

# Caracterización ambiental de la zona interna de la Bahía de Montevideo (Río de la Plata) mediante variables físico-químicas y biomarcadores de genotoxicidad en peces

Mario Acosta Rius

Tesina de grado. Licenciatura en Ciencias Biológicas, profundización Ecología.

Orientadores

Dra. Silvia Villar<sup>1</sup>

Dr. Ernesto Brugnoli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Facultad de Ciencias, UDELAR*

<sup>2</sup> *Oceanografía y Ecología Marina-IECA, Facultad de Ciencias*

*Montevideo*

*2017*



A mis padres, por darme la oportunidad.



"Mucho de la pesca es físico y para nada relajante, pero sí cumple una necesidad emocional, porque la idea es estar completamente quieto en ese escenario fuera del tiempo". Jeremy Wade.

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	4
<b>1. INTRODUCCION</b>	5
<b>1.1 Estado ambiental de la zona costera uruguaya y zona de estudio</b>	5
<b>1.2 Bioindicadores</b>	8
<b>1.3 Biomarcadores</b>	10
<b>1.4 Ensayo de Micronúcleos</b>	11
<b>1.5 Antecedentes en estudios con biomarcadores de daño genético en la zona costera Uruguay</b>	13
<b>1.6 Bioindicadores utilizados en este estudio</b>	13
<b>Hipótesis de trabajo</b>	15
<b>Objetivos</b>	
<b>Objetivos general</b>	15
<b>Objetivo específicos</b>	15
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	16
<b>2.1 Área de estudio</b>	16
<b>2.2 Colecta de muestras en el campo</b>	16
<b>2.3 Análisis de Laboratorio</b>	18
<b>3. RESULTADOS</b>	20
<b>3.1 Variables Ambientales</b>	20
<b>3.2 Metales pesados</b>	21
<b>3.3 Coliformes fecales</b>	26
<b>3.4 Ictiofauna</b>	27
<b>3.5 Test de Micronúcleos</b>	27
<b>4. DISCUSION</b>	31
<b>5 .CONSIDERACIONES FINALES</b>	37
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	38
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	39
<b>8. AGRADECIMIENTOS</b>	40
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	41
<b>ANEXO</b>	53

## RESUMEN

La contaminación de los ecosistemas acuáticos cercanos a zonas urbanas puede provocar la pérdida de biodiversidad y afectar la abundancia de las especies. En la actualidad, existen marcadores de alerta temprana que detectan efectos a niveles celulares y subcelulares, pudiendo monitorear poblaciones o ecosistemas y mitigar los impactos de la actividad humana en etapas previas a la alteración de las comunidades. El ensayo o test de Micronúcleos (MN) permite detectar alteraciones genéticas y celulares causadas por contaminantes químicos, físicos y biológicos, provocando errores en la segregación de los cromosomas o la ruptura de ellos durante la división celular, generando pérdida de material genético en células somáticas o germinales. El objetivo del presente trabajo fue analizar el estado ambiental de la zona interior de la Bahía de Montevideo (Río de la Plata) utilizando parámetros físico-químicos de la columna de agua y sedimentos, y organismos biomonitores o centinelas (*Brevoortia aurea* y *Cyprinus carpio*). La Bahía de Montevideo es un ecosistema altamente comprometido por diferentes actividades antrópicas (actividad portuaria, vertidos de efluentes urbanos e industriales, receptor final de arroyos altamente impactados). Se utilizaron redes de enmalle durante 12 horas para recolectar los peces y realizar la extracción de sangre, paralelamente se midieron parámetros físico-químicos y se obtuvieron muestras de agua y sedimento para su posterior análisis. Los resultados mostraron que *B. aurea* y *C. carpio* presentaron diferencias significativas en los niveles de daño genético y celular en la zona de estudio respecto a los controles. *Brevoortia aurea* exhibió mayor daño genético en la temporada de verano respecto a primavera, concordante con aumentos en los niveles de fósforo y presencia de floraciones algales en el sitio de estudio. Los resultados obtenidos constituyen el primer estudio de calidad ambiental, a través de bioindicadores genéticos en peces para la Bahía de Montevideo, generando una línea de base para futuras investigaciones.

**Palabras clave:** Micronúcleos, daño genético, bioindicadores, contaminación acuática.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas estuariales son sistemas complejos, con una marcada heterogeneidad ambiental producto del encuentro de masas de aguas continentales y marinas; presentan una alta productividad, un alto grado de estrés ambiental (debido principalmente al pronunciado gradiente de salinidad) y una diversidad baja, donde la riqueza y la abundancia de especies pueden ser influidas por la latitud, la diversidad de hábitats, el tamaño y la configuración del estuario (Pease, 1999; Hillebrand, 2004; Ley, 2005; Harrison & Whitfield, 2008; Nicolas *et al.*, 2010).

Los estuarios son importantes áreas de cría de especies de peces, principalmente de origen marino (Potter *et al.* 1990; McLusky & Elliott, 2004). Estos sistemas brindan beneficios como mayor temperatura de las aguas adyacentes, crecimiento más acelerado (Wasserman & Strydom, 2011), alta disponibilidad de nutrientes (Potter & Hyndes, 1999; Little, 2000) y refugio contra grandes predadores marinos que se encuentran en menor abundancia por ser áreas estresantes y donde la turbiedad no permite el encuentro entre predadores visuales y larvas (Lalli & Parsons, 1997; Meager *et al.* 2005; Shoup & Wahl, 2009). El incremento de las actividades productivas como la agricultura, las descargas de efluentes industriales y domésticos entre otras, alteran las condiciones fisicoquímicas y biológicas de estos sistemas provocando que la calidad del agua se deteriore, disminuyendo los beneficios que los estuarios brindan a la biota (Nichols, *et al.*, 1986; Perissinotto *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

### *1.1 Estado ambiental de la zona costera uruguaya y zona de estudio*

La integridad ecológica de diversos estuarios y sistemas costeros se encuentra afectada por las actividades relacionadas con el crecimiento de la población humana y el uso del suelo (Muniz *et al.*, 2005; Nigro *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2012). Los compuestos tóxicos, de origen natural y antrópico, dentro de los cuales se cuentan los metales pesados, hidrocarburos, contaminantes orgánicos persistentes y nutrientes afectan a los ecosistemas naturales generando efectos biológicos y/o químicos (Anzecc & Armcanz 2000, Muniz *et al.* 2006, Smith *et al.* 2006; Brugnoli *et al.* 2007, Muniz *et al.* 2011).

Las fuentes de contaminación pueden clasificarse en puntuales y difusas. Las puntuales son aquellas donde los contaminantes ingresan de forma directa, como efluentes industriales y urbanos. Las difusas, provenientes del escurrimiento superficial son más difíciles de identificar y controlar, y se vinculan por ejemplo con la actividad agrícola (Smol, 2007). El ambiente cumple funciones de filtración, descomposición, neutralización o almacenamiento de ciertos contaminantes, disminuyendo en cierto grado, la disponibilidad de los mismos en el medio. La sinergia de contaminantes provenientes de múltiples fuentes puede provocar asociaciones deletéreas, como la adsorción de diferentes metales pesados a partículas de sedimento que frente a cambios en ciertos parámetros físico-químicos rápidamente se vuelven biodisponibles (Newman & Clements, 2008).

En ambientes costeros y estuarinos los contaminantes ingresan a través de la descarga de efluentes urbanos e industriales, del aporte de ríos, de la deposición y precipitación atmosférica, del tráfico marítimo o del escurrimiento urbano y agrícola (Muniz *et al*, 2006). Esto enriquece los nutrientes del ecosistema, los que llegan a niveles más altos de los permitidos por la normativa vigente, generando eutrofización que tiene diferentes efectos ecológicos y toxicológicos, directa o indirectamente relacionados con la proliferación de los productores primarios (Spiro & Stigliani, 2005). Un ecosistema o ambiente eutrofizado es aquel caracterizado por una abundancia anormalmente alta de nutrientes; tradicionalmente el fósforo (P) ha sido el principal nutriente limitante para el crecimiento de las algas en los ecosistemas acuáticos, pero en la actualidad existe evidencia de que el nitrógeno (N) también puede actuar como nutriente limitante (Spiro & Stigliani, 2005).

El nitrógeno generalmente es identificado como el principal nutriente limitante, sin embargo cuando existe una entrada significativa de nitrógeno al sistema, el fósforo puede transformarse en el nutriente limitante. Otros elementos químicos, como el silicio (Si) y el hierro (Fe) también pueden incidir en el crecimiento y abundancia de las algas pero con menor relevancia que el N y P (Camargo & Alonso, 2007). Los eventos de floraciones algales en zonas estuarinas se han incrementado en los últimos años y las consecuencias de la producción de cianotoxinas sobre la biota es una preocupación permanente de los organismos reguladores (Belardi, 2008). En diversas áreas tales como el Mar Báltico, Mar del Norte, Mar Adriático, costas de Japón y Golfo de México, estas floraciones algales se han convertido en un fenómeno constante. Las floraciones algales nocivas (FAN) están

consideradas en la actualidad como uno de los mayores riesgos a los que tienen que hacer frente las zonas costeras a nivel mundial (FREPLATA, 2005).

La Bahía de Montevideo se encuentra en la costa este y zona media del Río de la Plata, presentando diversos impactos antrópicos similares a otras zonas costeras (Muniz *et al.*, 2000; 2002; 2004a, b; 2005a, b). Esta zona se destaca como una de las más impactadas del Río de la Plata debido a su conformación semicerrada y al efecto de diversos factores antrópicos (Viana, 2001). Un alto porcentaje de las industrias descargan sus efluentes en arroyos que reciben importantes cargas de metales pesados y desembocan en la Bahía de Montevideo (Muniz *et al.*, 2002; Burone *et al.*, 2005; Muniz & Venturini, 2005). Además, en ésta se encuentra la central termoeléctrica Batlle (UTE), la refinería de ANCAP (Asociación Nacional de Combustibles Alcohol y Portland), y el Puerto de Montevideo. La zona de la Bahía recibe efluentes municipales (ya sean vertidos no tratados o con tratamiento primario) del 50% de la población del país aproximadamente. Cabe destacar que los efluentes municipales con tratamiento primario o sin tratar son vertidos en la costa de Montevideo en la zona de Punta Carretas mediante un emisario submarino y en la Bahía de Montevideo, también recibe el aporte de los arroyos Pantanoso y Miguelete (Muniz *et al.*, 2004 b).

Los hidrocarburos, metales pesados y otro tipo de contaminantes derivados de las actividades industriales antes descriptas producen perturbaciones en el ecosistema bentónico afectando la biota (Venturini *et al.*, 2004). Se constató que la porción interna de la Bahía de Montevideo presenta una carga orgánica elevada y con altas concentraciones de cromo, plomo e hidrocarburos derivados del petróleo, mientras que la porción externa y la zona costera adyacente a este sistema muestran un nivel de contaminación moderado (Muniz *et al.*, 2004a; Venturini *et al.*, 2004; Brugnoli *et al.*, 2007).

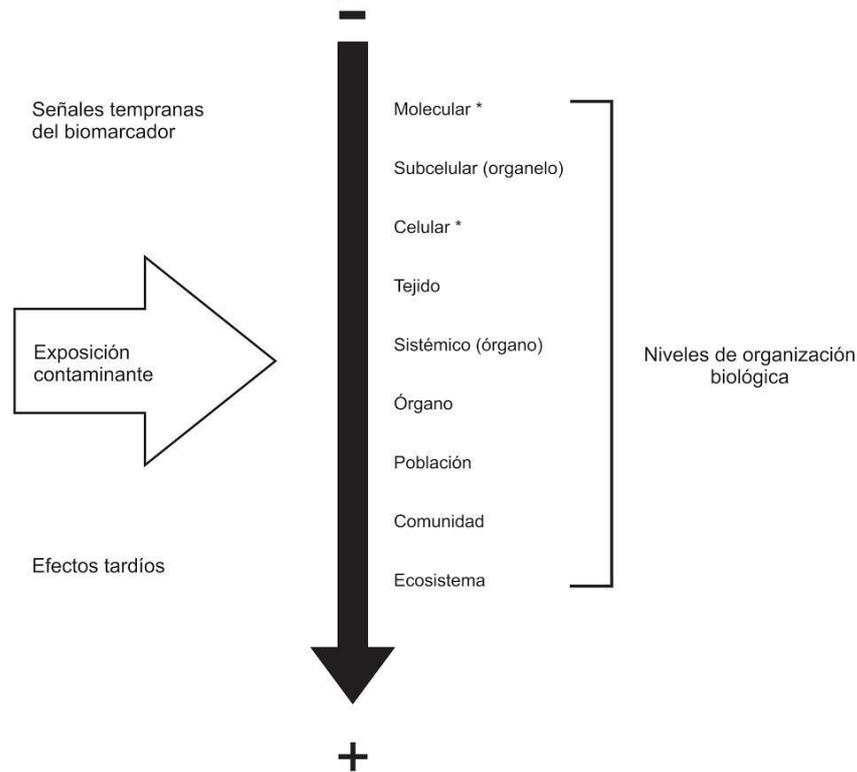
La Bahía y zona costeras adyacentes del departamento de Montevideo exhiben una gran variedad de usos; recreación (playas, clubes de remo), pesca artesanal o deportiva y actividad portuaria (Puerto de Montevideo y Puerto del Buceo).

El uso de diferentes índices biológicos (bentónicos) mostraron que la calidad ambiental en la Bahía de Montevideo es de pobre a moderada (Hutton *et al.*, 2015). La presencia de metales pesados en organismos como los peces (*Micropogonias furnieri* y *Mugil platanus*) en la Bahía y en zonas costeras cercanas revelan que la actividad antrópica (industrias,

actividad portuaria, ganadera y agrícola) contribuye al deterioro ambiental del sistema acuático afectando a los organismos que allí residen tanto en forma permanente como temporal (Corrales *et al.*, 2016). No existen antecedentes en cuanto a la riqueza y abundancia de la fauna ictícola en la zona interna de la Bahía, excepto el de Norbis *et al.* (2009) donde se describen las siguientes especies: *Brevoortia aurea*, *Cyprinus carpio*, *Micropogonias furnieri*, *Mugil platanus*, *Pimelodus maculatus*, *Pogonias cromis*, *Odontesthes argentinensis*, *Odonthestes bonariensis* en el reservorio de agua anexo, para la refrigeración de procesos industriales de la refinería de ANCAP.

