



Micronúcleos en peces como indicadores de calidad ambiental en estuarios de la costa uruguaya

Juan Manuel Gutiérrez

Orientadores:

Dra. Alicia Acuña¹

Dra. Silvia Villar²

¹Unidad de Oceanografía y Ecología Marina

²Microscopia Electrónica y EDS (Facultad de Ciencias, UDELAR)

Montevideo, Uruguay

2013

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Toxicología acuática.....	5
Genotoxicidad.....	6
Ensayo de micronúcleos.....	7
Sistemas estuariales.....	10
Antecedentes del área de estudio.....	11
Especies objeto de estudio.....	12
Objetivos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Área de estudio.....	16
Obtención de muestras.....	17
Análisis de laboratorio.....	17
Tratamiento de los datos.....	19
RESULTADOS.....	20
Estudio espacial: Pando Solís Chico y Solís Grande.....	20
Estudio temporal: Pando.....	24
Diferencias interespecíficas.....	28
DISCUSIÓN.....	29
Estudio espacial: Pando Solís Chico y Solís Grande.....	29
Estudio temporal: Pando.....	32
Susceptibilidad diferencial entre las especies.....	34
CONCLUSIONES.....	37
Consideraciones finales.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXO I.....	57
ANEXO II.....	58
ANEXO III.....	60
ANEXO IV.....	61

RESUMEN

La contaminación de los ecosistemas acuáticos puede provocar la pérdida de biodiversidad y abundancia de las especies. La necesidad de evaluar y detectar el impacto de las actividades antrópicas sobre los organismos y su ecosistema, induce a considerar el uso de bioindicadores. En estos organismos centinela se pueden analizar las variaciones inducidas por los contaminantes de origen urbano, agrícola o industrial. En este contexto el objetivo del estudio es evaluar el nivel de daño genético de cuatro especies de peces (*Micropogonias furnieri*, *Paralichthys orbignyanus*, *Mugil Platanus* y *Odontesthes argentinensis*), en tres estuarios (Pando, Solís Chico y Solís Grande) del Departamento de Canelones, Uruguay a través del uso del ensayo de Micronúcleos (MN) en eritrocitos periféricos, durante el período de un año. Dicho ensayo consiste en la determinación de alteraciones genéticas, debidas a la presencia de contaminantes, los cuales generan errores en la segregación de los cromosomas o de la ruptura de ellos durante la división celular, dando lugar a la formación de MN. El conocimiento de la calidad ambiental de estos tres estuarios, es de gran importancia, debido a que un gran número de especies de peces, utilizan dichos estuarios como área de cría. Los resultados de este estudio mostraron diferencias en los niveles de daño genético entre los tres estuarios. El estuario Pando presentó los mayores niveles de daño genético en todas las especies. Estos altos niveles de daño genético podría deberse al mayor impacto antropogénico que presenta dicho estuario, destacándose el vertido de efluentes industriales y cloacales. Los estuarios Solís Chico y Solís Grande presentaron menores niveles de daño genético, indicando una mejor calidad ambiental. Dentro del estuario Pando, el daño genético no se correlacionó con ninguna variable ambiental analizada a lo largo del año, lo cual sugiere que dichos niveles estarían relacionados con otros factores (antropogénicos, por ejemplo). Las especies analizadas en este estuario, no presentaron diferencias significativas en sus niveles de daño genético, mostrando similitudes en su vulnerabilidad. Los resultados obtenidos en esta investigación representan el primer estudio de calidad ambiental, a través de bioindicadores genéticos en peces para estos tres estuarios, generado una línea de base para futuras investigaciones.

Palabras clave: micronúcleos, daño genético, bioindicadores, contaminación acuática, estuarios.

INTRODUCCIÓN

Toxicología acuática

Una gran cantidad de compuestos tóxicos, de origen natural y antrópico, llegan a los ecosistemas acuáticos, donde son absorbidos, acumulados, biotransformados por procesos biológicos y/o químicos. Estos compuestos disueltos o dispersos en el agua, ingresan a los organismos acuáticos a través de las branquias, la piel y/o el tracto digestivo. Una vez dentro del organismo, estas sustancias tóxicas interactúan en diversos procesos fisiológicos y rutas metabólicas (Vanzella *et al.*, 2007).

Se pueden definir dos tipos de contaminación: i. Contaminación puntual o localizada, donde los contaminantes ingresan de forma directa a los cursos acuáticos (típica de efluentes urbanos e industriales) y ii. Contaminación difusa o no localizada, donde no existe un punto claro de ingreso al curso de agua (típicamente la producida por actividades agrícolas). En el primer caso, las fuentes son fáciles de identificar, monitorear y regular, pero producen un alto impacto sobre el sitio inmediato que recibe la descarga. En el segundo caso, los contaminantes (pesticidas, fertilizantes y otros químicos asociados) generalmente son arrastrados por lixiviado y escorrentía, del medio terrestre al medio acuático. Los impactos producidos por estos dos tipos de fuentes, van a depender de las características propias de los contaminantes, su periodicidad de descarga y el tipo de ambiente donde son vertidos (FAO, 1997). El ambiente puede ejercer funciones de filtración, descomposición, neutralización o almacenamiento de ciertos contaminantes. De esta manera puede reducir en determinado grado, la disponibilidad del contaminante en el medio, disminuyendo así su efecto nocivo en los organismos. Pero también puede provocar acumulación de contaminantes como metales pesados unidos a partículas del sedimento que quedan biodisponibles por cambios en parámetros físico-químicos. (Newman & Clements, 2008).

Los bioindicadores u organismos centinela, permiten estudiar los efectos de los contaminantes en el ecosistema, a través de una serie de respuestas moduladas e integrables, las cuales posibilitan evaluar el bienestar del individuo, de la población y de la comunidad. Por bioindicadores se

entienden todos aquellos 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, etc.) (Leonzio, 2002; Monserrat *et al.*, 2007). La información que proporcionan los organismos centinela, es el resultado de la exposición aguda o acumulativa de los diversos contaminantes en el ambiente. Se puede evaluar el impacto sobre los organismos a lo largo de un periodo de tiempo. A diferencia de los estudios físico-químicos tradicionales, los cuales brindan una información puntual en el tiempo, que identifica los contaminantes presentes en el ambiente. Ambos estudios pueden ser complementarios (Butterworth, 1995; Da Silva *et al.*, 2003).

Los peces son considerados buenos bioindicadores de la calidad del ecosistema acuático ya que ocupan diferentes niveles de la cadena trófica, bioacumulan sustancias tóxicas y reaccionan fácilmente a bajas concentraciones de agentes contaminantes (Minissi *et al.*, 1996; Gustavino *et al.*, 2001). La elección de las especies como bioindicadoras dependerá del conocimiento del contaminante del medio acuático (si se deposita en el sedimento o si se mantiene en la columna de agua), como también de la biología del comportamiento del animal (tipo de alimentación, posición en la columna de agua, movilidad, entre otros) (Torres-Bugarin *et al.*, 2007).

Las propiedades químicas de los xenobióticos, así como la capacidad de los peces para absorberlos, ingerirlos y metabolizarlos determinarán la importancia de las alteraciones o el grado de daño causado (Buchwalter *et al.*, 2003; Zavala-Aguirre *et al.*, 2010). Algunas especies de peces que están en niveles tróficos superiores (por ej. carnívoros) presentan mayores concentraciones de ciertos contaminantes y están potencialmente en mayor riesgo que otros de niveles inferiores (proceso de biomagnificación) (Porto *et al.*, 2005; Lee & Steinert, 2003). En general, la persistencia de un contaminante en el ambiente determina la peligrosidad del mismo.

Genotoxicidad

Dentro de los contaminantes que pueden ingresar a los ecosistemas acuáticos, se encuentran los agentes genotóxicos. Dicho agentes actúan directa o indirectamente sobre el material genético (ADN) y producen efectos detectables a concentraciones subletales (Koppe, 2002). Existen

diversos tipos y fuentes de contaminación que contienen agentes genotóxicos, varios de ellos relacionados con las actividades productivas del hombre (efluentes industriales, cloacales, actividades agrícolas, entre otras).

La concentración de estos agentes en el ambiente, su vía de entrada al organismo, así como la susceptibilidad y la capacidad de reparación del organismo, determinaran en última instancia, el grado de daño genético producido (Lee & Steinert, 2003). Dicho daño puede iniciar una cascada de consecuencias biológicas en células específicas, en tejidos u órganos albo, en el organismo completo (afectando su sobrevivencia o su capacidad reproductiva) y finalmente en la población o en la comunidad, dependiendo de si el daño ocurre en células somáticas o germinales (Zhu *et al.*, 2005). En una variedad de animales acuáticos, las alteraciones genéticas, están asociadas a la reducción del crecimiento corporal, desarrollo anormal del mismo, disminución de la sobrevivencia en embriones, larvas y adultos (Lee & Steinert, 2003).

Ensayo de micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son indicadores de daño cromosómico que se originan durante la división celular, tanto por fragmentos acéntricos o cromosomas que no se incorporan en los núcleos hijos (ANEXO I). 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, provocados por la acción de agentes genotóxicos (Mudry & Abrevaya, 2006; Ghisi *et al.*, 2011; Obiakor *et al.*, 2012). También pueden surgir debido a la interacción de agentes químicos, físicos o biológicos con estructuras genómicas, que promueven disturbios en la maquinaria mitótica y falla en la segregación cromosómica, originándose así, uno o varios MN por célula (Schimid, 1975; Rabello-Gay, 1991; Al-Sabti, 1995; Fenech, 2000; Souza & Fontanelli, 2006).

El ensayo de MN fue desarrollado por Schmid (1975), el cual permite analizar la frecuencia de MN en sangre periférica de roedores, luego Hooftman & Raat (1982) adaptaron esta técnica para trabajar con peces en laboratorio. Son muchos los estudios posteriores que se han hecho utilizando el ensayo de MN para detectar los efectos de la exposición crónica a sustancias

químicas mutagénicas y cancerígenas en peces (Manna & Sadhukhan, 1986; Majone *et al.*, 1988; Missini & Lombi, 1997; Campana *et al.*, 1999; Gustavino *et al.*, 2001; Grisolia & Starling, 2001; Flores-Kehn *et al.*, 2008). Esta técnica también puede ser utilizada directamente en un ecosistema, como indicador biológico de contaminación en peces (Missini *et al.*, 1996; Ateeq *et al.*, 2002), donde se pueden analizar los efectos mutagénicos de sustancias como mercurio, nitrito, arsénico y otros agentes clastogénicos (Matsumoto & Cólus, 2000; Grisolia & Cordeiro, 2000; Lemos *et al.*, 2001; Prieto Garcia *et al.*, 2008; Reis-Henriques *et al.*, 2009).

El aumento en los vertidos de efluentes industriales y domésticos, en ambientes acuáticos (producto del aumento poblacional) provoca la exposición de los organismos acuáticos a una alta concentración de compuestos genotóxicos. Una amplia variedad de compuestos sintéticos se han incrementado y dispersado en todos los hábitats. Entre ellos, los metales pesados y los poluentes orgánicos persistentes (COPs) tales como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) tienen severos efectos ambientales, dada su gran movilidad ambiental. Varios autores, han reportado el potencial genotóxico de estas sustancias químicas, como es el caso del cobre que induce estrés oxidativo, provocando la formación de MN (Guecheva *et al.*, 2001; Arkhipchuk & Garanko, 2005).

La evaluación genotóxica de ambientes acuáticos es un mecanismo clave para transformar el principio de desarrollo sostenible en medidas concretas. Los agentes genotóxicos se asocian a la ocurrencia de mutaciones génicas o cromosómicas, proliferación de células cuyos mecanismos de control se encuentran dañados (carcinogénesis), desarrollo de malformaciones (teratogénesis) y alteraciones en los mecanismos de reparación del material genético (Obiakor *et al.*, 2012).

El ensayo de MN representa una aproximación apropiada y suficiente ya que permite coleccionar varias muestras de diferentes especies y sitios, sin necesidad de sacrificar a los organismos (Monserrat *et al.*, 2007; Bolognesi & Hayashi, 2011). El ensayo es una técnica validada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA o USEPA por sus siglas en inglés), organismo de referencia para poluentes y agentes contaminantes ambientales. Su importancia fundamental radica en que es un marcador de efecto de los contaminantes y permite tomar medidas tempranas de manejo, a niveles subletales de agentes tóxicos (Obiakor *et al.*, 2012).

Los MN pueden ser fácilmente detectados en microscopio óptico o de fluorescencia. Para ello, 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 (Adams 2002) 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.

El ensayo de MN aplicado al biomonitoreo de contaminantes resulta ser una herramienta de gran practicidad en los estudios de mutagénesis ambiental (Koppe, 2002). Dado el alto costo de muchos análisis físico-químicos, los cuales, 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. En innumerables casos, los tóxicos, no pueden ser detectados en las diferentes matrices (suelo, agua, sedimentos), sin embargo, sus efectos pueden medirse en los organismos (Mudry & Carballo, 2006). Este test es ampliamente usado en organismos acuáticos tales como moluscos bivalvos (*Mytilus galloprovincialis*), (*Crassostrea gigas* y *Chamelea galina*), en anfibios (*Rana perezi*), peces como la trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*), Salmoniformes (*Umbra pigmaea*), carpa (*Carassius auratus gibelio*) y tilapias (*Oreochromis mossambica*) (Hoofman & Raat, 1982; Hose *et al.*, 1987; Metcalfe, 1988; Brunetti, *et al.*, 1988; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Vernier *et al.*, 1997; Koppe, 2002 ; Okonkwo *et al.*, 2009).

