

UCH-FC  
B. Ambiental  
K444  
C.1



ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**“EL ROL DEL OXÍGENO Y EL PH EN LA EVALUACIÓN DE ECOTOXICIDAD CON BIOENSAYOS DE CONTACTO, UTILIZANDO EMBRIONES DE PEZ CEBRA”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga Ambiental, por:

**MARÍA DEL SOL KEYER**

**Dr. Miguel Allende Connelly**  
Director de Seminario de Título

**M. Sc. Javiera De la Paz Montt**  
Co-Directora de Seminario de Título

**Julio 2012**  
**Santiago - Chile**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

**MARÍA DEL SOL KEYER**

Titulado:

**“EL ROL DEL OXÍGENO Y EL PH EN LA EVALUACIÓN DE ECOTOXICIDAD CON BIOENSAYOS DE CONTACTO, UTILIZANDO EMBRIONES DE PEZ CEBRA”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga Ambiental:

*Dr. Miguel Allende Connelly*  
**Director Seminario de Título**

*M.Sc. Javiera De la Paz Montt*  
**Co-Directora Seminario de Título**

**Comisión de Evaluación**

*M.Sc. Irma Vila*  
**Presidenta Comisión**

*Dr. Sylvia Copaja*  
**Evaluadora**



Santiago de Chile, Julio 2012

## BIOGRAFÍA



Nací en mi casa, tras el largo e intenso trabajo de parto de mi madre, que me trajo al mundo sin anestesia, a fuerza de voluntad y ejercicios respiratorios. Me recibieron los brazos de mi padre, que luego de recibirme chocho y decidir que yo sería "María", me cortó el cordón umbilical y me bañó, para después recostarme en el pecho de mi madre. Es así como las fuerzas naturales y sus fenómenos siempre me han interesado, debido al enérgico influjo de mis padres, que me inculcaron desde muy pequeña el respeto y amor por la naturaleza. Esta fascinación me llevó a decidir estudiar biología con mención en medio ambiente, para poder observar de cerca y objetivamente todo lo que me interesaba.

*A mi abuelo,  
Fernando del Sol*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Javiera de la Paz, por introducirme en el fabuloso mundo del pez cebra, por su entusiasmo inspirador y su iniciativa creativa, porque al meterse de cabeza a unir el mundo "moleculín" de la biología del desarrollo con la visión integradora de las problemáticas ambientales, abrió un campo en el que pude realizar con gusto mi seminario de título. También por su paciencia, su ayuda siempre oportuna, y las ideas y consejos fundamentales que me hicieron sentir acompañada, como si tuviera una "tutora personal", en un campo que es nuevo en la facultad.

Quiero agradecer por supuesto a Miguel Allende, por permitirme trabajar en un tema tan disímil de lo que suele hacer normalmente, por darme siempre la libertad y apoyo para explorar el tema a mi manera y según se fueron dando las cosas. Ha sido un placer trabajar bajo su dirección, pues su carácter afable y tranquilo se irradia a todo el laboratorio.

Quiero agradecer muy especialmente a Florencio Espinoza y Catalina Lafourcade, piedras angulares del laboratorio, fundamentales para el funcionamiento de todo, por su constante apoyo y cariño. Fue un honor trabajar con ellos, pues se nota que hacen su trabajo con amor y son ejemplos increíbles de que se puede trabajar eficientemente sin estresarse demasiado.

Por supuesto también le agradezco mucho a Juan Silva, "Juanito", por tener siempre todo limpio en el laboratorio a pesar del caos y mis "juegos con tierra", y por los exquisitos pasteles, galletas y cafecito que nos tuvo siempre puntualmente listo para los seminarios.

Quiero agradecer también muy especialmente a la profesora Sylvia Copaja, por su ayuda esencial respecto a la relación de los metales pesados con los sedimentos, por brindarme consejo respecto a aspectos clave de mi tesis, y por su apoyo desinteresado, reflejado, entre otras cosas, en el millón de veces que me prestó los tamices para procesar mis muestras.

Agradezco por supuesto a los proyectos FONDAP 15090007 y FONDECYT 1110275 que financiaron todo el seminario de título.

Quiero agradecer por otra parte a Nicolás Inostroza, por informarme sobre el tema de contaminación de suelos y sedimentos; por ayudarme a escoger un lugar de muestreo e incluso acompañarme luego a terreno a tomar las muestras.

Agradezco mucho también a Natalia Beiza, la Nati, por ayudarme en los asuntos estadísticos y por acompañarme gustosamente a terreno. También por su compañía y amistad dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco a Claudio Silva, que nos llevó las dos veces al lugar de muestreo en Penciahue, muy cordial y simpáticamente.

Agradezco a Don Héctor Sanhueza, que muy amablemente nos hizo de guía en terreno la primera vez que estuvimos allí.

Por supuesto agradezco a mis amigas entrañables, Sharim Sharom, Lauris, Marianne y Misque Sol, por ser un apoyo constante mucho más allá de lo que tuviera que ver con la U, por estar ahí siempre, en las buenas y en las malas, y por hacerme reír tanto!!!

Agradezco a mis amigas del colegio, Nao y Omiwis, por comprender que a pesar de que no nos viéramos muy seguido durante estos años, la amistad perdura con la misma fuerza de siempre!

Agradezco también a mis amigos, compañeros y jefes del famoso "Mr. Jack", por apoyarme y escucharme cuando estaba muerta del cansancio, por compartir y hacer un jugo "maravilloso" de esas miles de horas que pasamos juntos repartiendo hamburguesas, cervezas y milkshakes (y por los carretes memorables!).

Agradezco a mis amigos y compañeros del taller de acrobacia aérea, especialmente a mis "favoritos" Pollo y Patatita, Fran y Vale, Mara y Álvaro, Isabel y Alonso, Ale y Chapa; por compartir tan generosamente sus conocimientos, sus ganas de aprender cosas nuevas, esos momentos mágicos de vuelo y por esos abrazos tan ricos de cuando nos echamos de menos.

Agradezco a mi familia, a mis padres Antonio y Verónica, que me criaron tratando de vivir lo más armoniosamente posible con el entorno; a mi hermano querido, Milán, por acompañarme y apoyarme en todo lo que me apasiona; a mis primas Marce y Grisel, por las excelentes conversaciones; a mis primos Pato, Pipe, Pablitis, Fran, Franche, Ro, Pablo y Bastián, por los buenos momentos; y a mis tíos y tías, Tere, Caco, Mónica, Cristián, Nano, Pato, Maricarmen, Fina y Chela, por su ayuda en momentos difíciles.

Agradezco a Sebastián Beltrán y Sergio Vicencio, cuyo cariño y apoyo fue elemental durante mi proceso de estudios.

Agradezco por supuesto a Carlos Henríquez, por su magnífico trabajo.

Agradezco también a mi querido amigo Aldo, quien se pasó la noche entera editando conmigo los maravillosos videos para la defensa de este seminario.

Quiero hacer una mención especial de agradecimiento a la "Embajada de Santiago en Quito", por su magnífico apoyo, generosidad y hospitalidad, que me permitieron desarrollar la mayor parte de este escrito.

Por último agradezco muchísimo a Manuel Stemmer, Manu querido, por todo lo increíble y hermoso que ha sido este último tiempo, que ha coincidido con el desarrollo de mi seminario de título y muchos otros procesos importantes para mí.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Importancia de la evaluación de calidad toxicológica del recurso hídrico..	1
1.2 Importancia de la calidad de los sedimentos.....	2
1.3 Análisis biológicos (bioensayos) de matrices ambientales con modelo vertebrado.....	3
1.4 Bioensayos de contacto.....	4
1.5 Ventajas de los embriones de <i>Danio rerio</i> (pez cebra).....	5
1.6 Aspectos clave de los bioensayos.....	5
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis.....	7
2.2 Objetivo General.....	7
2.3 Objetivos Específicos.....	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1 Obtención de embriones.....	8
3.2 Lugar de muestreo.....	8
3.3 Recolección de muestras y procesamiento de éstas.....	10
3.4 Observaciones en terreno.....	11

3.5	Medición de parámetros químicos en laboratorio.....	11
3.6	Análisis químico de metales pesados presentes en sedimentos.....	12
3.7	Análisis biológico de sedimentos.....	12
3.7.1	<u>Experimentos de optimización</u> .....	12
3.7.2	<u>Características observadas en los experimentos de optimización</u> .....	16
3.7.3	<u>Experimentos en valores puntuales de pH</u> .....	20
3.7.4	<u>Características observadas en los experimentos en valores puntuales de pH</u> .....	20
3.8	Análisis estadístico.....	22
IV.	RESULTADOS.....	23
4.1	Observaciones en terreno.....	23
4.2	Medición de variables químicas en laboratorio.....	23
4.3	Análisis químico de metales presentes en sedimentos.....	24
4.4	Análisis biológico de sedimentos.....	28
4.4.1	<u>Ensayos de optimización</u> .....	28
4.4.2	<u>Experimentos en valores puntuales de pH</u> .....	44
V.	DISCUSIÓN.....	69
5.1	Observaciones en terreno y Medición de parámetros químicos.....	69
5.2	Análisis químico de metales presentes en sedimentos.....	70
5.3	Análisis biológico de sedimentos.....	71
5.3.1	<u>Ensayos de optimización</u> .....	71
5.3.2	<u>Resumen ensayos de optimización</u> .....	77
5.3.3	<u>Experimentos en valores puntuales de pH</u> .....	78
VI.	CONCLUSIONES.....	80

VII. BIBLIOGRAFÍA.....	81
VIII. ANEXO.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Movimiento de los sedimentos.....	2
Figura 2. Sedimentos como reservorio y fuente de contaminantes.....	3
Figura 3. Ubicación geográfica del muestreo de sedimentos.....	9
Figura 4. Tamizado de los sedimentos.....	10
Figura 5. Montaje de los bioensayos de contacto.....	12
Figura 6. Esquema de ensayos de optimización.....	14
Figura 7. Aspecto real de los experimentos de optimización.....	15
Figura 8. Desarrollo y extensión de la notocorda del embrión.....	16
Figura 9. Formación de MHB, somitos y aletas pectorales.....	17
Figura 10. Desarrollo del saco vitelino.....	18
Figura 11. Pigmentación.....	18
Figura 12. HTA.....	19
Figura 13. Concentración de metal encontrada en los sedimento. ....	24
Figura 14. Proporción de la cantidad total de metal lábil.....	25
Figura 15. Diagramas de distribución de especies de cada metal.....	27
Figura 16. Estadio aparente de embriones de 24 h incubados en el bioensayo de contacto clásico (BCC).....	29
Figura 17. Estadio aparente de los embriones incubados en cada tipo de bioensayo..	30
Figura 18. Muerte de los embriones .....	31
Figura 19. Supervivencia de los embriones incubados en cada tipo de bioensayo .....	32
Figura 20. Apariencia de embriones de 30 h, dentro de su corion.....	33
Figura 21. Eclosión de los embriones incubados en cada tipo de bioensayo.....	34
Figura 22. Movimiento de los embriones incubados en cada bioensayo.....	36
Figura 23. Saco vitelino de los embriones incubados en cada bioensayo.....	38

Figura 24. Pigmentación de larvas de 72 h incubadas en el bioensayo de contacto clásico (BCC).....	39
Figura 25. Pigmentación de las larvas incubadas en cada bioensayo.....	40
Figura 26. . Límite entre cerebro medio y posterior (MHB) de embriones de 24 h incubados en el bioensayo de contacto clásico (BCC).....	41
Figura 27. Límite entre cerebro medio y posterior (MHB) de embriones de 24 h incubados en cada bioensayo.....	41
Figura 28. Extensión de la notocorda de larvas de 48 h incubadas en cada bioensayo.....	42
Figura 29. Aletas pectorales de larvas de 72 h incubadas en el bioensayo de contacto clásico (BCC).....	43
Figura 30. Aletas pectorales de larvas de 72 h incubadas en cada bioensayo.....	43
Figura 31. Comparación entre embriones y larvas expuestos(as) a E3 a distinto pH....	47
Figura 32. ( <i>Continuación de la figura 31</i> ) Comparación entre embriones y larvas expuestos(as) a E3 a distinto pH.....	48
Figura 33. Estadio aparente de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH .....	49
Figura 34. Supervivencia de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.....	50
Figura 35. Eclosión de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.....	51
Figura 36. Ojos de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.....	52
Figura 37. Cápsulas óticas de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.....	53
Figura 38. Pigmentación de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH....	54
Figura 39. Diferentes defectos en el corazón de larvas de 72 hpf expuestas a sedimentos.....	55

Figura 40. Forma del corazón de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	55
Figura 41. Frecuencia cardíaca de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	56
Figura 42. Circulación corporal de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	57
Figura 43. Deformación del saco vitelino de larvas de 48 hpf producto de edema(s).....	58
Figura 44. Larvas de 96 hpf con saco vitelino con diferente estado.....	58
Figura 45. Saco vitelino de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.....	58
Figura 46. Embriones de 24 hpf con edemas de diferentes tamaños y ubicación.....	59
Figura 47. Larvas de 96 hpf con edemas de diferentes tamaños y ubicación.....	59
Figura 48. Formación de edemas en embriones y larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	60
Ángulo cabeza-tronco ( <i>head-trunk angle</i> , HTA) de embriones y larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	61
Figura 50. Notocorda de embriones y larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	62
Figura 51. Movimiento en respuesta a estímulo mecánico de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	63
Figura 52. Aletas pectorales de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	64
Figura 53. Aleta caudal de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH....	65
Figura 54. Protrusión de la mandíbula de larvas de 72 hpf.....	66
Figura 55. Mandíbula de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	66
Figura 56. Características observadas sólo a las 24 h. A) Límite entre cerebro medio y posterior (MHB) de embriones expuestos a sedimentos con medio a distinto pH.....	67

Figura 57. Inflación de la vejiga natatoria.....	68
Figura 58. Vejiga natatoria de larvas de 96 h expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.....	68
<i>Figura S1. Metales pesados medidos, a la misma escala.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura S2. Parte posterior del cuerpo de larvas de 48 hpf expuestas a polvo de cuarzo.....</i>	<i>91</i>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características observadas en los experimentos de optimización.....	17
Tabla 2. Características observadas en los experimentos con valores puntuales de pH.....	20
Tabla 3. Variables químicas medidas.....	22
Tabla 4. Observaciones consideradas normales y anormales de las características analizadas en los ensayos de optimización.....	28
Tabla 5. Observaciones consideradas normales y anormales de las características analizadas en los experimentos en valores puntuales de pH.....	44
<i>Tabla S1. Tabla de observaciones en terreno, 1er muestreo, punto AD-Mar.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabla S2. Tabla de observaciones en terreno, 1er muestreo, punto DD-Mar.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabla S3. Tabla de observaciones en terreno, 2do muestreo, punto AD-Oct.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabla S4. Tabla de observaciones en terreno, 2do muestreo, punto AD-Oct.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla S5. Resultados medición de oxígeno en el medio acuático con polvo de cuarzo y sedimentos, en un punto inicial y 24 h después.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla S6. Resultados análisis químicos de metales.....</i>	<i>90</i>



## LISTA DE ABREVIATURAS

Variables Físicas	Longitud	m	metro	
		mm	milímetro	
		µm	micrómetro	
	Volumen	L	litro	
		mL	mililitro	
	Masa	g	gramo	
		mg	miligramo	
	Tiempo	h	hora	
	Temperatura	°C	grados Celcius	
	Conductividad	µS	microSiemens	
	Concentración	M	molar	
	Presión	mPa	milliPascales	
Variables Biológicas	Edad	hpf	horas post fertilización	
	Bioensayos	FET	Fish Embryo Toxicity (toxicidad de embriones de pez)	
	Características Biológicas del Desarrollo	MHB	Midbrain-Hindbrain Boundary (límite entre cerebro medio y posterior)	
		OVL	Otic Vesicle Length (longitud de la vesícula ótica)	
		HTA	Head-Trunk Angle (ángulo entre cabeza y cuerpo)	
Siglas de este Seminario de Título	Bioensayos de Contacto	BCC	Bioensayo de Contacto Clásico (bioensayo de contacto con)	
		SAC	Sistema de Aireación Constante (bioensayo de contacto con)	
		MVA	Mínimo Volumen de Agua	
Siglas de Organismos u Organizaciones	Chilena	CONAMA	Corporación Nacional del Medio Ambiente (Chile)	
	Internacional	ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales)	
	Internacional	OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico)	
	Estadounidense	USEPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)	

## RESUMEN

Para evaluar la calidad ecotoxicológica de un sistema acuático se debe incluir la matriz sedimentaria en los análisis. Los sedimentos actúan como reservorio de contaminantes, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, los contaminantes son liberados y solubilizados en el cuerpo de agua, volviéndolo más tóxico de lo que cabría esperar si sólo se hacen análisis de la columna de agua. Las ventajas que presentan los embriones de pez cebra los vuelven tremendamente útiles para realizar análisis biológicos, parte fundamental de una evaluación ecotoxicológica. Existen varias aproximaciones para evaluar biológicamente la calidad de los sedimentos, siendo el *bioensayo de contacto* el que mejor reproduce la exposición *in situ* de los organismos a los contaminantes. Hoy en día no existe un protocolo estandarizado de bioensayo de contacto, lo que se debe, entre otros, al siguiente factor limitante: la declinación de oxígeno que se produce por la demanda biológica y/o química de los sedimentos. Circunscribiéndonos al caso de sedimentos contaminados con metales pesados, en este trabajo se proponen y analizan dos variaciones al bioensayo de contacto clásico (BCC): un bioensayo de contacto con un sistema de aireación constante (SAC) y un bioensayo de contacto con un mínimo volumen de agua (MVA). Si bien ambos resuelven el problema de la declinación de oxígeno, permitiendo distinguir los efectos producidos por hipoxia de los producidos por toxicidad de metales pesados presentes en sedimentos, el MVA resulta más práctico y fácil de estandarizar. Se utilizó esta metodología para abordar un segundo aspecto a considerar a la hora de evaluar un sistema acuático: los cambios de pH. Aunque los cuerpos de agua suelen mantenerse en un pH cercano al neutro o básico, pequeños cambios producidos al verter contaminantes ácidos, entre otros, pueden provocar un incremento de la solubilidad de metales pesados presentes en los sedimentos, generando un aumento de su biodisponibilidad en el cuerpo de agua. Se utilizó el bioensayo de contacto MVA con sedimentos expuestos a medio acuático con pH 7,0; pH 6,0 y pH 5,0. Los embriones se desarrollaron sin inconvenientes dentro de estos límites de acidez, y aparentemente se produce un aumento mínimo en la

solubilidad de los metales dentro de este intervalo de pH, por lo que no se observaron diferencias significativas.