## 1.2. Bioindicadores

Los indicadores biológicos llamados bioindicadores ambientales u organismos centinelas reflejan el impacto de contaminantes específicos o mezclas de ellos sobre su fisiología y además permiten detectar procesos de bioacumulación en sus tejidos, a través de una serie de respuestas moduladas e integrables, las cuales permiten obtener información sobre el bienestar del individuo, de la población y de la comunidad (Figura 1) (Leonzio, 2002; Monserrat *et al.*, 2007; Obiakor *et al.*, 2012). Son organismos que proporcionan información sobre la calidad del medioambiente o de una parte del mismo, a partir del uso de marcadores específicos (de daño genético, celular, inmunológicos, neurotransmisores, fisiológicos, etc.), que se analizan en el contexto de la incidencia de variables físico químicas naturales, de origen antrópico o de ambas (Leonzio, 2002; Mudry & Carballo, 2006; Monserrat *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Representación esquemática de la secuencia de respuestas a los contaminantes en un sistema biológico

Diversos organismos han sido utilizados como centinelas en ambientes acuáticos o terrestres: anélidos, esponjas, bivalvos, moluscos, peces y mamíferos (Mudry & Carballo, 2006). La elección de las especies bioindicadoras dependerá de las características biológicas de los organismos, su ecología y tipo de contaminación presente en el ambiente a analizar. Si los contaminantes predominan en la columna de agua, están asociados al sedimento u ocupan ambas matrices del ecosistema acuático, se deberían considerar aquellas especies que presenten mayor uso de esos hábitats (Torres-Bugarin *et al.*, 2010). Los peces son utilizados como bioindicadores de la calidad de este ecosistema ya que ocupan diferentes niveles de la cadena trófica, bioacumulan sustancias nocivas y son susceptibles a bajas concentraciones de agentes tóxicos (Missini *et al.*, 1996; Gustavino *et al.*, 2001).

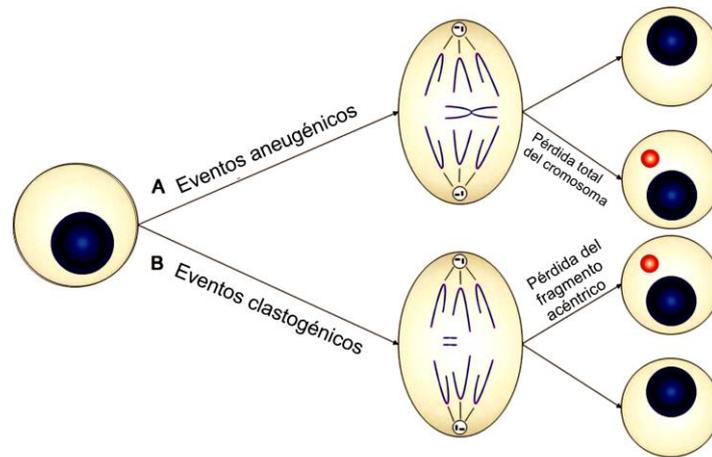
La composición química de los contaminantes así como la capacidad de los peces para absorberlos, ingerirlos y metabolizarlos serán importantes para establecer el posible efecto de estos sobre el organismo (Buchwalter *et al.*, 2003; Flores-Kehn *et al.*, 2008). Consecuentemente, ciertas especies que se encuentran en niveles tróficos superiores,

como algunos peces carnívoros, pueden presentar mayores concentraciones de contaminantes en su organismo y por lo tanto serán más *susceptibles* que otros que se encuentran en niveles inferiores en la cadena trófica (Lee & Steinert, 2003; Porto *et al.*, 2005).

El uso de la respuesta biológica al estrés (biomarcador) en especies centinela se ha convertido en una herramienta de alerta temprana utilizada ampliamente en la evaluación de la calidad ambiental y la evaluación de riesgos ecosistémicos (Nigro *et al.*, 2006).

### 1.3. Biomarcadores

Entre los numerosos biomarcadores ecotoxicológicos propuestos en las últimas tres décadas, se destacan aquellos que se basan en las respuestas a nivel molecular y celular (Collins, 2004). Estos biomarcadores representan las señales más tempranas de perturbación del medio ambiente y se utilizan comúnmente para establecer planes de biomonitorio (Collins, 2004). Dentro de los mismos resaltan el ensayo de electroforesis en células individuales (ensayo cometa) y el test de micronúcleos entre otros (Matheus & Bolaños, 2014). Los micronúcleos (MN) son indicadores de daño cromosómico; se originan durante la división celular, y están formados por fragmentos acéntricos o por cromosomas completos que no se incorporan en las células hijas. Esto se debe a la ocurrencia de eventos clastogénicos (pérdida de un fragmento cromosómico acéntrico) o aneugénicos (pérdida de cromosomas completos) ocurridos en algún momento del ciclo celular. Estas mutaciones son provocadas por la acción de agentes genotóxicos o que alteran la formación y normal funcionamiento del huso mitótico, fallando la segregación cromosómica y generando uno o varios MN por célula (Schmid, 1975; Fenech, 2000; Mudry & Abrevaya, 2006; Souza & Fontanelli, 2006; Ghisi *et al.*, 2011; Obiakor *et al.*, 2012) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de eventos aneugénicos (A) y clastogénico (B) durante la división celular. Se representan las células hijas normales y las que contienen MN representadas en rojo (Modificado de Terradas *et al.*, 2010).

#### 1.4 Ensayo de micronúcleos

El micronúcleo (MN) constituye una pequeña masa nuclear delimitada por membrana y separado del núcleo principal. Los MNs se forman durante la telofase de la mitosis o la meiosis cuando la envoltura nuclear se reconstituyó alrededor de los cromosomas de las células hijas. Son el resultado de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros acéntricos que no se incluyeron en el núcleo principal. Por lo tanto, el MN es la pérdida de la cromatina a consecuencia del daño cromosómico (fragmento) o afectación del aparato mitótico (Ribeiro *et al.*, 2003).

El ensayo de micronúcleos fue desarrollado en sus orígenes en mamíferos; se ha utilizado ampliamente para evaluar el riesgo genotóxico de un gran número de agentes químicos incluido los seres humanos. A diferencia de otros organismos, los peces son sensibles a concentraciones relativamente bajas de contaminantes con efectos mutagénicos y por lo tanto, se consideran excelentes bioindicadores ambientales (Da Rocha *et al.*, 2009).

El ensayo de MN representa una herramienta apropiada para monitorear zonas donde se sospecha la existencia de eventos de contaminación crónica, ya analizar muestras colectadas en diferentes sitios, sin necesidad de sacrificar a los organismos ya que basta con un volumen de sangre de microlitros extraído de la vena caudal para efectuarlo (Montserrat *et al.*, 2007; Bolognesi & Hayashi, 2011). Es una técnica validada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA o USEPA). Es un marcador de

efecto subletal de los contaminantes que permite establecer medidas tempranas de manejo y prevención (Obiakor *et al.*, 2012).

Los MN pueden ser detectados en forma sencilla en microscopio de fluorescencia. Para observarlo, el ADN es teñido con sustancias que permiten diferenciar el material genético del resto de las estructuras celulares (Ghisi *et al.*, 2011; Obiakor *et al.*, 2012). La ventaja de esta técnica es que provee índices cuantificables de daño genético, de manera rápida y relativamente sencilla. Debido a que el conteo al microscopio de un alto número de células como requiere el ensayo (>1000) genera un enorme esfuerzo de observación y precisión, se han desarrollado programas de análisis de imágenes, de conteo de MN y se siguen los protocolos estandarizados y validados a nivel internacional por organismos como la EPA. Otro de los aspectos que debe considerarse cuando se realiza el test de MN, es el efecto que los diferentes procedimientos de tinción tienen sobre este ensayo. La tinción más utilizada es el Giemsa, un colorante no específico que de acuerdo a Casartelli *et al.* (1997), genera falsos positivos. Nersesyan *et al.* (2006) recomiendan el uso de tinciones específicas para ácidos nucleicos como el ioduro de propidio (IP), el DAPI y otros fluorocromos de amplia utilización en biología molecular y celular.

El aumento en los vertidos de efluentes industriales y domésticos, en ambientes acuáticos (mayormente por el crecimiento poblacional) provoca la exposición de los organismos a una concentración elevada de agentes genotóxicos. Como principales agentes genotóxicos destacan los metales pesados y contaminantes orgánicos persistentes (COPs) tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) los cuales tienen severos efectos ambientales, dada su gran movilidad ambiental, generando efectos mutagénicos detectables a través del biomarcador seleccionado (Guecheva *et al.*, 2001; Arkhipchuk & Garanko, 2005)

El ensayo de MN aplicado al biomonitoreo de contaminantes resulta ser una importante herramienta en estudios de mutagénesis ambiental (Koppe, 2002). Dado el alto costo de muchos análisis físico-químicos, que muchas veces resultan insuficientes para explicar los efectos macroscópicos individuales, o los cambios en las poblaciones y comunidades, los marcadores moleculares de daño resultan en la actualidad, de gran relevancia por evidenciar efectos inmediatos a cambios ambientales a niveles subletales, microscópicos y tempranos. En la mayoría de los casos, los tóxicos no pueden ser detectados en las diferentes matrices (suelo, agua, sedimentos) ambientales, sin embargo, sus efectos

pueden medirse en los organismos (Mudry & Carballo, 2006). Por este motivo, el ensayo de MN se ha utilizado ampliamente en organismos acuáticos tales como moluscos bivalvos (*Mytilus galloprovincialis*), (*Crassostrea gigas* y *Chamelea galina*), en anfibios (*Rana perezii*), peces como la trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*), Salmoniformes (*Umbra pigmaea*), carpas (*Cyprinus carpio*), (*Carassius auratusgibelio*) o tilapias (*Oreochromis mossambica*) (Hooftman & Raat, 1982; Hose *et al.*, 1987; Metcalfe, 1988; Brunetti, *et al.*, 1988; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Vernier *et al.*, 1997; Koppe, 2002 ; García, 2009; Okonkwo *et al.*, 2011).

### 1.5 Antecedentes en estudios con biomarcadores de daño genético en la zona costera Uruguaya

La degradación ambiental y su impacto en la salud ecosistémica afectan en forma creciente a las especies que se encuentran en zonas costeras y estuariales. Los antecedentes para el ensayo de MN en peces para dichas zonas son escasos. Estudios realizados en invertebrados marinos, específicamente en moluscos como el gasterópodo - *Heleobia cf australis* y bivalvo *Erodona mactroides*, revelaron que la calidad ambiental de la Bahía de Montevideo se encuentra comprometida (Villar *et al.*, 2015) utilizando biomarcadores de daño genético agudo (ensayo de electroforesis en células individuales).

En peces, destacan los trabajos de Gutiérrez *et al.* (2015), donde se evaluó el nivel de daño genético de cuatro especies: *Micropogonias furnieri*, *Paralichthys orbignyanus*, *Mugil platanus* y *Odontesthes argentinensis*, en tres subestuarios (Pando, Solís Chico y Solís Grande) del Río de la Plata. Los autores encontraron mayor degradación ambiental en el Arroyo Pando que en el resto de los subestuarios, vinculada a un mayor impacto de actividades antropogénicas. Se identifica la ausencia de trabajos basados en biomarcadores de daño genético crónico (ensayo de MN) en peces asociados a la degradación ambiental de la Bahía y zonas adyacentes.

### 1.6 Bioindicadores utilizados en este estudio

Para el presente estudio se consideraron las especies *Brevoortia aurea* y *Cyprinus carpio* de las cuales a continuación se destacan las siguientes características.

### ***Brevoortia aurea*** (Lacha)

Especie perteneciente a la familia Clupeidae que habita de manera exclusiva en las aguas costeras de América del Sur. Su período de reproducción se extiende entre fines de octubre a fines de diciembre con pequeñas puestas parciales durante esta temporada. Existen evidencias de áreas de cría dentro de las lagunas costeras tanto en Argentina, Brasil y Uruguay (Cousseau & Perrota, 2000; Acuña *et al.*, 2016). Es un pez planctófago, cuya dieta se basa en diatomeas, dinoflagelados, copépodos y gran contenido de detrito (Stebniki, 2014). El aparato digestivo corresponde a un filtrador típico: en las tallas medianas diatomeas y dinoflagelados son el alimento dominante, en tanto que en las mayores aparecen en abundancia los copépodos. Estudios de crecimiento han establecido la existencia de edades entre 0 y 11 años, correspondientes a tallas entre 3 y 41 cm. Se consideran juveniles a los ejemplares con edades entre 0 y 2 años (Cousseau & Perrota, 2000) (Anexo, Figura 1).

### ***Cyprinus carpio*** (Carpa)

*Cyprinus carpio* es una especie de gran tamaño que supera los 100 cm de largo total y 40 kg de peso. Debido al gran interés para la acuicultura ha sido introducida en gran parte del mundo donde se volvió un invasor biológico con gran éxito (Teixeira de Mello *et al.*, 2011), siendo una especie resistente a una gran variedad de condiciones ambientales (Serra *et al.*, 2014). En Uruguay, habita las cuencas del Río de la Plata y Río Santa Lucía, pero actualmente se encuentra en gran parte del país, reportándose para la Laguna de Rocha (Fabiano *et al.*, 2011). Es un organismo omnívoro; se alimenta tanto de invertebrados del fondo como de material vegetal. Se reproduce en aguas someras de poca corriente y altas temperaturas con gran densidad de plantas, lo que asegura alta supervivencia a las larvas (Teixeira de Mello *et al.*, 2011). Existen reportes los cuales muestran que esta especie tiene una longevidad cercana a los 38 años (Froese & Pauly, 2016) (Anexo, Figura 1).

## **Hipótesis de trabajo**

El nivel de daño genético en dos especies de peces determinado por el test de MN será mayor en la Bahía de Montevideo (zona Central termoeléctrica José Batlle y Ordoñez) respecto a los sitios control (Laguna de Rocha y animales obtenidos en condiciones de laboratorio en el Instituto de Investigaciones Pesqueras), revelando la presencia de agentes mutagénicos.

## **Objetivo general**

Evaluar el estado ambiental de la Bahía de Montevideo (zona Central termoeléctrica José Batlle y Ordoñez), considerando parámetros ambientales (agua y sedimento) y el uso de biomonitores (daño celular y genético en *Brevoortia aurea* y *Cyprinus carpio*).

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar la zona de estudio a través del uso de variables físico-químicas (fósforo total, nitrógeno total, metales pesados) en sedimento y clorofila a y coliformes fecales en agua colectadas en la zona Central termoeléctrica José Batlle y Ordoñez, durante primavera y verano para evaluar su posible impacto sobre los bioindicadores.
2. Comparar la frecuencia de MN, analizar y cuantificar el daño celular y genético en *B. aurea* y *C. carpio* capturados en la Bahía de Montevideo (zona Central termoeléctrica José Batlle y Ordoñez) y compararlos con los controles para evidenciar alteraciones genéticas provocadas por deterioro ambiental de origen urbano e industrial.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Área de estudio

El Río de la Plata ( $35^{\circ}00' - 35^{\circ}10' \text{ S}$  and  $55^{\circ}00' - 58^{\circ}10' \text{ W}$ ) es un estuario ubicado sobre la costa este de Sudamérica, cubriendo un área de  $38.800 \text{ km}^2$  y drena una cuenca de  $3.170.000 \text{ km}^2$ , lo que la convierte en la segunda mayor cuenca fluvial de América del Sur. La Bahía de Montevideo se ubica en la zona media del Río de la Plata. Presenta un área de aprox. 1200 hectáreas y su profundidad oscila entre 0.5 y 3,5 m, con excepción de zonas de dragado alcanzando los 10 m en los canales de acceso al Puerto de Montevideo y Terminal ANCAP. Debido a su orientación y por ser un sistema semi-cerrado, presenta una variación de salinidad temporal, producto de la influencia de los caudales fluviales de los arroyos Miguelete y Pantanoso, la circulación y la rotación de los vientos. Estas características inciden de manera directa en la distribución de los recursos hidrobiológicos presentes en la Bahía (Norbis *et al*, 2009). En la figura 3 se indica la zona de estudio y el punto (B2) de colecta de las muestras.

