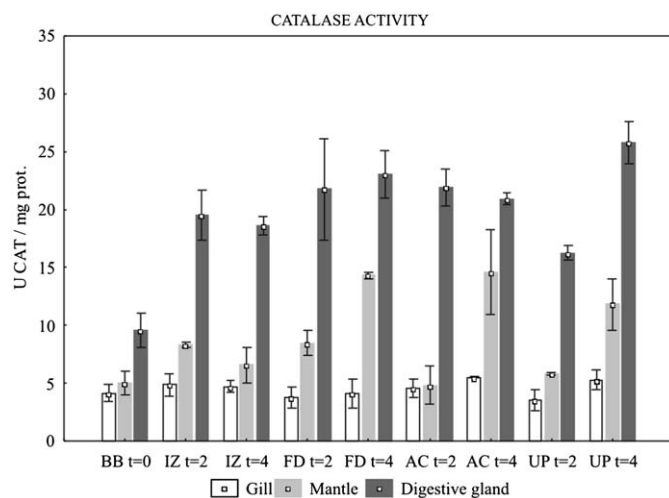


Fig. 2. Catalase activity in gill, mantle and digestive gland of *Mytilus edulis chilensis* from four sites inside Ushuaia Bay after 2 ($t=2$) and 4 ($t=4$) weeks of exposure and reference organisms ($t=0$), before transplantation. Values are expressed as U CAT/mg prot. (mean values ± standard deviations).

(between 87% and 239%) and T_4 (between 53% and 97%) respect to those of T_0 . At all sites, significant differences were found among tissues and time of exposure. MDA in digestive gland and gill were higher than in mantle being greater at T_4 than at the other times (two-way ANOVA, $p < 0.05$), except in UP where the highest MDA level was registered at T_2 (Fig. 3).

3.2.3. Total lipid content

IZ and UP showed significant increments at T_2 and T_4 in mantle (between 5 and 9 fold higher) as well as in digestive gland (between 9 and 11 fold higher). The highest increments were

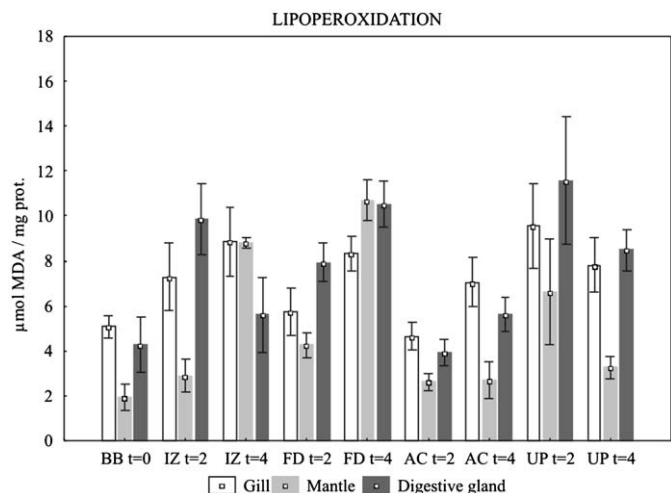


Fig. 3. Lipoperoxidation level in gill, mantle and digestive gland of *Mytilus edulis chilensis* from four sites inside Ushuaia Bay after 2 ($t=2$) and 4 ($t=4$) weeks of exposure and reference organisms ($t=0$), before transplanted. Values are expressed as $\mu\text{mol MDA}/\text{mg prot.}$ (mean values \pm standard deviations).

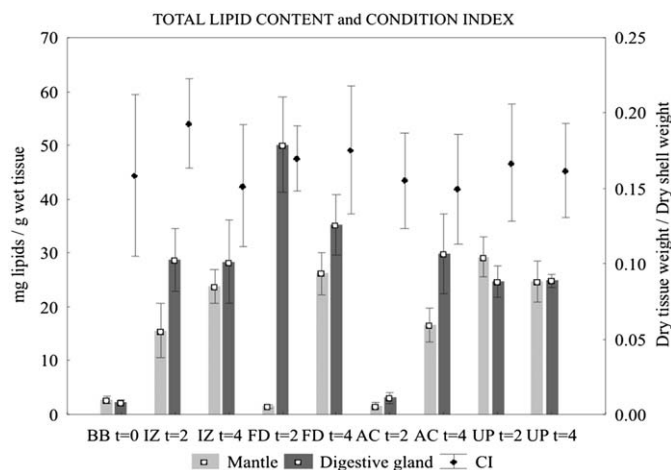


Fig. 4. Total lipid content in mantle and digestive gland and condition index of *Mytilus edulis chilensis* from four sites inside Ushuaia Bay after 2 ($t=2$) and 4 ($t=4$) weeks of exposure and reference organisms ($t=0$), before transplanted. Total lipid content is expressed as mg lipids/g wet tissue on left axis and condition index as dry tissue weight/dry shell weight on right axis (mean values \pm standard deviations).

measured in FD at T_2 (20 fold bigger) and T_4 (14 fold bigger) in digestive gland; while in mantle was only at T_4 (8 times higher). Total lipid content increased at T_4 in both organs assayed in AC (5 times higher in mantle and 12 times in digestive gland). At all sites, significant differences were found among times of exposure ($T_4 \geq T_2$ and T_0), while in UP $T_2 \geq T_4 > T_0$. Significant differences among tissues (digestive gland > mantle) were found in IZ, FD and AC (two-way ANOVA, $p < 0.05$) (Fig. 4).