### ABSTRACT

In evaluating ecotoxicologic quality of an aquatic system it is necessary to include a sediment matrix assessment. Sediments act as pollutant reservoirs, but under certain circumstances, pollutants are released and dissolved in water system, making it more toxic than if only water is assessed. The advantages of zebrafish embryos make them immensely useful for biological assessments, which are fundamental for ecotoxicologic evaluation. There are several approaches for evaluating the biological quality of sediments, being the *contact bioassay* the one that better reproduces *in situ* exposure of organisms to pollutants. There is still no standardized protocol for contact bioassay, which is somewhat due to the following factors: the low available oxygen due to the biological and/or chemical demand of sediments. Restricting our consideration to heavy metal polluted sediments, we develop and test two classic contact bioassay variations: a contact bioassay with a constant aeration system and a low water volume contact bioassay. Even though both of them resolve the problem of decreasing available oxygen, allowing distinctions between hypoxic effects and toxic effects of heavy metal polluted sediments, the lower water volume contact bioassay is easier to standardize. This method was used to asses another important aspect when evaluating the ecotoxicological quality of an aquatic system: pH values. Although water bodies maintain a neutral to basic pH most of the time, small changes produced by acid waste dumping could elevate the solubility of heavy metals present in sediments, generating an unexpected toxicity in body water. Lower water volume contact bioassay was used with sediments exposed to aquatic media at pH 7.0, pH 6.0 and pH 5.0. Embryos develop without any problems at these pH values, and apparently there is just a small rise in heavy metals solubility within this pH interval, so no significant differences were observed.

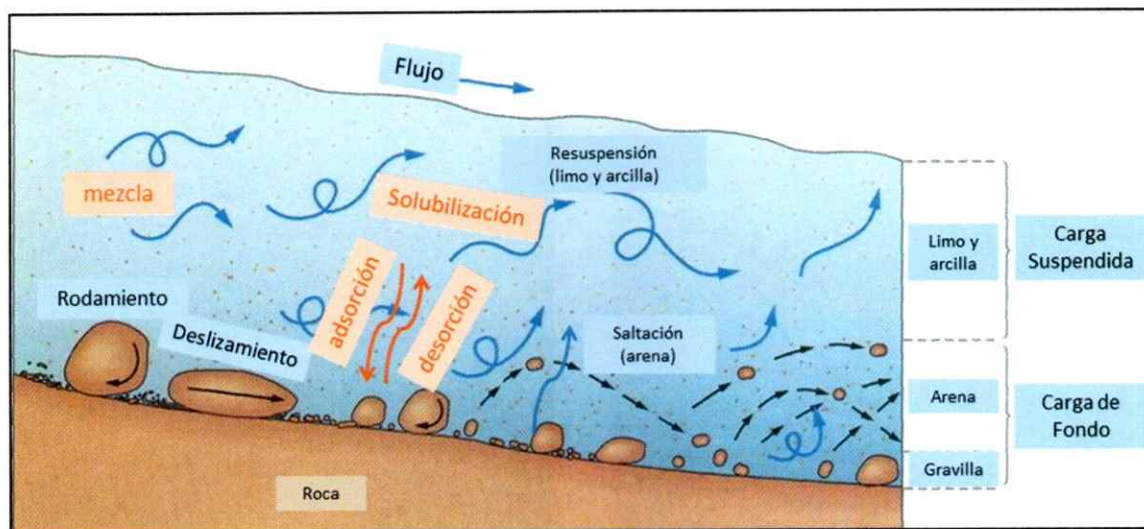
## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia de la evaluación de calidad toxicológica del recurso hídrico

Chile es un país cuya riqueza se basa en la exportación de materia prima. La actividad minera es uno de sus principales motores económicos, encontrándose actividad extractiva de distintos metales y minerales de norte a sur en nuestro país. El procesamiento del material extraído requiere grandes cantidades de agua, lo que ejerce fuertes presiones sobre este recurso. Debido a esto, se vuelve un tema de extrema importancia no sólo la cantidad de agua disponible, sino también su calidad; ya no sólo en el ámbito del consumo y la salud humana (Normas Primarias), o en función de su uso en actividades como la agricultura y ganadería, sino también en relación a su importancia en relación a la salud de la biota de la zona, es decir, respecto a la salud ecosistémica del lugar (Normas Secundarias). En respuesta a esta creciente preocupación, actualmente se encuentran en desarrollo las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para Aguas (Molina & Vila 2006; CONAMA 2004); encontrándose en estado de elaboración del proyecto definitivo las correspondientes a las cuencas de 13 ríos: Loa, Huasco, Elqui, Limarí, Maipo-Mapocho, Aconcagua, Cachapoal, Mataquito, Bío Bío, Villarrica, Aysén y Baker; en 11 Regiones: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XI y Metropolitana (MMA 2012). Esto conlleva un avance sin precedentes en materia ambiental en nuestro país, sin embargo, dichas normas sólo contemplan la calidad toxicológica de la columna de agua, y no consideran los sedimentos bajo ésta al evaluar los sistemas acuáticos.

## 1.2 Importancia de la calidad de los sedimentos

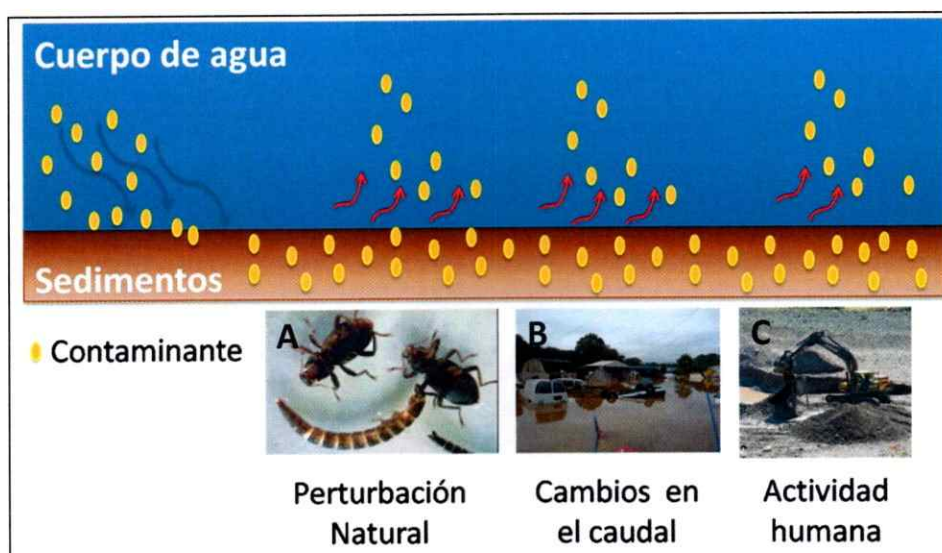
La calidad toxicológica de la matriz sedimentaria es muy relevante en los cuerpos de agua, dado que ésta funciona como *reservorio de contaminantes*, y su alteración bajo variadas circunstancias, como: bioturbación (agitación o mezcla del sedimento por actividad de organismos bentónicos), dragado de material u otras actividades antrópicas, eventos fluviométricos, o eventos químicos que causen adsorción y posterior desorción de contaminantes; pueden transformarla en una *fuentes de contaminación* (Hallare et al. 2011; Rocha et al. 2011; Wölz et al. 2009; Wölz et al. 2008; Hollert et al. 2003; Chapman et al. 1998; Neumann et al. 1998).



**Figura 1. Movimiento de los sedimentos.** La matriz sedimentaria es un sistema dinámico. Las partículas son transportadas por el flujo acuático, teniendo distinto movimiento y comportamiento según su tamaño y naturaleza química. Figura modificada de <http://rusoares65.pbworks.com>; Glossário "Geodinâmica Externa e Risco Geológico"

Al hacerse un análisis toxicológico considerando sólo la matriz acuática, probablemente se subestima la carga total de contaminantes presentes en el sistema límico. Actualmente existe evidencia de que la calidad toxicológica de la matriz

acuática no refleja la calidad toxicológica del sistema total, y que es necesario evaluar tanto la matriz acuática como la sedimentaria (Rocha et al. 2011; Hallare et al. 2005).



**Figura 2. Sedimentos como reservorio y fuente de contaminantes.** Los sedimentos actúan como reservorio de contaminantes, pero pueden pasar a ser fuente de éstos al ser perturbados por: **A)** Movimiento y excavación de fauna bentónica, **B)** Cambios pluviométricos, o **C)** Actividad humana de construcción, dragado de material y/o descarga de residuos químicos.

### 1.3 Análisis biológicos (bioensayos) de matrices ambientales con modelo vertebrado

Para evaluar el potencial riesgo que conlleva la contaminación química para las comunidades acuáticas, se recomienda utilizar análisis biológicos, además de los físico-químicos actualmente considerados. La ventaja proporcionada por los bioensayos radica en su capacidad para mostrar los efectos sobre la biota de un conjunto de contaminantes que no necesariamente se encuentran identificados, reflejando las interacciones sinérgicas, sumatorias o anulatorias existentes entre ellos (Rocha et al. 2011; Hallare et al. 2005).

Existen variados tipos de bioensayos para evaluar la calidad de sedimentos, en los cuales se utiliza en su mayoría organismos invertebrados (Hallare et al. 2011; Stesevic et al. 2007; Bat 2005; King et al. 2004; Wang et al. 2004; Steevens et al. 1998; Traunspurger et al. 1997; Keddy et al. 1995).

La utilización de modelos vertebrados en bioensayos para evaluación de agua, es reciente. La primera aproximación fue la realización de análisis de *toxicidad aguda* con peces adultos, es decir, observando sólo la sobrevivencia de los peces. Debido a problemáticas tanto éticas como prácticas respecto a su uso, recientemente se recomienda su reemplazo por la observación de puntos críticos en el desarrollo de embriones, en los cuales los defectos observados en el desarrollo denotan efectos subletales producidos por los contaminantes (Embry et al. 2010; Lammer et al. 2009; Scholz et al. 2008; Wedekind et al. 2007). Esta nueva modalidad se denomina FET test, *fish embryo toxicity test* (OECD 2006), y a pesar de existir fuertes argumentos que la recomiendan como metodología idónea para analizar, mediante un modelo vertebrado, sustancias químicas y contaminantes, aún se encuentra en desarrollo su versión definitiva y estandarizada (Scholz et al. 2008).

#### **1.4 Bioensayos de contacto**

Utilizando como base el FET test, se han desarrollado distintas aproximaciones para determinar la ecotoxicidad de los sedimentos, utilizando diferentes extractos o procesamientos de éstos. Los mayormente utilizados son: extracto orgánico (considerado como representativo del máximo potencial de contaminación), extracto acuoso, agua de poro (intersticial) y sedimento completo (Hollert et al. 2003; Burton 1991). Con el sedimento completo se realiza un "bioensayo de contacto", cuya

aproximación es la que resulta más similar a las condiciones de exposición *in situ* de los organismos a los contaminantes (Hallare et al. 2011; Keiter et al. 2010; Feiler et al. 2005; Hallare et al. 2005; Hollert et al. 2003).

### **1.5 Ventajas de los embriones de *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822)**

Este trabajo pretende aprovechar las ventajas que presenta el pez cebra, *Danio rerio*, como modelo biológico (corto tiempo generacional, transparencia de su huevo y embrión, rapidez y sincronía temporal del desarrollo, amplio conocimiento de su biología) con el fin de aportar conocimiento que permita mejorar y estandarizar la metodología de bioensayo de contacto utilizada en la actualidad.

### **1.6 Aspectos clave de los bioensayos**

Se ha descrito que este tipo de bioensayo presenta algunas restricciones, siendo una de ellas la disminución de la cantidad de oxígeno disponible por demanda biológica o química de los sedimentos. Esto afecta directamente la precisión del análisis, pues la hipoxia genera efectos evidentes a nivel morfológico. Se produce un marcado retraso en el desarrollo de los embriones, lo que impide distinguir entre los efectos producidos por falta de oxígeno versus los efectos producidos por toxicidad de los contaminantes presentes en los sedimentos (Strecker et al. 2011; Küster & Altenburger 2008).

Como este trabajo se restringe al estudio de contaminación relacionada a la minería, se analizarán los efectos producidos en el desarrollo de embriones por sedimentos altamente contaminados por metales.



Se persigue poner especial énfasis en dos aspectos, a nuestro parecer cruciales, del análisis biológico de sedimentos mediante bioensayo de contacto:

- Disminución del oxígeno disponible: los efectos producidos por hipoxia no pueden distinguirse de los producidos por contaminantes como los metales pesados; por lo que es necesario encontrar una forma de compensar o disminuir esta problemática.
- Cambios de pH: la bioaccesibilidad de metales pesados presentes en sedimentos, se ve afectada por la acidez del medio acuático; cambiando la solubilidad de los metales a distintos pH.

Incorporando modificaciones en la metodología original del bioensayo de contacto (Keiter et al. 2010; Feiler et al. 2005; Hollert et al. 2003), se intenta aportar al desarrollo de una metodología integral para el análisis toxicológico de sedimentos de aguas continentales, aprovechando un modelo biológico vertebrado más sensible, económico y rápido que los existentes.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

Tanto el oxígeno disponible como el pH, afectan la determinación de efectos subletales en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), producidos por metales pesados presentes en sedimentos.

### 2.2 Objetivo General

Proponer una nueva metodología de bioensayo de contacto que permita evaluar la toxicidad de sedimentos, producida por la presencia de metales pesados; reduciendo los efectos de la hipoxia y evaluando el cambio en la bioaccesibilidad de los metales producto de la variación en el pH del medio líquido presente sobre los sedimentos.

### 2.3 Objetivos Específicos

2.3.1. Probar variaciones al bioensayo de contacto clásico que permitan reducir los efectos tóxicos producidos por hipoxia, de manera que sean observables, específicamente, los efectos producidos por metales pesados bioaccesibles.

2.3.2. Determinar si valores moderadamente ácidos de pH (del medio acuoso) solubilizan los metales pesados presentes en los sedimentos, al grado de producir diferencias significativas en el desarrollo de los embriones.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Obtención de embriones

El vivero de peces del laboratorio se mantiene siguiendo las indicaciones propuestas por Nüsslein-Volhard & Dahm en 2002. Se tienen estanques de 30 L con 15 a 30 peces en cada uno. El sistema interconectado permite un recambio continuo de agua a  $28 \pm 5$  °C, la que es consecutivamente filtrada con papel corrugado, liberada de amonio por acción bacteriana, y esterilizada con luz UV. Se monitorea diariamente el pH y la conductividad, de forma que se mantenga un ambiente neutro (pH entre 6,8 y 7,5) y relativamente blando (conductividad entre 400 y 600  $\mu$ S). Los peces se exponen a un fotoperíodo de 14 horas de luz - 10 de oscuridad. Los adultos se alimentan dos veces al día con hojuelas secas TetraMin®, y una vez al día con nauplios de *Artemia*.

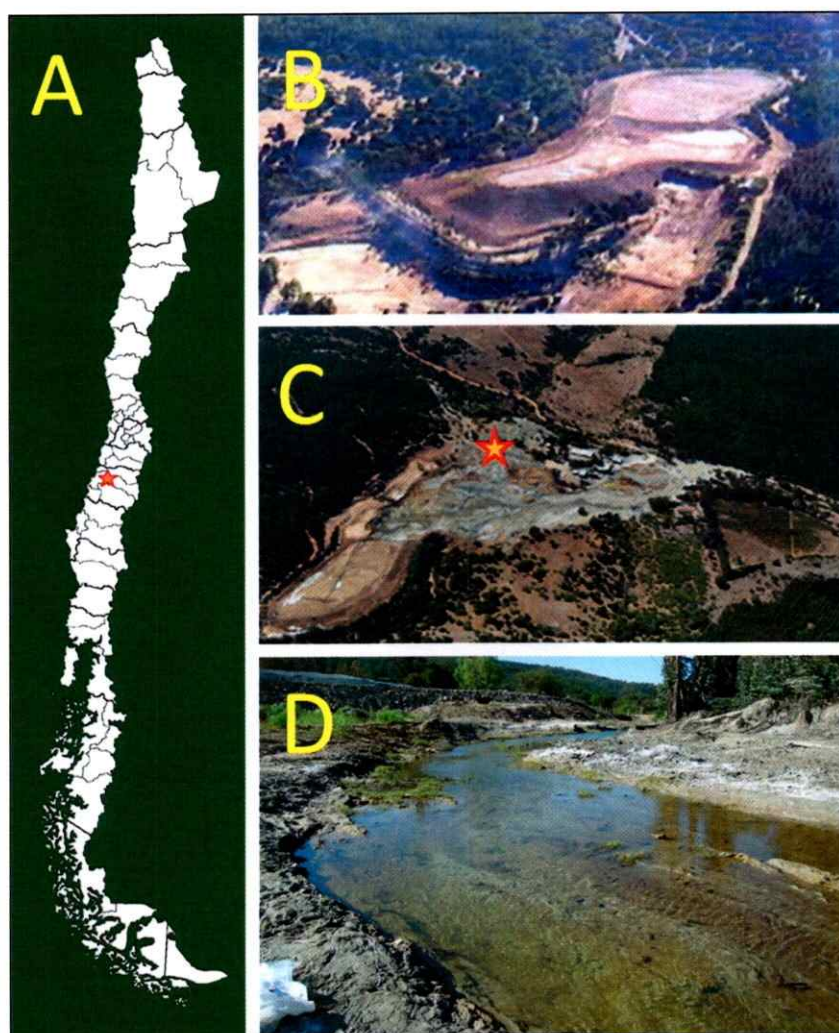
Se utilizan peces silvestres (*wild-type*). Los embriones se colectan haciendo cruces en cajas aisladas la tarde del día anterior a la colecta. Luego de haber sido alimentados con *Artemia*, hembras y machos son ubicados en cada caja (en proporción 2 a 1) y apartados mediante una separación removible. Esta separación se quita por la mañana, una vez que el ciclo de luz ha comenzado, para obtener embriones de la misma edad (sincronizados).