### 2.2 Colecta de muestras en el campo

La colecta de peces se realizó durante noviembre 2014 (primavera) y marzo (verano) de 2015. Se colocaron redes de enmalle de 4 cm, 7 cm, 10 cm y 12 cm (distancia entre nudos) por triplicado en la zona interna de la Bahía de Montevideo, frente a la Central termoeléctrica José Batlle y Ordoñez (Figura 3). La primera red de enmalle se caló a 30 m de la costa y las restantes a 50 m de la anterior, logrando cubrir una distancia de 130 m de largo aproximadamente. El calado se realizó en las últimas horas de la tarde y se recogieron en las primeras horas de la mañana (tiempo total de enmalle 12 horas).



**Figura 3.** Área de estudio y sitio de muestreo en el punto B2 (flecha roja). Detalle en fotografía extraída de Google Earth™.

Mediante un multiparámetro YSI pro Plus™ se determinó en superficie, la temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto *in situ*, en la zona de muestreo. Adicionalmente, se colectó agua superficial para la determinación de clorofila *a* y una muestra compuesta para la determinación del número de colonias de coliformes fecales.

Se colectó sedimento mediante una draga van Veen de 0.05 m<sup>2</sup> en el sitio de muestreo para análisis de fósforo total, nitrógeno total y metales pesados.

Las muestras de agua y sedimento se refrigeraron (4°C) para su posterior traslado y procesamiento en el laboratorio de Oceanografía y Ecología Marina (Facultad de Ciencias).

Durante el desenmalle, los peces vivos se colocaron en recipientes de 20 L con agua del lugar, se extrajo sangre periférica de la zona próxima a la aleta caudal, con jeringa heparinizada.

Como controles negativos, para los análisis genéticos, se utilizaron muestras de individuos de las especies *Brevoortia aurea* colectados en la Laguna de Rocha durante el mes de Julio mediante redes de enmalle. La Laguna de Rocha se destaca como un sistema costero con diversos usos del suelo, actividad urbanística y turística, sin embargo, es un sistema poco eutrofizado (Rodríguez-Gallego, 2011). Los individuos pertenecientes a *Cyprinus carpio* fueron facilitados por personal del Centro de Investigaciones Pesqueras (IIP), Facultad de Veterinaria (UdelaR), criados en condiciones controladas de laboratorio. La identificación taxonómica de los ejemplares colectados y utilizados para el test de MN, fue realizada en el campo a nivel específico (Ringuelet *et al.*, 1967; Menni *et al.*, 1984; Figueredo & Menezes, 2000; Dyer *et al.*, 2006), paralelamente, se determinó largo total mediante un ictiómetro ( $\pm 1$  mm) y peso total en una balanza ( $\pm 0.01$  g). Los organismos no fueron sacrificados.

## 2.3 Análisis de Laboratorio

### 2.3.1 Nutrientes en sedimento

La determinación de nutrientes Nitrógeno Total (NT) y Fósforo Total (PT) se realizó de acuerdo con Monteiro *et al.* (2003) y APHA (2005), con digestión previa según Valderrama (1981). Las fracciones de N y P se oxidaron conjuntamente en medio ácido y alcalino respectivamente, donde las formas nitrogenadas y fosforadas se hidrolizan a nitratos y fosfatos respectivamente; se realizaron métodos colorimétricos y se cuantificaron mediante un espectrofotómetro ThermoScientific Evolution 60S. Los resultados de nitrógeno y fósforo total se expresan en  $\mu\text{g/g}$ .

### 2.3.2 Clorofila

Las muestras para determinar el contenido clorofila a se filtraron utilizando filtros GF/C, la extracción de pigmentos se realizó con acetona 90% y la biomasa se cuantificó mediante análisis espectrofotométricos; los resultados se expresan en  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para el cálculo de clorofila a en agua, se utilizó la fórmula de Jeffrey & Humphrey (1975) y feopigmentos de acuerdo a Strickland & Parsons (1972).

### 2.3.3 Metales pesados

La presencia de metales pesados en las muestras de sedimento, se analizaron mediante sonda de espectroscopía de energía dispersiva (ThermoNoran™) acoplada a microscopio electrónico de barrido (JEOL 5900 LV). Los análisis se realizaron utilizando electrones retrodispersados a 20 keV en la modalidad Point and Shoot del EDS. Además se obtuvieron tablas con análisis semicuantitativos en % de átomos de los metales hallados.

### 2.3.4 Coliformes fecales

En una placa Petrifilm 3M™ (6404/6414/6444) se colocó con una jeringa estéril 1 mL de muestra compuesta obtenida en campo, considerando tres réplicas. Paralelamente se sembró 1 mL de agua destilada por duplicado como control negativo. Las placas se incubaron en estufa a 44°C, de acuerdo al método NNMKL (método 147.1993) (3m [www.3m.com/microbiology](http://www.3m.com/microbiology)) para detección y cuantificación de coliformes fecales. Se consideraron válidas para conteo aquellas placas que no superaron las 300 UFC (unidades formadoras de colonias).

Se realizó una revisión bibliográfica en la Intendencia de Montevideo (IM) colectando datos de presencia de coliformes fecales para el monitoreo de calidad de agua entre 2009 y 2015 para la zona de estudio.

### 2.3.5 Test de micronúcleos

Con la sangre colectada de cada ejemplar, se realizaron extendidos *in situ* por duplicado, que permanecieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado. Posteriormente se fijaron durante 10 minutos con metanol absoluto. Se tiñeron con bromuro de etidio (BET) o naranja de acridina (AO por sus siglas en inglés). Se observaron 2000 células (1000 por réplica) en microscopio de epifluorescencia Olympus BX 41™, con cámara Proevolution™, con filtro para AO y BET, por ser el método estandarizado para este ensayo (Zhu *et al.*, 2005). Los frotis se analizaron utilizando los programas Image Pro Plus™ e Infinity Capture™. Se determinó presencia de micronúcleos y número de micronúcleos por célula, considerando a un micronúcleo como tal si tiene forma redondeada, no está unido al núcleo principal del eritrocito y tiene diámetro entre 1/16 y

1/3 del núcleo principal. Adicionalmente, se registraron anomalías nucleares como núcleos lobados.

### 2.3.6 Análisis de datos

Los datos genéticos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Statistica™ para testar normalidad y homocedasticidad. Dado que las muestras no resultaron homocedásticas ni se ajustaron a la curva normal, se utilizó estadística no paramétrica (ensayo de Kruskal Wallis,  $p \leq 0.05$ ; utilizado para comparar de más de dos variables), Mann Whitney U;  $p \leq 0.05$ ; utilizado para comparar dos variables). Se realizó una transformación logarítmica de los valores absolutos de MN y NL. Se utilizó estadística descriptiva para graficar los datos (gráficos de barras) (Zar, 1999).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Variables Ambientales

La temperatura superficial del agua fue de 21,8 °C en primavera; en verano el valor registrado fue de 26,1°C. La salinidad fue superior en verano respecto de primavera y se registraron valores de oxígeno disuelto superiores en verano (Tabla 1).

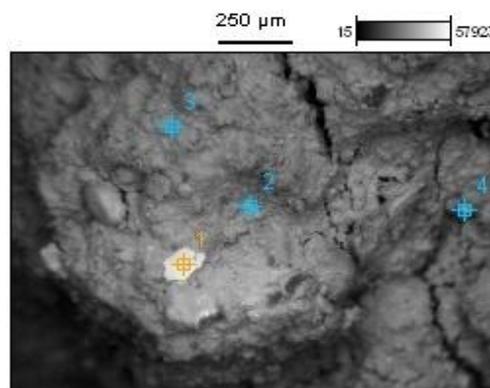
Se registró un valor mayor de nitrógeno total (NT) en sedimento en verano (3341,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) respecto al obtenido en primavera (1324,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). El fósforo total (PT) en sedimento resultó inferior en primavera (698,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) respecto a la temporada de verano (1459,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). El valor de clorofila *a* aumentó ampliamente en verano respecto al obtenido en primavera (Tabla 1).

**Tabla 1.** Variables ambientales durante Primavera (P) y Verano (V): (NT= Nitrógeno total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ); PT= Fósforo total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), T= temperatura (°C); Sal= salinidad; OD= oxígeno disuelto (mg/L); Clo a=Clorofila *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); sed= sedimento, sup= superficie)

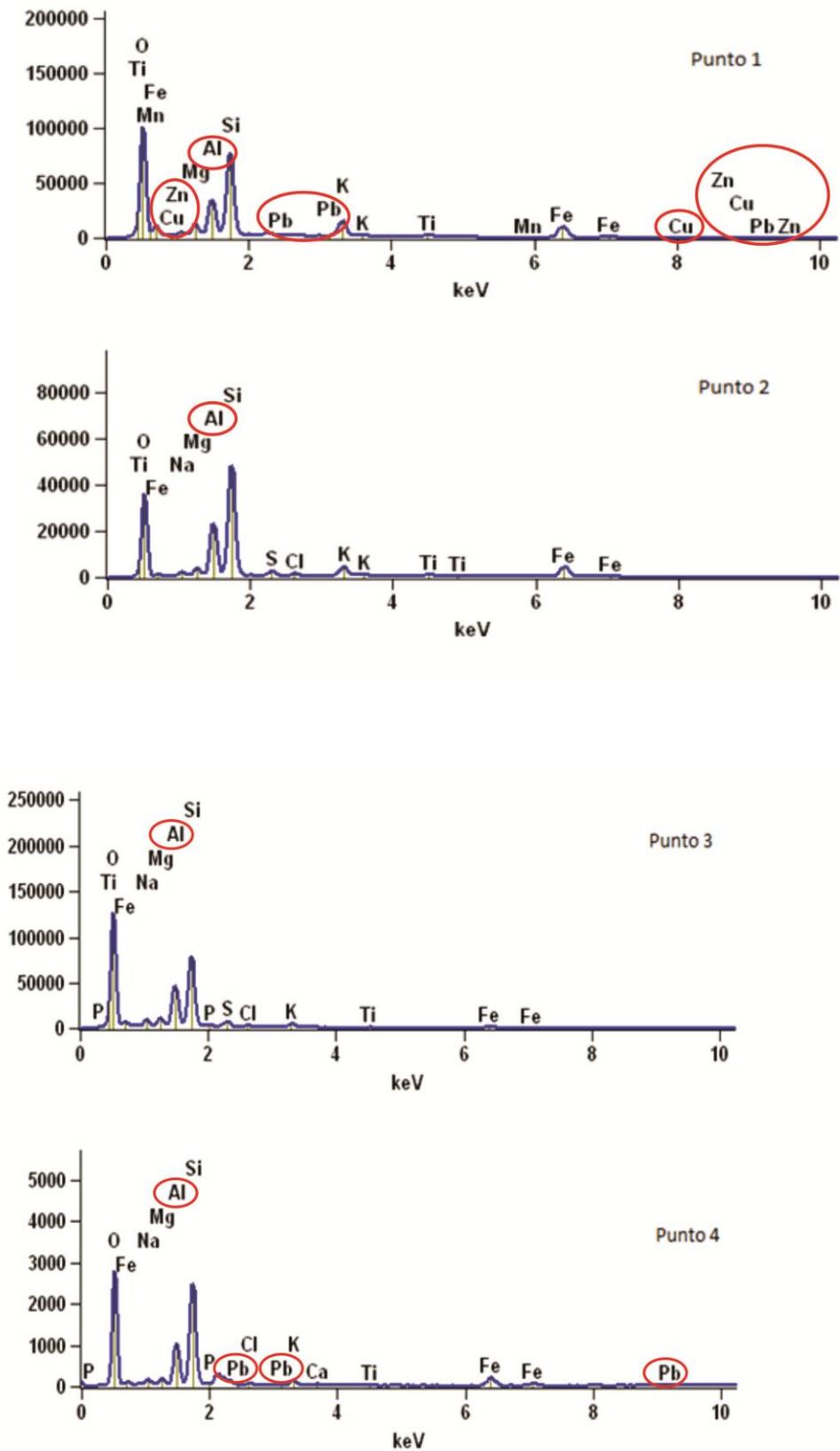
	T. sup (°C)	Sal. sup	OD sup (mg L <sup>-1</sup> )	Clo a sup ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	NT sed ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	PT sed ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<b>P</b>	21.8	3.7	8.9	4.25	1324.2	698.2
<b>V</b>	26.1	9.9	13.1	89.15	3341.9	1459.2

### 3.2 Metales pesados

La figura 4 muestra el análisis por puntos seleccionados aleatoriamente (Point and Shoot) en muestras de sedimento del sitio B2 en primavera, mientras que la figura 5 presenta los espectros obtenidos para cada punto de análisis. Los metales pesados hallados en los puntos seleccionados son: Aluminio (Al), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Plomo (Pb) en las muestras de sedimento analizadas.