3.2.4. Condition index

To assess the general health of the transplanted mussels, the condition index was measured at each time of collection (T_0 , T_2 and T_4) at all sites (Fig. 4). Results showed that the condition index remains stable with low variability (0.16 ± 0.01). No differences were found among sites nor among times (two-way ANOVA, $p < 0.05$).

3.3. Metal bioaccumulation in mussels

Accumulated metal concentrations in mussel's tissues are presented in Table 4. Digestive gland was the main target tissue of accumulation of Fe and Cu, while gill accumulated the highest levels of Zn (two-way ANOVA, $p < 0.05$). No significant differences were registered between tissues for Cd and Pb. These two metals showed high standard deviation. Concentrations of Fe, Cu and Zn in digestive gland as well as in gill were significantly different (two-way ANOVA, $p < 0.05$) among sites and times of exposure. Highest Cu and Zn concentrations were found at FD in both tissues, while Fe levels were higher at IZ, FD and UP especially in digestive gland. No significant correlation ($p > 0.05$) was found between metal concentrations in tissues and sediments.

3.4. Principal components analysis

PCA analysis with physical–chemical parameters revealed that 65.6% of the cumulative variance was explained by two components. PC1, which explained 45.5% of the variance, was negatively correlated with nitrites, nitrates, silicates and ammonia and positively correlated with total metal-in sediment and dissolved oxygen. PC2 explained 20.1% of the variance, represented mainly by phosphates and negatively correlated (Table 5). Stations from Ushuaia Bay were clearly different from the reference site (Fig. 5). Physical–chemical parameters seemed to be relatively stable at each station during the assayed period. Variations are given mainly by PC 2 except for AC where variation on PC1 was also noticed.

A second PCA analysis was done using significant physical–chemical parameters obtained in first PCA and biomarker data. The co-ordinates of PC1 and PC2 give the positions of the transplantation stations and the reference site at week 2 (Fig. 6A) and at week 4 (Fig. 6B). At both sampling times, PC1 explained more than 50% of the total variance. At week 2 and 4 dissolved oxygen and total metal in sediment had a positive correlation with PC1 while nutrients and biological responses showed a negative correlation for both periods of time. Total metal in digestive gland had a positive correlation with PC1 only at week 2. At week 2 PC2 showed phosphates, LPO in gill and Lipid in mantle on the positive axis and Total metal in gill on the negative axis. At week 4 PC2 had the highest loadings of phosphates and CAT in gill with positive signs and total metal in digestive gland with negative sign (Table 6). More defined positions of the sites were obtained for week 4 of exposure where FD and IZ were grouped together and AC and UP formed another group; both clearly separated from the reference site.

4. Discussion

In Ushuaia Bay a permanent strong current moves westward along the northern coast of the bay at 2 cm s^{-1} and then progresses to the southeast along the southern coast at 16.3 cm s^{-1} (Balestrini et al., 1998). At all studied sites, mussels increased their levels of the biomarkers analyzed. In general terms, PCA revealed that all biomarkers were directly related to nutrients and inversely related to dissolved oxygen and total metal in sediment. FD and IZ were the sites with the highest concentrations of ammonia and silicates due to the discharges of Este Stream and Grande Stream, respectively. Our findings are consistent with data reported by Esteves and Amin (2004), who have monitored these streams and considered them as “intermediate impacted” for their nutrient loadings. In concordance with findings made by Lau et al. (2004) on mussel *Perna viridis*, this study demonstrated the

Table 4
Heavy metal concentrations in gill and digestive gland of *Mytilus edulis chilensis* expressed in $\mu\text{g/g}$ of dry weight.

Station	Week	Tissue	Fe	Cu	Zn	Cd	Pb
BB	0	Gill	80.14 ± 7.04	6.49 ± 0.09	270.63 ± 0.34	1.28 ± 0.14	7.11 ± 5.10
		Dig. gland	448.57 ± 9.10	12.07 ± 0.54	63.17 ± 7.40	2.03 ± 1.05	9.10 ± 3.33
IZ	2	Gill	110.71 ± 15.80	7.42 ± 1.65	83.97 ± 2.09	0.38 ± 0.54	15.57 ± 0.32
		Dig. gland	887.69 ± 184.01	17.68 ± 2.19	59.92 ± 5.68	0.30 ± 0.43	6.22 ± 2.99
FD	2	Gill	128.20 ± 12.72	11.98 ± 0.35	280.57 ± 32.60	1.25 ± 1.09	nd
		Dig. gland	760.95 ± 121.69	23.22 ± 0.97	102.54 ± 6.62	2.03 ± 0.17	7.99 ± 0.14
AC	2	Gill	109.69 ± 3.49	9.40 ± 1.15	222.27 ± 45.71	2.57 ± 1.15	9.17 ± 6.35
		Dig. gland	491.83 ± 14.40	16.14 ± 0.49	68.55 ± 3.98	1.46 ± 0.69	5.05 ± 2.38
UP	2	Gill	87.65 ± 2.93	9.31 ± 0.14	95.16 ± 7.13	1.46 ± 1.02	7.59 ± 3.47
		Dig. gland	726.73 ± 64.02	16.68 ± 0.38	77.31 ± 10.87	1.18 ± 0.25	6.99 ± 4.98
IZ	4	Gill	159.23 ± 6.91	8.58 ± 0.48	212.06 ± 15.85	0.98 ± 0	3.37 ± 0
		Dig. gland	611.72 ± 13.32	15.09 ± 0.95	60.96 ± 1.89	1.22 ± 0.57	6.73 ± 4.75
FD	4	Gill	87.75 ± 12.25	9.61 ± 0	92.36 ± 5.19	0.89 ± 0.80	5.05 ± 2.38
		Dig. gland	492.08 ± 71.01	25.76 ± 3.40	74.55 ± 2.21	1.38 ± 0.58	3.37 ± 4.77
AC	4	Gill	106.02 ± 2.50	6.42 ± 0.68	96.07 ± 1.08	1.16 ± 0.10	5.52 ± 2.49
		Dig. gland	381.39 ± 14.30	11.56 ± 0.49	67.58 ± 8.80	1.94 ± 0.51	5.49 ± 2.60
UP	4	Gill	158.77 ± 6.78	7.19 ± 0.48	244.70 ± 20.51	2.11 ± 0.92	5.04 ± 2.38
		Dig. gland	572.08 ± 42.74	12.02 ± 2.43	55.42 ± 5.95	3.25 ± 0.23	3.37 ± 0