#### 3.2 Lugar de muestreo

Las muestras de sedimentos utilizadas fueron colectadas en un sitio con antecedentes de contaminación por metales pesados, relacionada a la actividad minera (Figura 3).

Producto del terremoto del 27 de febrero del 2010, se produjo un derrame de relaves del tranque de la mina de oro Las Palmas de Tapihue (inactiva), ubicada al noreste de Penco, en la provincia de Talca, VII Región del Maule.

Aledaño al tranque se encuentra el estero Los Ladrones. El depósito del tranque siguió el cauce de este estero tras el colapso de la estructura. Se recolectó sedimento en dicho estero, en un punto directamente afectado por el derrumbe.



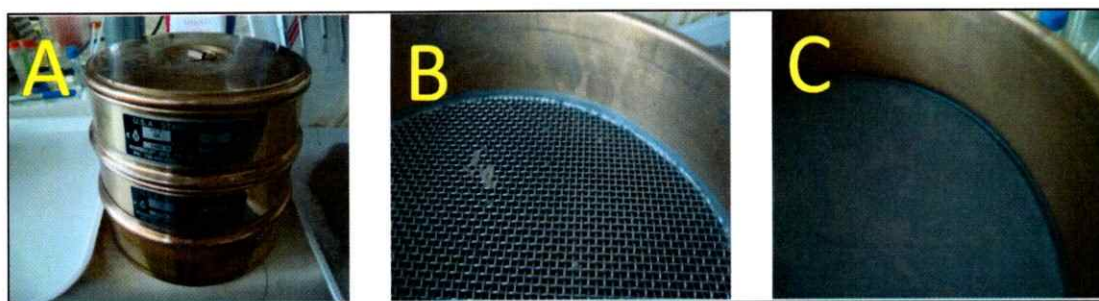
**Figura 3. Ubicación geográfica del muestreo de sedimentos.** A) Mina de oro Las Palmas de Tapihue; zona central de Chile. B) Tranque de relaves de Mina Las Palmas, disposición anterior al terremoto. C) Derrame del tranque producto del terremoto del 27/02/10. La estrella marca el punto de muestreo. D) Punto de muestreo: estero Los Ladrones.

### 3.3 Recolección de muestras y procesamiento de éstas

Se realizaron dos muestreos, uno en otoño (muestra utilizada en los experimentos de optimización); y otro en primavera (muestra utilizada en los experimentos con distintos valores de pH).

Los sedimentos fueron colectados en frascos plásticos (polietileno de alta densidad) de 600 mL, prelavados con jabón neutro en primera instancia, enjuagados con agua potable, posteriormente remojados en solución de ácido nítrico 1 M (pH 2.0) por 24 h, y finalmente enjuagados 5 veces con agua destilada (hasta obtener conductividad 0  $\mu$ S).

Se colectaron los sedimentos cercanos a la superficie (0 – 5 cm de profundidad). Se transportaron a 4° C hasta Santiago, donde fueron secados a temperatura ambiente y luego tamizados (Figura 4) hasta obtener la fracción fina (63  $\mu$ m), pues se ha documentado que los metales pesados se adhieren mayormente a partículas pequeñas (arcillas), por la carga negativa que éstas presentan en la superficie, como también debido a la gran área superficial que poseen respecto a su volumen, lo que las vuelve altamente reactivas, pudiendo intercambiar iones con los metales pesados (Golterman et al. 1983; McBride 1994).



**Figura 4. Tamizado de los sedimentos.** Los sedimentos son secados a temperatura ambiente y luego tamizados para obtener la fracción fina (partículas de tamaño  $\leq$  a 0,063 mm). **A)** Tamiz estandarizado. **B)** Tamiz de 2 mm. **C)** Tamiz de 0,063 mm.

Cabe destacar que, al utilizar sólo la porción fina de los sedimentos; de la muestra tomada en terreno, en nuestro caso sólo quedó disponible para su utilización un 10% del peso inicial muestreado, tras su procesamiento.

### **3.4 Observaciones en terreno**

Se anotaron las condiciones climáticas del día de muestreo, el aspecto de la columna de agua sobre los sedimentos y el aspecto de los sedimentos. Se midió pH *in situ* (medido por bandas indicadoras de pH en el primer muestreo, y con pHmetro en el segundo), y se agregó la medición de conductividad en el último (ver Tablas S1, S2, S3 y S4 en el Anexo).

### **3.5 Medición de parámetros químicos en laboratorio**

Se midió el pH y la conductividad de sedimentos y polvo de cuarzo, luego de ser procesados. También se calculó la demanda bioquímica de oxígeno de sedimentos y polvo de cuarzo (Tabla 3). El consumo de oxígeno se calculó midiendo la diferencia entre la cantidad de oxígeno presente en el medio acuoso (ddH<sub>2</sub>O) en un momento inicial y 24 hr después, a 28 °C, en vasos de precipitado de 50 mL tapados con parafilm, siguiendo la proporción 3:7 sedimentos:líquido (ver Tabla S5 en el Anexo).

### **3.6 Análisis químico de metales pesados presentes en sedimentos**

Se analizaron 6 metales: Cadmio, Cobre, Cromo, Níquel, Fierro y Plomo, en el Laboratorio de Química Orgánica y Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Se determinó la fracción lábil, es decir, la fracción que pasa fácilmente al medio acuoso, de cada metal (digestión con ácido débil: ácido acético) y su concentración total en el sedimento (digestión ácida con aplicación de microondas), utilizando el primer y cuarto paso, respectivamente, de la técnica de especiación

descrita por Ure et al., en 1993, utilizando Espectrofotómetro de absorción atómica, con atomización por llama (Shimatsu) (ver Tabla S6 en el Anexo).

### **3.7 Análisis biológico de sedimentos**

Con base en la metodología de bioensayo de contacto clásico (Keiter et al. 2010; Feiler et al. 2005; Hollert et al. 2003), se incorporaron varias modificaciones con el fin de observar un mayor número de características correspondientes a cada estadio de desarrollo, contrarrestar los efectos causados por baja disponibilidad de oxígeno y optimizar la utilización de sedimentos, aumentando el *n* de embriones/larvas por pocillo (cada pocillo es una réplica).

En la metodología original, se disponen 5 embriones por pocillo, sin embargo, en este trabajo se aumentó el número de embriones por pocillo a 15, con el fin de evitar que la muerte de 1 embrión por pocillo, invalidara el experimento por anulación de controles; ya que se consideraron sólo los ensayos cuyos controles tuvieran una sobrevivencia mayor al 90%.

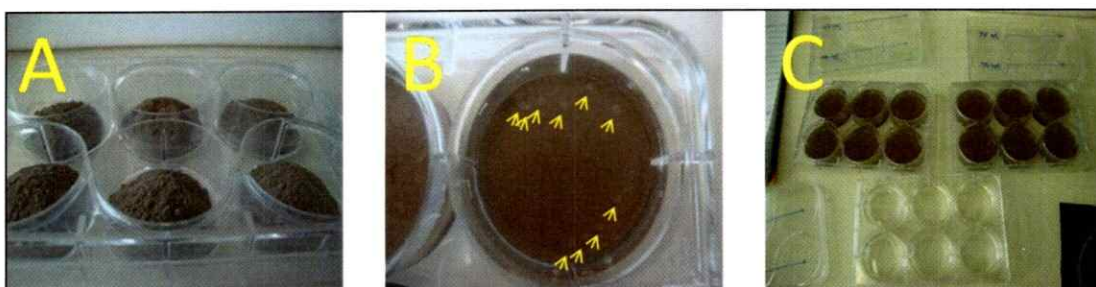
Un embrión se desarrolla en perfectas condiciones al disponer de 1 mL de medio acuoso cada 5-10 embriones (Kimmel et al. 1995) y 0,5 mg/L de oxígeno como mínimo (Hollert et al. 2003), aunque otras fuentes recomiendan que el medio acuático posea 2,5 mg/L de oxígeno disuelto o más (USEPA 1994; ASTM 1995).

En todos los experimentos, se utilizaron placas de 6 pocillos, con 15 embriones de 3-5 horas post fertilización (hpf) en cada pocillo, incubados con un régimen semi-estático (cambio de medio acuoso y sedimento cada 24 horas). Para efectos prácticos, se llamará "embriones" a los individuos de 24 hpf; y se llamará "larvas" a los individuos de 48 hpf o más.

En todos los casos, se utilizó E<sub>3</sub> (Embryo Medium 3: 286,6 mg/L NaCl, 12,6 mg/L KCl, 48,4 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 81,6 mg/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH = 7,00) como medio de control negativo, y ddH<sub>2</sub>O (agua bidestilada) en los pocillos con sedimento.

El polvo de cuarzo utilizado como control negativo de sedimentos, no era de nivel analítico, por lo que fue lavado repetidas veces (entre 6 y 8) con agua bidestilada, para eliminar minerales distintos al deseado. Como en este proceso se pierde gran cantidad de material, se decidió utilizar sin tamizar, pues venía en un tamaño (75 μm) levemente mayor al ideal (63 μm).

Para poder observar con claridad y fotografiar a los embriones y larvas, éstos(as) fueron anestesiados con tricaina (éster etílico del ácido 3-aminobenzoico, Sigma Chemicals Co.) al 0,003%, a pH 7 (Westerfield 1994). Después de cada observación, los embriones, aún anestesiados, fueron eutanasiados por congelamiento y posteriormente descartados. Los embriones fueron decorionados y observados a las 24, 48 y 72 hpf en los experimentos de optimización, y observados además a las 96 hpf en los experimentos de distintos valores de pH.



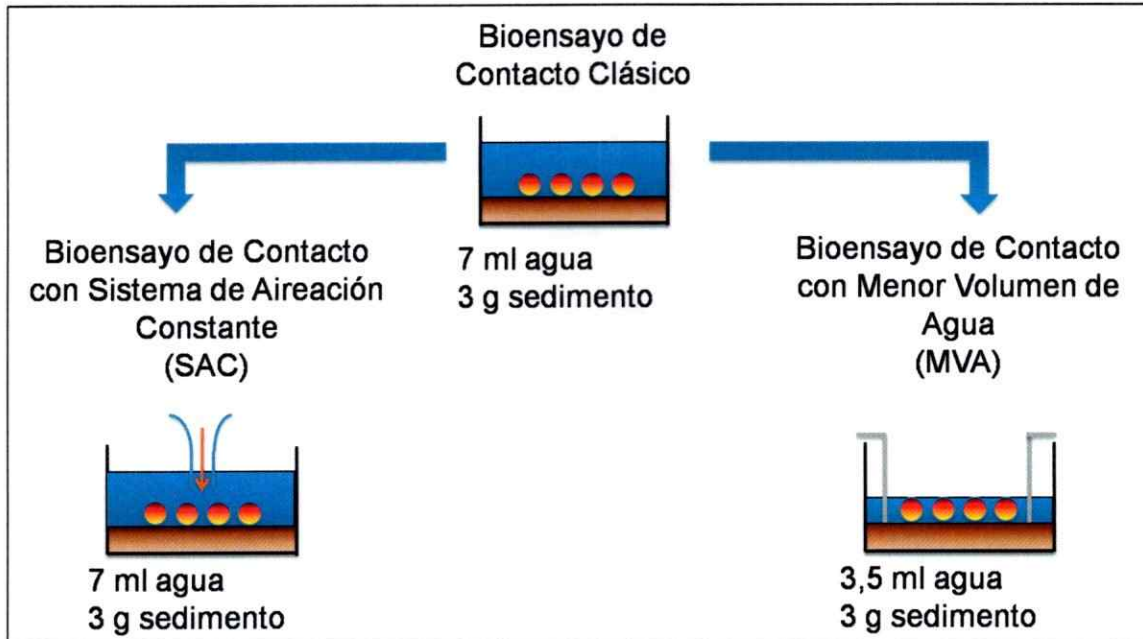
**Figura 5. Montaje de los bioensayos de contacto.** **A)** En cada pocillo se disponen 3 g de sedimento seco y procesado (partículas de tamaño  $\leq$  a 0,063 mm). **B)** Embriones en cada pocillo (10 en la foto, cada uno apuntado por una punta de flecha), incubados con un régimen semi-estático. **C)** Apariencia de las placas tratamiento (arriba) versus los controles (abajo).



### 3.7.1. Experimentos de optimización

Se realizaron tres tipos de bioensayo:

- 3.7.1.1. "Bioensayo de contacto clásico" (BCC): se utilizaron 7,00 mL de E<sub>3</sub> en los controles negativos; y se utilizaron 7,00 mL de ddH<sub>2</sub>O sobre 3,00 g de polvo de cuarzo (control negativo de sedimentos), y 7,00 mL de ddH<sub>2</sub>O sobre 3,00 g de sedimento de prueba.
- 3.7.1.2. Bioensayo de contacto con "Sistema de Aireación Constante" (SAC): se utilizaron las mismas proporciones medio acuoso/sedimento que en el bioensayo clásico. Utilizando bombas de aire de poca presión (0,009 mPa, 2 L/min, Boyu ®, modelo SE-312), y una red de conductos, se aireó cada uno de los pocillos, en proporción de 2 placas por bomba. Se reguló la presión de aire a través de la red, de forma que se produjera circulación de agua en cada pocillo producto de la aireación, pero no burbujeo.
- 3.7.1.3. Bioensayo de contacto con "Mínimo Volumen de Agua" (MVA): En las placas con 3,00 g de polvo de cuarzo/sedimento, sólo se agregaron 3,5 mL de ddH<sub>2</sub>O, de forma que el volumen de agua apenas sobrepasara la altura de los embriones dentro de su corion. Para garantizar que todos los embriones/larvas quedaran a la misma altura, se utilizaron insertos plásticos de 24mm de diámetro, con fondo de malla de 500 µm (Costar ® #3480). En los controles se utilizaron 4,5 mL de E<sub>3</sub> (reemplazando el volumen de polvo de cuarzo/sedimentos, por medio acuático).



**Figura 6. Esquema de ensayos de optimización.** Arriba: Bioensayo de contacto clásico (BCC). Izquierda: Bioensayo de contacto con sistema de aireación constante (SAC). Para garantizar que los embriones obtengan oxígeno suficiente para su desarrollo normal, se airea cada pocillo a través de una red de conductos conectados a una bomba de aire de baja presión. Derecha: Bioensayo de contacto con mínimo volumen de agua (MVA). Para garantizar que los embriones obtengan oxígeno suficiente para su desarrollo normal, se les permite obtenerlo directamente desde la atmósfera, al disminuir el volumen de agua hasta el nivel en que apenas sobrepasen la altura del embrión dentro del corion, facilitando así su difusión.



**Figura 7. Montaje de los experimentos de optimización.** Izquierda: Bioensayo de contacto con sistema de aireación constante (SAC). Se observa la red de conductos. Derecha: Bioensayo de contacto con mínimo volumen de agua (MVA). Se observan los insertos.

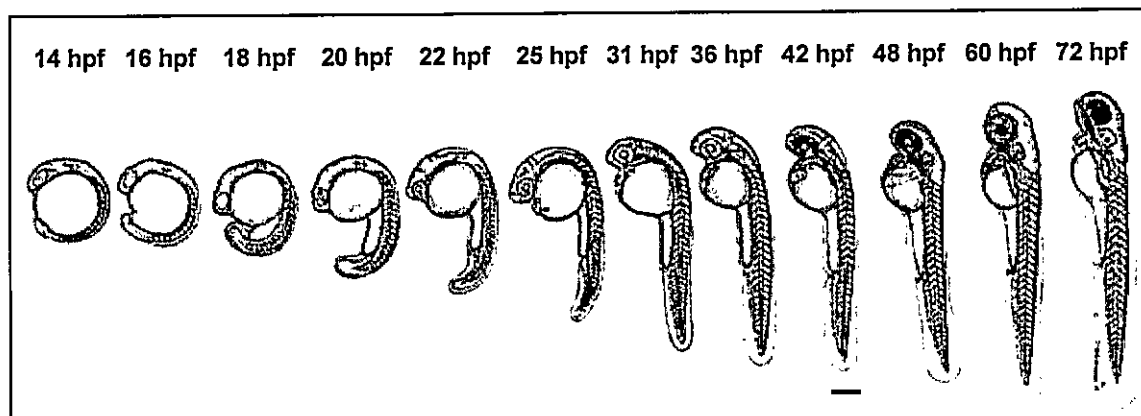
Los bioensayos de contacto SAC se realizaron en un sector aislado del vivero del laboratorio, a 26 °C, con ciclo de luz-oscuridad de 14 - 10 h. En el caso de los bioensayos de contacto MVA, fueron realizados en un incubador a 28 °C, con el mismo ciclo de luz-oscuridad. Como la temperatura es un factor determinante de la velocidad de desarrollo, y la diferencia en 2 °C ralentiza el proceso; los bioensayos de contacto SAC fueron evaluados un par de horas más tarde que lo correspondiente a los estadios de observación (26 hpf; 50 hpf; 74 hpf) de forma de hacer comparables los resultados con los bioensayos BCC y MVA.

### 3.7.2. Características observadas en los experimentos de optimización

Se escogieron las características que permiten determinar si existe o no atraso en el desarrollo de los embriones y larvas (Tabla 1). También se determinó la sobrevivencia (con el fin de determinar si el experimento era válido o no) y la eclosión.