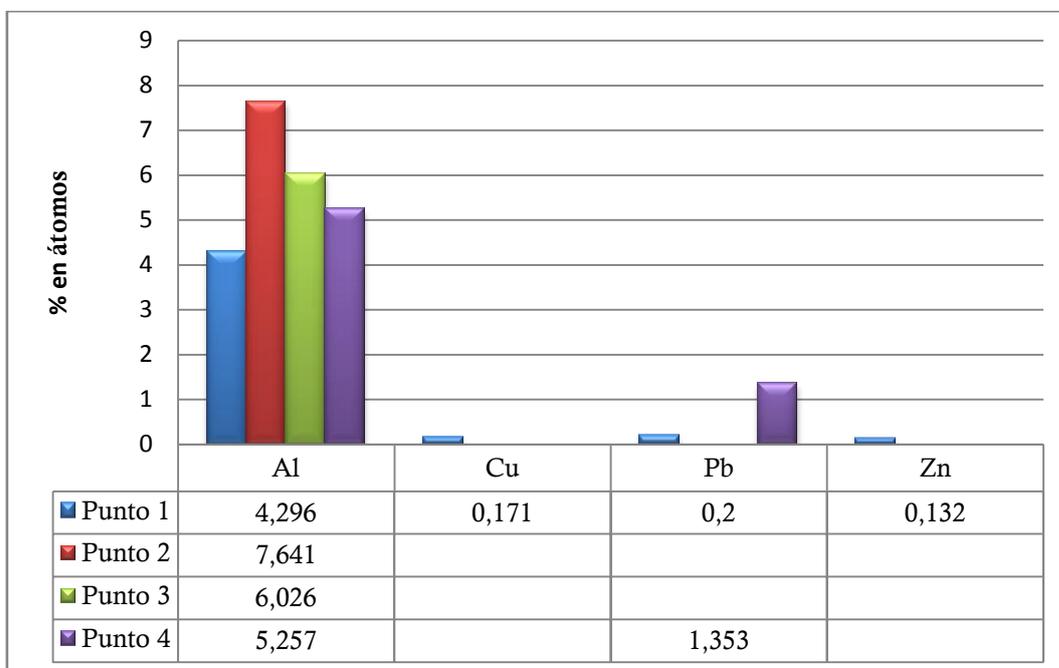


**Figura 4.** Microfotografía (MEB). Los puntos 1, 2, 3, 4 corresponden a las áreas de la muestra analizadas



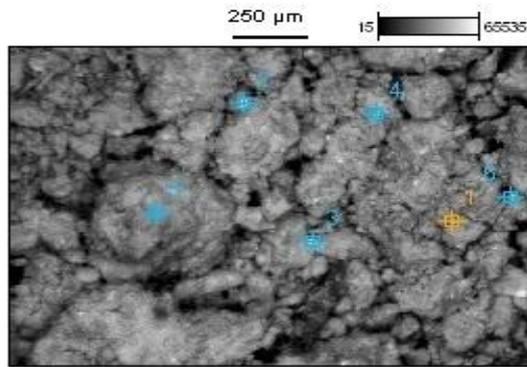
**Figura 5.** Espectros obtenidos para cada punto de análisis del sedimento (primavera). Se marcan con círculos rojos los metales que resultan relevantes para este estudio.

Los espectros obtenidos por los elementos que muestran mayor emisión durante el análisis por rayos X se observa en la figura 6.

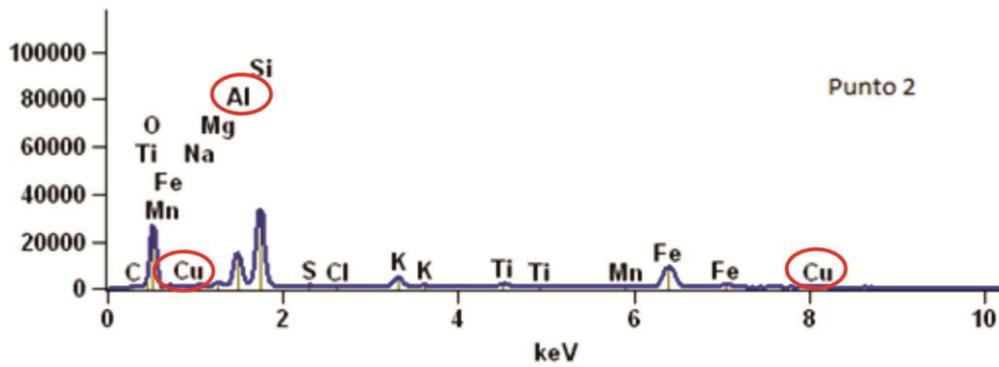
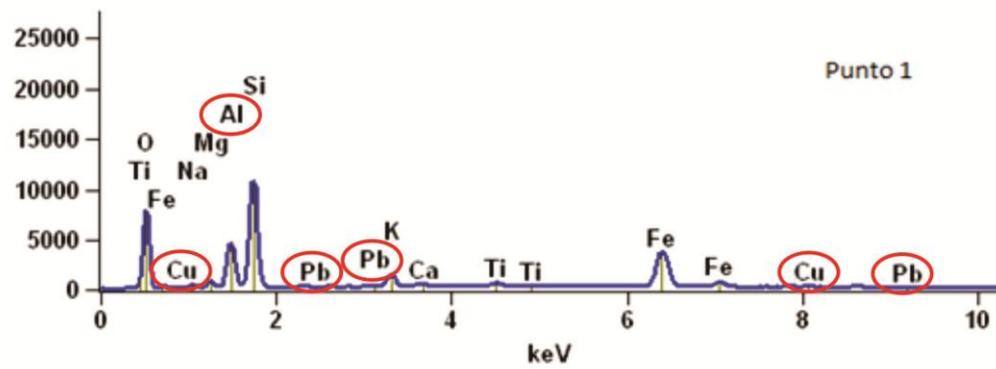


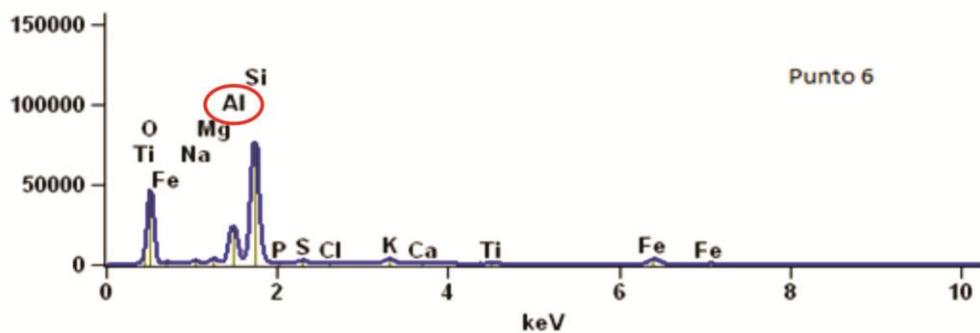
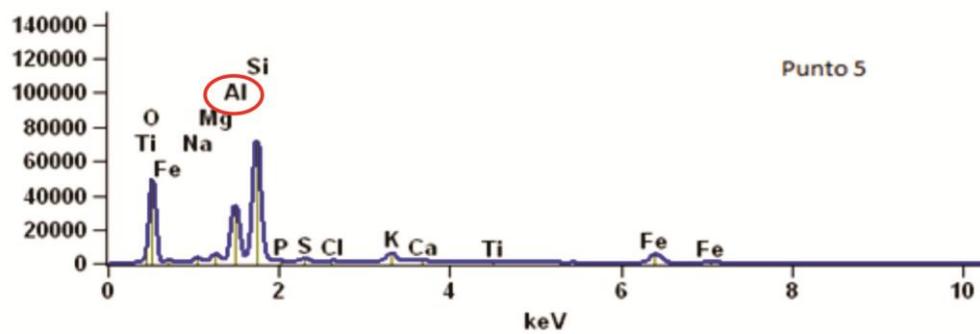
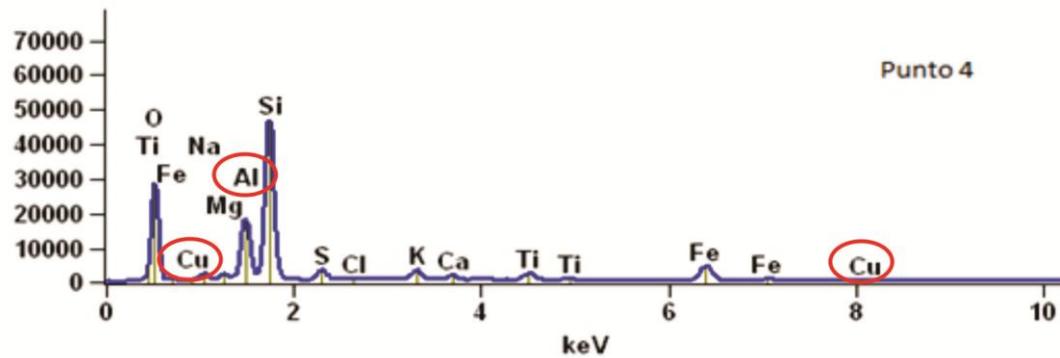
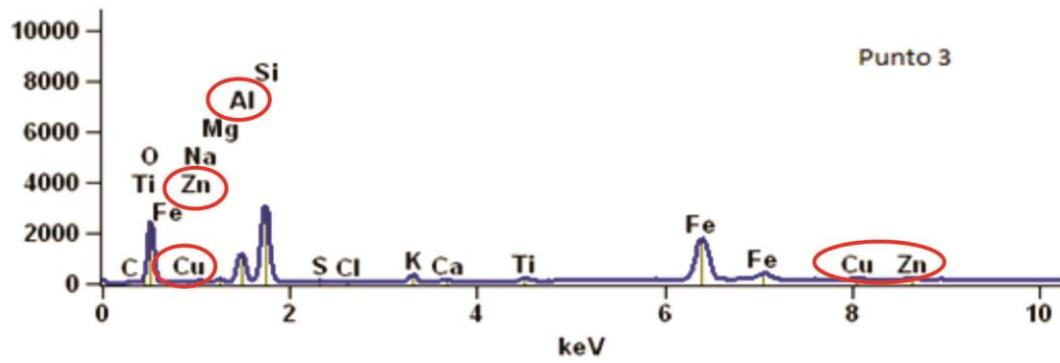
**Figura 6.** Porcentaje de átomos calculado para cada elemento de interés, en los puntos de análisis de la muestra de sedimento correspondiente a la temporada de primavera

La figura 7 muestra el análisis por puntos seleccionados aleatoriamente (Point and Shoot) en muestras de sedimento del sitio B2 en verano, mientras que la figura 8 presenta los espectros obtenidos para cada punto de análisis. Al igual que en primavera, los metales pesados hallados en los puntos seleccionados son: Aluminio (Al), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Plomo (Pb) en las muestras de sedimento analizadas



**Figura 7.** Microfotografía (MEB). Los puntos 1, 2, 3 ,4, 5 y 6 corresponden a las áreas de la muestra analizadas

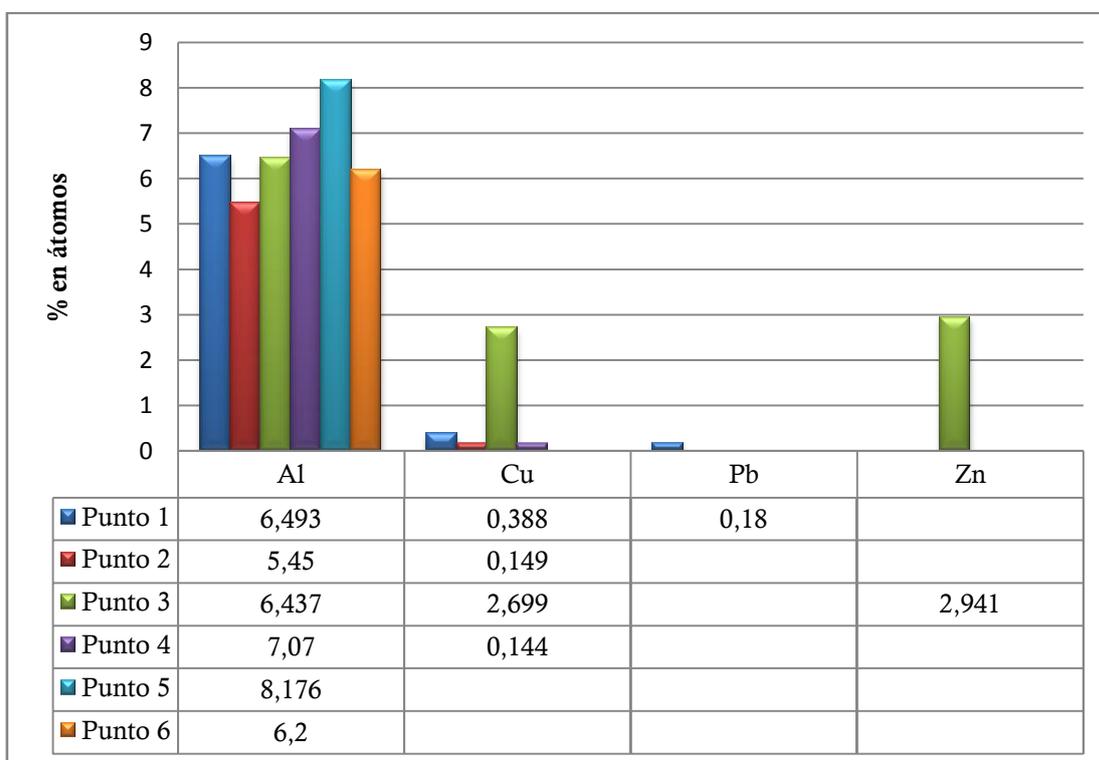




**Figura 8.** Espectros obtenidos para cada punto de análisis del sedimento (verano). Se marcan con círculos rojos los metales que resultan relevantes para este estudio.

Los espectros obtenidos por los elementos que muestran mayor emisión durante el análisis por rayos X se observan en la figura 9.

Aunque metales pesados como el Cu, Zn, Al y Pb pueden resultar tóxicos y se encuentran en ambas temporadas, no están presentes en igual porcentaje (figuras 6 y 9). El Cu y Zn registraron mayor porcentaje en verano que en primavera. El Al se detectó en menor proporción en primavera con respecto a verano a diferencia del Pb que se encontró en mayor proporción en la primavera (ver tablas asociadas a gráficos en figuras 6 y 9).



**Figura 9.** Porcentaje de átomos hallado para cada elemento de interés, en los puntos de análisis correspondiente a la temporada de verano

### 3.3 Coliformes fecales

El valor de coliformes fecales obtenidos en el presente trabajo fue similar para ambos muestreos ( $15100 \pm 4241$  UFC/100 mL).

### 3.4 Ictiofauna

Se analizó un total de 22 individuos distribuidos en 2 temporadas correspondientes a primavera y verano con sus respectivos controles. Los peces colectados fueron *Brevoortia aurea* (n=3 primavera; n=5 verano) y *Cyprinus carpio* (n=5; primavera). Los controles fueron *Brevoortia aurea* (n=5, Laguna de Rocha) y *Cyprinus carpio* (n=4, IIP). En la tabla 2 se presentan las características morfométricas de los diferentes organismos colectados.

**Tabla 2.** Talla y Peso de las especies colectadas en las temporadas de Primavera (P) y Verano (V), con sus respectivos controles (C) en IPP y Laguna de Rocha.