Data are expressed as mean values ± standard deviations.

Table 5
PCA: correlations between physical–chemical variables and principal components (loadings).

Variables	PC1	PC2
pH	0.57	0.18
Conductivity	0.44	-0.22
Dissolved oxygen	0.82	-0.24
Temperature	-0.25	-0.67
Chlorophyll- <i>a</i>	-0.52	-0.65
Ammonia	-0.70	0.47
Nitrites	-0.76	0.09
Nitrates	-0.87	-0.17
Phosphates	0.08	-0.91
Silicates	-0.86	0.24
Total metal sediment	0.95	0.24
Cumulative explained variance (%)	45.43	65.56

Correlation coefficients are significant when they are higher than 0.7 (bold coefficients).

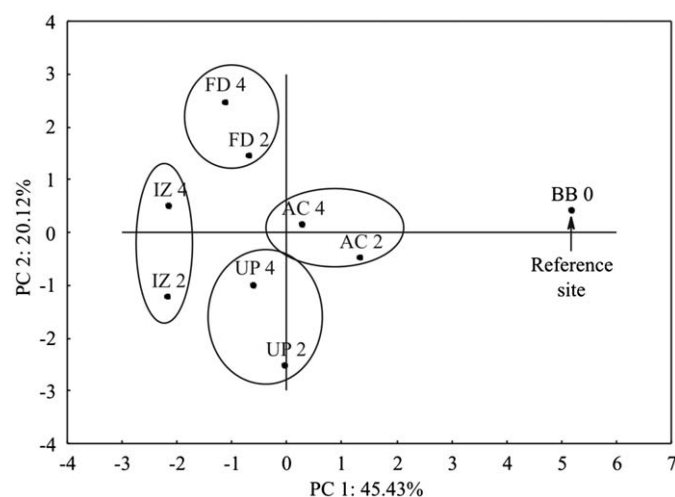


Fig. 5. Graphical representation of sampling sites in the first two axis of PCA derived from physical–chemical parameters.

importance of factors other than heavy metals on the biomarker responses of mussels *Mytilus edulis chilensis*. Nutrient loadings and abiotic factors were shown to induce variations in the biomarker responses. Therefore, interpretation of the

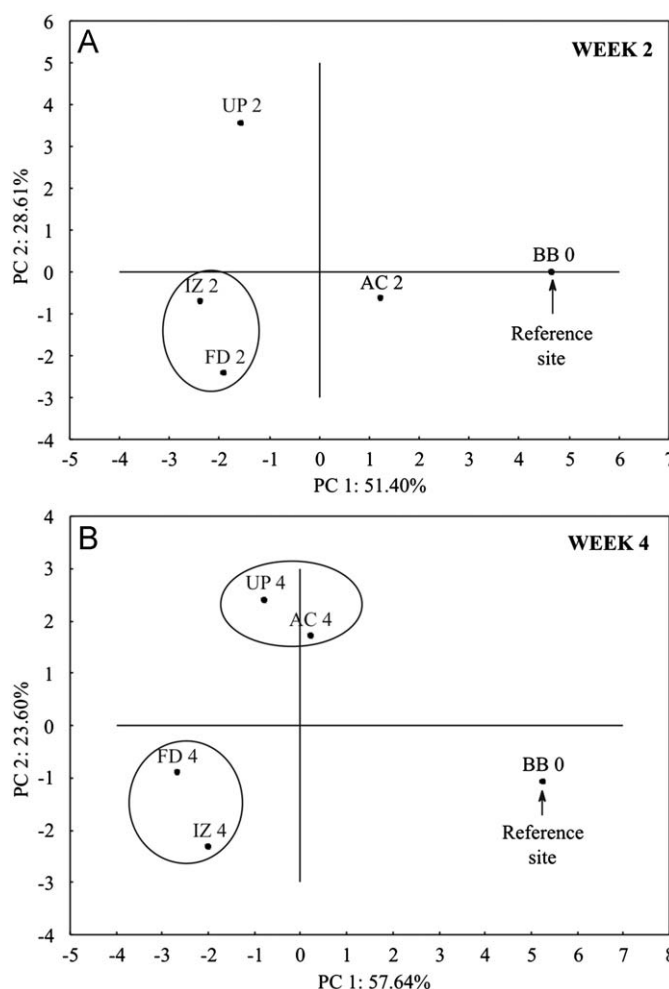


Fig. 6. Graphical representation of sampling sites in the first two axis of PCA (A) derived from significant physical–chemical parameters and biomarker data at week 2 of exposure and (B) derived from significant physical–chemical parameters and biomarker data at week 4 of exposure.

biomarker responses in short time studies should be made with caution.