El movimiento de los embriones cambia drásticamente durante las primeras etapas de su desarrollo. Dentro del corion, los recién formados somitos del embrión se contraen al producirse la conexión con las motoneuronas, provocando contorsiones espontáneas de los embriones dentro de su eje. Estos movimientos son fundamentales para el éxito de la eclosión, que se produce entre las 48 hpf y 72 hpf (Kimmel et al. 1995). Una vez eclosionados, los embriones pasan a ser larvas (nadan libremente), dejan de retorcerse y empiezan a nadar, aunque suelen quedarse inmóviles en el fondo o en los bordes del recipiente donde se encuentren, y sólo nadan al reaccionar al contacto de un objeto u otra larva (Kimmel et al. 1995). Debido a esto, se dividió el movimiento de los embriones observados en dos categorías: movimiento espontáneo

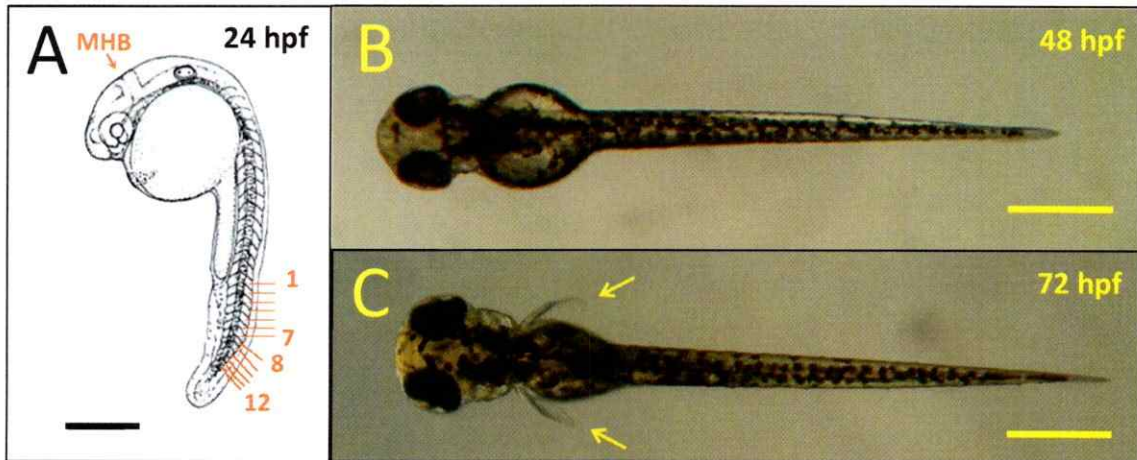
(contorsiones, dentro del corion) y movimiento en respuesta a estímulo mecánico (natación, larvas libres).



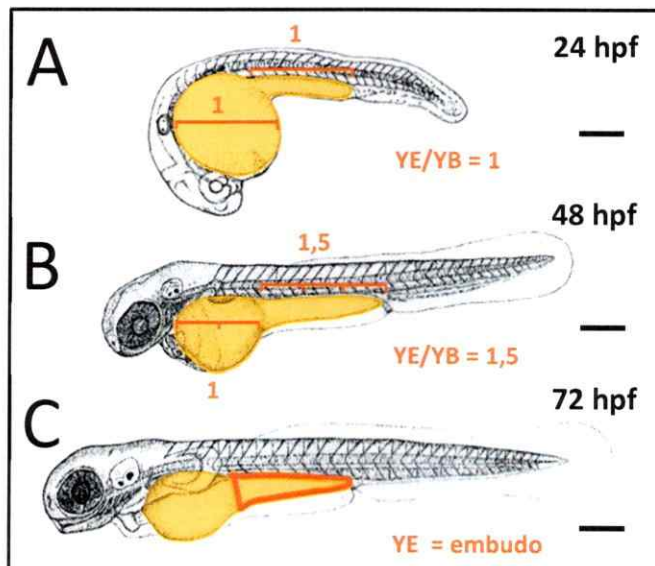
**Figura 8. Desarrollo y extensión de la notocorda del embrión.** El embrión comienza su desarrollo alrededor del saco vitelino, y se mantiene enrollado en su contorno hasta las 12 hpf aproximadamente. A partir de las 16 hpf el tronco del embrión empieza a extenderse y gradualmente separarse del saco vitelino. Desde las 48 hpf en adelante, se puede observar la notocorda totalmente extendida en línea recta. Barra de referencia: 200  $\mu\text{m}$ . Figura modificada de Kimmel et al. 1995.

**Tabla 1. Características observadas en los experimentos de optimización.** Estos rasgos (exceptuando sobrevivencia y eclosión) permiten determinar el estadio del individuo, y por ende, observar si existe atraso en su desarrollo.

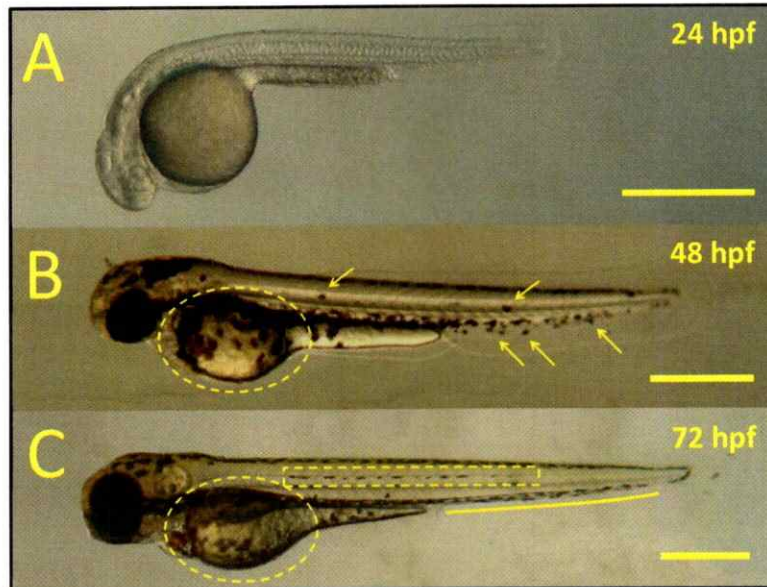
24 hpf	48 hpf	72 hpf
<i>Sobrevivencia</i>	<i>Sobrevivencia</i>	<i>Sobrevivencia</i>
-	<i>Eclosión</i>	<i>Eclosión</i>
Límite cerebro medio-posterior (MHB)	Extensión de la notocorda	Longitud de aletas pectorales
Número de somitos (post-extensión vitelo)	Pigmentación	Pigmentación
Forma del saco vitelino	Forma del saco vitelino	Forma del saco vitelino
Movimiento	Movimiento	Movimiento
Ángulo cabeza-tronco (HTA) $\sim 70^\circ$	Ángulo cabeza-tronco (HTA) $\sim 135^\circ$	Ángulo cabeza-tronco (HTA) $\sim 155^\circ$



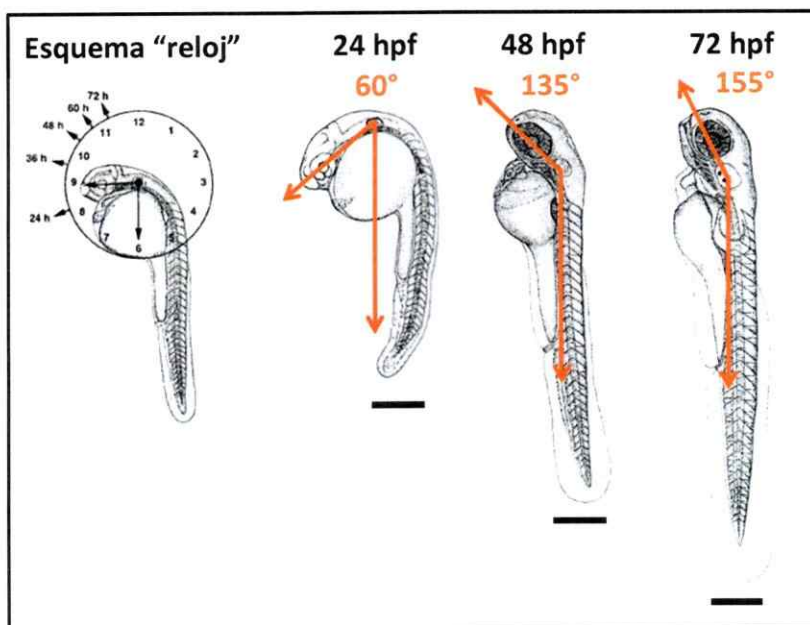
**Figura 9. Formación de MHB, somitos y aletas pectorales.** **A)** Embrión de 24 hpf. **MHB:** (*midbrain-hindbrain boundary*) = límite entre cerebro medio y posterior. **Somitos:** El número de somitos desarrollados post-extensión del vitelo, es muy útil para determinar el estadio en la etapa temprana del desarrollo del embrión, pues se forma un somito cada media hora, aproximadamente (Kimmel et al. 1995). Barra de referencia: 200  $\mu\text{m}$ . Figura modificada de Kimmel et al. 1995. **B)** Larva de 48 hpf, **vista dorsal.** La larva posee primordios de aletas pectorales, sin embargo, son muy difíciles de observar. Barra de referencia: 500  $\mu\text{m}$ . **C)** Larva de 72 hpf, **vista dorsal.** El desarrollo de las aletas pectorales es evidente, pues se encuentran extendidas y funcionales (flechas). Barra de referencia: 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10. Desarrollo del saco vitelino.** **YE (yolk extension) = extensión del vitelo; YB (yolk ball) = saco vitelino.** **A)** Embrión de 24 hpf. El saco vitelino (YB) es prácticamente esférico con una extensión (YE) a lo largo de la cola, de longitud similar al diámetro del YB. **B)** Larva de 48 hpf. El YB ha disminuido de tamaño en 1/3. La YB tiene una longitud equivalente a 1,5 veces el diámetro del YB. **C)** Larva de 72 hpf. El tamaño del YB ha disminuido a la mitad y tiene forma ovalada. La forma de la YE asemeja un cono. Barra de referencia: 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11. Pigmentación.** El patrón de pigmentación alcanza su configuración definitiva en la adultez. **A) Embrión de 24 hpf.** Prácticamente transparente. **B) Larva de 48 hpf.** Se observan melanóforos sobre el saco vitelino, cabeza y aleta caudal. **C) Larva de 72 hpf.** La mayoría de los melanóforos ha migrado hacia dorsal y ventral, quedando unos pocos sobre el saco vitelino. Se observa la formación de la línea lateral de melanóforos (sobre la notocorda). Barra de referencia: 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12. HTA (head-trunk angle) = ángulo cabeza-tronco.** Este ángulo permite determinar el estadio aparente de embriones y larvas al superponer al individuo sobre un reloj (esquema de la izquierda). Barra de referencia: 200  $\mu\text{m}$ . Figuras modificadas de Kimmel et al. 1995.

### 3.7.3. Experimentos en valores puntuales de pH

Utilizando la metodología de bioensayos de contacto MVA, y utilizando los sedimentos del punto "Después del Derrame-October" (DD-Oct), se expuso a los embriones y larvas a medio acuoso ( $E_3$  en los controles, ddH<sub>2</sub>O en tratamiento con sedimento contaminado) en valores crecientes de acidez: pH = 7,0; pH = 6,0 y pH = 5,0.

Para esto, se ajustó el pH del medio acuoso, luego se mezcló con los sedimentos (en el caso de los tratamientos) en las placas del experimento, posteriormente se dejó las placas decantando y temperando, de forma previa al montaje de los embriones en ellas.

El pH del medio acuoso se ajustó utilizando HCl 1M en botellas de vidrio de 50 mL con  $E_3$  o ddH<sub>2</sub>O. Diariamente, y previamente al cambio de medio y sedimentos, se verificó que el pH se mantuviera en el valor de pH deseado  $\pm 0,2$ .

### 3.7.4. Características observadas en los experimentos en valores puntuales de pH

Se incluyeron estructuras y características adicionales a observar, que no están contenidas en el bioensayo de contacto original (Clásico) descrito en la literatura (Rocha et al. 2011; Hallare et al. 2005; Hollert et al. 2003). El total de características observadas se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características observadas en los experimentos con valores puntuales de pH.

<b>24 hpf</b>	<b>48 hpf</b>	<b>72 hpf</b>	<b>96 hpf</b>
<i>Sobrevivencia</i>	<i>Sobrevivencia</i>	<i>Sobrevivencia</i>	<i>Sobrevivencia</i>
-	<i>Eclosión</i>	<i>Eclosión</i>	<i>Eclosión</i>
Límite cerebro medio-posterior (MHB)	-	-	-
Somitos (post-extensión vitelo)	-	-	-
-	Forma del Corazón	Forma del Corazón	Forma del Corazón
-	Frecuencia cardíaca	Frecuencia cardíaca	Frecuencia cardíaca
Ojo	Ojo	Ojo	Ojo
Cápsula ótica	Cápsula ótica	Cápsula ótica	Cápsula ótica
-	Extensión de la Notocorda	Extensión de la Notocorda	Extensión de la Notocorda
-	Pigmentación	Pigmentación	Pigmentación
Forma del Saco vitelino	Forma del Saco vitelino	Forma del Saco vitelino	Forma del Saco vitelino
Edema [presencia]	Edema [presencia]	Edema [presencia]	Edema [presencia]
-	-	Aletas pectorales	Aletas pectorales
-	-	Aleta caudal	Aleta caudal
-	Circulación sanguínea	Circulación sanguínea	Circulación sanguínea
Movimiento espontáneo	Respuesta a estímulo mecánico	Respuesta a estímulo mecánico	Respuesta a estímulo mecánico
-	-	Mandíbula	Mandíbula
-	-	-	Vejiga natatoria
Ángulo cabeza-tronco (HTA) -70°	Ángulo cabeza-tronco (HTA) -135°	Ángulo cabeza-tronco (HTA) -155°	Ángulo cabeza-tronco (HTA) -180°



### 3.8 Análisis estadístico

Se utilizó estadística no paramétrica para analizar todos los experimentos, realizando tests de intervalos Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre los grupos, y test de Dunn *a posteriori* para identificar los grupos desiguales (programa GraphPad Prism 5).

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Observaciones en terreno

#### 4.1.1 Primer muestreo (16/03/11)

El agua sobre ambos puntos donde se tomaron los sedimentos es transparente y tiene pH neutro (ver Tabla S1 y Tabla S2 en el Anexo). Ambos cursos de agua son intermitentes y se encuentran interrumpidos por sequía estival.

#### 4.1.2 Segundo muestreo (20/10/11)

El agua sobre ambos puntos donde se tomaron los sedimentos es transparente y tiene pH neutro (ver Tabla S3 y Tabla S4 en el Anexo). Se observa presencia de mayor cantidad de vegetación ribereña y de fondo aguas arriba del punto de derrame del Tranque de Relaves.

### 4.2 Medición de variables químicas en laboratorio

Tabla 3. Variables químicas medidas.

	pH	Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )	Declinación de $\text{O}_2$ (mg/L)
$\text{E}_3$	6,86	832	-
Polvo de Cuarzo	7,68	733	4,53
Sedimentos	6,84	430	1,85

El pH del polvo de cuarzo es ligeramente más alcalino que el de los sedimentos y el medio de incubación  $\text{E}_3$  (Tabla 3).

La conductividad de los sedimentos es menor a la del medio de incubación  $\text{E}_3$  y el polvo de cuarzo (Tabla 3).

La declinación de oxígeno del polvo de cuarzo es más del doble de la ocurrida en los sedimentos (Tabla 3).

#### **4.3 Análisis químico de metales presentes en sedimentos**

Los resultados para las mediciones de los metales Cromo y Níquel se encuentran por debajo del límite de detección (ver Tabla S5 en el Anexo).

Se considera el punto "Aguas Arriba" como representante de las concentraciones de metales naturales de la zona (punto no afectado por derrame de relaves).

No se observan diferencias entre las concentraciones de metales encontradas en la muestra del punto de derrame del tranque de relaves al finalizar la época seca (marzo) y la muestra tomada posteriormente a la época lluviosa (octubre) (Figura 13).

##### **4.3.1 Concentración de metales (Total y Lábil)**

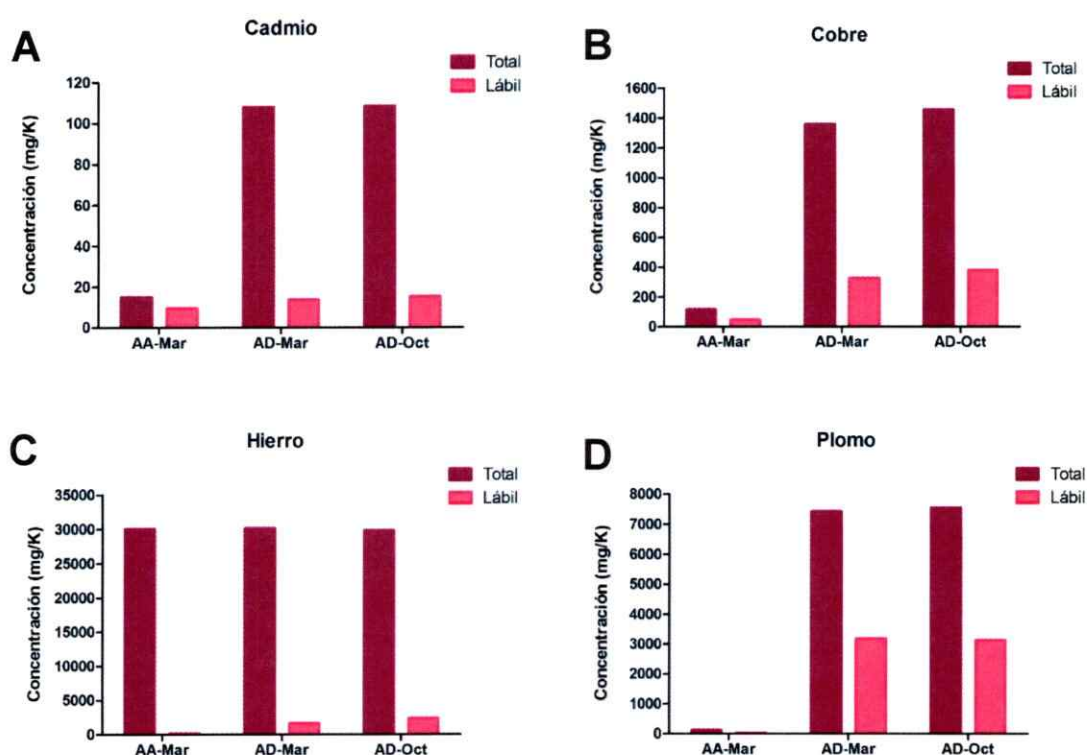
La concentración total de Cd, Cu y Pb es notoriamente mayor en el punto de derrame del tranque de relaves en relación al punto "Aguas Arriba" (Figura 13-A, 13-B y 13-D). La concentración total de Fe es similar en ambos puntos (Figura 13-C).