Especie	Talla (cm)	Peso (g)	Temporada
<i>C. carpio</i>	41	1144	P
<i>C. carpio</i>	44	1363	P
<i>C. carpio</i>	41	1026	P
<i>C. carpio</i>	43	1229	P
<i>C. carpio</i>	43	1321	P
<i>B. aurea</i>	12.3	20	P
<i>B. aurea</i>	12	18	P
<i>B. aurea</i>	13.5	24	P
<i>B. aurea</i>	12.3	19.1	V
<i>B. aurea</i>	12.3	18.27	V
<i>B. aurea</i>	13.4	23.7	V
<i>B. aurea</i>	36	304.75	V
<i>B. aurea</i>	11.7	19.3	V
<i>C. carpio</i>	31.2	907.3	IIP ( C )
<i>C. carpio</i>	29.5	841.1	IIP ( C )
<i>C. carpio</i>	32.4	937.1	IIP ( C )
<i>C. carpio</i>	30.7	875.5	IIP ( C )
<i>B. aurea</i>	25.3	192.2	Laguna de Rocha ( C )
<i>B. aurea</i>	19.7	101.1	Laguna de Rocha ( C )
<i>B. aurea</i>	25.3	174.9	Laguna de Rocha ( C )
<i>B. aurea</i>	23.1	150.3	Laguna de Rocha ( C )
<i>B. aurea</i>	27.4	213	Laguna de Rocha ( C )

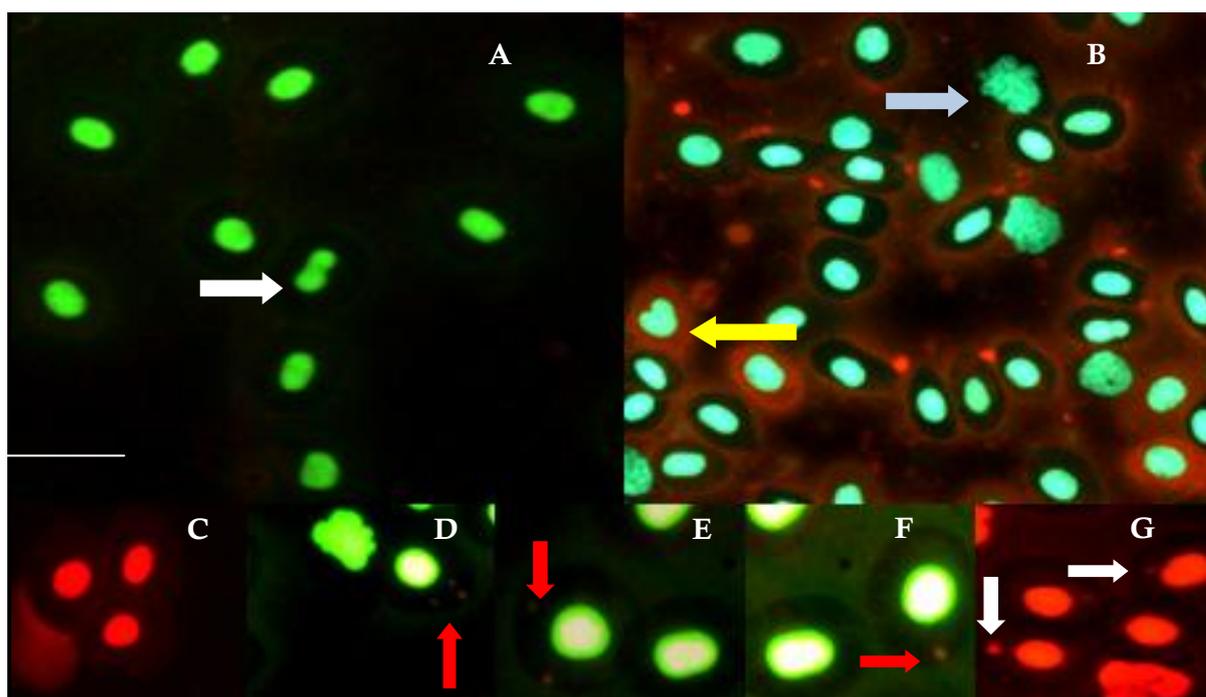
### 3.5 Test de Micronúcleos

Se determinó en todos los organismos capturados la presencia de Micronúcleos (MN) y Núcleos Lobados (NL) así como células normales en las especies colectadas durante las 2 temporadas en la Bahía de Montevideo, así como en los controles considerados (Tabla 3).

En la figura 10 se visualizan eritrocitos de las especies *B. aurea* y *C. carpio*, en las que se pueden observar células en proceso de división, células normales y con diferentes tipo de aberraciones (MN y NL).

**Tabla 3.** Conteo total de células de las especies *B. aurea* y *C. carpio* en las temporadas de primavera y verano: (ND= no dato). Se diferencian entre células normales, células con Micronúcleos y células con núcleos lobados.

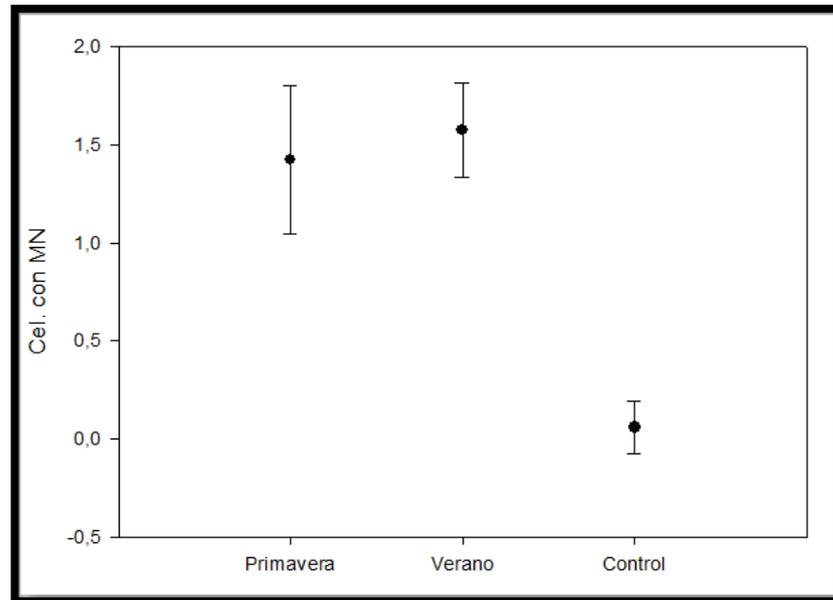
	Primavera		Verano		Control	
	<i>B. aurea</i>	<i>C. carpio</i>	<i>B. aurea</i>	<i>C. carpio</i>	<i>B. aurea</i>	<i>C. carpio</i>
Células con micronúcleos	98	135	215	ND	31	15
Células con núcleos lobados	6	10	23	ND	5	5
Células normales	2700	7501	6526	ND	7045	5833
Total de células	2804	7646	6764	ND	7081	5853



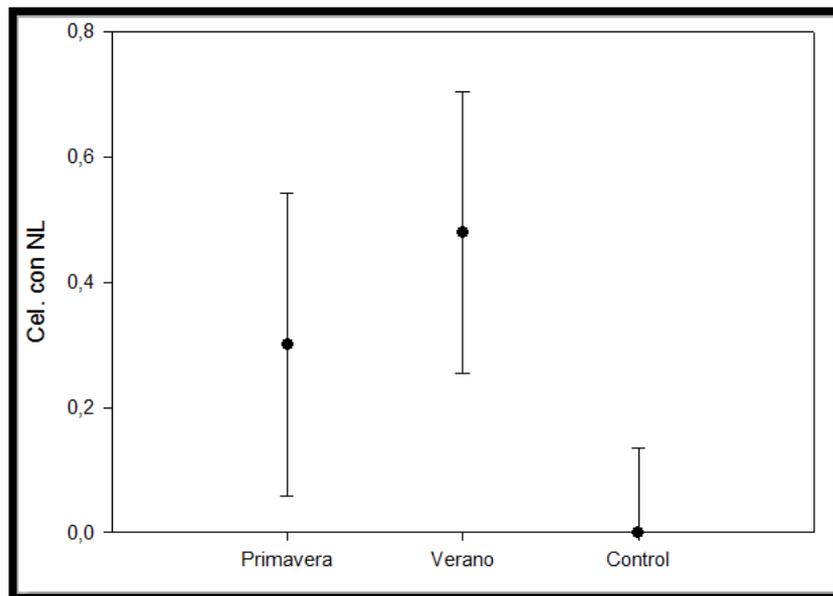
**Figura 10.** Eritrocitos de *B. aurea* y de *C. carpio*. En (A): eritrocitos normales y núcleo lobado (flecha blanca), (B): célula con núcleo lobado (flecha amarilla); célula en división (flecha gris), (C): células normales, D: célula con 3 MN (flecha roja), E: célula con 2 MN (flecha roja), F: célula con 1 MN (flecha roja), G: células con 1 MN (flechas blancas). Tinciones bromuro de etidio (rojo) y naranja de acridina (verde, celeste). La barra representa 10  $\mu$ m

### 3.5.1 Análisis temporal de *B. aurea*

Se encontraron diferencias significativas entre primavera y verano en las células con MN (Kruskal Wallis  $p < 0.05$  ( $p = 0.0298$ )). (Figura 11) entre temporadas y respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ), del mismo modo ocurrió con los núcleos lobados ( $p = 0.0118$ ). (Figura 12).



**Figura 11.** Rango intercuartílico de medianas de células con MN en *B. aurea* correspondiente a cada temporada y controles.

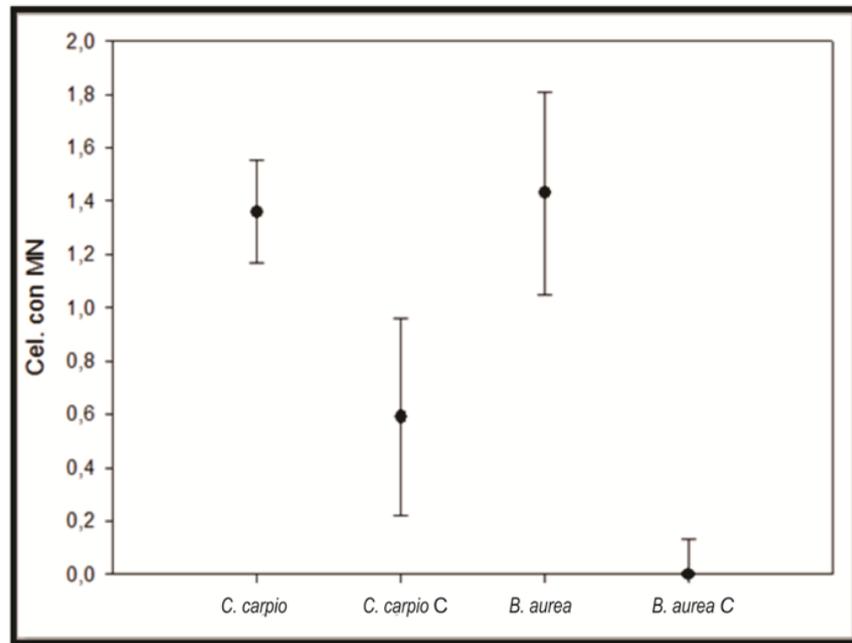


**Figura 12.** Rango intercuartílico de medianas de células con núcleos lobados en *B. aurea* correspondiente a cada temporada y controles.

### 3.5.2 Comparación entre las especies *B. aurea* y *C. carpio* para la temporada primavera

El número registrado de células con MN para primavera entre *B. aurea* y *C. carpio* no presentan diferencias significativas a través de Mann Whitney U a  $p < 0.05$  ( $p = 0.6547$ ).

Se observaron diferencias significativas entre cada especie y su respectivo control (Kruskal Wallis;  $p \leq 0.05$ ); siendo  $p = 0.0088$  para *B. aurea* y  $p = 0.0082$  para *C. carpio* (Figura 13).



**Figura 13.** Rango intercuartílico de medianas de células con MN correspondiente a la temporada de primavera para *C. carpio* y *B. aurea* con sus correspondientes controles (C)

#### 4. DISCUSIÓN

La Bahía de Montevideo y la zona costera adyacente se encuentran bajo la influencia de diferentes impactos antrópicos que comprometen su salud ecosistémica (Gómez-Erache *et al.*, 2001; Muniz *et al.*, 2011). Esto ejerce gran influencia en los organismos y en la productividad del sistema costero afectando la biodiversidad global (Muniz *et al.*, 2011).

Dentro de los parámetros analizados en este trabajo, temperatura y salinidad mostraron valores característicos para la zona y las estaciones muestreadas, registrándose un aumento en verano respecto a primavera. Según varios trabajos (Guerrero *et al.* 1997; FREPLATA, 2005; Muniz *et al.* 2006) la salinidad media superficial del Río de la Plata en el área próxima a Montevideo varía entre 5 y 10; los valores hallados resultaron inferiores en primavera, lo que podría explicar la presencia de *Cyprinus carpio* solo en dicha estación (García *et al.*, 2010).

Los valores de oxígeno disuelto (OD) en este estudio, son mayores a los reportados por la IM, que registró los valores más bajos en comparación a toda la costa de Montevideo, en los últimos años (IM, 2015). Aunque lo esperable es que el valor de OD sea inferior en períodos estivales con mayores temperaturas, según Muniz *et al.*, (2011) en la zona de estudio se han reportado elevados valores de oxígeno durante épocas de verano.

Se reportaron valores altos y mayores de clorofila *a* durante verano respecto a primavera, con la posibilidad de evidenciar contaminación o bien una alta productividad primaria, lo que podría explicarse por el bloom registrado en dicha temporada.

Según Tudurí, (2012) el contenido de Nitrógeno total y Fósforo total en sedimento del ambiente bentónico de la Bahía de Montevideo presenta una distribución homogénea, sin embargo los sedimentos ubicados en la desembocadura de los arroyos muestran un mayor enriquecimiento que el resto de la Bahía, debido a las descargas de los arroyos Miguelete, Pantanoso y Seco, que al entrar en contacto con aguas de mayor salinidad, producen floculación de las partículas en suspensión que sedimentan junto con los nutrientes contenidos en éstas.

En el presente estudio el contenido Nitrógeno total y Fósforo total en sedimento fueron superiores en verano coincidiendo con los mayores valores encontrados en el oxígeno, temperatura y clorofila a de la columna de agua.

Al comparar con otros estudios (Bueno 2012; Bueno *et al.*, 2013; Tudurí 2012) (Anexo, Tabla 1), donde las tendencias de valores de la zona costera de Montevideo coinciden, presentan valores máximos en la zona interna de la Bahía, los cuales concuerdan con los resultados encontrados en el presente estudio, recalcando la degradación ambiental del sistema de la zona interna de la Bahía de Montevideo

Según Bueno (2012) y Tudurí (2012), el máximo valor encontrado de Nitrógeno total para la zona cercana al área de estudio es  $1388 \mu\text{g g}^{-1}$ , similar al valor obtenido en este trabajo para primavera, registrándose un valor de más del doble al hallado por ambos autores durante la temporada de verano. Con respecto al Fósforo total, Bueno (2012) obtuvo un valor de  $1106.1 \mu\text{g g}^{-1}$  para el sitio de estudio, superior al registro obtenido en primavera e inferior al hallado en verano. Sin embargo, Tudurí (2012) encontró valores máximos de PT de  $910 \mu\text{g g}^{-1}$ , que se ubica dentro del rango obtenido durante ambas temporadas (Anexo, Tabla 1).

El exceso de fósforo y nitrógeno originado del vertido de efluentes cloacales e industriales sin tratar, puede incidir en la estabilidad de los ecosistemas acuáticos debido al proceso de eutrofización. El incremento desmedido de estos nutrientes afecta a las comunidades biológicas favoreciendo la aparición de floraciones algales que generan contaminación por cianotoxinas así como eventos de anoxia (Iida & Shock, 2009; Cárdenas & Sánchez, 2013).