Fe was the most abundant metal in sediment at all stations. Fe is the metal with the highest concentration under natural

Table 6
PCA: correlations between significant environmental variables and biological variables.

Variables	Week 2		Week 4	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Dissolved oxygen	0.89	0.38	0.92	−0.38
Ammonia	−0.63	−0.47	− 0.77	−0.64
Nitrites	− 0.93	0.01	− 0.84	−0.24
Nitrates	− 0.93	−0.07	− 0.90	−0.31
Phosphates	−0.16	0.92	0.37	0.89
Silicates	− 0.81	−0.55	− 0.94	−0.02
Total metal sediment	0.97	−0.11	0.94	−0.14
Total metal gill	−0.06	− 0.85	−0.07	0.22
Total metal Dig. gland	0.93	−0.19	0.05	− 0.89
CAT gill	0.05	−0.44	−0.21	0.75
CAT mantle	− 0.76	−0.47	−0.56	0.61
CAT Dig. gland	− 0.70	−0.42	− 0.83	0.54
LPO gill	−0.59	0.76	− 0.97	−0.12
LPO mantle	−0.60	0.63	− 0.76	−0.59
LPO Dig. gland	− 0.81	0.47	− 0.70	0.20
LIP mantle	−0.50	0.84	− 0.98	0.12
LIP Dig. gland	− 0.80	−0.29	− 0.95	0.14
Cumulative explained variance (%)	51.40	80.01	57.64	81.24

Correlation coefficients are significant when they are higher than 0.7 (bold coefficients).

conditions in this area, which is in accordance with previous data (Amin et al., 1996a; Amin et al., 1997). Changes in the Fe concentrations are therefore related to a varying contribution of Andean (Fe-rich) versus Coastal Range (Fe-poor) source rocks ultimately controlled by continental rainfall changes (Dezileau et al., 2007). Therefore, slight anthropogenic input may not affect significantly the content of this metal in sediment. The highest concentrations of Fe, Cu and Zn at BB must be of natural origin since there would not be a human activity that could cause such heavy metal input into the system. Metal concentration of sediment from BB constitutes baseline data since there is no previous information of this kind from BB. The highest value of Pb found in FD probably is associated with the intense shipping activity although it is one order of magnitude below the value reported by Amin et al. (1997). The concentration of Pb found in present work in IZ was five times lower than the value registered by Amin et al. (1997). Sediments from AC and UP showed the highest concentrations of Cu and Cd. Unfortunately there are no existing records about heavy metal in these sites that allow us to make comparisons. In the case of Cu, values of AC and UP were below the levels measured by Amin et al. (1996a) in several sites within Ushuaia Bay. In the previously mentioned study, non-detectable levels of Cd were found, meaning that the concentrations of Cd found in the present work would be of anthropic origin. Further studies are necessary to establish the real source of Cd. The diminishment of Cu, Zn and Pb concentration in sediments of Ushuaia Bay could be related to a lower input coming from the industrial sewages as a consequence of the economic crisis in 2001 when most electronic industries closed down their factories and left the area (INDEC, 2005). By comparing metal concentrations in sediments determined in this study with the levels found in coastal sediments of other Argentine coasts (Commendatore et al., 1996; Vázquez, 2005) or even with other parts of the world (Muniz et al., 2004; Lee et al., 1998), it can be observed that concentrations are in the same order of magnitude or even below. Results found during this study for Cu, Zn and Pb are within the ranges reported as background values for uncontaminated coastal and marine sediments (Cobelo-García et al., 2005; Cobelo-García and Prego, 2003). The significant correlation coefficient between concentrations of Cu,

Zn and Fe in sediments indicated that these metals might have come from the same natural source.

Data presented in this paper demonstrate that mussel *Mytilus edulis chilensis* from Ushuaia Bay in the period assayed accumulated mainly Fe and Cu in digestive gland and Zn in gill. It has been suggested that metal concentration in gill and digestive gland can be used to estimate dissolved and particulate exposure of metals, respectively (Fisher et al., 1996). Then, Fe and Cu could be taken up bound to particulate material and Zn in soluble form. Pb and Cd concentrations were similar in both tissues. The same tissue distribution of Fe, Cu and Zn was found in *Mytilus galloprovincialis* by Regoli and Principato (1995), but they found higher concentrations of Pb in gill. Also in *M. galloprovincialis*, Irato et al. (2003) measured higher concentrations of Fe and Cd in digestive gland, while they did not find selective patterns of accumulation for Cu and Zn. Regoli (1998) found high Fe and Cu accumulation in digestive gland, meanwhile Pb and Zn did not show a specific target organ. The levels of metals accumulated by *M. edulis chilensis* were similar to those obtained by Gil et al. (2006) in mussel *Mytilus edulis* from various sites of the South of Argentina. Many researchers have evaluated bioaccumulation of heavy metals in various bivalves reaching diverse results in different organs and species. Results are difficult to compare because responses differ among species, threats differ among metals, and environmental influences are complex (Luoma and Rainbow, 2005).