Este ensayo se puede adaptar fácilmente para hacer estudios *in situ* de calidad ambiental. Es importante tener en cuenta que muchos factores biológicos pueden influenciar las respuestas genotóxicas en peces. Estos factores pueden ser: especie, edad, sexo, estatus reproductivo, salud, temperatura del agua, entre otros, ya que juegan un rol importante en la expresión de efectos genotóxicos en peces (Al Sabti & Metcalfe, 1995; Hayashi *et al.* 1998; Arcand-Hoy & Metcalfe, 2000), por eso, se deben tener en cuenta a la hora de correlacionar los efectos cuantificados por

marcadores de daño como los MN, con otras variables como pH, temperatura, oxígeno disuelto, tallas, etc.

En resumen, la utilización del ensayo de MN aplicada en peces, ofrece varios tipos de información única, no obtenible a través de otros métodos:

- ✓ Detección precoz de peligro y o daño ambiental.
- ✓ Detección del efecto integrado de una variedad de estresores ambientales sobre la salud de un organismo, una población, una comunidad o un ecosistema.
- ✓ Determinación de las relaciones entre las respuestas individuales de los organismos expuestos a la contaminación y los efectos a nivel poblacional.
- ✓ Desarrollo de medidas tempranas de protección sanitaria y ambiental de la vida silvestre y humana.
- ✓ Control de la efectividad de los esfuerzos de biorremediación ambiental (Villela *et al.*, 2006).

Sistemas estuariales

Los ecosistemas estuariales son sistemas complejos, donde se puede observar una marcada heterogeneidad ambiental debido a la interacción de aguas continentales y marinas. Estos ecosistemas generalmente presentan una alta productividad, un alto grado de estrés ambiental (debido fundamentalmente al pronunciado gradiente de salinidad) y una baja diversidad, donde la riqueza y la abundancia de especies pueden ser fuertemente 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).

Se han definido a los estuarios como importantes áreas de cría para numerosas especies de peces, principalmente de origen marino (Potter *et al.* 1990; McLusky & Elliott, 2004). Los beneficios de los estuarios como áreas de cría pueden ser atribuidos a la mayor temperatura de las aguas adyacentes (crecimiento más acelerado y menor susceptibilidad a la predación) (Wasserman & Strydom, 2011), la 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). Los ambientes estuariales representan un recurso ecológico y económico de gran importancia, ya que permiten el desarrollo de varias especies de peces, muchas de ellas de interés pesquero (McLusky & Elliott, 2004).

El desarrollo de actividades productivas, como producción agrícola, descargas de efluentes industriales y domésticos entre otras, aguas arriba de los estuarios, modifican las condiciones fisicoquímicas y biológicas de estos sistemas acuáticos. Estas modificaciones alteran la calidad del agua, disminuyendo los beneficios que los estuarios brindan a los peces (Nichols, *et al.*, 1986; Perissinotto *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

Antecedentes del área de estudio

En la zona costera de Canelones, Uruguay, se encuentran tres estuarios, producto de la desembocadura de tres arroyos: Pando, Solís Chico y Solís Grande. Dichos estuarios poseen características naturales similares, presentando similitudes en los hábitats asociados y algunas variaciones en sus caudales, formas y tamaños de sus cuencas (Centro Interdisciplinario para el Manejo Costero Integrado del Cono Sur, 2011). La actividad antrópica asociada a las cuencas de estos tres arroyos, se diferencia marcadamente, presentando diferentes niveles de urbanización y de tamaño poblacional, así como las actividades productivas asociadas a las mismas (FREPLATA, 2004; INE, 2009).

El estuario del Solís Grande se encuentra en la zona estuarina externa (Defeo *et al.*, 2009), presenta el caudal más importante de la ecoregión (Gomez-Erache *et al.*, 2000) y puede considerarse como moderadamente impactada (Geo Canelones, 2009). Los estuarios del Pando y Solís Chico se encuentran la zona estuarina interna (Defeo *et al.*, 2009). La cuenca del arroyo Pando registra un aumento en la población humana en los últimos años (INE, 2011), acompañado de un desarrollo urbano, lo cual podría generar una disminución de la calidad de las aguas estos estuarios.

Las actividades productivas asociadas a las cuencas de los arroyos Solís Chico y Solís Grande son fundamentalmente agrícolas, ganaderas y forestales (Geo Canelones, 2009; Centro Interdisciplinario para el Manejo Costero Integrado del Cono Sur, 2011). No se registran actividad industrial en la cuenca de estos dos arroyos, como tampoco centros urbanos de gran nivel demográfico (Goyenola *et al.*, 2011).

La cuenca del Arroyo Pando es la que presenta los valores demográficos más altos de las tres (INE, 2011), con la ubicación de la ciudad de Pando a orillas del mismo arroyo, a unos 10 Km de la desembocadura. Dicha ciudad presenta un elevado grado de urbanización y una actividad industrial importante, presentando varias fábricas que vierten sus efluentes al arroyo. Los emprendimientos corresponden a diferentes ramas: cárnica, papel, bitumen, curtiembres, química, tratamientos cloacales, entre otras (ANEXO II) (SADI, 2013).

Más próximo a la desembocadura del Arroyo Pando, en la localidad de Pinar Norte, se encuentran las piletas de aguas residuales domésticas, donde se vierten a través del sistema de barométricas, los desechos domésticos de la mayor parte de los hogares del Departamento de Canelones (Geo Canelones, 2009; Goyenola *et al.*, 2011).

En la cuenca del arroyo Pando se registra una alta actividad agropecuaria, con una elevada concentración de animales, los cuales generan una importante cantidad de residuos con gran carga orgánica. Algunos establecimientos cuentan con sistemas de tratamiento pero en general están mal mantenidos y no funcionan correctamente (ECOPLATA, 2003; Geo Canelones, 2009; Goyenola *et al.*, 2011).

Especies objeto de estudio

La elección de las especies a estudiar fue determinada por varios factores. Uno de ellos es la abundancia de organismos en las diferentes especies en cada arroyo. Al hacer un análisis comparativo a lo largo de un año, es necesario coleccionar un número mínimo de individuos por especie, por estación y por arroyo. Por esta razón se trabajó con las especies más abundantes y representativas de estos estuarios. Al mismo tiempo las especies a analizar, deben ser residentes

del estuario (en al menos una etapa de su vida), para impedir que los individuos se alejen del área de estudio y eviten así otras potenciales fuentes de contaminación. Por este motivo se trabajó con juveniles de las especies más abundantes para asegurar su residencia en los estuarios (Canavese, 2007; Acuña *et al.*, 2010). Por otro lado, es importante que las especies se diferencien en su nivel trófico, para poder evaluar la relación entre el hábito trófico y el grado de daño genético.

De acuerdo a todo lo mencionado las especies seleccionadas fueron: corvina, lenguado, lisa y pejerrey. Estas cuatro especies también son recursos pesqueros de interés comercial (Fischer *et al.*, 2004; Norbis & Verocai, 2005; López Cazorla, 2005; Bemvenuti, 2006).

Micropogonias furnieri (corvina)

Es una especie eurihalina demersal costera, la cual tiene una amplia distribución y es abundante en el Río de la Plata (Fischer *et al.*, 2004; Norbis & Verocai, 2005; Gilberto *et al.*, 2007). La corvina utiliza los ambientes estuarinos como zonas de desarrollo, donde sus las larvas y juveniles encuentran refugio y alimento, beneficiándose de la productividad del área (Fischer *et al.*, 2004; Acuña *et al.*, 2010). Es una especie muy estudiada, utilizada en varios estudios como bioindicadora (Amado *et al.*, 2006; Monserrat *et al.*, 2007; Kuniyoshi *et al.*, 2010). Los juveniles alcanzan tallas máximas de entre 19,8 cm y 32,2 cm (Vizziano *et al.*, 2002; Militelli & Rodrigues 2011) y se alimentan principalmente de organismos con hábitos bentónicos como crustáceos, moluscos y poliquetos (Fischer *et al.*, 2004; Canavese, 2007; Gilberto *et al.*, 2007).

Paralichthys orbignyanus (lenguado)

Es una especie costera, eurihalina, euriterma, con preferencia por ambientes de baja salinidad (Sampaio & Bianchini, 2002; López Cazorla, 2005). Los juveniles se alimenta principalmente de larvas de poliquetos, de crustáceos y de moluscos (López Cazorla & Forte, 2005) y alcanzan tallas máximas de unos 32 cm (Vazzoler *et al.*, 1996). Su hábito bentónico y su estrecha asociación con el sustrato, hacen que el lenguado sea un excelente bioindicador, ya que en el sustrato se depositan la mayor parte de las sustancias genotóxicas (Besten & Munawar, 2005; Amado *et al.*, 2006)

Mugil platanus (lisa)

Es una especie pelágica costera, vive en aguas tropicales y subtropicales. Habita tanto en el agua dulce como en ambientes estuarinos donde es encontrada en gran abundancia (Fischer *et al.*, 2004; Cousseau *et al.*, 2005). Los juveniles se desarrollan en áreas estuarinas, alcanzando tallas de entre 28 cm y 41,2 y luego migran hacia el océano para desovar (Fischer *et al.*, 2004; Esper *et al.* 2001). Esta especie es un buen bioindicador por su tipo de alimentación, la cual es principalmente de material de detritos y vegetal obtenidos de ambientes bentónicos (Andrade *et al.*, 2004; González Castro *et al.*, 2009; Moreira, 2010).

Odontesthes argentinensis (pejerrey)

Es una especie que vive en la superficie de aguas costeras oceánicas y de estuarios, como también en lagunas salobres y manglares (Bemvenuti, 2006). Es una especie estuarina residente, desarrollando todo su ciclo dentro del estuario (Chao *et al.*, 1985). Se ha utilizado a *O. argentinensis* como especies bioindicadora (Carriquiriborde & Ronco, 2006; Gusmão, 2009; Gusmão *et al.*, 2012). Los juveniles alcanzan tallas de unos 13,5 cm y muestran una preferencia alimenticia sobre el zooplancton, mientras que los adultos prefieren presas bentónicas (Bemvenuti, 1990, 2006; Canavese, 2007).

Hipótesis de trabajo

Los estuarios Pando, Solís Chico y Solís Grande presentan diferentes niveles de impacto ambiental: nivel de urbanización, así como tipo y cantidad de desechos que se vierten en los arroyos. La amplitud de este impacto ambiental se reflejará en el grado de daño genético en los peces medido por el test de MN. Se espera encontrar mayor nivel de daño genético en el estuario Pando, en comparación con los otros dos.

Objetivo general

Evaluar el daño genético en las especies de corvina, lenguado, lisa y pejerrey que habitan los estuarios de los arroyos Pando, Solís Chico y Solís Grande a través del ensayo de MN, relacionando los resultados con los niveles de urbanización y las actividades productivas asociadas a sus cuencas.

Objetivos específicos

-Determinar el porcentaje de eritrocitos micronucleados (EMN) y de MN totales en las especies corvina, lenguado, lisa y pejerrey de los tres estuarios.

- Analizar el vínculo entre las variables ambientales y el nivel de daño genético en las diferentes especies.

-Evaluar la variación del daño genético en los peces a lo largo del tiempo.

-Analizar las diferencias en el daño genético entre las especies, con el fin de evaluar la vulnerabilidad de cada especie.

- Realizar una evaluación de los resultados a los efectos de contribuir a valorizar en forma primaria si existen diferencias en los niveles de calidad ambiental en los tres arroyos, en relación a las variables mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La zona de estudio se ubica en la costa de Canelones, más precisamente en la desembocadura de los Arroyos: Pando ($34^{\circ}47' \text{ S}$, $55^{\circ}51' \text{ O}$), Solís Chico ($34^{\circ}45' \text{ S}$, $55^{\circ}41' \text{ O}$) y Solís Grande ($34^{\circ}22' \text{ S}$, $55^{\circ}33' \text{ O}$) (Figura 1). La cuenca y el caudal de los arroyos Pando y Solís Chico presentan tamaños similares, abarcando una superficie de 831 km^2 y un caudal medio de $6,44 \text{ m}^3/\text{s}$ para el Pando y 659 km^2 y $5,4 \text{ m}^3/\text{s}$ para el Solís Chico. Ambos presentan una longitud similar de unos 47 km . La cuenca del Solís Grande es la mayor de los tres, con una superficie de 1354 km^2 , un caudal medio de $9,6 \text{ m}^3/\text{s}$ y un largo de 71 km (Lasta *et al.*, 2005).



Figura 1: Ubicación geográfica de los estuarios Pando, Solís Chico y Solís Grande.

Se han registrado la presencia de 27 especies de peces dulceacuícolas, eurihalinas y marinas par el estuario del Pando (Richly *et al.*, 2003; Richly *et al.*, 2005). Donde la especie más abundante fue *M. furnieri* seguida por *M. platanus* y *P. orbignyanus*. A través de estudios de histología gonadal y de composición de tallas determinaron que el estuario del Pando constituye un área de

cría, regulada principalmente por la salinidad (Richly *et al.*, 2005; Acuña *et al.*, 2010). En el estuario Solís Grande habitan especies residentes, migratorias y visitantes marinos, donde la salinidad es principal regulador temporal de las especies (Gurdek *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011). No se han publicado estudios sobre la ictiofauna del estuario Solís Chico.

Obtención de las muestras

Se efectuaron cinco muestreos: Octubre de 2011 (Temporada I), Mayo de 2012 (Temporada II), Setiembre de 2012 (Temporada III), Noviembre de 2012 (Temporada IV) y Febrero del 2013 (Temporada V), abarcando así las cuatro estaciones del año, en los tres estuarios.

Los peces fueron capturados mediante una maniobra de pesca, utilizando un bote a remo y una red de arrastre camaronera de 12 metros de largo y 2 metros de ancho, con un copo de 6 metros de largo y una apertura de malla de 12 milímetros.