Los efectos toxicológicos de exposiciones prolongadas a excesos de estos nutrientes disminuyen la respuesta inmunológica de los organismos acuáticos induciendo a patologías que pueden conducir a la muerte de organismos marinos, reduciendo la habilidad de osmoregulación e inhibiendo los ciclos reproductivos (Cárdenas & Sanchez, 2013). El aumento de los valores de pH y de temperatura en el ambiente, pueden transformar ciertos compuestos nitrogenados como el amonio en su forma tóxica (amoníaco) (Pepe, 2003; Spiro & Stigliani, 2004) que de acuerdo con Colt & Armstrong (1981), afecta el transporte de oxígeno a los tejidos; ya que afecta la función branquial en

los organismos, causando una disminución del oxígeno disponible y generando daños histológicos (Frías & Páez, 2001).

La presencia de coliformes fecales refleja la existencia de contaminación orgánica y es un indicador de la posible existencia de organismos patógenos en el cuerpo de agua (Silva *et al.*, 2004; Newman & Clements, 2008; Vilchez, 2010; FPTCDW, 2011). Los valores obtenidos para la zona de estudio en las dos temporadas (primavera y verano) se situaron en el entorno de las 15100 UFC/100 mL sobrepasando el valor mínimo aceptado para este tipo cuerpo de agua (clase 3 “*aguas destinadas a la preservación de los peces en general y de otros integrantes de la flora y fauna hídrica, o también aguas destinadas al riego de cultivos cuyo producto no se consume en forma natural o en aquellos casos que siendo consumidos en forma natural se apliquen sistemas de riego que no provocan el mojado del producto*”) (MVOTMA, 1979 modificado en 2012). La normativa del decreto 253/79, establece que para aguas clase 3, los coliformes fecales no deben exceder las 1000 UFC/100 mL. Los valores del presente trabajo superan el máximo establecido. El valor obtenido (luego de su transformación logarítmica en base 10<sup>1</sup>) fue de 4,2, situándose dentro del rango de dispersión de los valores obtenidos para la zona de la Bahía por la IM. Desde el año 2011 (valor mínimo 2.3), los coliformes fecales han aumentado aunque sin llegar al histórico de 6,2 registrado en el año 2010 (IM, 2015). La alta concentración de coliformes registrada en este estudio, podría explicarse por la descarga de tres arroyos urbanos que transportan residuos domésticos y efluentes industriales, de pequeños emisarios y del sistema de desagüe pluvial. La carga de nutrientes proveniente de efluentes municipales sin tratar o sólo con tratamiento primario originados por la población de la ciudad de Montevideo, impactan en la Bahía y hacia el Este, en la zona de Punta Carretas, donde está localizado el mayor emisario submarino del país (Muniz *et al.*, 2006).

Se detectó la presencia de metales pesados, destacándose por su toxicidad: Aluminio, Cobre, Plomo y Zinc. Los primeros estudios realizados sobre la contaminación por hidrocarburos y metales pesados en la costa de Montevideo fueron publicados por Moyano *et al.* (1993) y Moresco & Dol (1996) quienes encontraron en la desembocadura del Arroyo Pantanoso sedimentos contaminados por cromo, proveniente de efluentes no

---

<sup>1</sup>Para hacerlos comparables con los valores históricos obtenidos por la IM.

tratados de las curtiembres localizadas en las proximidades del mismo (Muniz *et al.*, 2006). Otros estudios realizados en la zona, la Bahía presentan resultados similares, destacándose la presencia de altos niveles de plomo y cromo (FREPLATA, 2005; IM, 2015), a diferencia de otras zonas portuarias como Piriápolis y Punta del Este (FREPLATA, 2005).

Varios investigadores han analizado la toxicidad celular y genética *in vitro* de ciertos metales, como es el caso del aluminio (García, 2009). Si bien el aluminio se encuentra en forma natural en los cuerpos de agua, su exceso se debe principalmente al vertido de efluentes domésticos e industriales así como la lluvia ácida (García, 2009). En este trabajo, se destaca la presencia de aluminio en las muestras de sedimento, en particular en la temporada de verano.

Existe evidencia que sustenta que el aluminio puede dañar el ADN indirectamente al modificar la estructura de la cromatina, por ejemplo generando especies reactivas del oxígeno (García, 2009). Dicho metal aumenta la producción de secreciones mucosas en la zona branquial modificando la osmoregulación y los procesos respiratorios en los peces. Este efecto se ha probado particularmente en *Salmon trutta* L y en *Cyprinus carpio* (García, 2009).

En resumen, la zona de estudio presenta alto grado de impacto antrópico principalmente de la descarga de efluentes urbanos reflejado en las elevadas concentraciones de Nitrógeno total y Fósforo total en sedimento, valores elevados de Clo *a*, como así también en los altos contenidos de coliformes durante ambas temporadas. Además se detecta la presencia de metales pesados donde estudios previos indican su potencial toxicidad (García, 2009) y los mismos estarían aportados por descargas industriales (Bueno *et al.*, 2016).

Considerando que los estuarios constituyen sistemas hidrológicos expuestos a actividades antrópicas, los peces estuarinos pueden usarse para indicar la contaminación disponible mediante la bioacumulación y alteraciones genéticas (Kuniyoshi & Braga, 2010) particularmente utilizando un biomarcador de exposición crónica como el ensayo o test de micronúcleos, que revela el daño genético acumulado por una especie en un cierto tiempo. Diversos estudios, tanto en aguas continentales como en ambientes costeros evidencian formación de MN, promovida por efluentes cloacales vertidos en el medio acuático (Li *et al.*, 2004; Grisolia *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2006; Talapatra & Banerjee, 2007).

Los niveles de daño y las anomalías nucleares observadas concuerdan con lo esperado para un ambiente con altos niveles de contaminación por aporte de aguas servidas no tratadas como el sitio de estudio.

Los metales pesados inciden en la formación de MN y anomalías nucleares y daño celular (como núcleos lobados) como se ha comprobado en trabajos de exposición a diferentes tipos de metales tanto en condiciones de campo como en laboratorio (Pradipta, 2012). Existen estudios que muestran incidencias de metilmercurio provocando efectos mutagénicos y del mercurio en peces del Río Amazonas detectando altas tasas de MN en peces con dieta piscívora comparada a otros con dieta detritívora/omnívora (Machado da Rosa *et al.*, 2009). Otros autores han realizado estudios sobre la acción del cobre y zinc afectando el ADN obteniendo resultados coincidentes con otros trabajos sobre la incidencia de los metales en peces. Una de las vías posibles de la genotoxicidad del cobre es la inducción del estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno que dañan el ADN. La genotoxicidad del cobre, zinc y su mezcla binaria a dos especies de peces mediante la prueba de micronúcleos revelaron el efecto genotóxico de estas especies metálicas a corta duración e independiente de las concentraciones tóxicas (Obiakor *et al.*, 2012). Aunque en este estudio, se obtuvieron datos semicuantitativos por EDS, la presencia de metales pesados tóxicos y asociados a la producción de mutaciones genéticas, indica que la contaminación de origen industrial también estaría influyendo negativamente en la salud de los bioindicadores y el estado del ecosistema, a través de procesos de mutagénesis y daño celular agudo.

Los niveles de MN en *B. aurea* resultaron altos respecto a los controles (valores estadísticamente significativos) en la temporada de verano. Esto podría indicar un deterioro del estado fisiológico de dicha especie, coincidente con una alta mortandad ocurrida en el Río de la Plata, sobre las costas de Montevideo y de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) ocurrida en el mes de marzo de 2015 según comunicado de Presidencia de la República Oriental del Uruguay ([www.presidencia.gub.uy](http://www.presidencia.gub.uy)). Estudios realizados por la IM (2015) sugieren que la mortandad se pudo haber producido por la elevación en la temperatura promedio sobre el valor histórico para la zona, con una consecuente anoxia en el agua en zonas someras habitadas por esta especie (IM, 2015). Cabe destacar, que previo a la anoxia se generan procesos físico-químicos en los cuerpos de agua que pueden provocar la aparición de agentes mutagénicos, como es el

caso de las floraciones algales y la liberación de cianotoxinas. A propósito, el Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental (IM) detectó una floración bacteriana (Raphidophyceae cf. *Heterosigma* sp.) con una concentración de 1188000 cél/mL en una muestra proveniente de la Playa Ramírez (cercana a la Bahía) sugiriendo que dicho fenómeno podría explicar la alta mortalidad registrada en marzo de 2015. El grupo Raphidophyceae está asociado con masiva mortandad de peces, por hipoxia en diversas regiones tales como Japón, Canadá, Europa, Estados Unidos y Chile. (IM, 2015). Es importante resaltar, que el nivel de MN y de núcleos lobados en *B. aurea* aumentó días antes de que se produjera la mortandad masiva, confirmando que el biomarcador utilizado reveló daño genético y celular significativo en etapas previas al evento de mortandad, revelando probablemente la acción de cianotoxinas.

En Uruguay se han introducido especies de peces provenientes de diferentes partes del mundo para su utilización en emprendimientos gastronómicos o de control sobre otros organismos, siendo reportadas hasta el momento cuatro especies, la más relevante por su presencia en diferentes hábitats naturales es *C. carpio* (Teixeira de Mello *et al.*, 2011). Dicha introducción puede tener diferentes consecuencias, entre ellas la alteración del hábitat natural o la competencia directa o indirecta con las especies nativas. *Cyprinus carpio* es una especie invasora que ha colonizado exitosamente ecosistemas acuáticos dulceacuícolas y salobres expuestos a diferentes grados de contaminación (InBuy, 2011). Siendo *C. carpio* una especie invasora exitosa, era esperable encontrar valores de MN inferiores a *B. aurea*, sin embargo, los niveles de daño genético y celular fueron similares, una posible explicación sería que durante la temporada de primavera no se registraron floraciones algales y las condiciones del ambiente se mantuvieron estables. En la temporada de verano sin embargo, las condiciones ambientales favorecieron la ocurrencia de un bloom de cianobacterias, pero *C. carpio* no fue capturado en el muestreo, probablemente debido a que la salinidad no favorecía su presencia en la zona. Por tanto, su respuesta a condiciones desfavorables como la exposición a cianotoxinas no pudo ser analizada.

Cabe destacar, que ambas especies presentaron niveles de daño genético superiores a los controles por lo que su utilización como bioindicadores está justificada, en particular en el caso de la lacha, cuya sensibilidad para el test de MN evidenció un efecto estadísticamente significativo ante un evento de contaminación agudo, previamente a que se registrara su mortandad masiva.

No se puede dejar de mencionar que una ampliación del número de individuos muestreados disminuiría la dispersión de los datos, pudiendo confirmarse o refutarse, el hecho de que ambas especies presenten igual tolerancia a los contaminantes genotóxicos presentes en la Bahía, como ocurrió en el presente trabajo.

## 5. CONSIDERACIONES FINALES

- ✓ Durante verano 2015 se registraron los mayores niveles de degradación ambiental manifestado en diversos parámetros ambientales del sedimento (Nitrógeno total, Fósforo total) y columna de agua (clorofila *a*). Esto concuerda con un aumento del daño genético en *B. aurea* comparando con primavera.  
Los coliformes registraron valores similares entre ambas temporadas pero igualmente superiores a la normativa vigente. Los metales pesados en sedimentos detectados son potencialmente tóxicos para la biota, en especial para *C. carpio*.
- ✓ El biomarcador de exposición y efecto (test de MN) reveló degradación ambiental de la Bahía de Montevideo en comparación a los individuos control (Laguna de Rocha e individuos del Instituto de Investigaciones Pesqueras).
- ✓ El ensayo de MN muestra que no existen diferencias significativas entre las especies *B. aurea* y *C. carpio*, pero sí con sus respectivos controles negativos, indicando que ambas se encuentran afectadas a nivel genético por los contaminantes presentes en la zona.
- ✓ El ensayo de MN resultó útil al detectar una afectación genética y celular en la especie *B. aurea*, que a posteriori generó una mortandad masiva.

## 6. RECOMENDACIONES

Es de destacar el bajo número de individuos considerado para el presente trabajo por lo cual se recomienda para trabajos futuros aumentar el número de individuos y especies analizadas.

El uso de biomarcadores de alerta temprana como el ensayo micronúcleos se ha transformado en una herramienta de vital importancia para detectar eventos crónicos de contaminación así como para determinar el efecto de las alteraciones del ecosistema que revelan los datos físico-químicos. Entre las ventajas que presentan los biomarcadores moleculares se cuentan:

- Alerta temprana, permitiendo tomar acciones de control o mitigación de los eventos de contaminación cuando no son masivos, previniendo alteraciones irreversibles en las comunidades.
- Observación del efecto integrado de una variedad de tensiones ambientales sobre la salud de un organismo, una población, una comunidad y el ecosistema.
- Extrapolación de respuestas individuales de los organismos expuestos a contaminantes y predicción de sus efectos a nivel poblacional.
- Alerta temprana de posibles daños a la salud humana basados en las respuestas de la fauna silvestre a los contaminantes.
- Seguimiento de la eficacia de los esfuerzos de bioremediación a niveles de detección que ninguna otra herramienta puede ofrecer.

La evaluación genotóxica del medio acuático es un mecanismo clave para traducir el principio de desarrollo sostenible en acción (Obiakor,2012). Resulta importante el conocimiento integral del estado de la salud ecosistémica de la Bahía de Montevideo y las zonas costeras adyacentes, ya que los daños genéticos detectados, pueden estar afectando a una gran cantidad de especies sino además porque muchas de ellas se utilizan para consumo.

Se recomienda para próximos estudios, utilizar diferentes biomarcadores que puedan explicar de mejor manera el estado de salud de los organismos presentes en dicha área de estudio. A nivel genético se recomienda la utilización del ensayo cometa y el índice

ARN/ADN. El ensayo cometa permite detectar lesiones en el ADN (rupturas simple y doble hebra asociadas a reparación incompleta por escisión de nucleótidos) (Collins, 2004), mientras que el índice ARN/ADN detecta la condición nutricional de los organismos (Buckley et al 1999). Estos estudios podrían realizarse en laboratorio bajo condiciones controladas. De esta manera se podría determinar de forma precisa, la respuesta de las especies analizadas en este estudio, a diferentes tipos de contaminantes

## **7. PERSPECTIVAS**

Es importante señalar, que este estudio debe profundizarse, abarcando más temporadas (que implican diferentes condiciones ambientales) y aumentando el número de individuos y especies analizadas. Una vez establecidos los niveles basales de cada especie como se hizo en este estudio para *B. aurea* y *C. carpio* y conociendo su nivel de respuesta en zonas impactadas (número o frecuencia de MN), podríamos contar con un indicador de salud ecosistémica extrapolable a otras zonas.