La concentración de Pb lábil es notoriamente mayor en el punto de derrame del tranque en relación al punto "Aguas Arriba" (Figura 13-D). La concentración de Cu lábil también es mayor en el punto de derrame del tranque (Figura 13-B). La concentración de Cd y Fe lábil es relativamente similar en ambos puntos (Figura 13-A y 13-C).

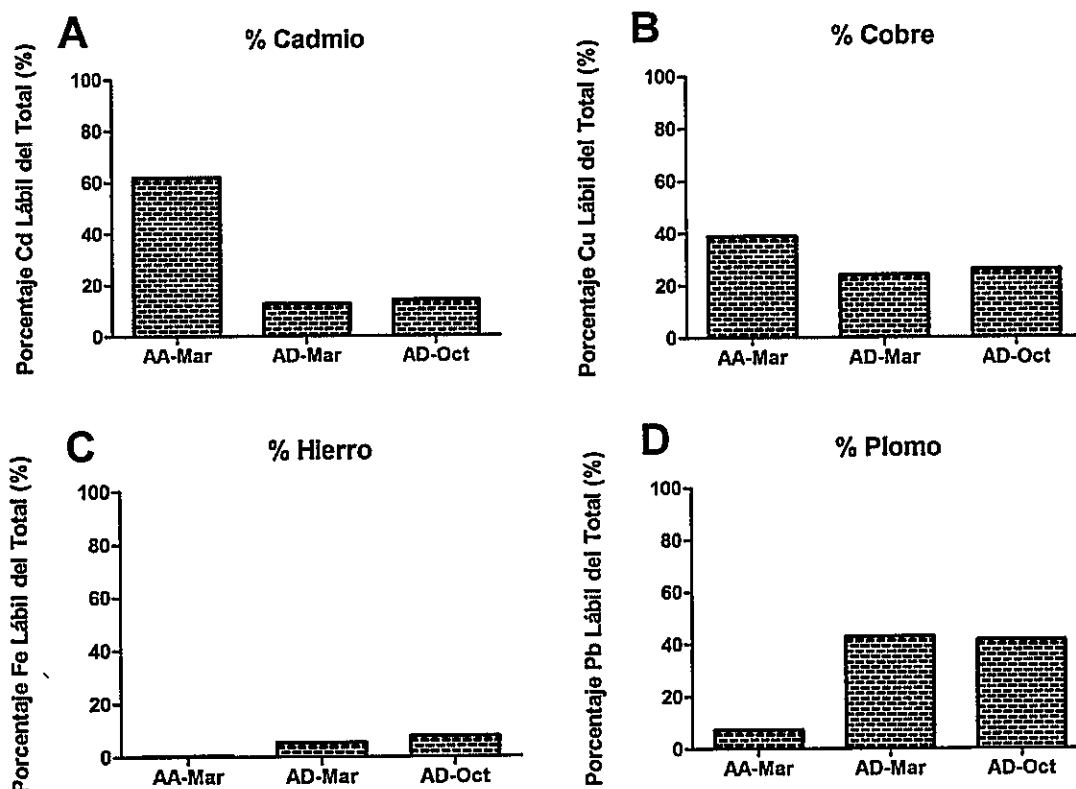
##### **4.3.2 Proporción del metal Lábil respecto al Total**

La proporción de Cd que se solubiliza fácilmente es mayor en el punto no contaminado. La proporción de Cu y Fe que se solubiliza fácilmente es similar en

ambos puntos; siendo de alrededor de un 10% en el caso del Fe, y de alrededor del 30% en el caso del Cobre. La proporción de Pb que se solubiliza fácilmente es notoriamente mayor en el punto del derrame del tranque.



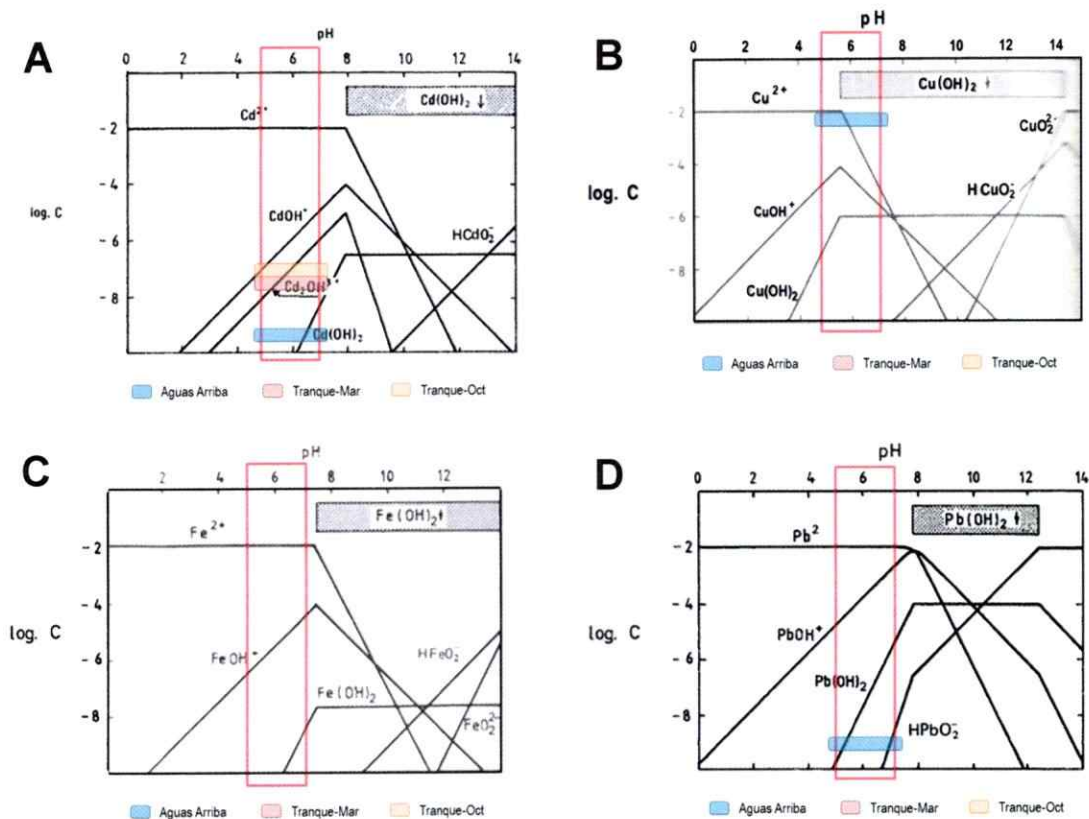
**Figura 13. Concentración de metal encontrada en los sedimentos de los puntos de muestreo: “Aguas Antes del Derrame-Marzo” (AA-Mar), “Aguas Después del Derrame-Marzo” (AD-Mar) y “Aguas Después del Derrame-October” (AD-Oct). Se observa que prácticamente no existe diferencia entre los muestreos de sedimento a diferentes tiempos. A) Cadmio.** La cantidad de Cd total encontrada en los sedimentos del punto del derrame del tranque es 5 veces mayor a la encontrada naturalmente; sin embargo, la cantidad de Cd lábil es similar en ambos casos. **B) Cobre.** La cantidad de Cu es mayor en el punto contaminado, tanto en la cantidad de metal total como en la cantidad lábil. **C) Hierro.** Se encuentra la misma cantidad de Fe en el punto contaminado y naturalmente. La proporción de Fe lábil es ligeramente mayor en el punto de contaminación por el tranque de relaves. **D) Plomo.** Prácticamente no se encuentra este metal naturalmente, encontrándose una cantidad 75 veces mayor en el punto del derrame del tranque.



**Figura 14. Proporción de la cantidad total de metal que se solubiliza fácilmente (fracción lábil).** Se observa que prácticamente no existe diferencia entre los puntos "Tranque-Marzo" y "Tranque-October". **A) Cadmio.** La proporción de Cd que se solubiliza fácilmente respecto al total es mayor en el punto no contaminado. **B) Cobre.** La proporción de Cu que se solubiliza fácilmente es ligeramente mayor en el punto no contaminado. **C) Hierro.** Prácticamente no se encuentra Fe soluble naturalmente. La proporción lábil en el punto contaminado es alrededor del 10%. **D) Plomo.** Sólo un 10% del Pb encontrado naturalmente se solubiliza fácilmente; mientras que en el punto del derrame, se encuentra alrededor de un 40% de Pb lábil.

#### 4.3.3 Diagramas de distribución de especies en función del pH

A valores de pH 7, 6 y 5, los metales se encuentran en distintas formas, en distinta proporción cada una (Figura 15). El Cd se encuentra en las formas  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CdOH}^+$ ,  $\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}$  y  $\text{Cd}(\text{OH})_2$ . El Cu se encuentra como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{CuOH}^+$  y  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . El Fe se encuentra como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{FeOH}$  y  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ . El Pb se encuentra en las formas  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{PbOH}^+$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_2$  y  $\text{HPbO}_2^-$ .



**Figura 15. Diagramas de distribución de especies de cada metal en función del pH.** El recuadro rojo encierra las formas encontradas en los valores puntuales de pH utilizados (pH = 7, pH = 6 y pH = 5). **A) Cadmio.** El Cd se encuentra en las formas:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CdOH}^+$ ,  $\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}$ , y una muy pequeña fracción como  $\text{Cd}(\text{OH})_2$ ; entre los valores de pH 5 y 7. En los rectángulos se encuentra el logaritmo correspondiente a la concentración de Cd encontrada en cada punto. **B) Cobre.** El Cu se encuentra en las formas:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{CuOH}^+$  y  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ; entre los valores de pH 5 y 7. En el rectángulo se encuentra el logaritmo de la concentración de Cu encontrada naturalmente. El logaritmo correspondiente a la concentración de Cu encontrada en el punto de derrame tiene valor positivo, indicando que se encuentra como  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (insoluble). **C) Hierro.** El Fe se encuentra en las formas:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{FeOH}^+$  y una muy pequeña fracción como  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ; entre los valores de pH 5 y 7. El logaritmo de la de la concentración de Fe encontrada en todos los puntos tiene valor positivo, indicando que se encuentra como  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  (insoluble). **D) Plomo.** El Pb se encuentra en las formas:  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{PbOH}^+$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ , y una muy pequeña fracción como  $\text{HPbO}_2^-$ ; entre los valores de pH 5 y 7. En el rectángulo se encuentra el logaritmo de la concentración de Pb encontrada naturalmente. El logaritmo de la de la concentración de Pb encontrada en el punto de derrame tiene valor positivo, indicando que se encuentra como  $\text{Pb}(\text{OH})_2$  (insoluble).

#### 4.4 Análisis biológico de sedimentos

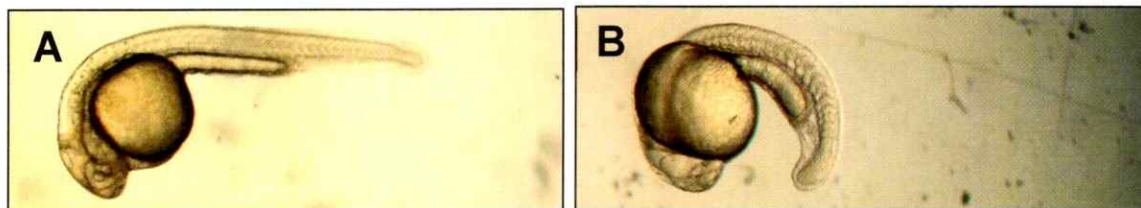
##### 4.4.1 *Ensayos de optimización*

Tabla 1. Observaciones consideradas normales y anormales de las características analizadas en los ensayos de optimización.

Característica del individuo	Normal	Anómalo
Sobrevivencia (por pocillo)	Mayor a un 90%	Menor a un 90%
Eclosión (por pocillo)	48 hpf: aprox. 40% 72 hpf : aprox. 80%	48 hpf: distinto a 40% 72 hpf: distinto a 80%
MHB	24 hpf: Límite definido	Límite poco claro o indefinido
Somitos (post-extensión del vitelo)	24 hpf: 10 somitos	24 hpf: menos de 8 somitos
Extensión de la notocorda	Extensión progresiva hasta alcanzar la horizontalidad	Extensión incompleta; lordosis, cifosis y escoliosis
Pigmentación	48 y 72 hpf: melanocitos de color negro	48 y 72 hpf: ausencia de melanocitos; melanocitos de color gris
Forma del saco vitelino	Vitelo de forma esférica que disminuye de tamaño progresivamente; transparente	Deformado o discontinuado por presencia de edemas; acumulación de sangre; coagulación (opaco)
Movimiento	24 hpf: Contorsiones a lo largo del eje longitudinal (twisting) cada 10 seg. mínimo 48 y 72 hpf: Nado rápido al entrar en contacto con otras larvas o frente a estímulo mecánico	24 hpf: Contorsiones cada 1 minuto o menos, o ninguna contorsión durante la observación 48 y 72 hpf: Nado lento, torpe, o ausencia de respuesta al entrar en contacto con otras larvas o frente a estímulo mecánico
HTA	24 hpf: ~70° 48 hpf: ~135° 72 hpf: ~155°	Menor en ~30° al ángulo correspondiente al estadio de observación

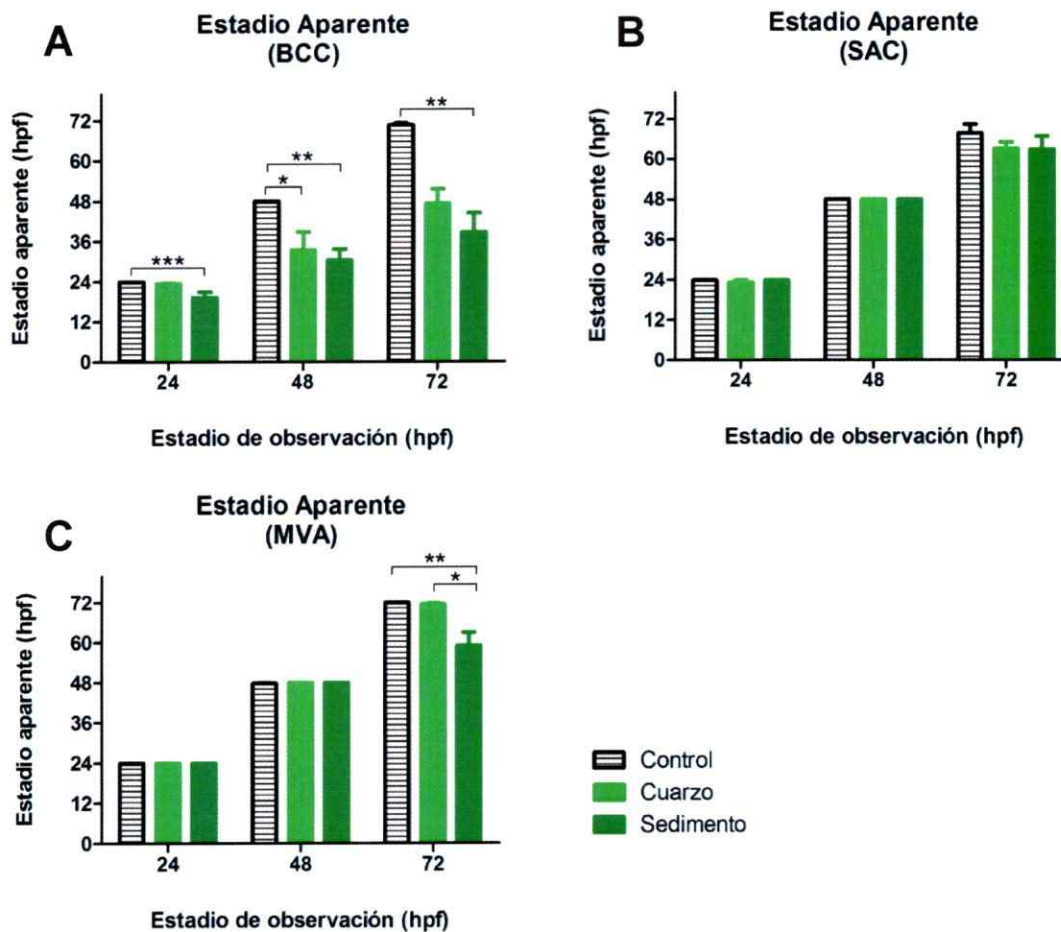
#### 4.4.1.1 Estadio aparente

Utilizando el BCC, se observa que los embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos no logran desarrollarse normalmente (Figuras 16 y 17) y no superan el estadio de 48 hpf, siendo este retraso en la edad aparente estadísticamente distinta a los controles en todo estadio de observado (Figura 17). Utilizando el SAC, no existe diferencia en la tasa de desarrollo entre embriones y larvas control, versus tratados(as) (todos superan el estadio de 48 hpf). En el caso del MVA, sólo se observa una diferencia significativa en la edad aparente de los embriones y larvas control versus tratados(as) en el estadio de 72 hpf; no obstante, estos también superan el estadio de 48 hpf.