Los individuos colectados se identificaron con claves específicas (Menni *et al.*, 1984; Figueiredo & Menezes, 2000).

En el campo se tomaron datos de temperatura, salinidad, conductividad, concentración y porcentaje de oxígeno disuelto, en superficie y fondo con un equipo multiparámetro Ysi Pro-plus.

Análisis en el laboratorio

Una vez en el laboratorio, los individuos fueron pesados con una balanza electrónica y mediante un ictiomómetro se registró el largo total. Inmediatamente después se extrajo una gota de sangre de cada individuo para hacer un frotis por duplicado (delgada capa de sangre sobre un portaobjetos) mediante el siguiente procedimiento: Se colocó una gota de sangre en una zona cercana a la etiqueta del portaobjetos limpio y previamente rotulado (se codificó para no sesgar los

resultados) y se extendió la misma con un cubreobjetos deslizando sobre la superficie en un ángulo de 30°C. Se dejó secar al aire durante 24 horas (dentro de cajas, fuera de polvo y lejos de la luz), luego se fijó durante 10 minutos en metanol absoluto y se secó en oscuridad. Se tiñó con Ioduro de Propidio (0,001 mg/mL) para su posterior observación.

El análisis y conteo de MN se realizó en el Laboratorio de Microscopia Electrónica y EDS (Facultad de Ciencias, UDELAR) mediante el software Image Pro Plus TM. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX 41, filtro I.P., aumento 40 X con un acople de 0,63 X, longitud de onda de absorción: 536 nm y de emisión: 617 nm.

Se contaron 2.000 células por frotis, examinando dos por cada ejemplar y se contabilizó: número de eritrocitos con MN (EMN) y la cantidad total de MN identificados en esas 2000 células. Se calculó el porcentaje de EMN (eritrocitos micronucleados / eritrocitos totales x 100) y de MN totales (micronúcleos totales / eritrocitos totales x 100).

Se aplicaron Criterios de Identificación de MN según Majone *et al.* (1987), Carrasco *et al.* (1990), Fenech *et al.* (2000) y Koppe (2002), donde:

- El diámetro del MN debe ser menos de una mitad del núcleo principal.
- Los MN se debe estar separado del núcleo principal, debe haber una identificación clara del límite nuclear.
- Los MN no son más refractivos y tienen un color e intensidad como la del núcleo principal.
- Los MN son casi redondos.
- Los MN deben estar incluidos en el citoplasma celular.

Tratamiento de datos

Estudio espacial: Pando, Solís Chico y Solís Grande

Se realizó un estudio comparativo de los tres estuarios considerando por un lado: i. Análisis comparativo global, todas las temporadas juntas, de las variables ambientales para los tres estuarios, mediante un análisis de varianza (ANOVA) para los datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos (Zar, 2010). ii. Se compararon los niveles de daño genético entre los tres estuarios para las especies: *O. argentinensis* (Temporada I y II, Test-T) y *P. orbignyana* (Temporada II, Test de Kruskal-Wallis). Se decidió hacer este estudio con las primeras dos temporadas, ya que fueron las únicas temporadas que presentaron un número considerable de individuos de la misma especie para los tres estuarios.

Estudio temporal: Pando

Se pudo realizar un estudio a lo largo del tiempo en el estuario Pando, para *O. argentinensis* (presente en las cinco temporadas). Se analizaron las relaciones entre las variables ambientales y los niveles de daño genético mediante correlaciones de Pearson y un análisis de ordenación de las variables de acuerdo al análisis de componentes principales (ACC). El programa estadístico utilizado fue Statistica 6.1.

Estudio inter-específico

Se analizaron las diferencias inter-específicas en los niveles de daño genético, para las especies: *M. furnieri*, *O. argentinensis* y *P. orbignyana*, en las Temporadas IV y V para el estuario del Pando, a través de un análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS

Se analizaron un total de 223 individuos a lo largo de las cinco temporadas: 112 individuos pertenecieron a la especie *O. argentinensis*, 39 a la especie *P. orbignyana*, 50 a la especie *M. platanus* y 22 a la especie *M. furnieri* (Tabla 1).

Tabla 1: Número de individuos colectados de las cuatro especies en cada temporada.

	<i>O. argentinensis</i>	<i>P. orbignyana</i>	<i>M. platanus</i>	<i>M. furnieri</i>
Temporada I (Octubre 2011)	46	0	0	0
Temporada II (Mayo 2012)	24	15	7	0
Temporada III (Setiembre 2012)	14	15	15	0
Temporada IV (Noviembre 2012)	15	9	14	10
Temporada V (Febrero 2013)	13	0	14	12

Estudio espacial: Pando, Solís Chico y Solís Grande

Variables ambientales

La máxima variabilidad de temperatura para las cinco temporadas de muestreo (ANEXO III), fue registrada para el estuario del Pando (Figura 2a). Mientras que el estuario del Solís Chico presento la menor variabilidad de los tres. No existen diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) para la temperatura (superficie y fondo) entre los tres estuarios.

Los máximos valores de salinidad fueron registrados en el estuario del Solís Grande (Figura 2b), mientras que el estuario del Pando registro los mínimos valores. La salinidad de fondo se diferenció significativamente (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) entre ambos estuarios.

Los tres estuarios presentaron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,005$) en los valores de oxígeno disuelto. El estuario del Solís Chico presento mayor variabilidad, registrando los máximos valores (superficie), así como los mínimos (fondo), en relación a los otros dos estuarios (Figura 3).

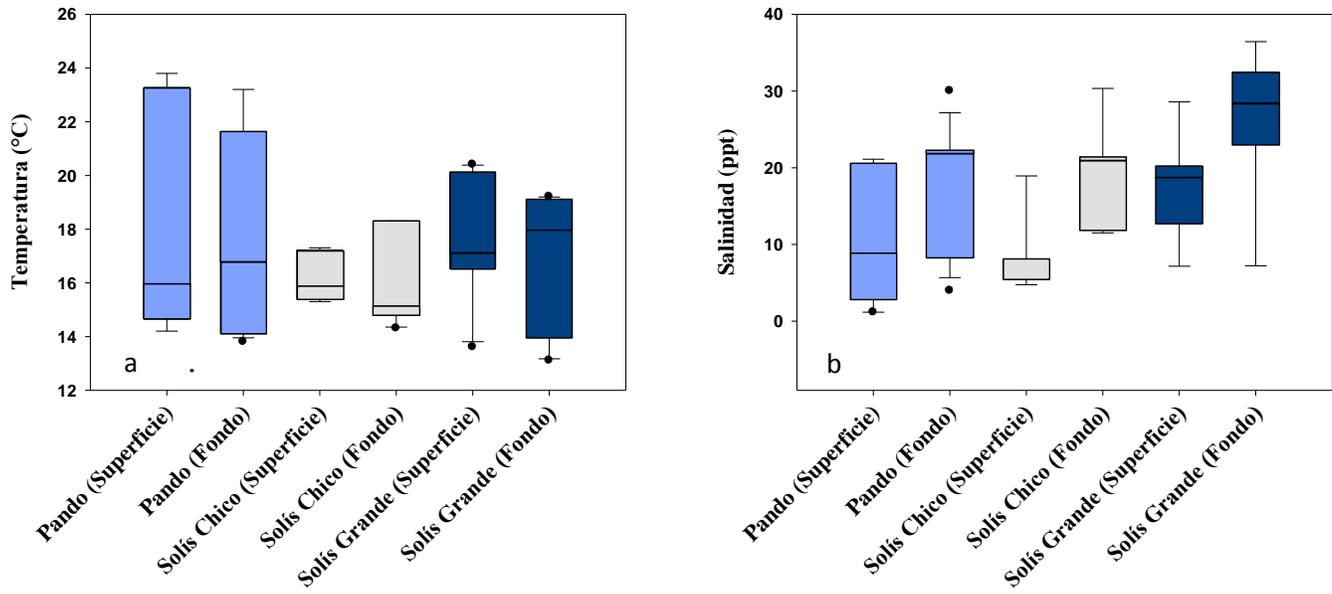


Figura 2: a) Temperatura (superficial y fondo), b) Salinidad (superficie y fondo) del estuario del Pando, Solís Chico y Solís Grande en las cinco temporadas.

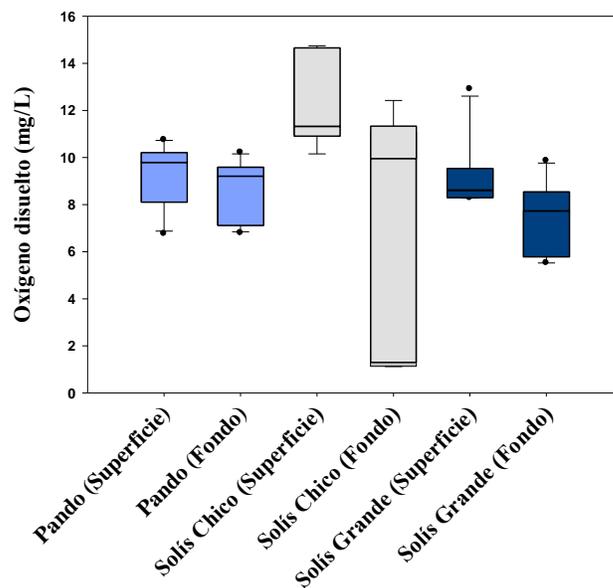


Figura 3: Concentraciones de oxígeno disuelto (superficie y fondo) del estuario del Pando, Solís Chico y Solís Grande en las cinco temporadas.

Test de Micronúcleos

Se determinó el porcentaje de EMN y de MN para todos los individuos colectados (Tabla 2), los cuales corresponden a las cuatro especies mencionadas, en las 5 temporadas de muestreo.

Tabla 2: Número de individuos capturados para cada especie, en cada temporada y en cada estuario, con su correspondiente porcentaje de EMN y de MN totales.

		Pando				Solís Chico			Solís Grande	
Temporada I (Octubre 2011)	n	17				15			14	
	EMN	0,42%				0,16%			0,18%	
	MN	0,58%				0,17%			0,19%	
Temporada II (Mayo 2012)	n	7	4	2		10	4	5	7	7
	EMN	0,35%	0,24%	0,09%		0,08%	0,10%	0,08%	0,10%	0,15%
	MN	0,38%	0,26%	0,09%		0,09%	0,10%	0,08%	0,12%	0,18%
Temporada III (Setiembre 2012)	n	14		15			6			9
	EMN	0,12%		0,09%			0,17%			0,08%
	MN	0,13%		0,09%			0,19%			0,08%
Temporada IV (Noviembre 2012)	n	15	1	14	10					8
	EMN	0,14%	0,05%	0,08%	0,18%					0,10%
	MN	0,15%	0,05%	0,09%	0,18%					0,10%
Temporada V (Febrero 2013)	n	13		14	12					
	EMN	0,17%		0,12%	0,23%					
	MN	0,18%		0,14%	0,27%					

	<i>O. argentinensis</i>		<i>M. platanus</i>		<i>P. orbignyana</i>		<i>M. furnieri</i>
--	-------------------------	--	--------------------	--	----------------------	--	--------------------

La figura 4 presenta los porcentajes de EMN y los porcentajes de MN totales para *O. argentinensis* en los tres estuarios, obtenidos en las temporadas I y II. Los máximos valores para estos porcentajes, en ambas temporadas, son registrados en el estuario del Pando (temporada I: 0,42% y 0,58 %; temporada II: 0,35 % y 0,38%).

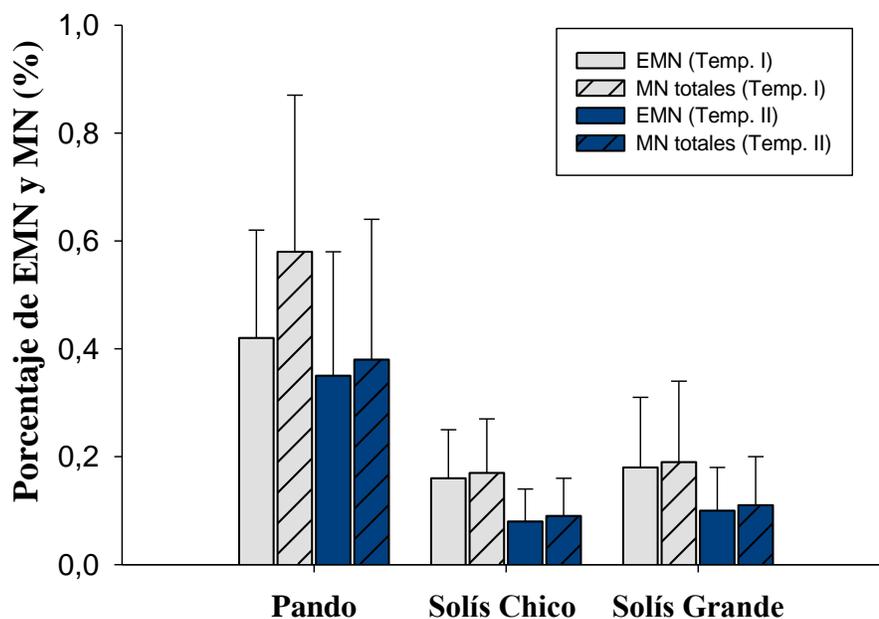


Figura 4: Porcentaje de EMN y MN totales para *O. argentinensis* para el estuario Pando, temporada I y II.

Los valores de EMN y MN totales presentaron diferencias significativas (t-test) entre el estuario del Pando y los otros dos ($p < 0,05$), para la temporada I y II.

La figura 5 presenta los porcentajes de EMN y los porcentajes de MN totales para *P. orbignyana*, obtenidas en la temporada II. No se encuentran diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) en los porcentajes de EMN y MN totales entre los estuarios. Los máximos valores de daño genético se observan en el estuario del Pando (0,24 % y 0,26 %).