## 8. AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, *Silvia Villar y Ernesto Brugnoli*, por permitirme ser su pasante, por tenerme la paciencia necesaria en esos momentos difíciles, por estar continuamente preocupándose por mis avances pero sobre todo por mantener mi motivación lo más alto posible y enseñarme lo necesario para la realización de la tesina.

A la **Administración Nacional de Puertos (ANP)** en convenio con la Facultad de Ciencias (UdelaR), por permitirme realizar mi pasantía en la Bahía de Montevideo.

Quiero agradecer a las diferentes instituciones que hicieron posible la realización de mi tesina : **Laboratorio de Oceanografía y Ecología Marina** de la Facultad de Ciencias, en especial a *Carolina Bueno, Noelia Kandratavicius* ; **Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental** (SECCA, IM), en especial a *Grabriela Feola, Beatriz Brena, Gustavo Saona, Daniel Sienna* ; **Instituto de Investigaciones Pesqueras** (Facultad de Veterinaria, UdelaR), por permitirme obtener muestras para este trabajo.

A *Alicia Acuña, Walter Norbis* por ser una fuente de consulta permanente y saber escucharme para luego brindarme su opinión. A *Rodrigo Gurdek*, quien fue el que me enseñó a planificar diferentes muestreos con las diferentes artes de pesca y que sin él, no podría haber obtenido mis muestras.

A mis compañeros de carrera, en especial a *Beatriz, Juan, Maya, Silvana, Verónica*, los cuales fueron fundamentales para lograr superar mis grandes obstáculos.

A mis padres, *Mario y Ma.Elena*, quienes desde que inicie mi carrera nunca dejaron de apoyarme a pesar de mis caídas, de mis momentos más duros, dándome un abrazo y diciendo "vamo' arriba, vos puedes". Gracias papá y mamá!

A mi hermana *Silvina*, la cual me ha ayudado en muchísimas instancias brindándome su opinión sobre los diferentes avatares de la carrera.

Una mención muy especial, a mi novia, amiga y compañera, *Valeria*. Gracias por aguantarme en mis momentos más difíciles de verdad, en los que me sentía completamente desorientado, por ser una consejera y darme ese impulso que necesitaba.

A mi *familia*, quienes siempre me aconsejaron y ayudaron para que el camino fuera más sencillo. Una consideración especial a mi tío *Javier Rius*, quien me enseñó desde chico el maravilloso mundo de los peces, en particular la pesca.

A mis amigos de Minas, los cuales siempre se preocuparon por mis avances en la carrera.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, A., Gurdek, R., Muñoz, N., Gutierrez, J., Spósito, M., Correa P. & Caride, A. 2016. Seasonal composition, abundance and biomass of the subestuary fish assemblage in Solís Chico (Río de la Plata estuary, Uruguay). *Brazilian Journal of Biology*, DOI: 1519-6984.02216, en prensa
- Al-Sabti, K. 1995. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutation Research*, 335 (2): 109-120.
- Al-Sabti, K. & Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343 (3): 121-135.
- Anzecc & Armcanz. 2000. Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality, Australian and New Zealand Environment Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra.
- APHA. 2005. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water 21st. Ed.
- Arkipchuk, V. & Garanko, N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 42-52
- Belardi, E. 2008. El Hassan. Floraciones algales nocivas en el mar mediterráneo. Cátedra euroárabe de medio ambiente. Fundación Euroárabe de Altos Estudios. Pp 49. <http://www.fundea.org>.
- Bolognesi, C. & Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1): 205-213.
- Brugnoli, E., Muniz, P., Venturini, N. & Burone, L. 2007. Environmental Perturbation and Coastal Benthic Biodiversity in Uruguay. In I. C. Willis. Ed. *Progress in Environmental Research*. Nova Publishers, 75-126.
- Buchwalter, D.; Jenkins, J. & Curtis, L. 2003. Temperature influences on water permeability and chlorpyrifos uptake in aquatic insects with differing respiratory strategies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 2806-2812.
- Buckley L.J., Caldarone E. & Ong T.L. 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia*, 401: 265-277.

- Bueno, C. 2012. Una aproximación a la caracterización del estado trófico de la zona costera metropolitana mediante el análisis de variables geoquímicas del sedimento superficial. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias, UdelaR.
- Bueno, C., Tudurí, A., Brugnoli, E., Muniz, P., Venturini, N., Burone, L. & García Rodríguez, F. 2013. Variabilidad ambiental y antrópica del contenido orgánico de los sedimentos en la zona costera metropolitana mediante el uso de indicadores químicos y biológicos. Resumen. COLACMAR.
- Bueno, C., Brugnoli, E., Muniz, P., Figueira, R., Ferreira, P. & García Rodríguez, F. 2016. Historical economic and environmental policies influencing trace metal inputs in Montevideo Bay, Río de la Plata. *Marine Pollution Bulletin* 113. pp 141–146
- Burone, L., Venturini, N., Sprechmann, P., Valente, P. & Muniz, P. 2005. Distribuição dos foraminíferos bentônicos e sua influência da contaminação na zona costeira de Montevideu, Uruguai. II Congresso Brasileiro de Oceanografia. 09 a 12 de Outubro de 2005 - Vitória - ES – Brasil.
- Camargo, J. & Alonso, A., 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* (16) 2. Madrid, España. 13 pp.
- Cárdenas, G. & Sánchez, I. 2013. Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Rev. Universidad y salud. Universidad de Nariño. Colombia*, 15(1) 72 – 88.
- Casartelli, G.; Monteghirfo, S.; De Ferrari, M.; Bonatti, S.; Scala, M.; Toma, S.; Margarino, G. & Abbondandolo, A. 1997. Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa. *Anal Quant Cytol Histol.* 19 (6):475-481.
- Collins, A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3): 249-261.
- Colt, J. & Armstrong, D. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs. *Proceedings of the Bio-Engineering Symposium for Fish Culture. Fish Culture Section of the American Fisheries Society (FCS Publ. 1): 34-47.*
- Corrales, D., Acuña, A., Salhi, M., Saona, G., Odino, R., Gabrielli, A., Piuma, L. Reina, E. & E. Brugnoli. 2016. Copper, Zinc and Mercury content in *Micropogonias furnieri* and *Mugil platanus* from the Uruguayan coastal zone of Río de la Plata. Aceptado en *Bulletin Journal of Oceanography*

- Cousseau M. B. & Perrotta, R. G. 2000. Peces Marinos de Argentina: Biología, distribución, pesca INIDEP, Mar del Plata, 167pp.
- Da Rocha, C., Dos Santos, R., Bahia, M., Da Cunha, L., Ribeiro, H., Ferreira, B. & Rommel, M. 2009. 'The Micronucleus Assay in Fish Species as an Important Tool for Xenobiotic Exposure Risk Assessment—A Brief Review and an Example Using Neotropical Fish Exposed To Methylmercury', *Reviews in Fisheries Science*, 17: 4, 478 — 484.
- Da Rocha, H.R., Manzi, A.O., Cabral, O.M., Miller, S.D., Goulden, M.L., Saleska, S.R. & Maia, J.F. 2009. Patterns of water and heat flux across a biome gradient from tropical forest to savanna in Brazil. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 114(G1): 2005-2012.
- Dyer, B. S. H. 2006. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell*, 30(1): 69-88
- Fabiano, G., Santana, O., Silveira, S., Martinez, A., Zarucki, M. 2011. Registros de Carpa común (*Cyprinus carpio*) en la Laguna de Rocha (Uruguay). *Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras (Facultad de Veterinaria, UdelaR)*. P.5
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.
- Ferreira, J.G., Andersen, J.H., Borja, A., Bricker, S.B., Camp, J., Cardoso da Silva, M., Garcés, E., Heiskanen, A., Humborg, C., Ignatiades, L., Lancelot, C., Menesguen, A., Tett, P., Hoepffner, N., Claussen, Ulrich. 2011. Review of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. *Estuarine*, 93(2): 117-131.
- Figueiredo, J. L. & Menezes, N. A. 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). Museu de Zoologia da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 116 p.
- Flores-Kehn, L.P., Zavala-Aguirre, J.L., Buelna-Osben, H.R., Ramos Ibarra, L.M., Zuñiga Gonzales, G., Ogura, T. & Torres-Bugarín, O. 2008. Micronúcleos y anomalías nucleares en el Goodeido *Xenotoca melanosoma* del lago La Alberca en Michoacán, México. Guadalajara México, XIX Semana Nacional de la Investigación Científica. 15 pp.
- FPTCDW: Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water. 2011. Total Coliforms in Drinking Water. Canadá. Pp. 34
- FREPLATA, 2005. Análisis diagnóstico transfronterizo del Río de la Plata y su Frente Marítimo. Documento Técnico. Proyecto: "Protección Ambiental del Río de la Plata

- y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitats”. Proyecto FREPLATA - PNUD/GEF.RLA/99/G31, 311 pp.
- Frías, M. & Páez, F. 2001. Toxicidad de los Compuestos del Nitrógeno en Camarones. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. pp.253-254.
- Froese, R. & D. Pauly. Editors 2016. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (10/2016).
- García, S. 2009. Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad producida por el aluminio en linfocitos de la carpa (*Cyprinus carpio*). Tesis de doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Mexico D.F., 90 pp.
- García M., Jaureguizar A. & Protogino L. 2010. From fresh water to the slope: fish community ecology in the Río de la Plata and the sea beyond. Latin American Journal Aquatic Research 38, 81–94.
- Ghisi N. de C., Ramsdorf W, de Almeida M., Ribeiro C. & Cestari M. 2011. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. Environmental monitoring and assessment, 180 (1-4): 589-99.
- Gómez-Erache, M., Vizziano, D., Muniz, P. & Nagy, G.J. 2001. The Health of the Río de la Plata system: Northern Coast, Uruguay. In: Chopin, T., Wells, P.G. (Eds.), Opportunity and Challenges for Protecting, Restoring and Enhancing Coastal habitats in the Bay of Fundy. Proceedings of the 4th Bay of Fundy Science Workshops, Saint John, New Brunswick. Metales pesados en peces de la zona costera Metropolitana Environment Canada, Atlantic Region. Occasional Report N° 17, Environment Canada, Dartmouth, Nova Scotia, pp.17–35.
- Grisolia, C. K., de Oliveira, A. B. B., Bonfim, H. & de Nazaré Klautau-Guimarães, M. 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and molecular Biology, 28(2): 334-338
- Guecheva T., Henriques J. & Erdtmann, B 2001. Genotoxic Effects of Copper Sulphate in Freshwater Planarian In vivo, Studied with Single- Cell Gel Test (Comet Assay). Mutation Research, 497: 19-27.
- Guerrero R.A., Acha E., Framiñan M.B. & Lasta C.A. 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata Estuary, Argentina. Continental Shelf Research 17, 727-742.

- Gustavino, B., Scornajenghi, K.A., Minissi, S. & Ciccotti, E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutation Research*, 494(1): 151-159.
- Gutiérrez, J., Villar, S. & Acuña, A. 2015. Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). *Marine Pollution Bulletin*, Volume 91, Issue 2, Pages 518-523.
- Harrison T.D. & Whitfield A.K. 2008. Geographical and typological changes in fish guilds of South African estuaries. *Journal of Fish Biology*, 73: 2542-2570.
- Hillebrand H. 2004. Strength, slope and variability of marine latitudinal gradients. *Marine Ecology Progress Series*, 273: 251-267.
- Hooftman, R.N. & de Raat, W. K. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mud minnow *Umbra pygmaea* by ethyl methane sulphonate. *Mutation Research*, 104(3): 147-152.
- Hose, J.E., Cross, J.N., Smith, S.G. & Diehl, D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern California. *Marine Environmental Research*, 22: 167-176.
- Hutton, M., Venturini, N., García-Rodríguez, F., Brugnoli E. & Muniz, P. 2015. Assessing the ecological quality status of a temperate urban estuary by means of benthic biotic indices. *Mar. Pollut. Bull.*, 91: 441-453.
- IM, Intendencia Municipal de Montevideo. 2009-2015 Estudio de la calidad de agua, sedimento y biota del Río de la Plata. Tomado de: [www.montevideo.gub.uy/ambiente](http://www.montevideo.gub.uy/ambiente)
- Iida, C. & Shock, C. 2009. El dilema del fósforo. Técnicas para la agricultura sostenible. Oregon State University, 1-5.
- InBUy (Base de datos de Invasiones Biológicas para Uruguay). 2011. Consultada Noviembre 2016. [http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas\\_de\\_especies/DATAonline/DBASEonline/Cyprinus\\_carpio\\_w.pdf](http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas_de_especies/DATAonline/DBASEonline/Cyprinus_carpio_w.pdf)
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiological Pflanzen* 167, 191-194.
- Lamb, A. L., Wilson, G. P. & Leng, M. J. 2006. A review of coastal palaeoclimate and relative sea-level reconstructions using  $\delta^{13}\text{C}$  and C/N ratios in organic material. *Earth-Science Reviews* 75, 29–57.