**Figura 16. Estadio aparente de embriones de 24 h incubados en el bioensayo de contacto clásico (BCC). A) Embrión control (24 hpf). B) Embrión expuesto a sedimentos. Las estructuras del ojo y del cerebro recién se están formando; la notocorda no se encuentra extendida aún y sólo se han formado 5 somitos post-extensión del vitelo. Estadio aparente: 20 hpf.**



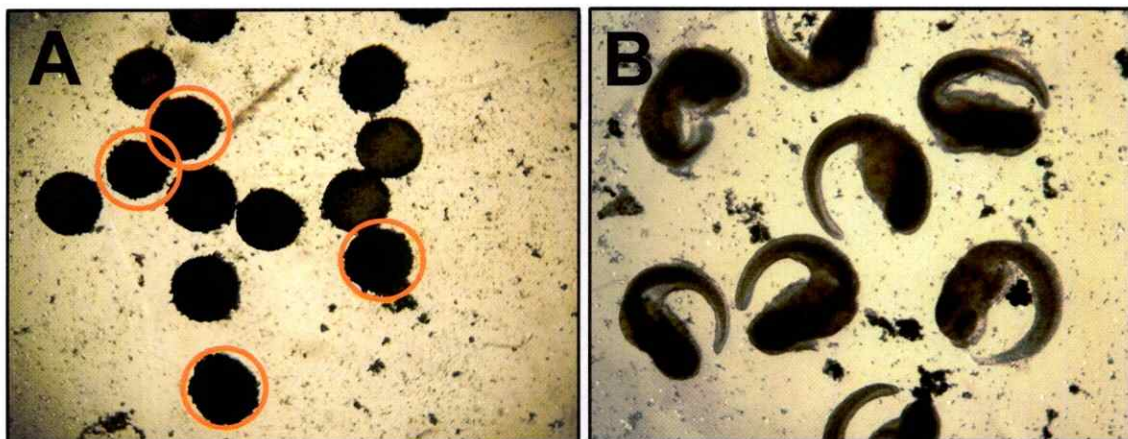


**Figura 17. Estadio aparente de los embriones incubados en cada bioensayo. A) Bioensayo de Contacto Clásico (BCC):** Se observa un atraso significativo en el desarrollo de los embriones expuestos a los sedimentos en comparación con los controles, en cada estadio de observación. Los embriones expuestos a los sedimentos no superan el estadio de 48 hpf. Además se observa una diferencia en el estadio aparente de los embriones expuestos a polvo de cuarzo respecto a los controles a partir de las 48 hpf, sin embargo, a las 72 hpf esta diferencia no es estadísticamente significativa. **B) Sistema de Aireación Constante (SAC):** No existe diferencia significativa en el estadio aparente de los embriones. **C) Mínimo Volumen de Agua (MVA):** Sólo a las 72 hpf se observa un atraso significativo en el desarrollo de los embriones expuestos a sedimentos, los que sin embargo, superan el estadio de 48 hpf. Los embriones expuestos a polvo de cuarzo no presentan diferencia respecto a los controles.

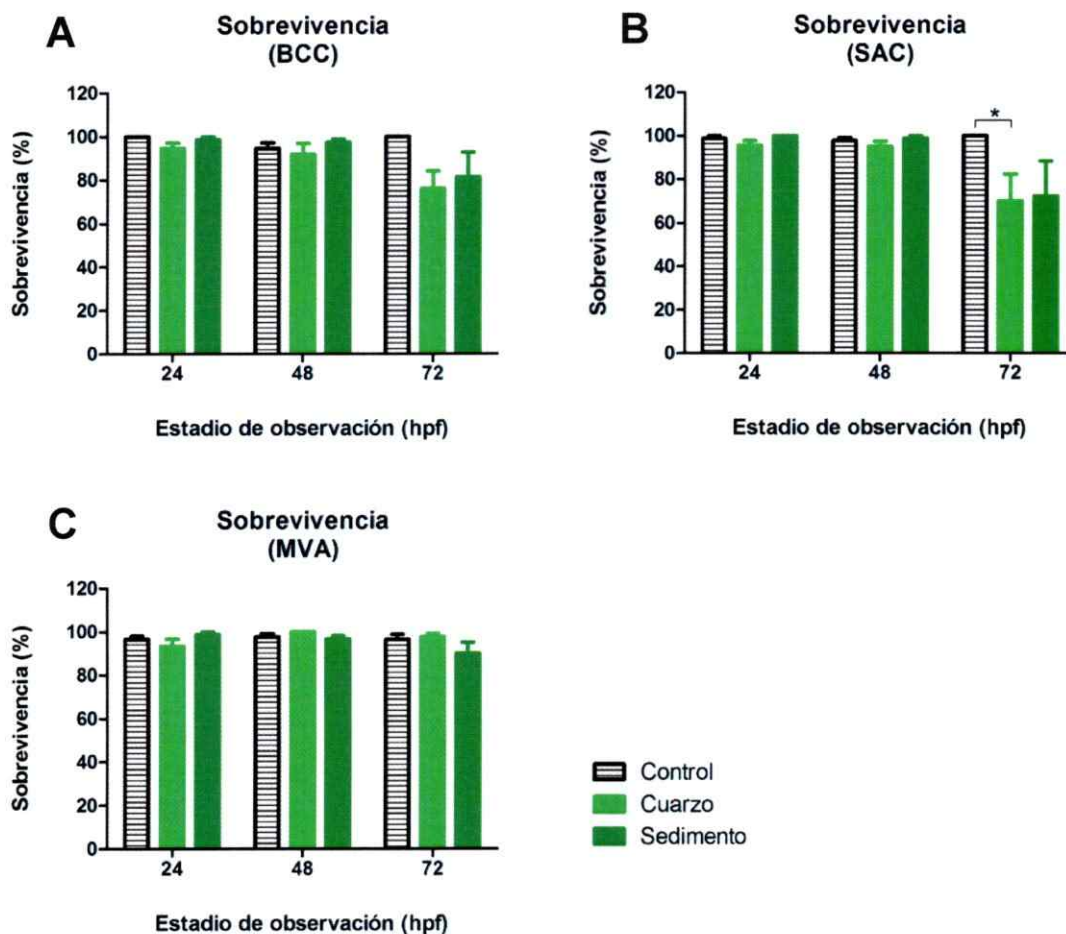
\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.1.2 Supervivencia

No se observa diferencia significativa en la supervivencia de los embriones, ni entre tratamientos (polvo de cuarzo o sedimentos), ni entre los distintos tipos de bioensayo; exceptuando la menor supervivencia de embriones expuestos a polvo de cuarzo en el SAC, en el estadio de 72 hpf (Figuras 18 y 19). Cabe destacar que, a pesar de no ser diferencias significativas respecto a los controles, en el SAC sobrevive alrededor del 70% de los embriones expuestos a polvo de cuarzo o sedimentos, mientras que en el MVA, sobrevive más del 90% de los embriones expuestos a estas mismas condiciones.



**Figura 18. Muerte de los embriones.** Es bastante fácil identificar los embriones que han muerto, pues dejan de ser transparentes. **A)** Incluso si el corion está cubierto de partículas de sedimento, es posible identificar los embriones que no han sobrevivido (círculos). **B)** Los embriones muertos se vuelven opacos al ir descomponiéndose.



**Figura 19. Sobrevivencia de los embriones incubados en cada bioensayo. A) Bioensayo de Contacto Clásico (BCC):** Aunque el promedio de embriones sobrevivientes expuestos a polvo de cuarzo y sedimentos parece diferir de los controles a las 72 hpf, los análisis estadísticos no son concluyentes. **B) Sistema de Aireación Constante (SAC):** Sólo a las 72 hpf se observa una diferencia significativa en la sobrevivencia de embriones expuestos a polvo de cuarzo respecto a los controles. La diferencia entre el promedio de embriones sobrevivientes expuestos a sedimentos y los controles no es significativa. **C) Mínimo Volumen de Agua (MVA):** No existe diferencia significativa en la sobrevivencia de los embriones.

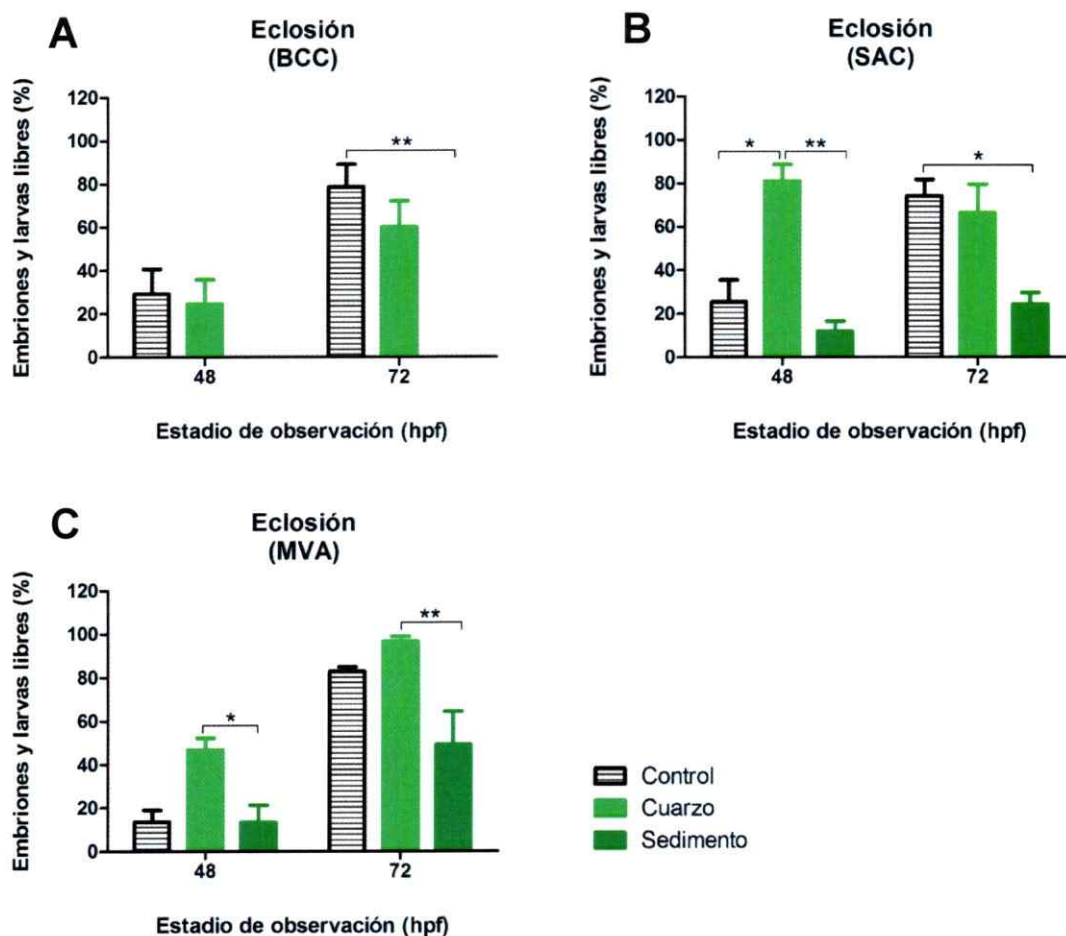
\*  $p \leq 0,05$

#### 4.4.1.3 Eclosión

En términos generales, se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos y los distintos bioensayos (Figuras 20 y 21). Utilizando el BCC, ninguno de los embriones expuestos a sedimentos eclosiona, sin embargo, esta diferencia sólo es significativa en el estadio de 72 hpf. Utilizando el SAC, alrededor de un 20% de los embriones expuestos a sedimentos logra eclosionar en el estadio de 72 hpf. Por otra parte, llama la atención que a las 48 hpf prácticamente todos los embriones expuestos a polvo de cuarzo han eclosionado. Utilizando el MVA también pareciera que los embriones expuestos a polvo de cuarzo eclosionaran antes que los controles, sin embargo esta diferencia no es significativa. Respecto a los embriones expuestos a sedimentos, se observa que en el estadio de 48 hpf ha eclosionado una proporción similar a la de los controles; y luego en el estadio de 72 hpf, alrededor de la mitad de los embriones nada libremente, siendo esta proporción sólo diferente a la de los embriones expuestos a polvo de cuarzo.



**Figura 20. Apariencia de embriones de 30 h, dentro de su corion. A)** Embriones control. **B)** Embriones expuestos a polvo de cuarzo. **C)** Embriones expuestos a sedimentos.



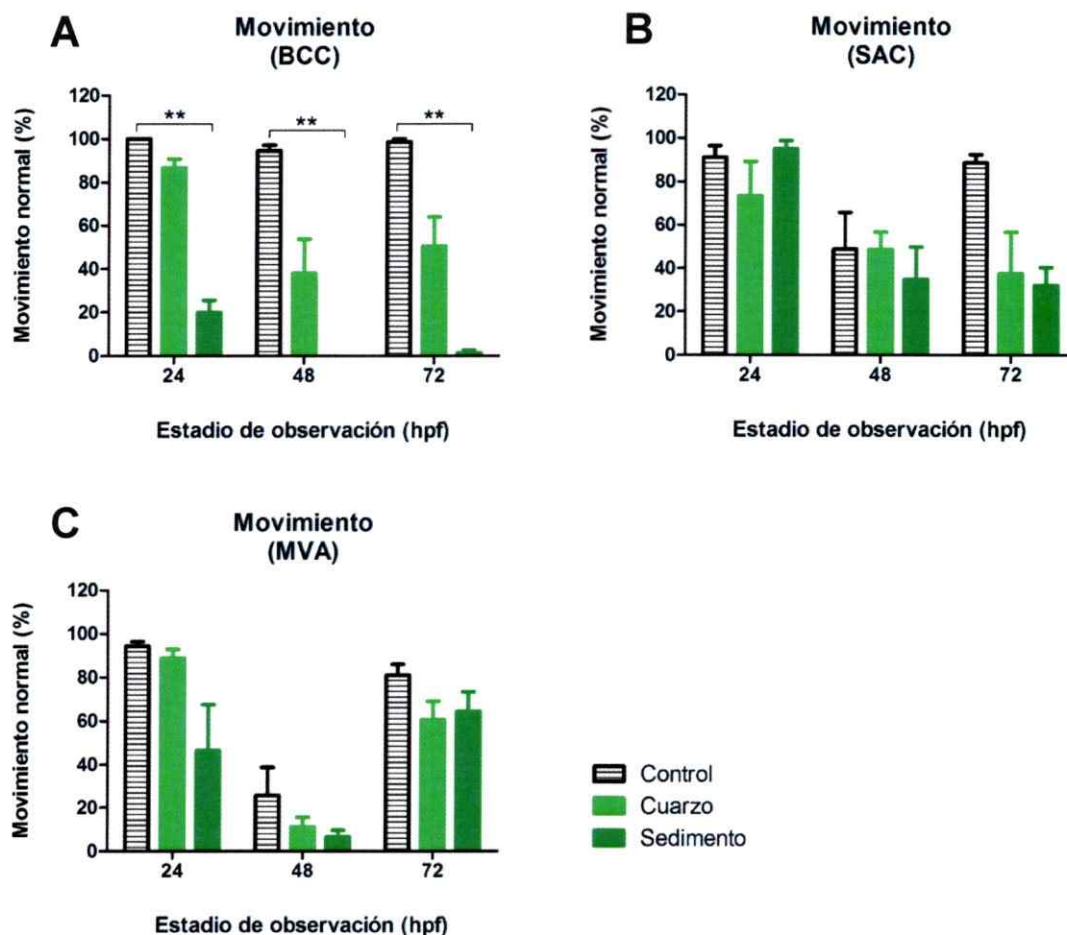
**Figura 21. Eclosión de los embriones incubados en cada bioensayo. A) Bioensayo de Contacto Clásico (BCC):** Aunque ningún embrión expuesto a sedimentos eclosiona en este tipo de bioensayo, esta diferencia sólo es significativa a las 72 hpf. **B) Sistema de Aireación Constante (SAC):** A las 48 hpf prácticamente la totalidad de los embriones expuestos a polvo de cuarzo ha eclosionado; mientras que controles y embriones expuestos a sedimentos eclosionan en medida similar y menor. A las 72 hpf la proporción de embriones expuestos a sedimentos que han eclosionado es significativamente menor al control. **C) Mínimo Volumen de Agua (MVA):** A las 48 hpf prácticamente la mitad de los embriones expuestos a polvo de cuarzo ha eclosionado, siendo esta proporción significativamente diferente sólo a los embriones expuestos a sedimentos. A las 72 hpf ha eclosionado la totalidad de los embriones expuestos a polvo de cuarzo y alrededor de la mitad de los embriones expuestos a sedimentos.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

#### 4.4.1.4 Movimiento

En términos generales, no se observa diferencia significativa en el movimiento de los embriones, ni entre tratamientos (control, polvo de cuarzo o sedimentos), ni entre los distintos tipos de bioensayo (Figura 22). La excepción corresponde a los embriones expuestos a sedimentos del BCC, cuyo escaso movimiento a las 48 hpf, y prácticamente nulo movimiento en los estadios siguientes, difiere significativamente de los controles. Aunque en el SAC pareciera que los embriones del estadio de 72 hpf expuestos a polvo de cuarzo o sedimentos tuvieran una proporción de embriones con movimiento normal menor a los controles, esta diferencia no es significativa. Por otra parte, a las 72 hpf menos del 50% de los embriones expuestos a polvo de cuarzo o sedimentos presenta un movimiento normal en el SAC, mientras que en el MVA alrededor del 70% de los embriones expuestos a estas mismas condiciones se mueve normalmente.

Tanto en el SAC como en el MVA, se observa una disminución de embriones con movimiento normal, bajo cualquier tratamiento, a las 48 hpf.