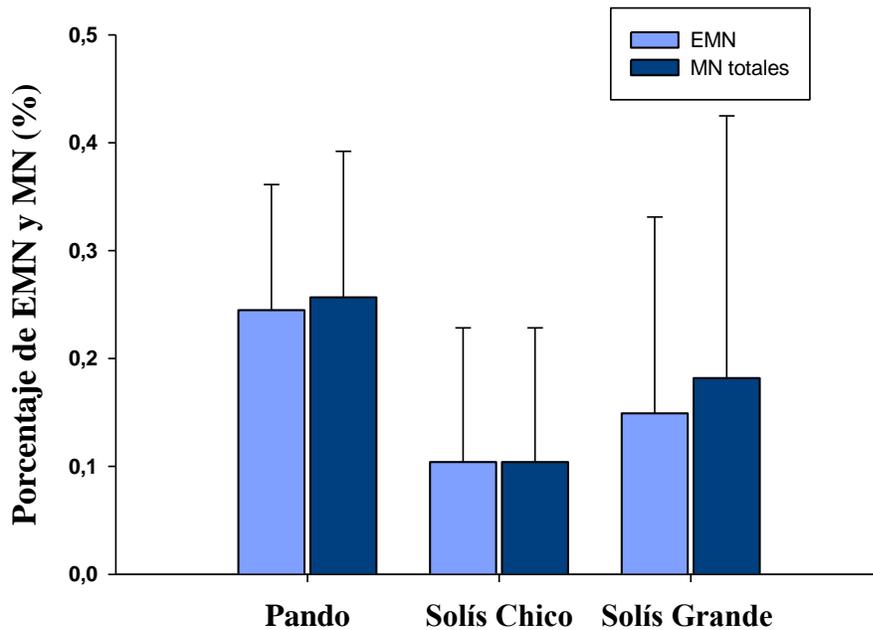


Figura 5: Porcentaje de EMN y MN totales para *P. orbignyana* para el estuario Pando, temporada II.

Estudio temporal: Pando

Variables ambientales

La temperatura superficial y de fondo no mostraron grandes diferencias a lo largo de las cinco temporadas en el estuario del Pando (Figura 6a), diferenciándose significativamente (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) las temporadas I, II y III con las IV y V.

La salinidad presento sus máximos valores en la temporada V y sus mínimos en la temporada II (Figura 6b). Existieron diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) en la salinidad superficial entre las cinco temporadas. No se registraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) en la salinidad de fondo para las cinco temporadas.

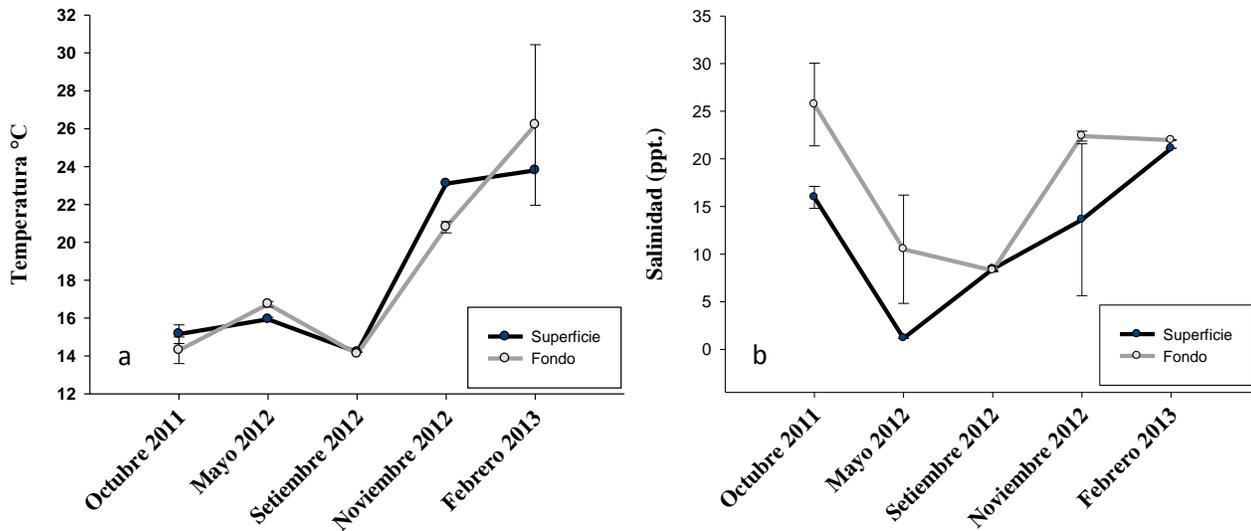


Figura 6: a) Temperatura (superficial y fondo) y b) Salinidad (superficial y fondo) en el estuario Pando en las cinco temporadas.

El oxígeno disuelto superficial presentó diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) entre las temporadas I, II y III y las temporadas IV y V (Figura 7). Se registró una marcada diferencia (ANOVA, $p < 0,05$) entre superficie y fondo en la temporada II. En la temporada V se registraron los mínimos valores de oxígeno disuelto, tanto a nivel de superficie como de fondo.

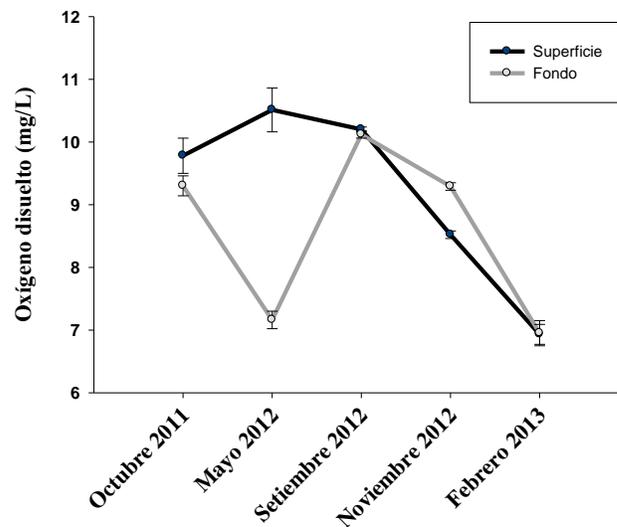


Figura 7: Concentración de oxígeno disuelto (superficie y fondo) en el estuario del Pando para las cinco temporadas.

Correlaciones entre variables ambientales y daño genético

No se encontraron correlaciones significativas entre los porcentajes de EMN y MN totales (Tabla 3), con la variables ambientales, en fondo y superficie para el estuario del Pando a lo largo de las cinco temporadas.

Tabla 3: Correlaciones de Pearson entre variables ambientales (temperatura, salinidad, conductividad, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno, en superficie y fondo) y porcentajes de EMN y MN totales en *O. argentinensis* del estuario Pando para las cinco temporadas.

	EMN	MN	Temp. Sup.	Temp. Fon.	Sal. Sup.	Sal. Fond.	Cond. Sup.	Cond. Fon.	OD Sup.	OD Fon.	% OD sup.	% OD Fon.
EMN	1	0,9844	-0,1703	-0,1651	-0,1634	-0,1044	-0,1592	-0,1106	0,0498	-0,0782	-0,0786	-0,0886
	p= ---	p=,000	p=,578	p=,590	p=,594	p=,734	p=,603	p=,719	p=,872	p=,800	p=,799	p=,771
MN	0,9844	1	-0,1948	-0,1915	-0,1778	-0,1252	-0,18	-0,1343	0,0109	-0,092	-0,1074	-0,1124
	p=,000	p= ---	p=,524	p=,531	p=,561	p=,684	p=,556	p=,662	p=,972	p=,765	p=,727	p=,706

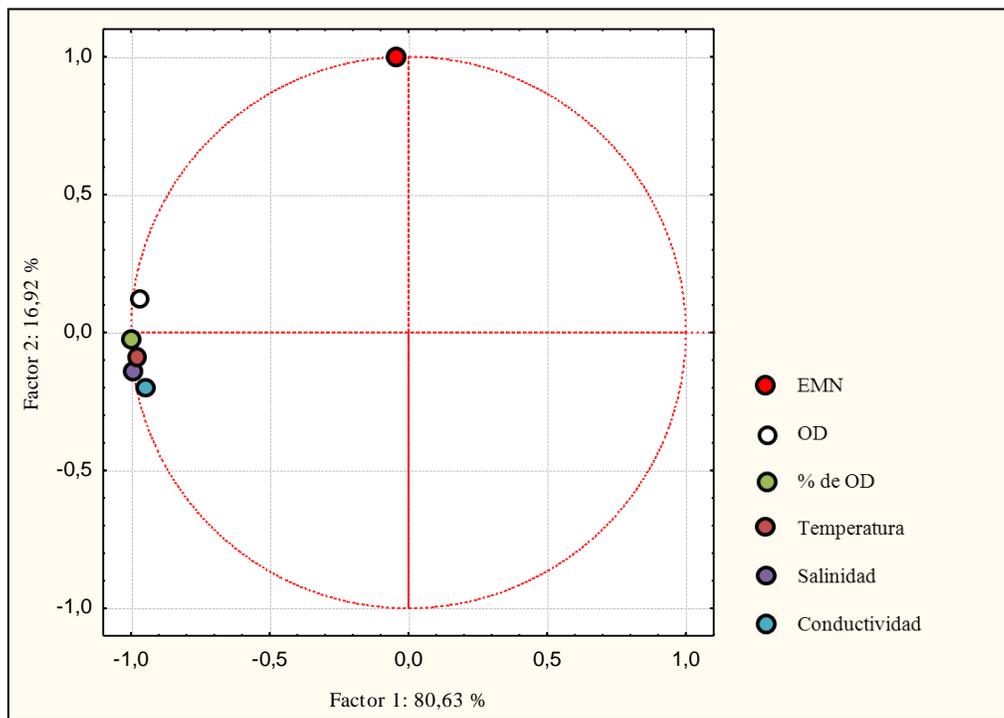


Figura 8: Ordenación de las variables ambientales (temperatura, salinidad, conductividad, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno, en superficie y fondo) y de daño genético de acuerdo al análisis de componentes principales (ACC), para *O. argentinensis* en el estuario Pando a lo largo de las cinco temporadas.

El análisis multivariado (componentes principales) generó dos componentes, de los cuales el primero es el más importante, ya que explica el 80,63 % de la variabilidad encontrada. Las variables que más aportan a este componente son las ambientales. El segundo componente solo explica el 16,92 % de la variabilidad encontrada y a dicho componente aportan las variables de daño genético (Figura 8). Como se observa las variables ambientales analizadas no se relacionan con el daño genético. Lo que confirma lo hallado en el análisis de correlaciones.

La figura 9 presenta los porcentajes de EMN y de MN totales para la especie *O. argentinensis* en el estuario del Pando, en las cinco temporadas de muestreo. La temporada I y II se diferenciaron significativamente (ANOVA, $p < 0,05$) con las temporadas III y IV. La temporada I presentó los valores más altos (0,42% y 0,58 %), mientras que la temporada II presentó los mínimos valores.

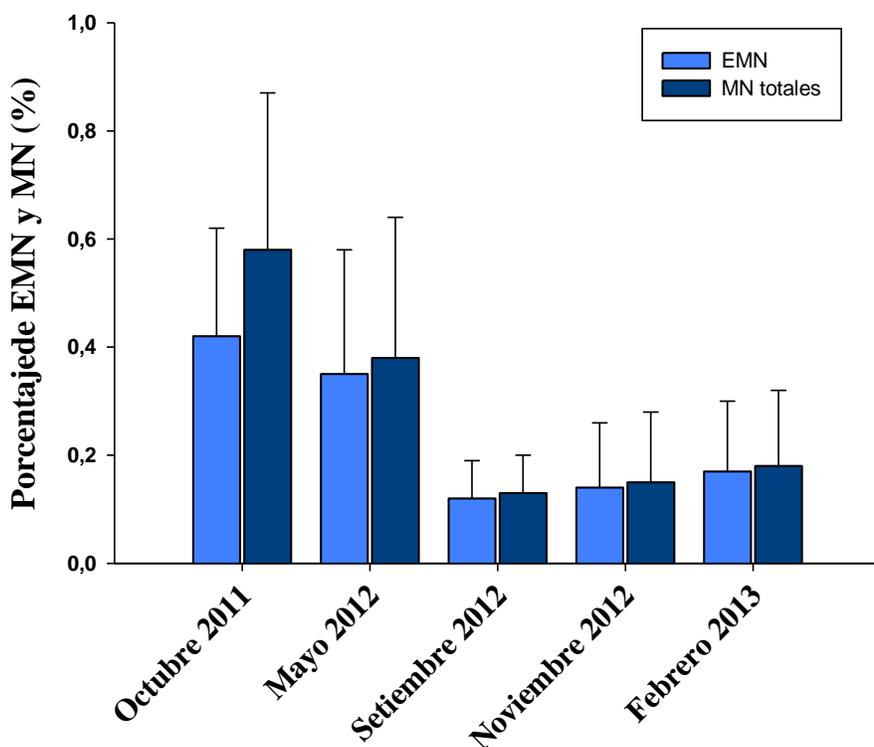


Figura 9: Porcentaje de EMN y MN totales para *O. argentinensis* en el estuario Pando para las cinco temporadas.

Diferencias interespecíficas

Los valores de EMN y MN totales fueron similares entre las especies *M. furnieri*, *O. argentinensis* y *M. platanus* (Figura 10). No se registraron diferencias significativas entre las tres especies (ANOVA, $p > 0,05$) para el estuario del Pando en las temporadas IV y V.