Despite the variation found between the study sites, the overall pattern was constant at all sites. The order of magnitude of accumulation at all sites was Fe > Zn > Cu > Pb > Cd. Although BB showed the highest levels of Fe, Cu and Zn in fine sediment, except for Zn that was accumulated in gill, the other metals were not accumulated by mussels from BB. FD was the site with the top rates of incorporation of Cu and Zn in gill. We measured the highest accumulation of Fe in digestive gland at IZ, UP as well as at FD. Maximum values of Cd were found in mussels transplanted to AC and UP, precisely where we registered the highest concentration of Cd in sediment. Under oxic conditions, Cd is a labile competitor in adsorption on metallic oxyhydroxides. Therefore it is probable that dissolved forms are predominant and bioavailable to be incorporated by the biota (Bewers et al., 1987). Considering that there is no industrial or mineral source in the proximities of AC and UP, Cd would be of natural origin. Apart from possible natural differences such as geochemical compositions of sediment, the observed site-specific concentration differences may be caused by anthropogenic sources. One possible source of metal, besides the natural one, constitutes the several metallurgic industrial and urban sewages that reach the coastal waters without treatment (Esteves and Amin, 2004). Metals could be transported from IZ southeast along the southern coast by the counter-clockwise current arriving to AC and UP.

There were no significant correlations between total metal concentrations in sediment and mussel tissue levels in this study, as it has been shown in other works (Hickey et al., 1995; Gundacker, 1999; Beiras et al., 2003). The absence of relationships between mussel tissue and sediment concentrations suggests that differences in bioavailability may be influenced markedly by local site conditions (Hickey et al., 1995). Sediments are known to act as 'traps' for pollutants and to reflect rather long-term contamination, whereas suspended matter and filtrate concentrations vary due to local metal emissions, quality and quantity of suspended materials, as well as physicochemical parameters (Salomons et al., 1995).

CAT has biological importance due to the fact that H₂O₂ is the main cellular precursor of the hydroxyl radical (HO[•]), which is a highly reactive and toxic form of ROS. The removal of H₂O₂ by this enzyme is an important strategy of marine organisms against oxidative stress (Regoli et al., 2002). The enhancement of the CAT

activity observed at all sites compared with reference site confirms the presence of an oxidative stress that may affect mussels throughout the Ushuaia Bay. The highest activity of CAT was measured in the digestive gland being the values similar at all stations within Ushuaia Bay. The higher response in digestive gland compared to that in gill and mantle tissues is in agreement with other studies on bivalves transplanted to coastal waters (De Luca-Abbott et al., 2005; Box et al., 2007). CAT activities measured in this work were higher than those reported by Giarratano and Amin, 2008 in mussels transplanted to the same sites within Ushuaia Bay but in summer season. The same seasonal differentiation was found in mussels *Perna viridis* (Lau et al., 2004) and in *Mytilus galloprovincialis* (Santovito et al., 2005). One possible explanation is that the water temperature is the lowest in winter and the solubility of oxygen increases. This condition implies a high probability of ROS formation in cells influencing the higher CAT activity (Santovito et al., 2005).

Several studies have evidenced that lipid peroxidation increases in tissues of different species of aquatic organisms, as a result of being exposed to environmental pollutants (Almeida et al., 2007). Lipid peroxidation corresponds to reactions in chain that can be induced by transition metals such as Cd, Cu, Fe and Pb in mussels (Almeida et al., 2004; Viarengo et al., 1990). During these reactions, various compounds are produced such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE), both able to bind to proteins and to form adducts. Indeed, these compounds react in a spontaneous way with cysteines of proteins and with glutathione (Manduzio et al., 2005). An increment in MDA concentration was found at all sites, being higher in gill and digestive gland than in mantle. Box et al. (2007) neither evidenced significant differences in MDA concentration between digestive gland and gill. We measured a progressive increment at IZ and FD, meanwhile a late and lower increment was registered at AC at week 4 of exposure. The depletion of MDA levels measured at week 4 of exposure in digestive gland at UP and at IZ could be related to the diminishment of Cu and Fe accumulated in the organ mentioned above in these two sites. The depletion of MDA levels could also be related to a faster transformation of MDA to other metabolites at UP and IZ rather than in the other three sites. Another possible explanation is that other antioxidant parameter than those measured in this study, such as the tripeptide GSH, could ensure protection and compensation for the above depletion (Santovito et al., 2005). Levels of MDA registered in this study are similar to those reported by Giarratano and Amin (2008) for summer season, who did not find a clear differentiation among tissues. There is an inverse correlation between MDA content and the activity of catalase suggesting its importance in protecting the cell from membrane damage. In fact an effective CAT control will end up with a low MDA level and vice versa (Lau and Wong, 2003). The enzyme efficiently prevented lipid peroxidation by neutralizing oxyradical leading to low TBARS concentration at AC and UP. However, in this study, correlation between MDA and CAT was not found.