- Jin, S. W., Wang, J., Wu, M. L. & Zhu, S. D. 2006. The Effects of Domestic Sewage on the Micronucleus and Abnormal Nucleus of Red Cell of Tadpoles .Jiangsu Environmental Science and Technology, 4: 1.
- Koppe, C. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomicina c and various pesticides. Mutation Research, 518: 145-150.
- Kuniyoshi, L. & Braga, E.2010.Cytogenetic disruption in fishes as bioindicator of the environmental quality in two estuarines systems under different exposition to anthropogenic influeneces. Safety, Health and Environment World Congress.São Paulo, Brazil. 4pp
- Lalli C.M. & Parsons T.R. 1997.Biological Oceanography: An introduction. Pergamon Press. 301 pp
- Leonzio, C. 2002. Evaluación y monitoreo de la contaminación acuática: bases científicas y casos de estudio. Contaminación química y bioindicadores. Centro de ciencias ambientales Eula-Chile. Universidad de concepción. 10 pp
- Lee, F. & Steinert, R. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 544 (1): 43-64.
- Ley J.A. 2005.Linking fish assemblages and attributes of mangrove estuaries in tropical Australia: criteria for regional marine reserves. Marine Ecology Progress Series, 305: 41-57.
- Li, G., Sang, N. & Zhao, Y. 2004. Micronuclei induced by municipal landfill leachate in mouse bone marrow cells in vivo. Environmental Research, 95(1): 77-81.
- Little C. 2000.The biology of soft shores and estuaries.Oxford University Press.252 pp.
- Matheus, T. & Bolaños, A.2014. Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Vol 18 N° 2
- Majone, F., Beltrame, C. & Brunetti, R. 1988. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. Mutation Research, 209: 131-134-
- McLusky, D. S., & Elliott, M. (2004). The estuarine ecosystem: ecology, threats, and management. Oxford, Oxford University Press.
- Meager J.J., Solbakken T., Utne-Palm A.C. & Oen T. 2005.Effects of turbidity on the reaction distance, search time and foraging success of juvenile Atlantic cod

- (*Gadusmorhua*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 62: 1978-1984.
- Menni, R. C., Ringuélet, R. A. & Aramburu, R. H. 1984. Peces marinos de la Argentina y Uruguay. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, 359 p.
- Metcalf, E.D. 1988. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes micronuclei of mud minnows *Umbra limi* and brown bullheads *Ictalurus nebulosus*. The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 40: 489-495.
- Missini, S., Ciccoti, E. & Rizzoni, M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbusplebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. Mutationresearch, 367: 245-251.
- Monserat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G. & Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146(1): 221-234
- Monteiro, M.I. C., F.N. Ferreira, N.M.M., de Oliveira & A.K. Ávila. 2003. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. Analytica Chemical Acta, 477: 125–129.
- Mudry, M. & Abrevaya, X. 2006. Evaluación de Aneugenicidad y Clastogenicidad. En: Genética Toxicológica, 1: 277-298.
- Mudry M. & Carballo M. 2006 Genética Toxicológica. Buenos Aires, Argentina: Ed. De Los 4 .Vientos.
- Muniz, P; Venturini, N; Rodríguez, M; Martínez, A; Lacerot, G. & Gómez, M.2000 Benthic communities in a highly polluted urban bay. In: Milón Delgado Paredes Paredes & Benavides (eds.). Ecología y Desarrollo Sostenible: Reto de América Latina para el Tercer Milenio. Arequipa, Perú. 274pp.
- Muniz, P., Venturini, N. & Martinez, A. 2002. Physico-chemical characteristics and pollutants of the benthic environment in the Montevideo coastal zone, Uruguay. Marine Pollution Bulletin 44 962–968
- Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., García-Alonso, J., Medina, G. & Bicego, M.C. 2004a. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). Environment International, 29: 1019-1028

- Muniz, P., Venturini, N. & Gómez-Erache, M. 2004b. Spatial distribution of chromium and lead in the benthic environment of coastal areas of the Río de la Plata estuary (Montevideo, Uruguay). *Brazilian Journal of Biology*, 64(1): 103-116.
- Muniz, P. & Venturini, N. 2005. Macrobenthic communities in a temperate urban estuary of high dominance and low diversity: Montevideo Bay (Uruguay). *Oceanoticias* 13.
- Muniz, P.; Venturini, N.; Pires-Vanin, A M S.; Tommasi, L R & Borja, A. 2005a. Testing the applicability of a Marine Biotic Index (AMBI) to assessing the ecological quality of soft bottom benthic communities, in the South America Atlantic region. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 624-637.
- Muniz, P.; Clemente, J. & Brugnoli, E. 2005b. Benthic invasive pests in Uruguay: a new problem or an old one recently perceived? *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1014-1018.
- Muniz, P., Venturini, N. & Burone, L. 2006. Contaminación de la bahía de Montevideo y zonas costeras adyacentes y su relación con los organismos bentónicos. En: Menafra, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D. (Eds.), *Bases para la conservación y el Manejo de la costa uruguaya*. *Vida Silvestre*, 467-476.
- Muniz, P., Venturini, N., Hutton, M., Kandratavicius, N., Pita, A., Brugnoli, E., Burone, L. & García-Rodríguez, F. 2011. Ecosystem health of Montevideo coastal zone: A multi approach using some different benthic indicators to improve a ten-year-ago assessment. *Journal of Sea Research* 65(2011), 38–50
- MVOTMA (Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente). Modificado 2012. Consultado Octubre 2016.  
<http://www.mvotma.gub.uy/ciudadania/item/10003601-decreto-253-079.html>
- Nersesyan, A.; Kundi, M.; Atefie, K.; Schulte-Hermann, R. & Knasmüller, S. 2006. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 15: 1835-1840.
- Newman, M. & Clements, W. 2008. *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*. CRC Press. 852 pp
- Newton A, Carruthers TJB & Icely J. 2012. The coastal syndromes and hotspots on the coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 96: 39-47.
- Nichols, F. H., Cloern, J. E., Luoma, S. N. & Peterson, D. H. 1986. The modification of an estuary. *Science*, 231(4738): 567-573.
- Nicolas D., Lobry J.L., Lepage M., Sautour B., LePape O., Cabral H., Uriarte A. & Boët P. 2010. Fish under influence: A macroecological analysis of relations between fish

- species richness and environmental gradients among European tidal estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86 (1): 137-147.
- Nigro M, Falleni A, Del Barga I, Scarcelli V, Lucchesi P, Regoli F & Frenzilli G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*. 77: 339–347.
- Norbis W., Russo R., Verocai J. Olsson D., Scarani M., Delbene L. & Demicheli A., 2009. Características de la estructura de tamaños dinámica temporal de las comunidades de peces en un reservorio de agua utilizada para la refrigeración de procesos industriales en la refinería de ANCAP. Informe final. Proyectos de vinculación ANCAP-UR. Pag:5-6
- Obiakor M. O., Okonkwo J., Nnabude P. & Ezeonyejiaku C. 2012. Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as in situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *Journal of Animal Science Advances*, 2(1): 123-130.
- Okonkwo, J.C., Obiakor, M.O. & Nabude, P.C. 2011. Micronuclei profile: an index of chromosomal aberrations in freshwater fishes (*synodontis clarias* and *tilapia nilotica*). *Journal of Animal and Feed Research*, 1(1): 40-45.
- Pease B.C. 1999. A spatially oriented analysis of estuaries and their associated commercial fisheries in New South Wales, Australia. *Fisheries Research*, 42: 67-86.
- Pepe, U. D. 2003. Tratamiento alternativo de efluentes cloacales individuales. Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente, 13: 1-31.
- Perissinotto, R. 2010. Temporarily open/closed estuaries in South Africa. Nova Science Publishers. 142 pp.
- Porto, J. I., Araujo, C. S. & Feldberg, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97(3): 287-292.
- Potter I.C., Beckley L.E., Whitfield A.K. & Lenanton R.C.J. 1990. Comparisons between the roles played by estuaries in the lifecycles of fishes in temperate Western Australia and southern Africa. *Environmental Biology of Fishes*, 28: 143- 178.
- Potter I.C. & Hyndes G.A. 1999. Characteristics of the ichthyofauna of southwestern Australian estuaries, including comparisons with holarctic estuaries and estuaries elsewhere in temperate Australia: a review. *Australian Journal of Ecology*, 24: 395-421.

- Pradipta, S., 2012. Micronucleus assay: a sensitive indicator for aquatic pollution. Department of Zoology, Indira Memorial College, Chandiput, Gajapati, (Odisha), India. *International Journal of Research in BioSciences* .Vol. 1 Issue 2, pp. (32-37),
- Presidencia de la República Oriental del Uruguay. 2015. Comunicación. Noticias. Consultado, Setiembre 2016. <https://www.presidencia.gub.uy/comunicacion/comunicacionnoticias/direccion-de-recursos-acuaticos-considero-que-falta-de-oxigeno-provoco-mortandad-de-peces>
- Ribeiro, L., Salvadori, D. & Marques, E.. 2003. Mutagénesis ambiental. Canoas: Ed.1. ULBRA.P.203
- Ringuelet, R. A., Aramburu, R. H. & de Aramburu, A. A. 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigación Científica. La Plata, 602 p.
- Rodriguez-Gallego, L. 2011. Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: impacto y optimización de los usos del suelo. Tesis de Doctorado. PEDECIBA.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus tests. *Mutation Research*, 31:9–15
- Serra, S., Bessonart, J., Teixeira de Mello, F., Duarte, A., Malabarba, L. & Loureiro, M. 2014. Peces del Río Negro. Montevideo, MGAP-DINARA, 101pp.
- Shoup D.E. & Wahl D.H. 2009. The effect of turbidity on prey selection by piscivorous largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 138: 1018-1027.
- Silva, J.; Ramírez, L.; Alfieri, A.; Rivas, G. & Sánchez, M. 2004. Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24(1-2): 46-49. ISSN 1315-2556
- Smith, V.H., Joye, S.B. & Howarth, R.W. 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystem. *Limnology and Oceanography* 51, 351–355.
- Smol, J. 2007. Marine sediments tell it like it was. *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS* 104(45), 17563–17564.
- Souza, T. & Fontanelli, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents. *Mutation Research*, 605: 87-93
- Spiro, T. & Stigliani, W. 2004. *Química medioambiental*. Ed. Pearson. 2° ed. 520 pp
- Stebniki, S. 2014. Hábitos tróficos de cuatro especies de peces en los estuarios Pando, Solis Chico y Solis Grande (Dpto. Canelones, Uruguay). Informe Pasantía. UdelaR.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada 167, 2nd Edition.

- Talapatra, S.N., & Banerjee, S.K. 2007. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of (*Labeobata*) cultivated in sewage-fed fish farms. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 210-215.
- Teixeira de Mello, F., González-Bergonzoni, I. & Loureiro, M. 2011. Peces de agua dulce del Uruguay. PPR-MGAP. 80 pp.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L. & Genescá, A. 2010. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Universitat Autònoma de Barcelona, España. Review. Pp:61.*
- Torres-Bugarin, O., Buelna-Osben, H.R., Flores-Kehn, L.P., Ramos-Ibarra, M.L., Zúñiga-González, G. & Ogura, T. 2010. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities by cyclophosphamide and colchicine in *Xenoto camelanosoma* (Pisces, Goodeidae) from Lake La Alberca in Michoacán, México. *Journal of Environmental Science and Health, Part A 45: 75–81*
- Tudurí, A. 2012. Evaluación de la eutrofización en la Bahía de Montevideo: situación actual y aproximación histórica. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias, UdelaR.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total N and total P in natural Waters. *Marine Chemistry* 10, 109-122.
- Venturini, N., Muniz, P. & Rodríguez, M. 2004. Macrobenthic subtidal communities in relation to sediment pollution: the phylum-level meta-analysis approach in a south-eastern coastal region of South America. *Marine Biology*, 144: 119–126.
- Vernier, P., Maron, S. & Canova, S. 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzol [a] pyrene. *Mutation Research*, 390: 33-44.
- Viana, F. 2001. Metales pesados en peces de la costa de Montevideo y Piriápolis (Uruguay). Tesis de Maestría en Biología, Opción Zoología. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Vilchez, H. 2010. Manual de Prácticas de Microbiología. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Perú. Pp. 101.
- Villar, S., Kandratavicius, N., Martínez S. & Muniz, P. 2015. Single cell gel electrophoresis as a tool to assess genetic damage in *Heleobia cf. australis* (Mollusca: Gastropoda) as sentinel for industrial and domestic pollution in Montevideo bay (Uruguay). *Facultad de Ciencias, UdelaR. Brazilian Journal of Oceanography*, 63(3):347-354;2015

- Wasserman R.J. & Strydom N.A. 2011. The importance of estuary head waters as nursery areas for young estuary- and marine-spawned fishes in temperate South Africa. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94: 56-67.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zhu, L., Huang, Y.& Liu, G.,2005.Using DNA damage to monitor water environment *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. Vol. 23, No. 3,P. 340-348, 2005.

ANEXO

Figura 1. Especies estudiadas en el presente trabajo, en (A) *Brevoortia aurea* y (B) *Cyprinus carpio*

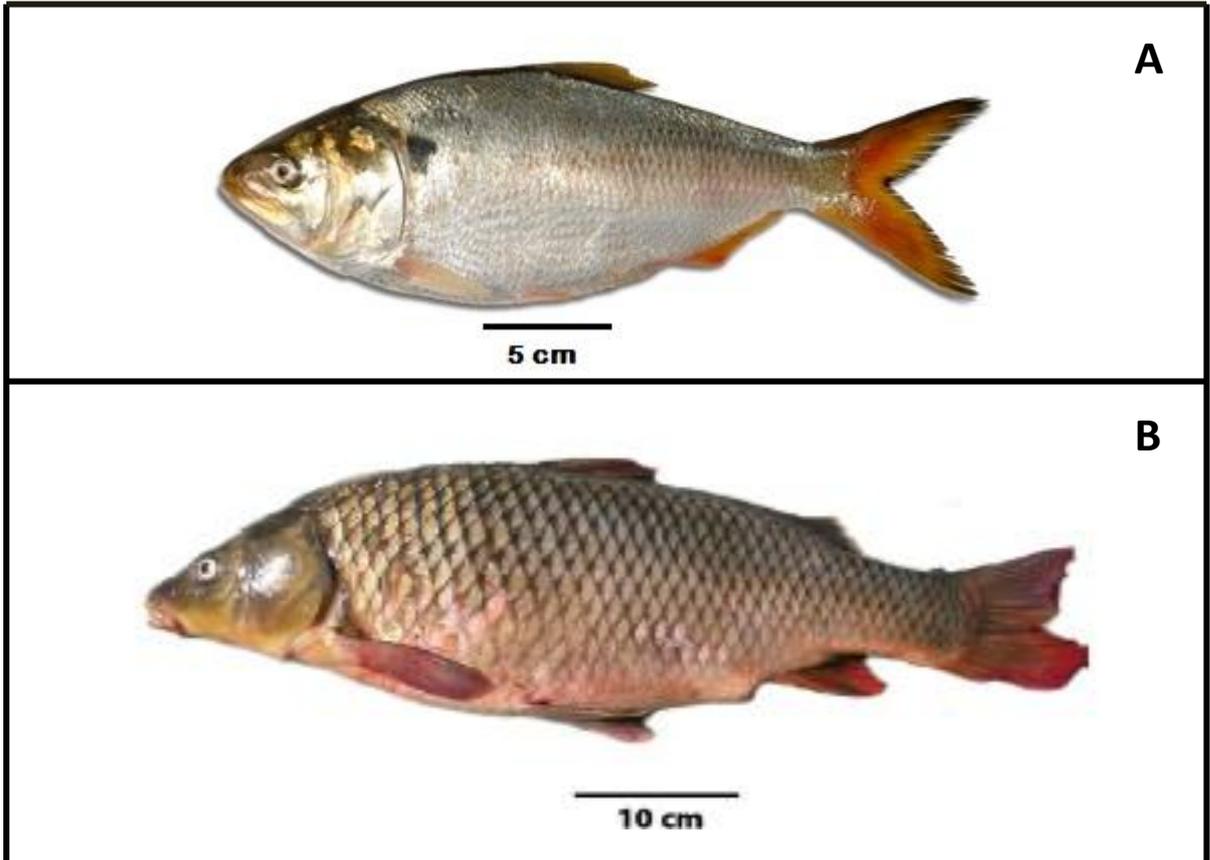


Tabla 1. Contenido de Nitrógeno total y Fósforo total en sedimento correspondiente a Bueno (2012)<sup>†</sup>, Tudurí (2012)<sup>\*\*</sup> y al presente estudio durante Invierno (I), Primavera (P) y Verano (V): (NT= Nitrógeno total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ); PT= fósforo total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ); sed= sedimento).

	NT sed ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	PT sed ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
I	1388 1388 <sup>**</sup>	1106.1 910 <sup>**</sup>
P	1324.2	698.2
V	3341.9	1459.2