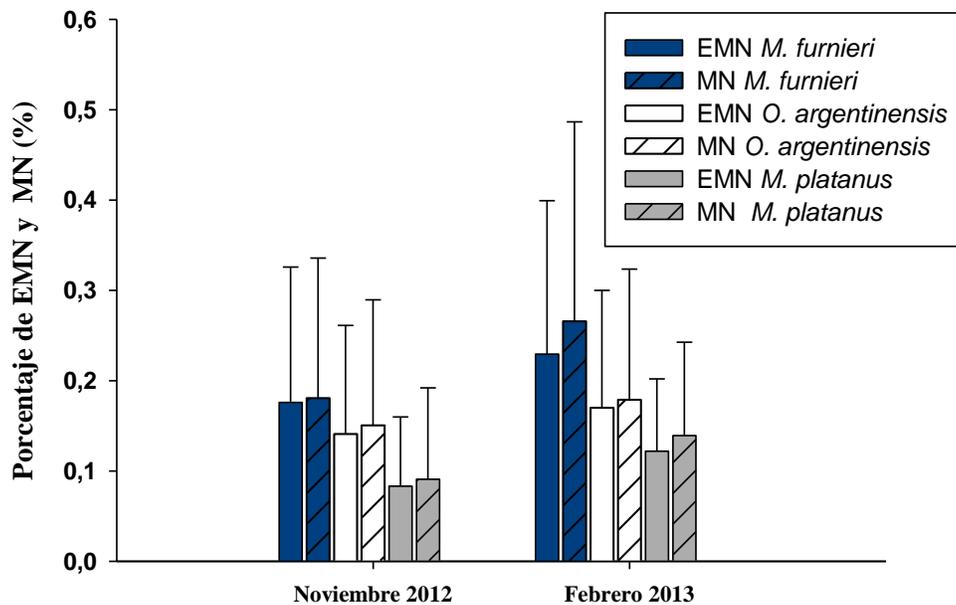


Figura 10: Porcentaje de EMN y MN totales para *M. furnieri*, *O. argentinensis* y *M. platanus*, en el estuario Pando para la temporada IV y V.

DISCUSIÓN

Estudio espacial: Pando, Solís Chico y Solís Grande

Los estuarios Pando, Solís Chico y Solís Grande, presentan diferentes grados de urbanización, densidad demográfica e intensidad de actividades productivas (Geo Canelones, 2009; Goyenola *et al.*, 2011). El estuario del Pando presenta los mayores niveles de estos indicadores, con una alta tasa demográfica asociada al estuario, con la presencia de una ciudad con actividad industrial, con actividades agrícolas de alta producción y la descarga de efluentes cloacales a la cuenca de este estuario (Goyenola *et al.*, 2011). Los altos niveles de estos indicadores podrían relacionarse con los valores más altos de daño genético registrados en los tres estuarios. El ensayo de MN aplicado en peces, evidencia diferencias en las concentraciones o el tipo de compuestos genotóxicos presentes en los tres estuarios, reflejando en forma primaria la calidad ambiental de dichos ambientes.

Existe una gran cantidad de investigaciones que relacionan los niveles de EMN en estuarios con diferencias en sus niveles de contaminación (Çavas & Ergene-Gözükara, 2005; Amado *et al.*, 2006; Abujamara *et al.*, 2011) (Tabla 4). Algunos de estas investigaciones utilizan las especies seleccionadas en este estudio, como especies bioindicadoras.

Amado *et al.* (2006) comparan los porcentajes de EMN (entre otros bioindicadores) para la especie *P. orbignyanus* y *M. furnieri* en dos sitios diferentes del estuario Laguna de los Patos. Un sitio es considerado no contaminado (sin descargas antropogénicas) y el otro sitio es considerado contaminado (altamente industrializado y con descargas de efluentes domésticos). Se encuentran diferencias significativas para ambas especies en los porcentajes de EMN, entre el sitio no contaminado y el sitio contaminado (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentajes de EMN para las diferentes especies, los diferentes sitios de estudio. Modificada de Ergene-Gözükara, 2005, Amado *et al.*, 2006 y Abujamara *et al.*, 2011.

Sitio de estudio	Especie de estudio	Porcentaje de EMN
Laguna de los Patos (sitio no contaminado)	<i>P. orbignyanus</i>	0,005 % - 0,06 %
	<i>M. furnieri</i>	0,026 % - 0,032 %
Laguna de los Patos (sitio contaminado)	<i>P. orbignyanus</i>	0,05 % - 0,12 %
	<i>M. furnieri</i>	0,018 % - 0,087 %
Estuario Santos (San Pablo)	<i>M. furnieri</i>	0,11 %
Estuario Itanhaém (San Pablo)	<i>M. furnieri</i>	0,07 %
Bahía de Mersin (zona control)	<i>Mugil cephalus</i>	0,082 % - 0,207 %
Bahía de Mersin (puerto)	<i>Mugil cephalus</i>	0,656 % - 0,352 %
Bahía de Mersin (refinería)	<i>Mugil cephalus</i>	0,705 % - 0,317 %
Estuario Pando	<i>M. furnieri</i>	0,18 % - 0,23 %
	<i>P. orbignyanus</i>	0,05 % - 0,24 %
	<i>M. platanus</i>	0,08 % - 0,12 %
	<i>O. argentinensis</i>	0,12 % - 0,42 %
Estuario Solís Chico	<i>P. orbignyanus</i>	0,10 % - 0,17 %
	<i>M. platanus</i>	0,08 %
	<i>O. argentinensis</i>	0,08 % - 0,16 %
Estuario Solís Grande	<i>P. orbignyanus</i>	0,08 % - 0,15 %
	<i>O. argentinensis</i>	0,10 % - 0,18 %

Abujamara *et al.* (2011), aplica el ensayo de MN a *M. furnieri* para comparar la calidad ambiental de dos estuarios en San Pablo. Un estuario es turístico, sin la presencia de actividad industrial, ni efluentes domésticos y el otro estuario es considerado contaminado, con alta actividad industrial, registrándose descarga de efluentes industriales así como efluentes domésticos. Los valores de EMN de estos dos estuarios se diferencian significativamente (Tabla 4).

Çavas & Ergene-Gözükara (2005) realizan un monitoreo de contaminación genotóxica en la Bahía de Mersin (Mar Mediterráneo, Turquía). Se muestrean 3 sitios: Un sitio relativamente libre de contaminantes (sin descargas industriales) el cual se lo considera como zona control. El segundo sitio es un puerto, el cual presenta altos niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos

(PAHs) y el tercer punto es un estuario, la cual recibe efluentes industriales de una refinería de petróleo (Tabla 4). La especie bioindicadora fue *Mugil cephalus*. Si bien esta especie es diferente a *M. platanus*, pertenece al mismo género y puede considerarse a la hora de comparar sus porcentajes.

El enfoque con el cual se realizaron estos tres estudios, es similar al presente estudio. Se selecciona un sitio de estudio aparentemente libre de contaminación (sin descarga de efluentes industriales, ni cloacales), el cual es considerado sitio control. Este sitio es el que permite establecer una línea de base, donde se registran los porcentajes de EMN libre de contaminación, para luego compararlos con los porcentajes registrados en un sitio de estudio determinado.

El estuario del Pando podría considerarse como el sitio impactado, el cual presenta una alta densidad demográfica, con emprendimientos agropecuarios, recibiendo efluentes industriales y cloacales en una región cercana al estuario. A su vez, los estuarios Solís Chico y Solís Grande podrían considerarse como áreas control, ya que no presentan actividades industriales y la población asociada a sus cuencas es relativamente baja (fundamentalmente la del arroyo Solís Grande) (Geo Canelones, 2009; Goyenola *et al.*, 2011; INE, 2011).

Los resultados revelan altos valores de EMN y MN totales para *O. argentinensis* en el Pando en las primeras dos temporadas. Estos valores se diferencian significativamente y en promedio triplican los valores obtenidos en los estuarios Solís Chico y Solís Grande.

Para el resto de las especies, los mayores porcentajes de EMN y MN también se registran en el estuario del Pando. Estos altos porcentajes de EMN y MN en las especies, podrían relacionarse con las descargas de efluentes industriales en la cuenca del arroyo Pando. Dentro de las diferentes ramas de industrias que se encuentran en esta cuenca (ANEXO II), se destacan la rama cárnica (mataderos de ganado, cortes de carne, chacinería y curtiembres), la rama de papel y celulosa, rama química (fabricación de productos farmacéuticos, pesticidas, agroquímicos y veterinarios, pinturas y plastificantes) y la rama de caucho y plástico (SADI, 2013). Varias investigaciones demuestran el efecto nocivo de los efluentes industriales sobre los organismos, fundamentalmente los de la rama química, induciendo la formación de MN y deformaciones

nucleares en peces (Grisolia & Cordeiro, 2000; Grisolia, 2002; Könen & Çavas, 2008; Da Rocha *et al.*, 2009; Bolognesi & Hayashi, 2011).

La descarga de efluentes cloacales es otro factor distintivo, que diferencia la calidad ambiental del estuario Pando en comparación con los otros dos estuarios. Las piletas de aguas residuales domésticas ubicadas en la localidad de Pinar Norte, a pocos kilómetros del estuario, representan un factor importante de contaminación. Para el año 2009 las piletas de Pinar Norte recibían un volumen de efluentes de 1000 metros cúbicos por día. Este volumen supera en gran medida, al volumen para el que fueron diseñadas, lo cual genera problemas para su correcto funcionamiento (Geo Canelones, 2009, Goyenola *et al.*, 2011).

Los efluentes cloacales son ricos en compuestos nitrogenados (amonio y nitratos) y microorganismos patógenos. Un aumento en los valores de pH y de temperatura en el ambiente, pueden transformar estos compuestos nitrogenados en su forma tóxica (amoníaco) (Pepe, 2003; Spiro & Stigliani, 2004). El vertido de efluentes cloacales al ambiente acuático, sin un correcto tratamiento previo, produce un impacto negativo en el ambiente, afectando la calidad del agua y los organismos presentes (Newman & Clements, 2008). Existe una gran cantidad de estudios, tanto en ambientes costeros, como de agua dulce, donde se evidencia la formación de MN, promovida por los efluentes cloacales vertidos en el medio acuático (Li *et al.*, 2004; Grisolia *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2006; Talapatra & Banerjee, 2007).

Estudio temporal: Pando

Los altos porcentajes de EMN y MN para *O. argentinensis* en el estuario del Pando, presentaron diferencias significativas entre las temporadas I y II con las III y IV. Estas diferencias no se relacionaron a ninguna variable ambiental, ya que no se encontraron correlaciones entre los porcentajes de MN y las variables ambientales. Esta ausencia de relación entre los porcentajes de EMN y las variables ambientales coincide con los resultados obtenidos por Amado *et al.* (2006), para las especies *M. furnieri* y *P. orbignyana* en Laguna de los Patos. En otro estudio, Baršienė

et al. (2012) trabajando en el Mar Báltico con la especie *Platichthys flesus* (lenguado), tampoco encuentran una correlación entre las variables ambientales y el porcentaje de EMN.

Rybakovas *et al.* (2009) encuentran que los porcentajes de MN en peces se diferenciaron estacionalmente, detectándose los mínimos valores en invierno y otoño. Los autores encontraron una correlación entre la frecuencia de MN y la temperatura. Asumieron que el aumento de temperatura producía un aumento de la actividad mitótica y por ende en la formación de MN. También se ha demostrado que un aumento de temperatura de 4 ° C a 37 ° C puede aumentar la habilidad de los compuestos genóxicos para dañar el ADN (Buschini *et al.*, 2003). En el estuario del Pando, a lo largo de los cinco muestreos, la variación de temperatura fue más acotada, variando entre 13 °C y 23 °C a lo largo de los cinco muestreos.

La formación de MN en eritrocitos en peces, varía con el tiempo de exposición de los organismos a los contaminantes. Existe una gran cantidad de estudios en laboratorios, donde se someten a los peces a ciertas concentraciones de contaminantes y se evalúan los porcentajes de MN a lo largo del tiempo (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000; Moreira, 2010; Kumar, 2012; Kurteshi & Letaj, 2012; Ghisi *et al.*, 2013).

Moreira (2010) expone a individuos juveniles de *M. platanus* a diferentes concentraciones de fracción soluble de petróleo en agua (FSA). Entre otros objetivos, Moreira evalúa la formación de EMN a lo largo del tiempo (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentaje de EMN en *M. platanus* formados para 4 y 14 días de exposición a diferentes concentraciones de FSA. Modificado de Moreira, 2010.

	4 días de exposición	14 días de exposición
Control	0,04 %	0,03 %
1,7 % FSA	1,60 %	2,30 %
3,5 % FSA	2,50 %	1,60 %
7,0 % FSA	3,80 %	1,70 %

Para un período de exposición mayor a 4 días, los porcentajes de EMN producidos por las diferentes concentraciones de WFS, fueron superiores al porcentaje de EMN del grupo control. A los 14 días de exposición, los porcentajes de EMN presentaron sus máximos valores. Un periodo de siete días, posterior a la exposición de FSA, fue suficiente para que los porcentajes de EMN retornaran a porcentajes similares a condiciones normales (control).

Si bien los tipos de contaminantes en el estuario del Pando son diferentes a los utilizados por Moreira (2010), se puede observar la rápida respuesta a los agentes genotóxicos. En cuestión de días los porcentajes de EMN pueden aumentar o descender dependiendo de la exposición a dichos agentes.

La falta de diferenciación estacional en los porcentajes de MN para el estuario del Pando podría estar explicado también por las características físicas del mismo. La presencia de agua dulce o salada en el mismo está determinada por el régimen fluvial, así como la dirección de los vientos (Attrill & Power, 2002; Gillanders *et al.*, 2011). Vientos del Norte y altos niveles de lluvia, direccionan el flujo del estuario hacia el mar, mientras que vientos del Sur promueven el ingreso de agua salada al estuario (Gutiérrez & Panario, 2012). Las principales fuentes de contaminación de este estuario se encuentran arroyo arriba (SADI, 2013), por lo tanto una dirección del flujo hacia el mar, podría significar un aumento en la concentración de los contaminantes disueltos en el agua, para el estuario. Mientras que el ingreso de agua salada al estuario produciría una dilución de dichos contaminantes. La gran variabilidad de estos procesos a lo largo del año podría explicar la falta de estacionalidad en los porcentajes de MN.