Natural stress and stress related to pollution are often linked with reduced growth rates (Dame, 1996) and with changes in biochemical composition, specifically in fractions that involve changes in the cycle of accumulation and use of energy reserves (Smolders et al., 2004). Seasonal biochemical and energy storage cycles in marine bivalves are closely related to reproductive activity. Seasonal metabolic activity in molluscs results from complex interactions among food availability, environmental conditions and gametogenic cycle (Dridi et al., 2007). In this study, an increment in total lipid content was registered at all sites of Ushuaia Bay with respect to Brown Bay. Only in UP total lipid content kept constant with time, but increased along exposure time in the other sites. PCA results revealed that total

lipid content was directly related to nutrients. Additionally, although chlorophyll-*a* concentrations at all sites of Ushuaia Bay were relatively low, they were greater than the value measured at Brown Bay. Levels of nutrients in Ushuaia Bay were higher than in Brown Bay too. When present study was carried out in August, mussels would be starting gametogenesis (Gray et al., 1997). Probably lipid content would continue increasing until late spring (November–December) when mussels reach their phase of highest ripeness (Gray et al., 1997) likely associated to a superior availability of phytoplankton and warmer temperature. In the same sense, Lomovasky et al. (2004) found in clam *Eurhomalea exalbida*, also from Beagle Channel, the highest lipid content in September (spring) and January (summer). *E. exalbida* was characterized by an important spawning event in November, followed by a quick recovering in summer with the presence of ripe gonads in the rest of the year (Morriconi et al., 2002). In Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, lipids were also accumulated in gonads during the period of maximum ripeness (spring) and decrease in summer. During autumn, the increment of lipids appeared to be related to the available food in association with an increment in the chlorophyll-*a* concentrations (Dridi et al., 2007).

Mussels that experience a life period in urban influenced areas are exposed to a complex mixture of pollutants and they are forced to spend a great part of their energy budget in detoxification processes and maintain homeostasis to the detriment of body growth and gonad production (Pampanin et al., 2005). The condition index has been used as an estimation of the physiological condition in mussels (Smolders et al., 2004; Pampanin et al., 2005). It is a parameter strongly linked to the availability of food resources and the quality of the diet (Mourgaud et al., 2002). The low value of condition index is related to reproductive phase (mussels with empty gonads after the spawning) and/or to adverse environmental conditions like presence of pollutants, scarce food availability or changes in temperature (de Zwaan et al., 1995; Damiens et al., 2007). During the present work condition indexes of transplanted mussels were similar among stations, and compared to those belonging to the farm indicated similar water trophic conditions and reproductive phase. Perhaps the differences in the availability of nutrients found between Ushuaia Bay and Brown Bay are so small that cannot affect the condition index. It is also possible that a period of 4 weeks may not be enough time to appreciate an effect over the condition index of transplanted mussels.

Biological responses measured at stations IZ and FD were related with the proximity to discharge points of domestic and industrial sewages and contaminants (Esteves and Amin, 2004). Despite that AC and UP were considered to be relatively low contaminated sites due to the distance to local points of discharges from Ushuaia city, they also showed increments in the biochemical markers studied in concordance with previous researches made in the same area (Giarratano et al., 2006; Giarratano and Amin, 2008). This could be associated to the existing counter-clockwise water circulation within Ushuaia Bay (Balestrini et al., 1998) that could transport the urban and industrial sewages generated by Ushuaia city until far sites such as AC, UP or even farthest.

In this sense, the PCA proved an easy and useful tool to summarize the obtained results, also able to classify the sites indicating different physicochemical conditions on each study area. IZ and FD are located nearer to the urban influences and grouped together, while AC and UP are the most away sites from the city influence and constituted another group, both groups separated from the reference site.

5. Conclusions

As a whole, the biological and chemical results obtained by transplanting mussels from a reference site to coastal waters of

Ushuaia Bay suggest that transplanting can be a good strategy for biomonitoring environmental and urban effects in coastal zones.

An increment in CAT activity and MDA content at all studied sites in the period assayed confirm the use of these parameters as early warning biomarkers of oxidative stress, representing sensitive responses of the mussel antioxidant defense system. Our results suggest that antioxidant enzyme CAT, especially in digestive gland and mantle, and LPO levels in gill and in digestive gland may be considered as good markers of urban pollution, with a relatively short time response to environmental stressors, as suggested by the transplantation experiment.

We believe the progressive increment in total lipid content measured in our experiment represents mainly the reproductive phase of mussels before spawning and the improvement in available food supply of Ushuaia Bay. For a better understanding we suggest that studies in much longer period of time should be carried out in order to be able to distinguish physiological variations from natural and anthropogenic stress at least during a whole year.

Metal concentrations in tissue of *M. edulis chilensis* were not significantly correlated to sediment concentrations, at least for the studied areas. Mussels resulted poorly suitable as a heavy metal indicator tool in this short experiment, may be because the analysis of total metal concentrations without consideration of chemical speciation and specific bioavailability. Probably further investigations that include changes in the distribution of metals between the dissolved and particulate phases are crucial to understand the importance of waterborne and dietary exposure routes and their environmental relevance to metal accumulation by these filter-feeding invertebrates.