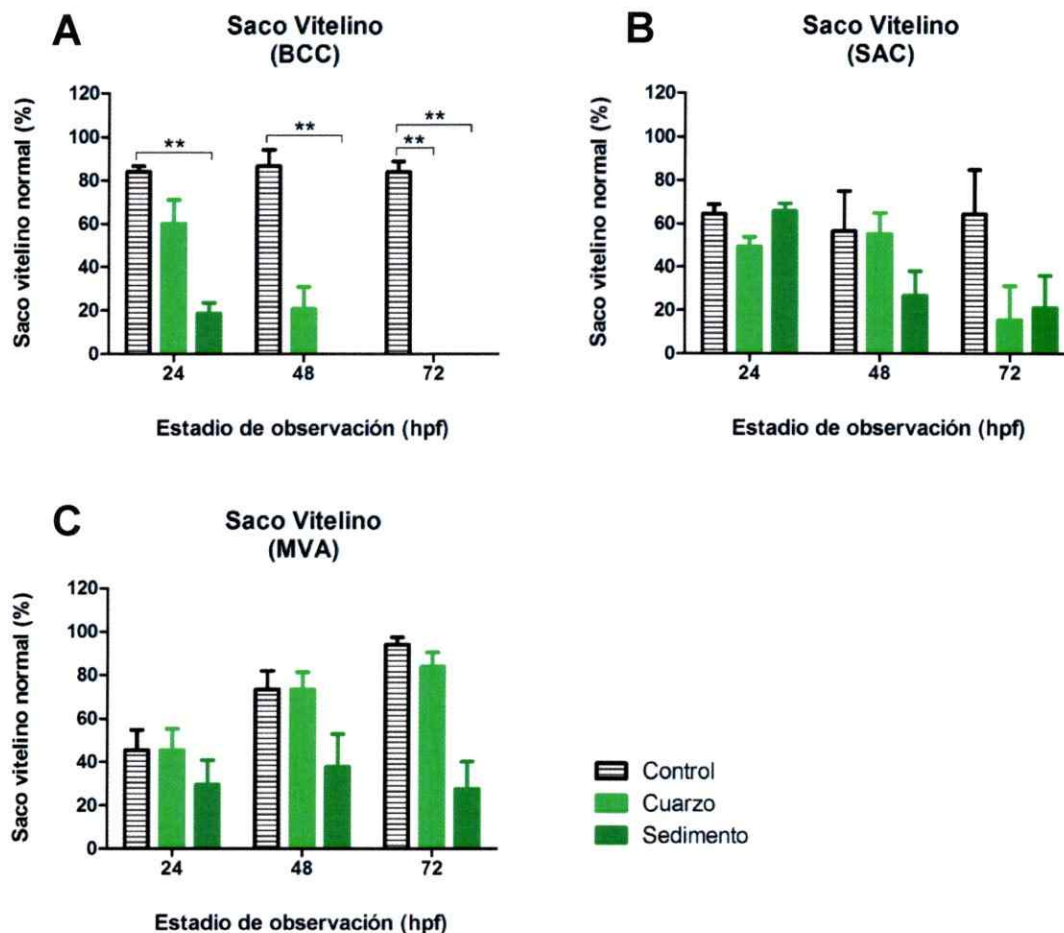
**Figura 22. Movimiento de los embriones incubados en cada bioensayo. A) Bioensayo de Contacto Clásico (BCC):** La proporción de embriones expuestos a sedimentos que se mueve normalmente es significativamente menor respecto a los controles en todo estadio de observación; de hecho, tanto a las 48 hpf como a las 72 hpf, prácticamente ningún embrión expuesto a sedimentos presenta movimiento normal. No existe diferencia significativa en el movimiento de los embriones expuestos a polvo de cuarzo respecto a los controles. **B) Sistema de Aireación Constante (SAC):** Aunque a las 72 hpf pareciera existir diferencia entre el control y los embriones expuestos a polvo de cuarzo o sedimentos, los resultados estadísticos no son concluyentes. A las 48 hpf, la proporción de embriones con movimiento normal en los controles es menor a las proporciones respectivas de los controles las 24 hpf y a las 72 hpf. **C) Mínimo Volumen de Agua (MVA):** No existe diferencia significativa respecto al movimiento de los embriones, sin embargo, se observa una proporción menor de embriones con movimiento normal en todos los tratamientos a las 48 hpf.

\*\*  $p \leq 0,01$

#### 4.4.1.5 Saco vitelino

Sólo se observan diferencias significativas en la proporción de embriones con saco vitelino normal dentro del BCC (Figura 23). Utilizando este tipo de bioensayo, la cantidad de embriones expuestos a polvo de cuarzo con saco vitelino normal pareciera ir disminuyendo a medida que pasa el tiempo, sin embargo, la diferencia respecto a los controles sólo es significativa en el estadio de 72 hpf, cuando ningún embrión expuesto a polvo de cuarzo presenta un saco vitelino normal. Por su parte, sólo aproximadamente el 20% de los embriones expuestos a sedimentos presenta un saco vitelino normal a las 24 hpf; y luego, en los estadios de 48 y 72 hpf, todos los embriones expuestos a sedimentos presentan defectos en su vitelo. Por otra parte, en el SAC alrededor del 80% de los embriones expuestos a polvo de cuarzo presenta defectos en su saco vitelino a las 72 hpf, mientras que en el MVA esto sólo sucede con cerca del 20% de los embriones.





**Figura 23. Saco vitelino de los embriones incubados en cada bioensayo. A) Bioensayo de Contacto Clásico (BCC):** La proporción de embriones expuestos a sedimentos con saco vitelino normal es significativamente menor respecto a los controles en todo estadio de observación; de hecho, tanto a las 48 hpf como a las 72 hpf, ningún embrión expuesto a sedimentos presenta saco vitelino normal. Los embriones expuestos a polvo de cuarzo con saco vitelino normal parecieran presentar una proporción decreciente a partir de las 48 hpf, sin embargo la diferencia sólo es significativa a las 72 hpf, cuando todos estos embriones presentan un vitelo defectuoso. **B) Sistema de Aireación Constante (SAC):** No existen diferencias significativas respecto al saco vitelino de los embriones. Pareciera que la proporción de embriones expuestos a polvo de cuarzo y sedimentos con saco vitelino normal fuera menor a los controles en el estadio de 72 hpf, sin embargo los resultados estadísticos no son concluyentes. **C) Mínimo Volumen de Agua (MVA):** No existe diferencia significativa respecto al saco vitelino de los embriones. Pareciera que la proporción de embriones expuestos a sedimentos con saco vitelino normal fuera menor a los controles en los estadios de 48 y 72 hpf, sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa.

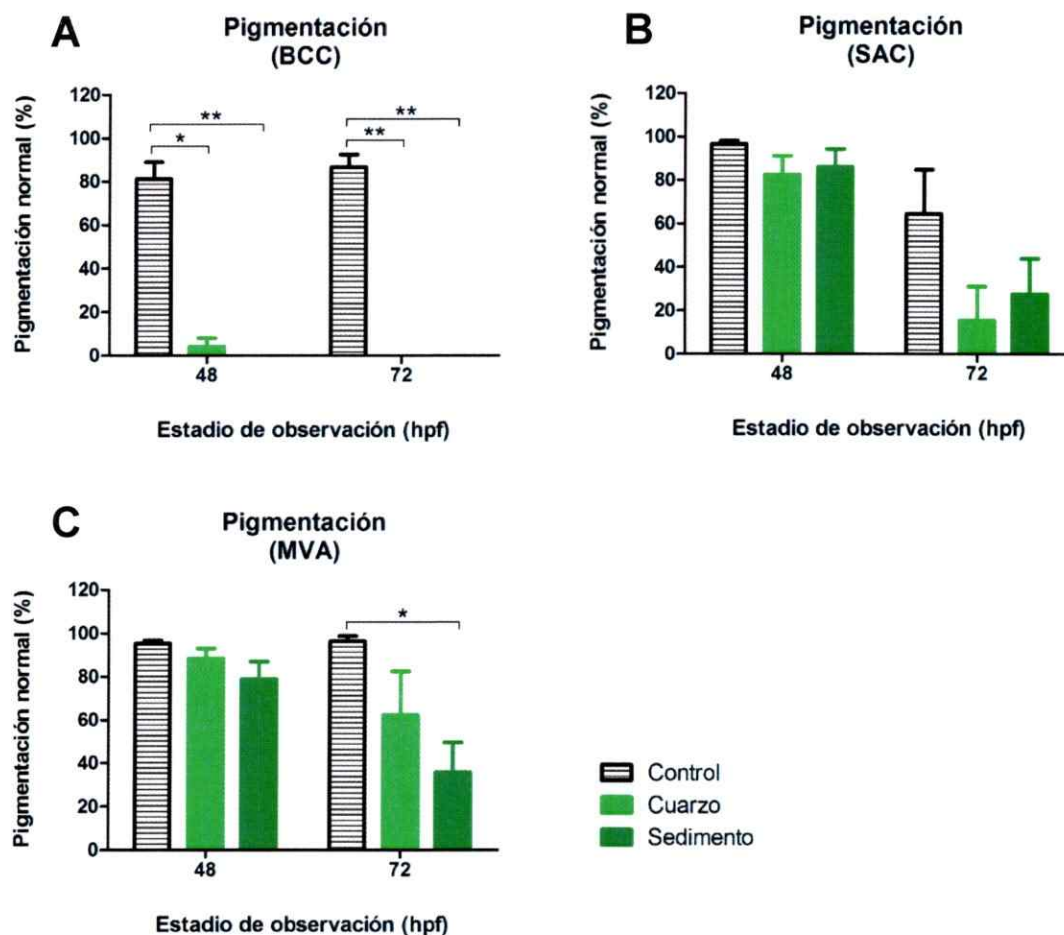
\*\*  $p \leq 0,01$

#### 4.4.1.6 Pigmentación

Utilizando el BCC se observa que tanto larvas expuestas a polvo de cuarzo como las expuestas a sedimentos presentan una pigmentación anormal respecto a los controles, en todo estadio de observación (Figuras 24 y 25). Utilizando el SAC, esta situación pareciera revertirse, pues no existen diferencias significativas en la pigmentación de las larvas entre tratamientos (polvo de cuarzo o sedimentos) respecto al control. Utilizando el MVA todos los controles presentan pigmentación normal, observándose una diferencia significativa respecto a éstos sólo en las larvas expuestas a sedimentos, a las 72 hpf.



**Figura 24. Pigmentación de larvas de 72 h incubadas en el bioensayo de contacto clásico (BCC). A) Larvas control (72 hpf). B) Larvas expuestas a polvo de cuarzo; se observa que algunas tienen menos pigmento. C) Larvas expuestas a sedimentos; se observa que no presentan pigmentación en absoluto.**

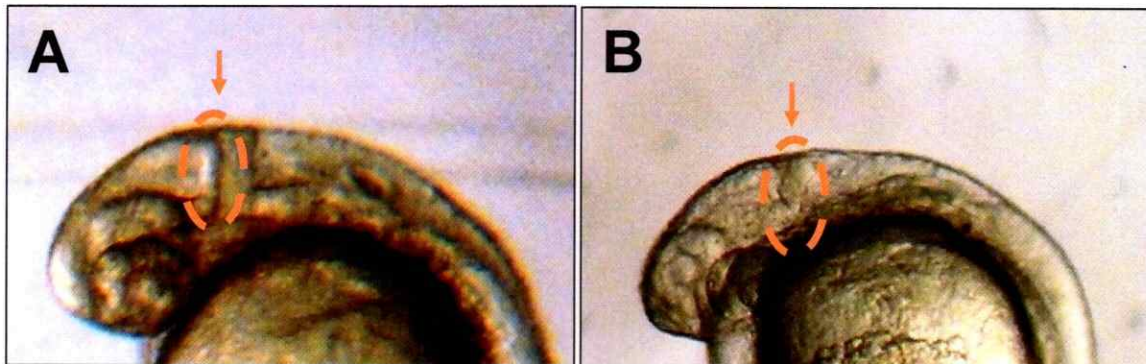


**Figura 25. Pigmentación de las larvas incubadas en cada bioensayo. A) Bioensayo de Contacto Clásico (BCC):** Tanto las larvas expuestas a polvo de cuarzo como las expuestas a sedimentos presentan pigmentación anormal. **B) Sistema de Aireación Constante (SAC):** No existen diferencias significativas respecto a la pigmentación de las larvas. Pareciera que la proporción de larvas expuestas a polvo de cuarzo y sedimentos con pigmentación normal fuera menor a los controles en el estadio 72 hpf, sin embargo los resultados estadísticos no son concluyentes. Se observa que a las 72 hpf, no todas las larvas control presentan pigmentación normal. **C) Mínimo Volumen de Agua (MVA):** No existe diferencia significativa respecto a la pigmentación de las larvas en el estadio de 48 hpf, sin embargo, a las 72 hpf las larvas expuestas a sedimentos presentan una proporción de larvas con pigmentación normal menor al control.

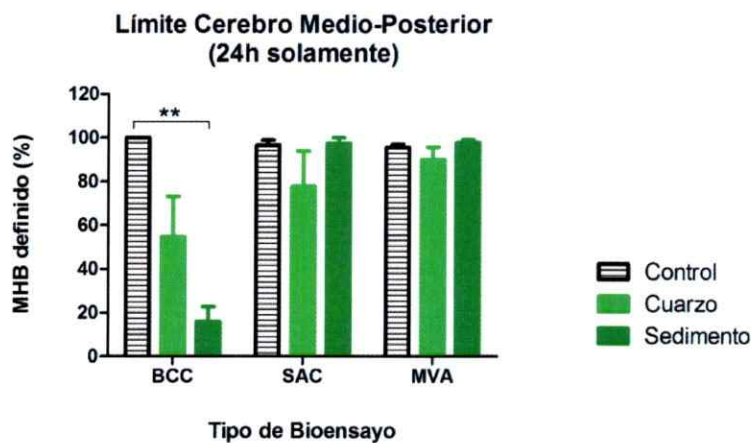
\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.1.7 Límite entre cerebro medio y posterior (MHB)

Sólo se observa una diferencia significativa en el BCC (Figuras 26 y 27). Sólo los embriones expuestos a sedimentos, utilizando el bioensayo BCC, presentan un MHB defectuoso o poco definido.



**Figura 26. Límite entre cerebro medio y posterior (MHB) de embriones de 24 h incubados en el bioensayo de contacto clásico (BCC).** A) Embriones control (24 hpf). Se observa claramente el límite entre cerebro medio y posterior. B) Embriones expuestos a sedimentos; se observa que el MHB no está bien definido.

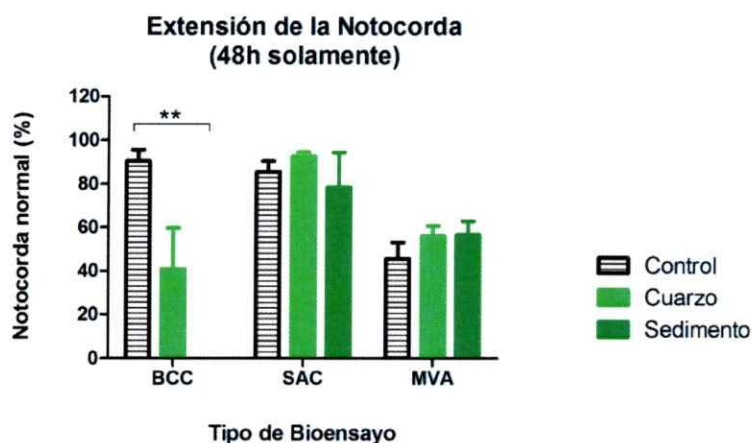


**Figura 27. Límite entre cerebro medio y posterior (MHB) de embriones de 24 h incubados en cada bioensayo.** Sólo se observa una diferencia significativa en la formación de las vesículas del cerebro, reflejada por la definición del límite entre cerebro medio y posterior (MHB, midbran-hindbrain boundary) entre controles y embriones expuestos a sedimentos, en el bioensayo de contacto clásico (BCC).

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.1.8. Extensión de la notocorda

Ninguna de las larvas expuestas a sedimentos en el BCC presenta notocorda normal, sin embargo, esta es la única diferencia significativa entre todas las larvas expuestas a distintos tratamientos (control, polvo de cuarzo y sedimentos), en todos los bioensayos (Figura 28). Aunque prácticamente la mitad de las larvas expuestas a polvo de cuarzo en el BCC presenta una notocorda defectuosa, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

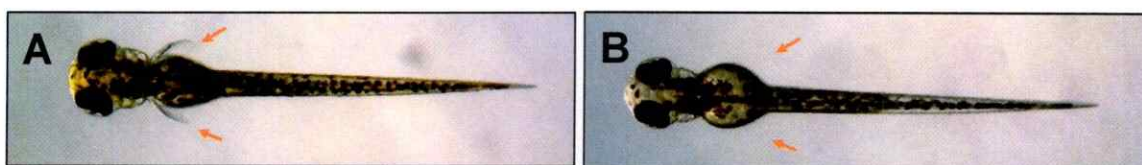


**Figura 28. Extensión de la notocorda de larvas de 48 h incubadas en cada bioensayo.** Sólo se observa una diferencia significativa en el estiramiento de la notocorda entre controles y larvas expuestas a sedimentos, en el bioensayo de contacto clásico (BCC). En este tipo de bioensayo, ninguna larva expuesta a sedimentos posee una notocorda extendida normalmente.

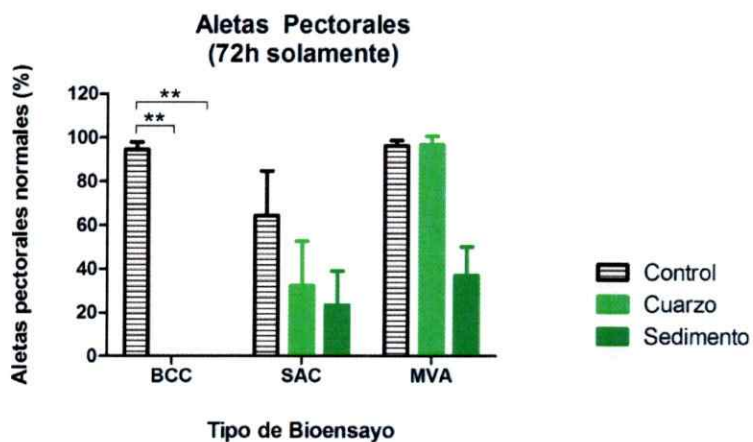
\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.1.9 Aletas pectorales

En el bioensayo de contacto clásico (BCC), ninguna larva expuesta a polvo de cuarzo o sedimentos desarrolla sus aletas pectorales normalmente (Figuras 29 y 30). En los otros bioensayos, a pesar de observarse que aproximadamente la mitad o incluso una menor proporción de larvas expuestas a sedimentos presentan aletas pectorales normales, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por otra parte, en el SAC, no todos los controles presentan aletas pectorales normales, y más de la mitad de las larvas expuestas a polvo de cuarzo o sedimentos, presenta aletas pectorales defectuosas.