Susceptibilidad diferencial entre las especies

En la temporada IV y V, los valores de EMN y MN para *O. argentinensis*, *M. platanus* y *M. furnieri* en el Pando, no se diferenciaron significativamente entre sí. Reflejando una susceptibilidad similar a los contaminantes presentes en el estuario Pando.

Las diferentes especies de peces responden de manera particular a determinados contaminantes. Algunas especies pueden responder rápidamente, así como otras pueden ser más resistentes (Hayashi *et al.*, 1998; Bolognesi *et al.*, 2006; Grisolia *et al.*, 2009). Se pueden producir procesos de biomagnificación de los contaminantes. Los diferentes hábitos alimenticios o la ubicación en la columna de agua podrían estar determinando su relacionamiento con los compuestos genotóxicos presentes en el ambiente y por ende definiendo su vulnerabilidad. Organismos con alto nivel trófico y estrecha asociación con el sustrato estarían más expuestos a los contaminantes, debido a procesos de biomagnificación y sedimentación de los contaminantes (Porto *et al.*, 2005; Newman & Clements, 2008).

Estas diferencias en los valores de EMN y MN entre varias especies de peces para un mismo lugar, fue registrada por varios autores (Bolognesi *et al.*, 2006; Monserrat *et al.*, 2007; Bolognesi & Hayashi, 2011). Bolognesi *et al.* (2006) evalúan los porcentajes de EMN para 10 especies de peces, en la costa de Santa Teresa (Golfo La Spezia, Italia), la cual es considerada libre de contaminación. Registraron diferencias en los porcentajes de EMN para las diferentes especies, los cuales variaron de 0,175 % de EMN a 0,00% de EMN. Esta variabilidad interespecífica, de 0 a 17 MN detectados en 1000 células es adjudicada por los autores a diferencias metabólicas y de mecanismos de reparación del material genético. Por otro lado, Porto *et al.* (2005) evaluando el efecto mutagénico del mercurio en tres especies de peces del Rio Amazonas, encuentran una relación entre el nivel trófico de la especie y el porcentaje de EMN. Dentro de estas tres especies, la especie piscívora presentó porcentajes de EMN altamente superior a las otras dos especies (detritívora y omnívora). Estas diferencias en los porcentajes de EMN son explicadas por los autores a procesos de biomagnificación de los contaminantes.

En el estuario Pando los procesos de biomagnificación no serían tan preponderantes como lo encontrado por Porto *et al.* (2005), ya que no hay una diferenciación significativa del daño genético entre las especies analizadas. Sin embargo los promedios de los porcentajes de EMN y MN de las tres especies, coinciden con el orden de los niveles tróficos.

Los porcentajes de EMN detectados a lo largo de las cinco temporadas en los tres estuarios, superan a los valores registrados por Amado *et al.* (2006), tanto para la especie *P. orbignyanus*

como para la especie *M. furnieri*. Lo cual podría estar sugiriendo mayor concentración de agentes genotóxicos o con mayor potencial mutagénico en los estuarios uruguayos, en comparación con los 2 sitios estudiados en Laguna de los Patos.

Por otro lado es importante describir las tallas de los organismos analizados por Amado *et al.* (2006). Los promedios del largo total de sus individuos (en ambos sitios) duplicaron los promedios del largo total, para ambas especies, en las cinco temporadas y en los tres estuarios (ANEXO IV). Se ha identificado una relación negativa entre el tamaño del pez y el daño genético. Individuos de mayor talla, de la misma especie y en las mismas condiciones ambientales, presentan menor porcentaje de EMN (Strum *et al.*, 1999; Wirzirger *et al.*, 2007; Talapatra *et al.*, 2010).

No existen estudios realizados donde se registre el porcentaje de MN *in situ* para las especies *O. argentinensis* y *M. platanus* para determinados ambientes naturales. Sin embargo existen algunos estudios *in vitro* para estas especies. Moreira (2010) expone el uso de *M. platanus* como especie bioindicadora. Los porcentajes de EMN obtenidos en los estuarios Pando y Solís Chico fueron superiores a los valores del grupo control en Moreira (2010), pero inferiores a los valores de los individuos expuestos a las diferentes concentraciones de fracción soluble de petróleo en agua (FSA).

Los resultados obtenidos en los tres estuarios uruguayos, representan el primer estudio que aplica el ensayo de MN en la especie *O. argentinensis*. Esta especie ha sido utilizado como bioindicadora a través de otros ensayos, donde se evaluó el crecimiento de larvas y el efecto histopatológico, de organismos juveniles expuestos a diferentes concentraciones de contaminantes (Gusmão, 2009; Gusmão *et al.*, 2012). Sus resultados sugieren la utilización de *O. argentinensis* como especie bioindicadora para monitorear contaminaciones costeras, ya que se observó una rápida respuesta a los contaminantes. Esta sensibilidad también se registró a nivel genético en los tres estuarios del presente estudio. *O. argentinensis* registró los valores más altos de EMN y MN totales (Temporada I) a lo largo de este estudio. También se diferenció significativamente entre los tres estuarios (Temporada I y II).

CONCLUSIONES

En base a los resultados aportados en el siguiente estudio, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Los peces analizados en el estuario Pando presentaron los altos porcentajes de EMN y MN totales, en comparación con los estuarios Solís Chico y Solís Grande. Estos altos niveles de daño genético podría deberse al mayor impacto antropogénico que presenta este estuario, destacándose el vertido de efluentes industriales y cloacales.
- *O. argentinensis* no presento una variabilidad estacional en el estuario Pando. La falta de correlación con las variables ambientales registradas, sugiere que los niveles de daño genético estarían determinados, en mayor medida, por otros factores. Por ejemplo: volumen de efluentes industriales y cloacales, así como su periodo de vertido.
- Los niveles de daño genético en el estuario Pando, no se diferenciaron significativamente entre las especies analizadas en las temporadas IV y V. Estas especies presentan una vulnerabilidad similar a los agentes mutagénicos presentes en el estuario. Las pequeñas diferencias podrían deberse al habito trófico de cada especie.
- La alta sensibilidad a los agentes mutagénicos, así como su gran abundancia en los tres estuario definen a *O. argentinensis* como una buena especie bioindicadora de daño genético para dichos estuarios. La cual podría ser utilizada para futuros estudios de calidad ambiental.

Consideraciones finales

El monitoreo biológico es una valiosa herramienta para evaluar la salud ambiental, particularmente en aquellos ambientes impactados por contaminación, donde existe la necesidad de remediación. A través de los bioindicadores, se pueden cuantificar las respuestas biológicas de los organismos a diferentes niveles. Estas respuestas pueden proveer índices de exposición y de estrés, los cuales no son producto de un momento puntual en el ambiente, sino que son el resultado de un período determinado de exposición (Monserrat *et al.*, 2007).

El ensayo de MN aplicado en peces, es un sistema útil para detección *in situ* de agentes genotóxicos en el ambiente acuático cuando los centinelas permanecen en la zona de estudio (Koppe 2002; Buschini *et al.*, 2004; Porto *et al.*, 2005). Este ensayo puede ser aplicado *in vivo* o *in vitro* para determinar la relación entre los contaminantes de un ambiente y su grado de daño genético.

Es importante tener conocimiento acerca de la calidad ambiental de los estuarios Pando, Solís Chico y Solís Grande, ya que cumplen una función ecológica de gran importancia, como la de área de cría de peces. En dichos estuarios se han detectado la máxima densidad de juveniles de peces de toda la costa uruguaya (Defeo *et al.* 2009; Gurdek *et al.*, 2011). Por otro lado el turismo y las actividades recreacionales, son de gran importancia en estos sitios, fundamentalmente en la temporada de verano. Por lo tanto, la conservación de estos ambientes, está directamente relacionada con la salud y seguridad humana.

Los altos niveles de daño genético detectados en el estuario Pando, merecen un estudio más profundo. Se recomienda para próximos estudios, utilizar una batería de biomarcadores que puedan explicar de mejor manera el estado de salud de los organismos presentes en dicho estuario. 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). A nivel histopatológico se podrían detectar lesiones en los tejidos de las branquias e hígado. Estos

estudios son complementarios con ensayos genotóxicos y pueden definir la calidad ambiental de un sitio determinado (Valdez Domingos *et al.*, 2009; Katsumiti *et al.*, 2009; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2013).

Estos estudios podrían realizarse en laboratorio bajo condiciones conocidas. De esta manera se podría determinar de forma precisa, la respuesta de las especies analizadas en este estudio, a diferentes tipos de contaminantes. Se podrían evaluar los tiempos de respuesta para cada especie, así como el daño producido a diferentes concentraciones de un contaminante.

Por ultimo estos estudios ambientales podrían ser realizados en paralelo a un programa de monitoreo de calidad del agua en los tres estuarios. Donde se evalúen las características físicas y químicas del cuerpo de agua a lo largo del tiempo. Identificando los compuestos xenobióticos presentes en el agua.

BIBLIOGRAFÍA

Abujamara, L.D., Seriani, R., Ranzani-Paiva, M.J., Moreira, L.B., de Sousa Abessa, D.M., Dias Seabra, C. 2011. Análise de parâmetros citogenotóxicos da corvina, *Micropogonias furnieri*, provenientes de dois estuários da baixada santista, sp. Revista Ceciliana Dez, 3 (2):17-20.

Acuña Plavan, A., Passadore, C., Giménez, L. 2010. Fish assemblage in a temperate estuary on the uruguayan coast: seasonal variation and environmental influence. Brazilian Journal of Oceanography, 58 (4): 299-314.

Adams, M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Environmental Sciences Division Oak Ridge National Laboratory. American Fisheries Society Bethesda, Maryland. 625 pp.

Al-Sabti, K. 1995. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. Mutation Research, 335 (2): 109-120.

Al-Sabati, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research, 343 (3): 121-135.

Al-Sabti, K., Hardig, J. 1990. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 97(1): 179-182.

Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M., Bianchini, A. 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). Marine pollution bulletin, 52(2): 207-213.

Amado, L.L., Rosa, C.E.D., Leite, A.M., Moraes, L., Pires, W.V., Pinho, G.L.L., Geracitano, L.A. 2006. Biomarkers in croakers (*Micropogonias furnieri*) (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine pollution bulletin*, 52(2): 199-206.

Arcan-Hoy, Metcalfe, C. 2000. Hepatic micronuclei in brown bulheads (*ameiurus nebulosus*) as a biomarker for exposure to genotoxic chemicals. *J. Great lakes Research*, 26(4): 408-415.

Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 42-52.

Ateeq, B., Abul Farah, M., Ali, N., Ahmad, W. 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518: 135-144.

Bemvenuti, M. A. 2006. Silversides in South Brazil: Morphological and ecological aspects. *Biocell*, 30(1): 111-118.

Bemvenuti, M. A. 1990. Hábitos alimentares de peixes-rei na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Atlântica*, 12: 79-102.

Beunetti, R., Ajone, F., I Gola, I., Beltrame, C. 1988. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Marine Ecology Progress Series*, 44: 65-68.

Bolognesi, C., Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1): 205-213.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., Sciutto, A. 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic toxicology*, 78: S93-S98.

Besten P.J., Munawwar, M. 2005. Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems. Emerging Techniques, Trends, and Strategies. U.S. Editorial: Taylor & Francis Group. 271 pp.

Buchwalter, D.; Jenkins, J. y 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.

Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Rizzoni, M. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(2): 119-129.

Butterworth, F. 1995. Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Ed. Butterworth, B.; Corkum, L.; Guzmán-Rincón, J. Plenum Press, New York. 18pp.

Campana, M.A., Panzeri, A. M., Moreno, V.J.; Dulout, F.N. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of fish *Cheirodon interruptus*. *Mutation Research*, 438: 155-161.

Canavese R. 2007. Relaciones tróficas en el área estuarial del Arroyo Pando, Uruguay. 2007. Tesis de grado en la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, 57 pp.

Carrasco, K., Tibury, L., Myers, M. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical effects. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 47(11): 2123-2136.

Carriquiriborde, P., Ronco, A. E. 2008. Distinctive accumulation patterns of Cd (II), Cu (II), and Cr (VI) in tissue of the South American teleost, pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquatic toxicology*, 86(2): 313-322.

Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S. 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and molecular mutagenesis*, 46(1): 64-70.

Centro Interdisciplinario para el Manejo Costero Integrado del Cono Sur. 2011. Manejo Costero Integrado en Uruguay: ocho ensayos interdisciplinarios. UDELAR/CIDA. Montevideo, 278 pp.

Chao, L.B., Pereira, L.E., Vieira, J.P. 1985. Estuarine fish community of the Patos Lagoon (Lagoa dos Patos, RS, Brazil) A baseline study. *Fish community ecology in estuaries and coastal lagoons*, 20: 26-28.

Collins, A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3): 249-261.

Cousseau, M.B., González Castro, M., Figueroa, D.E., Gosztonyi, A.E. 2005. Does *Mugil liza* Valenciennes 1836 (Teleostei: Mugiliformes) occur in Argentinean waters?. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 40(2): 133-140.

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.

Da Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. 2003. *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Brasil. 422 pp.

De Andrade, V.M., Da Silva, J., Da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L., De Freitas, T.R. 2004. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(5): 459-468.