The whole set of data allowed to group the stations as a function of the chemical data and biochemical responses of transplanted mussels. These responses suggested the potential presence of different stressors.

Acknowledgments

This study was supported by GEF/PNUD ARG 02/018, ANPCyT PICTR 0090 and PICT06 1261 grants. We are grateful to Dr. N. Chiarello (IADO-CONICET) for analytical assistance for heavy metal determinations, Dr. Laura Comoglio for her comments, José M. Barbona for providing us mussels and Ricardo Saenz Samaniego for his technical support. We also wish to thank the two reviewers for their valuable comments that really improved this work.

References

- Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2004. Protective effects of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 386–392.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Melo Loureiro, A.P., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Machado Garcia, C.C., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 588–600.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7915–7922.
- Amin, O., Ferrer, L., Marcovecchio, J., 1996a. Heavy metal concentrations in littoral sediments from the Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 4, 219–231.
- Amin, O., Andrade, S., Marcovecchio, J., Comoglio, L., 1996b. Heavy metal concentrations in the mussel *Mytilus edulis chilensis* from the coast near Ushuaia city (Tierra del Fuego, Argentina). In: Marcovecchio, J.E. (Ed.), *Pollution Processes in Coastal Environments*. U.N.M.d.P, pp. 335–339 (Chapter V).
- Amin, O., Comoglio, L., Ferrer, L., Marcovecchio, J., 2000. Variación en la concentración de plomo, zinc y cadmio en el mejillón *Mytilus edulis* transplantado dentro de la Bahía de Ushuaia, Tierra del Fuego. *Proc. Jorn. Nac Cs. Mar.* 11–14 de Septiembre de 2000, Puerto Madryn, Chubut, Argentina, pp. 31.
- Amin, O., Ferrer, L., Barral, A., Marcovecchio, J., Pucci, A., 1997. Geochemical distribution of trace metals in marine sediments from Beagle Channel, in Argentina. *Proc. Int. Symp. Cold Region Dev.*, 333–336.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34, 151–162.
- Balestrini, C., Manzella, G., Lovrich, G.A., 1998. Simulación de corrientes en el canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. *Servicio Hidrografía Naval. Dto. Oceanog. Inf. Téc.* 98, 58.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47, 415–439.
- Beiras, R., Bellas, J., Fernández, N., Lorenzo, J.I., Cobelo-García, A., 2003. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula): metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo–larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Mar. Environ. Res.* 56, 531–553.
- Beutler, E., 1982. Catalase. In: Beutler, E. (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton Inc., pp. 105–106.
- Bewers, J.M., Barry, P.J., MacGregor, D.J., 1987. Distribution and cycling of cadmium in the environment. In: Nriagu J.O., Series Editor. Nriagu, J.O., Sprague, J.B. (Eds). *Cadmium in the aquatic environment* 1, 1–18. John Wiley & Sons Inc., New York. *Adv. Environ. Sci. Technol.* 19.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 531–539.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52, 302–310.
- Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C., Vasseur, P., 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-29-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Sci. Tot. Environ.* 322, 109–122.
- Cobelo-García, A., Prego, R., 2003. Heavy metal sedimentary record in a Galician Ria (NW Spain): background values and recent contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1253–1262.
- Cobelo-García, A., Labandeira, A., Prego, R., 2005. Dos casos opuestos en la acumulación de metales en el sedimento de una ría: Ferrol y Corme-Laxe (Galicia, NO Península Ibérica). *Cienc. Mar.* 31, 653–659.
- Commendatore, M., Gil, M., Harvey, M., Colombo, J.C., Esteves, J.L., 1996. Evaluación de la contaminación por hidrocarburos y metales en la zona costera patagónica. *Fundación Patagonia Natural. Inf. Téc.* 21, 47.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C., 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in methallothionein concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 690–702.
- Dame, R.F., 1996. Bivalves as components of ecosystem health. In the ecology of marine bivalves: an ecosystem approach, pp. 213–226. In: Dame, R.F. (Ed.), *CRC Marine Science Series*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 254.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., Salbert, V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere* 66, 574–583.
- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 694–707.
- Dezileau, L., Pizarro, C., Rubio, M.A., 2007. Sequential extraction of iron in marine sediments from the Chilean continental margin. *Mar. Geol.* 241, 111–116.
- de Zwaan, A., Cortesi, P., Cattani, O., 1995. Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. *Sci. Total Environ.* 171, 121–125.
- Dridi, S., Romdhane, M.S., Elcafsi, M., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263, 238–248.
- Dröge, W., 2003. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Eberlein, K., Kattner, G., 1987. Automatic method for the determination of orthophosphate and total dissolved phosphorous in the marine environment. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 326, 354–357.
- Esteves, J.L., Amin, O., 2004. Evaluación de la Contaminación Urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina (Provincia de Tierra del Fuego, Antártica e Islas del Atlántico Sud). Consolidación e Implementación del Plan de la Zona Costera Patagónica (PMZCP) –ARG/02/G31– GEF/PNUD, CD-ROM, pp. 64.
- Fisher, W., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defence measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–138.
- Fisher, N.S., Teysseie, J.L., Fowler, S.W., Wang, W.W., 1996. Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3232–3242.
- Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Time-course evaluation of ROS mediated toxicity

- in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar. Environ. Res.* 58, 609–613.
- Giarratano, E., Amin, O.A., 2008. Biomarcadores de estrés oxidativo del mejillón *Mytilus edulis* transplantado a Bahía Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina)". X Congreso Brasileiro de Ecotoxicología, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Giarratano, E., Gil, M., Comoglio, L.I., Amin, O.A., 2006. Respuesta bioquímica del mejillón *Mytilus edulis* chilensis transplantado a Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina". IX Congreso Brasileiro de Ecotoxicología, São Pedro, São Paulo, Brasil.
- Gil, M.N., Torres, A., Harvey, M., Esteves, J.L., 2006. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Rev. Biol. Mar. Ocean* 41 (2), 167–176.
- Grasshoff, K., 1983. In: *Methods of Seawater Analysis*. CEIME Verlag, New York.
- Gray, A.P., Seed, R., Richardson, C.A., 1997. Reproduction and growth of *Mytilus edulis chilensis* from the Falkland Islands. *Sci. Mar.* 61 (2), 39–48.
- Guerlet, E., Ledy, K., Giamberini, L., 2006. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix pepogra* (Gastropoda, Pulmonata). *Aquat. Toxicol.* 77, 19–32.
- Gundacker, C., 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. *Chemosphere* 38, 3339–3356.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley and Sons, pp. 319–368.
- Hickey, C.W., Ropera, D.S., Buckland, S.J., 1995. Metal concentrations of resident and transplanted freshwater mussels *Hyridella menziesi* (Unionacea: Hyriidae) and sediments in the Waikato River, New Zealand. *Sci. Total Environ.* 175, 163–177.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 30, 3–15.
- INDEC, 2005. In: *Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Estructura productiva*. Censo Nacional Económico.
- Irato, P., Santovito, G., Cassini, A., Piccinni, E., Albergoni, V., 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 476–484.
- Lau, P.S., Wong, H.L., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1563–1572.
- Lau, P.S., Wong, H.L., Garrigues, P., 2004. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *Cont. Shelf Res.* 24, 1969–1987.
- Lee, C.-L., Fang, M.-D., Hsieh, M.-T., 1998. Characterization and distribution of metals in surficial sediments in Southwestern Taiwan. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 464–471.
- Lomovasky, B.J., Malanga, G., Calvo, J., 2004. Seasonal changes in biochemical composition of the clam *Eurhomalea exalbida* (Bivalvia, Veneridae) from the Beagle Channel (Argentina). *J. Shellfish Shell. Res.* 23, 81–87.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Critical review. Environ. Sci. Technol.* 39 (7), 1921–1931.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Le Boulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2, 91–104.
- Marcovecchio, J., Moreno, V., Perez, A., 1988. Determination of some heavy metal baselines in the biota of Bahía Blanca, Argentina. *Sci. Tot. Environ.* 75, 181–190.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87, 206–210.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readmen, J.W., Leonard, D.R.P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552, 247–268.
- Morriconi, E., Lomovasky, B.J., Calvo, J., Brey, T., 2002. The reproductive cycle of *Eurhomalea exalbida* (Chemnitz, 1795) (Bivalvia: Veneridae) in Ushuaia Bay 154° 50' S), Beagle Channel (Argentina). *Invert. Reprod. Dev.* 42, 61–68.
- Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.Y., Amiard, J.C., 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7, 479–490.
- Mubiana, V.K., Vercauteren, K., Blust, R., 2006. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 144, 272–279.
- Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., García-Alonso, J., Medina, G., Býcego, M.C., 2004. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environ. Int.* 29, 1019–1028.
- Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* 77, 339–347.
- Pampanin, D.M., Volpato, E., Marangon, I., Nasci, C., 2005. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comp. Biochem. Physiol.* A 140, 41–52.
- Pellerin-Massicotte, J., 1997. Influence of elevated temperature and air exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Rech. Océanogr.* 22, 91–98.
- Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 48–63.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54, 419–423.
- Salomons, W., Forstner, U., Mader, P., 1995. In: *Heavy Metals. Problems and Solutions*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 412.
- Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol.* C 140, 321–329.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129, 99–112.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. In: *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bulletin 167 second ed. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, pp. 310.
- Sureda, A., Box, A., Enseñat, M., Alou, E., Tauler, P., Deudero, S., Pons, A., 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpernyne. *Comp. Biochem. Physiol.* C 144, 191–196.
- Technicon®, 1973. Silicates in water and seawater. *Industrial Method no. 186 – 72W/B*, pp. 2.
- Treguer, P., Le Corre, P., 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'Autoanalyzer II Technicon®), second ed., France, pp. 109.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189.
- Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., Silva, M.D., Randi, M.A.F., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Multi-biomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environ. Res.* 105, 350–363.
- Vázquez, N., 2005. Contaminación por metales pesados en organismos de la Bahía de San Antonio, Golfo San Matías, Patagonia Argentina. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, pp. 52.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* C 146, 281–300.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orenes, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* LAM. *Comp. Biochem. Physiol.* C 97, 37–42.
- Yeats, P., Gagné, F., Hellou, J., 2008. Body burden of contaminants and biological effects in mussels: an integrated approach. *Environ. Int.* 34, 254–264.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54, 176–186.