Defeo, O., Horta, S., Carranza, A., Lercari, D., De Alava, A., Gomez, J., Martinez, G., Lozoya, J. P., Celentano, E. 2009. Hacia un manejo ecosistémico de las pesquerías. *Áreas Marinas Protegidas en Uruguay*. Montevideo: Facultad de Ciencias-DINARA. 122 pp.

ECOPLATA. 2003. Contaminación en Agua y Sedimentos. Proyecto Piloto Arroyo Carrasco, Arroyo Pando, Río Santa Lucía. Dirección Nacional de Medio Ambiente. Servicio de Oceanografía, Hidrografía y Meteorología de la Armada. 29 pp.

Fabre, N.N., Díaz de Astrola, J.M. 2001. Distributional patterns and abundance of Paralichthyidae flounders in the South- west Atlantic (Pleuronectiformes, Paralichthyidae). *Thalassas*, 17(1): 45-55.

FAO (Food and Agriculture Organization) 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. [Internet]. Disponible desde: <<http://www.fao.org/docrep/W2598S/W2598S00.htm>> [Acceso 10 de Octubre de 2012].

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.

Figueredo, J.L., Menezes, N.A. 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste de Brasil. VI. Teleostei. Museu do Zoologia Universidade do São Paulo, (5).

Fischer, L.G., Días Pereira, L.E., Vieira, J.P. 2004. Peixes estuarinos e costeiros. *Ecoscientia*. Série Biodiversidade do Atlântico Sudoeste, (1).

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 anormalidades nucleares en el Goodeido *Xenotoca melanosoma* del lago La Alberca en Michoacán, México. Guadalajara México, XIX Semana Nacional de la Investigación Científica. 15 pp.

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.

Geo Canelones. 2009. Informe Ambiental. PNUMA, IMC, MVOTMA, CLAES, Número de volúmenes: 1, Edición: 1ª. 181pp.

Ghisi, N. de C., Cestari, M. M. 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environmental monitoring and assessment*, 1-7.

Ghisi N. de C., Ramsdorf W., de Almeida M., Ribeiro C. y 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.

Gilberto, D.A., Bremec, C.S., Acha, E.M., Mianzan, H.W. 2007. Feeding of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae; pisces) in the estuary of the Rio de la Plata and adjacent uruguayan coastal waters. *Atlântica, Rio Grande*, 29(2): 75-84.

Gomez-Erache, M., Norbis, W., Bastreri, D. 2000. Wind effect as forcing factor controlling distribution and diversity of copepods in a shallow temperate estuary (Solís Grande, Uruguay). *Scientia Marina*, 64: 87-95.

Gonzalez Castro, M., Abachian, V., Perrota, R.G. 2009. Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32'S–57°19'W): a proposal for a life-history model. *Journal of applied ichthyology*, 25: 61–66.

Goyenola, G. Acevedo, S., Machado, I., Mazzeo, N. 2011. Diagnóstico del Estado Ambiental de los Sistemas Acuáticos Superficiales del Departamento de Canelones Canelones: Intendencia Municipal de Canelones. Volumen I: Ríos y Arroyos. 60 pp.

Grisolia, C. K., Rivero, C. L., Starling, F. L. R. M., Silva, I. C. D., Barbosa, A. C., Dorea, J. G. 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1): 138-143.

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.

Grisolia, C. K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2): 145-150.

Grisolia, C.K., Starling, F.L.R.M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research*, 491 (1-2): 39-44.

Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 235-239.

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.

Gusmão, E.P., Rodrigues, R.V., Moreira, C.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A., Miranda-Filho, K.C. 2012. Growth and Histopathological Effects of Chronic Exposition of Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae to Petroleum Water-Soluble Fraction (WSF). *Ambio*, 41(5): 456-466.

Gusmão, L.F.M., McKinnon, A.D. 2009. The effect of food type and quantity on egg production and nucleic acid content of *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 296(1): 71-80.

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, O., Panario, D. 2012. Dinámica geomorfológica de la desembocadura del Arroyo Pando, Uruguay. *Geografía histórica y SIG, análisis de tendencias naturales y efectos antrópicos sobre sistemas dinámicos. Xeográfica: territorio e medio ambiente*, (5), 107-126.

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.

Hayashi, M., Ueda, T., Ueyno, K., Wada, K., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, 399: 125-133.

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 methanesulphonate. *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.

INE. 2011. [Internet]. Disponible desde: <<http://www.ine.gub.uy/censos2011>> [Acceso 20 de noviembre 2013].

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.

Katsumiti, A., Domingos, F.V., Azevedo, M., Da Silva, M.D., Damian, R.C., Almeida, M.I.M., Freire, C.A. 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, 152(4): 209-222.

Könen, S., Çavas, T. 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation treflan using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 434-438.

Kumar, A., Sharma, B., Pandey, R. S. 2012. Assessment of stress in effect to pyrethroid insecticides, λ -cyhalothrin and cypermethrin in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Cellular & Molecular Biology*, 58(1): 153-159.

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. S., de Santis Braga, E. 2010. Cytogenetic disruption in fishes as bioindicator of the environmental quality in two estuarine systems under different exposition to anthropogenic influences. *Mutation Research*, 518: 125-130.

Kurteshi, K., Shaqiri, Z., Letaj, K. 2012. Biomonitoring of genotoxic effect of fungicide propineb through micronucleus. *Radovi Poljoprivrednog Fakulteta Univerziteta u Sarajevu (Works of the Faculty of Agriculture University of Sarajevo)*, 67(2): 57-62.

Lalli C.M., Parsons T.R. 1997. *Biological Oceanography: An introduction*. Pergamon Press. 301 pp.

Lasta, C., Perdomo, A., Carsen, A., Fernández, V., Calliari, D., Resnichenko, Y. y Soldano, A. 2005. *Cuencas hidrográficas tributarias al Río de la Plata y su Frente Marítimo*. Documento de trabajo. 246 pp.

Lee, Richard, F., Steinert, Scott. 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.

Lemos, C.T., Rodel, P.M., Terra, N.R., Erdtmann, B. 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6):1320-1324.

Leonzio, C. 2002. *Evaluación y monitoreo de la contaminación acuática: bases científicas y casos de estudio. Contaminación química y bioindicadores*. Centro de ciencias ambientales eulachile. Universidad de concepción. 10 pp.

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.

- López Cazorla, A., Forte, S. 2005. Food and feeding habits of flounders *Paralichthys orbignyanus* (Jenyns, 1842) in Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Hydrobiology*, 549:251-157.
- Majone, F., Brunetti, R., Gola, I., Levis, A. 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *mytilus galloprovincialis*, after treatment whit Mitomycin C. *Mutation Research*, 191:157-161.
- 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.
- Manna, G. K., Sadhukhan, A. 1986. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT.) *Current Science*, 55(10): 498-501.
- Matsumoto, F.E., Cólus, I.M.S. 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, 23(2): 489-492.
- McKelvey-Martin, V.; Green, M., Schmezer P., Pool-Zobel, B., De Meo, M., Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288: 47–63.
- 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 (*Gadus morhua*). *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. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. 238 pp.

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.

Militelli, M.I., Rodrigues, K.A., Cortés, F., Macchi, G.J. 2013. Influence of environmental factors on the spawning of sciaenids in the Buenos Aires Coastal Zone, Argentina. Ciencias Marinas, 39(1): 55-68.

Missini, S., Ciccoti, E., Rizzoni, M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. Mutation research, 367: 245-251.

Missini, S., Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. Mutation Research, 393: 17-21.

Monserrat, 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.

Moreira, C.B. 2010. Avaliação toxicológica da exposição de tainhas *Mugil platanus* à fração solúvel do petróleo em água. Universidade Federal do Rio Grande. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. 62 pp.

Mudry, M., Abrevaya, X. 2006. Evaluación de Aneugenicidad y Clastogenicidad. En: Genética Toxicológica, 1: 277-298.

Newman, M., Clements, W. 2008. Ecotoxicology: a comprehensive treatment. CRC Press. 852 pp.

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., Le Pape 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.

Norbis, W., Verocai, J. 2005. Presence of two whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Pisces: Scianidae) groups in the Río de la Plata spawning coastal area as consequence of reproductive migration. *Fisheries Research*, 74: 134-141.

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.

Okpokwasili, G. 2009. Contributions of Industrial Pollution and Environmental Degradation on the Emergence of Communicable and Non-Communicable Diseases. A paper presented at the 5th Annual National Conference of Society for Occupational Safety and Environmental Health. 12 pp.

Oliveira Ribeiro, C.A., Katsumiti, A., Franca, P., Maschio, J., Zandoná, E., Margarete Cestari, M., Vicari, T., Roche, H., Silva de Assis, C., Filipak Neto, F. 2013. Biomarkers Responses in Fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, Southern Brazil, for Assessment of Pollutant Effects. *Brazilian Journal of Oceanographic*, 61(1): 1-11.

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.

Prieto García, F., Báez Ramirez, O.A., Scout, W., Gaytán Oyarzún, W., Zuñiga Estrada, W. 2007. Toxicidad y teratogénesis por arsénico en aguas por el pez cebra (*Danio rerio*). *Critical reviews in toxicology*, 24:18-22.

Rabello-Gay, M.N. 1991. Teste de micronúcleo em medula óssea. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. *Sociedade Brasileira de Genética*, 1: 83- 90.

Reis-Henriques, M.A., Ferreira, M., Coimbra, A.M., D'Silva, C., Costa, J., Shailaja, S.M. 2009. Efectos del fenantreno y el nitrito en juveniles del róbalo, *Dicentrarchus labrax*, mediante el uso de enzimas hepáticas biotransformadoras, fluorescencia biliar y micronúcleos como biomarcadores. *Ciencias Marinas*, 35(1): 29–40.

Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(3): 442-448.

SADI. 2013. [Internet], desde: <<http://www.mvotma.gub.uy/ciudadania/tramites/tramites-medio-ambiente/item/10004360-trámite-de-informe-ambiental-de-operación-iao-vía-web.html>> [Acceso 20 de noviembre 2013].

Sampaio, L.A., Bianchini, A. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269(2): 187-196.

Schmid, W. 1975. The micronucleus tests. *Mutation Research*, 31:9–15.

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.

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. 2º ed. 520 pp.

Sturm, A., Da Silva de Assis, H.C., Hansen, P.D. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47(4): 389-398.

Talapatra, S.N., Dasgupta, S., Guha, G., Auddy, M., Mukhopadhyay, A. 2010. Therapeutic efficacies of *Coriandrum sativum* aqueous extract against metronidazole-induced genotoxicity in *Channa punctatus* peripheral erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 3458-3461.

Talapatra, S.N., & Banerjee, S.K. 2007. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of (*Labeo bata*) cultivated in sewage-fed fish farms. Food and chemical toxicology, 45(2), 210-215.

Valdez Domingos, F.X., Assis, H.C.S., Silva, M.D., Damian, R.C., Almeida, D.I.M., Cestari, M.A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A. 2009. Anthropic Impact Evaluation of Two Brazilian Estuaries Through Biomarkers in Fish. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 4(1-3): 21-30.

Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., C'olus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. Mutation Research, 631:36–43.

Vazzoler, A.E.A. 1996. Biologia da reprodução de peixes Teleósteos: teoria e prática. Editora da Universidade Estadual de Maringa, Maringa, Brasil. 169 pp.

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.

Villela I., De Oliveira I. y Da Silva J Henriques, J. 2006. DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel Exposed to Environmental Contaminants. Mutation Research, 605 (1-2): 78-8.

Vizziano, D., Forni, F., Saona G., Norbis, W. 2002. Reproduction of *Micropogonias furnieri* in a shallow temperate coastal lagoon in the southern Atlantic. Journal of Fish Biology, 61: 196-206.

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.

Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J., Sordyl, H. 2007. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool?. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(1): 19-30.

Zar, J. 2010. *Biostatistical Analysis*. Fifth Ed. Pearson Education. London. 944 pp.

Torres-Bugar, 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 *Xenotoca melanosoma* (Pisces, Goodeidae) from Lake La Alberca in Michoacán, México. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 45: 75–81.

Zhu, Y., Wang, J., Bai, Y., Zhang, R. 2004. Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72 (1): 78-86.

ANEXO I

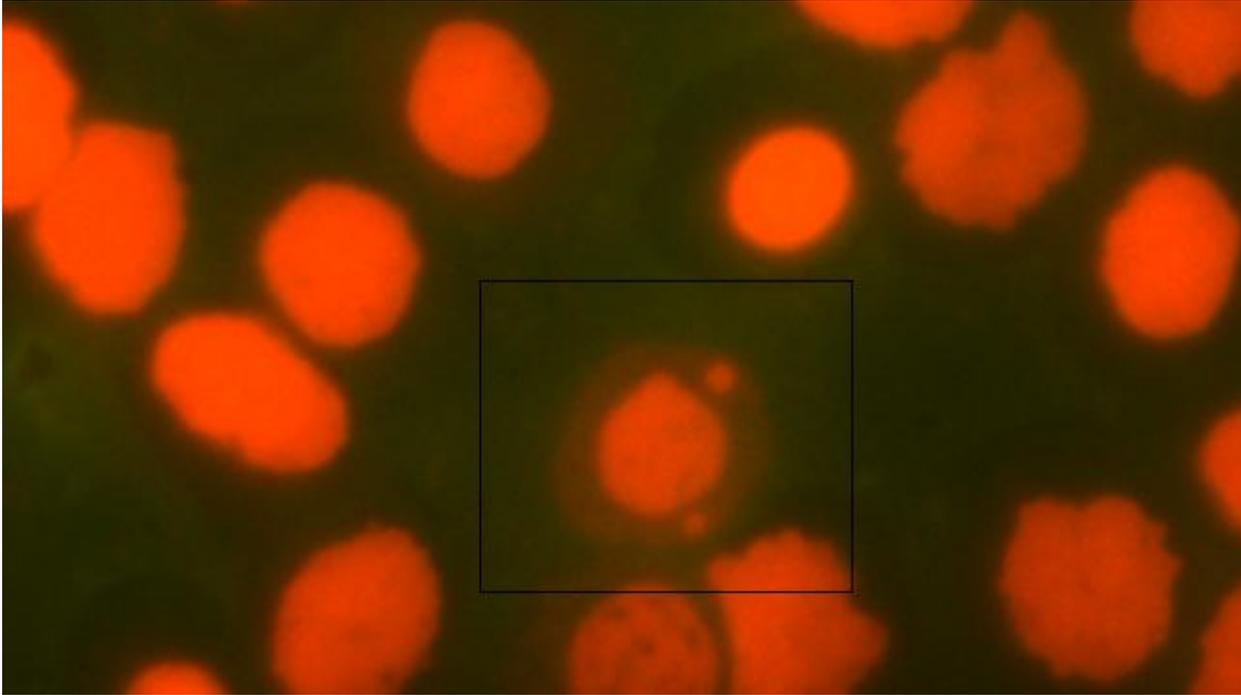


Figura 11: Eritrocitos de *O. argentinensis* del estuario Pando. En el recuadro se observa un eritrocito con dos MN. Microscopia de fluorescencia, tinción con Bromuro de Etidio.

ANEXO II

Los emprendimientos que generan efluentes líquidos deben Solicitar la Autorización de Desagüe Industrial (SADI). En el formulario asociado al trámite, se debe presentar el Proyecto de Ingeniería de la Planta de Tratamiento de Efluentes, e información sobre los efluentes que genera en función del sector productivo y los niveles de actividad, y otros aspectos ambientales relevantes (residuos sólidos, emisiones gaseosas, sustancias químicas).

Depende de: DINAMA - División de Control y Desempeño Ambiental - Departamento de Emisiones al Ambiente.

Tabla 6: Emprendimientos que vierten efluentes industriales en las cuencas de los estuarios estudiados.

Nombre	Ubicación	Localidad	Cuenca	Vertido	Rama	Tipo
Alimentos Organicos	Ruta N 75 Km. 39.000	Pando	Arroyo Pando	Curso de agua	Cárnica	Harina de hueso y sebo
Anep (Paraje Sauce)	Santa Isabel esq. Santa Lucía	Sauce	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Barométricas IM Canelones (Pinar)	Ruta Interbalnearia km 29.300 Camino Andrés	Pinar	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Descarga de barométricas
BHU Ciudad de la Costa	Avda Giannattasio Km. 27.500	Cuidad de la Costa	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Caboril S.A.	Ruta 67 km. 38.500	Sauce	Arroyo Pando	Curso de agua	Bebidas	Bodega y elaboración de vinos
Cañada Grande SRL (NO SADI)	Ruta 82, pasando Emp. Olm. Cno vec. al N a 700	Empalme Olmos	Falta Curso		Extracción minerales no	Extracción piedra, arena, arcilla
Clay	Ruta N° 7 Km. 40	Totoral del Sauce	Arroyo Pando	Infiltración al Terreno	Cárnica	Matadero de equinos
Cooperativa El Porvenir	Falta dato	Falta dato	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Cooperativa Empalme Olmos	Empalme Olmos	Empalme Olmos	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento de OSE
DELGON S.A.	Avenida España esq. 17 Metros	Pando	Falta Curso	Colector	Cárnica	Cortes de carne
Dinolar	Ruta 8 - Km 28.200 Manzana 101 Solar 3	Cap. Juan A. Artigas	Arroyo Pando	Curso de agua	Cárnica	Cortes de carne
El Peñascal S.A.	Cno. Los Horneros km. 3	7ma. Sección policial de	Arroyo Pando	Retiro por barométrica	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Fabitech S.A.	Ruta 8 Km. 36.400	Rincon del Monte	Arroyo Pando	Curso de agua	Celulosa y Papel	Papel y/o cartón
Fadicar S.A.	Ruta N° 8 Km. 32.200	Pando	Arroyo Chamizo	Infiltración al Terreno	Alimenticia	Otros productos alimenticios
Galia S.A.	Camino Franco S/N°	Sauce	Arroyo Pando	Curso de agua	Química	Fabricación productos farmacéuticos
GERASCOFF S.A.	Ruta 8 km 25,100	Barros Blancos	Arroyo Pando	Curso de agua	Cárnica	Chacinería
Gil Herszhorn	Los Olivos esq. Arazá	Capitán J. A. Artigas	Arroyo Pando	Curso de agua	Cuero	Curtiembre de vacunos
Gornet S.A.	Cno Cedres s/n	San Bautista	Arroyo Pando	Infiltración al Terreno	Cárnica	Matadero y preparación de pollos y gallinas
Granja La Familia - Chacinería	Ruta N° 8 Km. 27.500	Pueblo Capitan Artigas	Falta Curso	Curso de agua	Cárnica	Chacinería

Nombre	Ubicación	Localidad	Cuenca	Vertido	Rama	Tipo
Granja La Familia-Criadero Cerdos	Cno. Gervacio Gonzales y Cno. Vecinal (Ruta N° 8 K	Rincón de Pando	Arroyo Pando	Curso de agua	Producción agropecuaria	Criadero de cerdos
Ipusa Planta 3	Avda. España s/n.	Pando	Arroyo Pando	Curso de agua	Celulosa y Papel	Papel y/o cartón
Kevenoll S.A.	Ruta 74, a 1.200mts norte de Ruta 8	Suarez	Arroyo Pando	Curso de agua	Química	Productos químicos orgánicos
Laboratorios Rosenbusch S.A.	Ruta N° 8 Km. 28.500	Pando	Arroyo Pando	Curso de agua	Química	Fabricación productos farmacéuticos
Las Praderas S.A.	Cno. de los Horneros S/N°	Ciudad de la Costa	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
La Tahona	Cno. Horneros	Colinas de Solymar	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Microsules I	Ruta 101 km 28	Capitán J. Artigas	Arroyo Pando	Infiltración al Terreno	Química	Fabricación productos farmacéuticos
Microsules II	Ruta 101 Km. 28	Capitán J. Artigas	Falta Curso	Infiltración al Terreno	Química	fabricación/formulación de pesticidas, agroquímicos y
Milentur S.A.	Camino Eduardo Perez y Camino Vecinal	Colinas de Solimar	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Mirabel S.A. (Ruta 76, ex	Ruta N° 75 Km. 36.500	Pando	Arroyo Pando	Curso de agua	Cárnica	Matadero de suinos
Montelur S.A.	Los Ceibos N° 5212	Pando	Falta Curso	Curso de agua	Química	Productos químicos inorgánicos
Olbinco S.A.	Camino de los Horneros y Camino Paso del Escobar	Lomas de Solymar	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Ontilcor	Ruta N° 75 Km. 34.200	Pando	Falta Curso	Curso de agua	Cárnica	Matadero de vacunos
Oscar Muñiz Arocena	Ruta 33 km. 30,500	Carrasco El Sauce	Arroyo Pando	Curso de agua	Cárnica	Tripería
OSE Pando (NO ES SADI)	Ansina esq. Danubio	Pando	Río de la Plata - 220	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento de OSE
Plaza Industrial S.A.	Ruta 101 24.200	Pueblo Artigas	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
San Jacinto	Ruta N° 7 Km. 59.500	San Jacinto	Arroyo Pando	Curso de agua	Cárnica	Matadero de vacunos
Sarel	Ruta N° 7 Km. 28.600	Pando	Arroyo Pando	Infiltración al Terreno	Cárnica	Matadero de equinos
Sindon S.A.	Ruta 80 Km. 91	Montes	Arroyo Solis Grande	Curso de agua	Cárnica	Chacinería
Tibamar S.A. (Altos de la	Camino de los Horneros N° 2220	Lomas de Solymar	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Todlin S.A.	Paraje Rincon de Carrasco	Paraje Rincon de Carrasco	Arroyo Pando	Curso de agua	Doméstico	Planta de tratamiento cloacales
Torrente S.A.	Los Ceibos 5215	Pando	Arroyo Pando	Infiltración al Terreno	Química	Productos químicos orgánicos
Universal Plastic S.A.	Ruta 7 km. 36200	Total del Sauce	Arroyo Pando	Infiltración al Terreno	Caucho y plástico	Artículos de plástico
Urupema S.A.	Ruta N° 8 Km. 27.200	Capitan J. A. Artigas	Arroyo Pando	Curso de agua	Química	Pinturas y plastificantes

Tabla 7: Variables ambientales (temperatura, salinidad conductividad, concentración de oxígeno disuelto y porcentaje de oxígeno disuelto) de fondo y superficie, para los estuarios Pando, Solís Chico y Solís Grande en las cinco temporadas.

Fecha y Estuario	Temperatura (C°)		Salinidad (ppt)		Conductividad (mS/cm)		Oxígeno disuelto (mg/L)		Porcentaje de oxígeno	
	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo	Superficie	Fondo
Octubre 2011.										
Pando	15,15 ±0,49	14,3 ±0,7	15,97 ± 1,15	25,72 ±4,34	19,99 ±0	34,98 ±0	9,78 ±0,28	9,3 ±0,16	98,15 ±0,91	83,27 ±10,35
Solís Chico	15,9 ±0,42	14,55 ±0,35	16,84 ±3,81	25,87 ±2,14	18,94 ±0	30,33 ±0	10,5 ±0,5	11,07 ±0,76	106,3 ±6,5	104,55 0,91
Solís Grande	14,65 ± 1,48	13,55 ±0,63	16,47 ±9,5	27,07 ±5,05	28,58 ±0	36,43 ±0	11,39 ±2,13	9,39 ±0,65	108,55 ±3104	90,4 ±7,77
Mayo 2012.										
Pando	15,93 ±0,11	16,73 ±0,15	11,7 ±0,02	10,52 ±5,68	1,88 ±0,04	14,5 ±7,37	10,51 ±0,35	7,16 ±0,14	108,9 ±3,56	75,3 ±1,65
Solís Chico	17,23 ±0,06	18,3 ±0	5,21 ±0,4	21,21 ±0,2	7,57 ±1,12	29,4 ±0,26	11,24 ±0,13	1,35 ±0,38	116,8 ±199	12,2 ±0,3
Solís Grande	17,13 ±0,35	17,96 ±0,05	18,45 ±0,23	32,45 ±0,03	25,25 ±0,47	42,91 ±0,04	8,55 ±0,23	5,65 ±0,16	89,13 ± 151	59,43 ± 1,1
Setiembre 2012.										
Pando	14,2 ±0	14,1 ±0	8,45 ±0,3	8,29 ±0,03	11,3 ±0,22	11,31 ±0,3	10,2 ±0,04	10,12 ±0,06	99,63 ±0,25	98,26 ±0,65
Solís Chico	15,33 ±0,05	15,06 ±0,11	8,04 ±0,01	11,83 ±0,28	11,3 ±0,19	16,03 ±0,36	14,66 ±0,1	10,76 ±1,43	146,53 ±1	106,56 ±14,15
Solís Grande	17,05 ±0,07	15,45 ±2,33	7,19 ±0,05	12,51 ±7,5	10,63 ±0,87	16,87 ±0,88	9,4 ±0,01	7,82 ±0,5	97,25 ±0,49	78,05 ±2,05
Noviembre 2012.										
Pando	23,1 ±0	20,8 ±0,3	13,62 ±7,97	22,39 ±0,52	21,39 ± 1,21	32,6 ±0,5	8,52 ±0,06	9,29 ±0,06	99,5 ±0,65	103,26 ±3,05
Solís Grande	20,23 ±0,15	19,13 ±0,05	20,07 ±0,38	28,34 ±0,05	29,26 ±0,53	38,91 ±0,01	8,3 ±0,02	7,95 ±0,4	91,06 ±0,92	86,33 ±5,03
Febrero 2,013										
Pando	23,8 ±0	26,2 ±5,19	21,1 ±0,01	21,97 ±0,04	32,89 ±0,01	33,72 ±0,05	6,93 ±0,16	6,95 ±0,2	82,2 ±194	81,4 ±2,38

ANEXO IV

Tabla 8: Largo total promedio (cm) y desvío estándar para *Odontesthes argentinensis*.

Temporada	Pando	Solís Chico	Solís Grande
Octubre 2011.	10,06 ± 0,70	10,09 ± 2,02	11,69 ± 3,28
Mayo 2012.	10,04 ± 0,53	11,35 ± 0,61	10,38 ± 0,94
Setiembre 2012.	10,42 ± 1,25	-	-
Noviembre 2012.	14,40 ± 1,33	-	-
Febrero 2013.	19,27 ± 1,83	-	-

Tabla 9: Largo total promedio (cm) y desvío estándar para *Paralichthys orbignyanus*.

Temporada	Pando	Solís Chico	Solís Grande
Mayo 2012.	13,86 ± 3,83	7,59 ± 3,74	7,31 ± 2,19
Setiembre 2012.	-	8,46 ± 2,92	7,10 ± 2,09
Noviembre 2012.	12,90 ± 0,00	-	10,62 ± 7,23

Tabla 10: Largo total promedio (cm) y desvío estándar para *Mugil platanus*.

Temporada	Pando	Solís Chico	Solís Grande
Mayo 2012.	15,6 ± 3,68	8,82 ± 1,39	-
Setiembre 2012.	11,3 ± 0,59	-	-
Noviembre 2012.	4,49 ± 1,14	-	-
Febrero 2013.	4,27 ± 2,82	-	-

Tabla 11: Largo total promedio (cm) y desvío estándar para *Micropogonias furnieri*.

Temporada	Pando	Solís Chico	Solís Grande
Noviembre 2012.	8,83 ± 1,09	-	-
Febrero 2013.	8,95 ± 0,88	-	-