**Figura 29. Aletas pectorales de larvas de 72 h incubadas en el bioensayo de contacto clásico (BCC).** A) Larva control (72 hpf). Se observan claramente las aletas pectorales, completas y funcionales. B) Larva expuesta a sedimentos; no se observan aletas pectorales.



**Figura 30. Aletas pectorales de larvas de 72 h incubadas en cada bioensayo.** En el BCC, sólo las larvas control presentan aletas pectorales normales. En los otros bioensayos los análisis estadísticos no son concluyentes.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2 Experimentos en valores puntuales de pH

**Tabla 2. Observaciones consideradas normales y anormales de las características analizadas en los experimentos en valores puntuales de pH (continúa en pág. siguiente).**

<b>Característica del individuo</b>	<b>Normal</b>	<b>Anómalo</b>
Sobrevivencia (por pocillo)	Mayor a un 90%	Menor a un 90%
Eclosión (por pocillo)	48 hpf: aprox. 70% 72 hpf: 100% 96 hpf: 100%	48 hpf: distinto a 70% 72 hpf: distinto a 100% 96 hpf: distinto a 100%
MHB	24 hpf: Límite definido	Límite poco claro o indefinido
Somitos (post-extensión del vitelo)	24 hpf: 10 somitos	24 hpf: menor a 8 somitos
Ojos	24 hpf: muy poco pigmento 48, 72 y 96 hpf: tamaño 1,5 veces mayor; retina de color negro	24 hpf: menor tamaño 48, 72 y 96 hpf: menor tamaño; retina con pigmentación no uniforme
Cápsulas óticas	24 hpf: forma elíptica otolitos no visibles 48 hpf: forma elíptica; otolitos esféricos visibles de igual tamaño 72 y 96 hpf: forma irregular, otolitos de distinto tamaño entre ellos	24 hpf: no se distingue 48 hpf: otolitos no visibles 72 y 96 hpf: forma elíptica; otolitos esféricos visibles de igual tamaño
Extensión de la notocorda	Extensión progresiva hasta alcanzar la horizontalidad	Extensión incompleta; lordosis, cifosis y escoliosis
Pigmentación	48, 72 y 96 hpf: melanocitos de color negro	48, 72 y 96 hpf: ausencia de melanocitos; melanocitos de color gris
Forma del corazón	48, 72 y 96 hpf: bicameral enrollado sobre sí mismo	48, 72 y 96 hpf: hipertrofiado (mayor al doble de su tamaño normal); extendido

Frecuencia Cardíaca	125 latidos/min (aprox. 2 latidos/seg)	Menos de 60 latidos/min (menos de 1 latido/seg)
Circulación sanguínea	48, 72 y 96 hpf: eritrocitos circulan por vena y arteria caudal	48, 72 y 96 hpf: no se observa flujo de eritrocitos en la parte posterior del cuerpo
Forma del saco vitelino	Vitelo de forma esférica que disminuye de tamaño progresivamente; transparente	Deformado o discontinuado por presencia de edemas; acumulación de sangre; coagulación (opaco)
Edemas [formación]	Menor a un 10%	Mayor a un 10%
Aletas pectorales	72 y 96 hpf: Extendidas; funcionales (larva aletea); longitud similar a ½ largo del vitelo	72 y 96 hpf: Plegadas o contraídas; no hay movimiento de las aletas; longitud menor a la mitad del largo del vitelo
Aleta caudal	72 y 96 hpf: Completa y extendida	72 y 96 hpf: Incompleta, rasgada, contraída
Movimiento	24 hpf: Contorsiones a lo largo del eje longitudinal (twisting) cada 10 seg. mín. 48, 72 y 96 hpf: Nado rápido al entrar en contacto con otras larvas o frente a estímulo mecánico	24 hpf: Contorsiones cada 1 minuto o menos, o ninguna retorsión durante la observación 48, 72 y 96 hpf: Nado lento, torpe, o ausencia de respuesta al entrar en contacto con otras larvas o frente a est. mecánico
HTA	24 hpf: -70° 48 hpf: -135° 72 hpf: -155° 96 hpf: -180°	Menor en -30° al ángulo correspondiente al estadio de observación
Protrusión de la mandíbula	72 y 96 hpf: Sobresale (protruye) más allá de los huesos nasales	72 y 96 hpf: No sobresale (no protruye)
Inflación de la vejiga natatoria	96 hpf: cerca de un 80% de las larvas presenta vejiga natatoria inflada (flotan)	96 hpf: menos de un 20% de las larvas presenta vejiga natatoria inflada (no flotan)

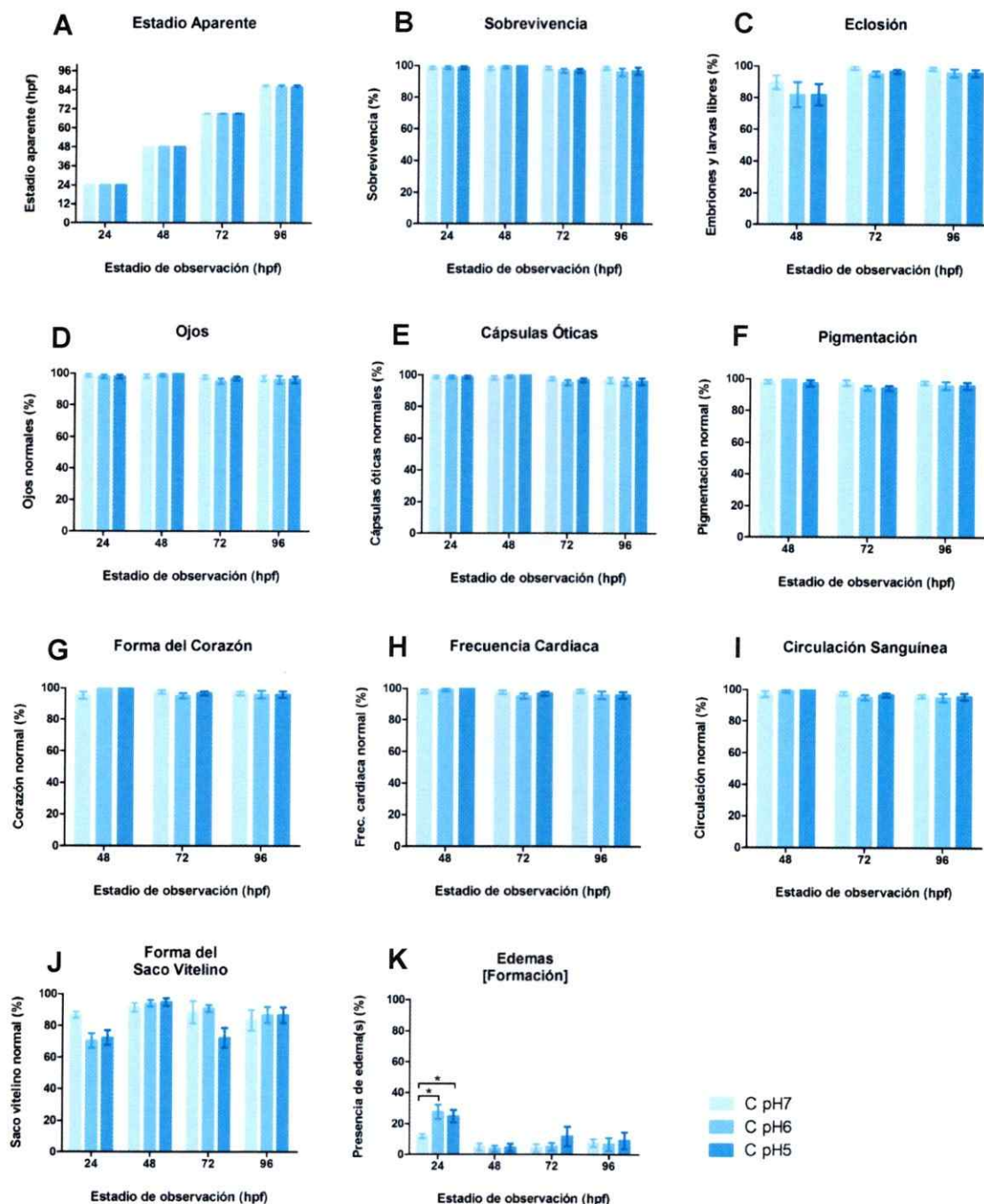


#### 4.4.2.1 Comparación entre embriones y larvas expuestos(as) a E<sub>3</sub> a distinto pH

En general, no existen diferencias en las características de los embriones y larvas expuestos(as) a E<sub>3</sub> (*Embryo Medium 3*) a pH 7 respecto a los embriones expuestos a E3 a pH 6 o pH 5 (Figuras 31 y 32); siendo la excepción la formación de edemas (Figura 31-K).

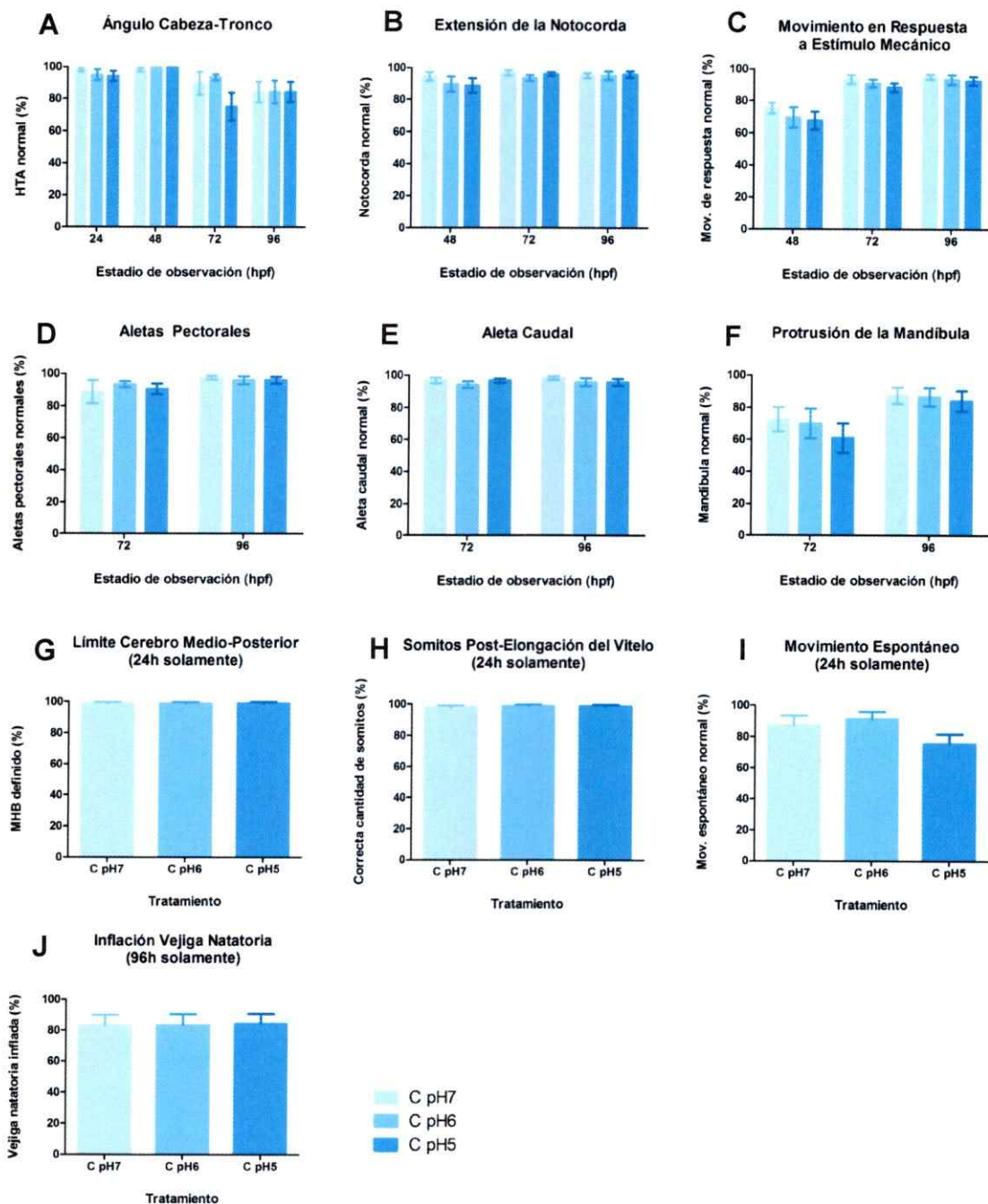
Respecto a esta última característica, a las 24 hpf se observa que los embriones expuestos a E3 a pH 6 y pH 5, presentan una mayor proporción de edemas que los embriones expuestos a E3 a pH 7, sin embargo, la cantidad de embriones con edema no supera el 20% y esta diferencia entre embriones expuestos a distinto pH deja de ser significativa en los estadios siguientes.

Como los resultados de estos embriones y larvas no difieren significativamente entre sí, en los análisis estadísticos siguientes (comparación con los embriones y larvas expuestos a sedimento con medio acuoso a distinto pH) fueron reunidos, generándose un solo grupo control.



**Figura 31. Comparación entre embriones y larvas expuestos(as) a E3 a distinto pH.** No se observan diferencias significativas en la mayoría de las características de los embriones expuestos a *medio de embriones 3* (E3, *embryo medium 3*) a pH 7, pH 6 y pH 5.

**K) Formación de edemas:** A las 24 hpf se observa mayor formación de edemas en los embriones expuestos a E3 con pH 6 y pH 5, no obstante, esta diferencia no se observa en los siguientes estadios. \* p < 0,05

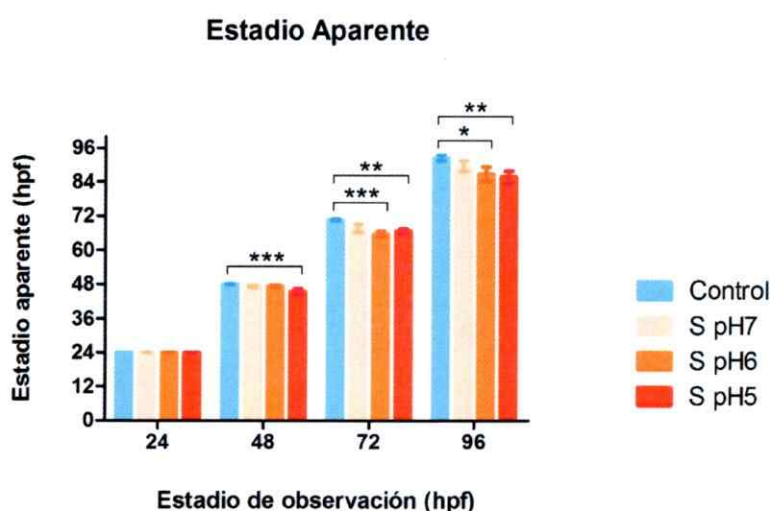


**Figura 32. (Continuación de la figura 31) Comparación entre embriones y larvas expuestas(as) a E3 a distinto pH. No se observan diferencias significativas en las características de los embriones expuestos a medio de embriones 3 (E3, embryo medium 3) a pH 7, 6 y 5.**

#### 4.4.2.2 Comparación entre embriones y larvas control, versus expuestos(as) a sedimentos con medio acuoso a distinto pH

##### 4.4.2.2.1 Estadio aparente

Se observa un ligero atraso en el desarrollo de los embriones expuestos a sedimentos con medio a pH 5 a partir de las 48 hpf (Figura 33). También se observa una diferencia significativa en el estadio aparente de las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 respecto a los controles a partir de las 72 hpf. Las larvas se atrasan en su desarrollo por pocas horas (aparentan un atraso leve).

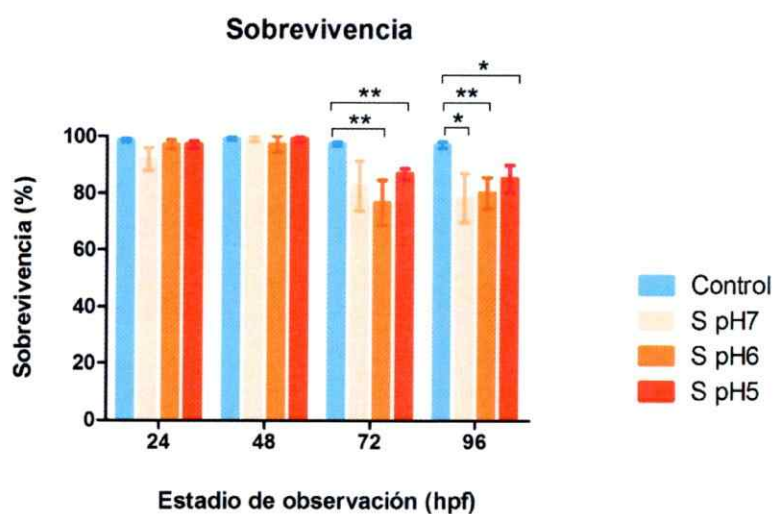


**Figura 33. Estadio aparente de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observan diferencias significativas a partir del estadio de 48 hpf entre los controles y las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 5. A partir de las 72 hpf también existe una diferencia significativa entre las larvas control y las expuestas a sedimentos con medio acuoso a pH 6.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.2 Sobrevivencia

Se observa una menor sobrevivencia de las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y 5 a las 72 hpf (Figura 34); y una menor sobrevivencia de las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7, 6 y 5 a las 96 hpf. En ambos estadios sobrevive más del 70% de las larvas.

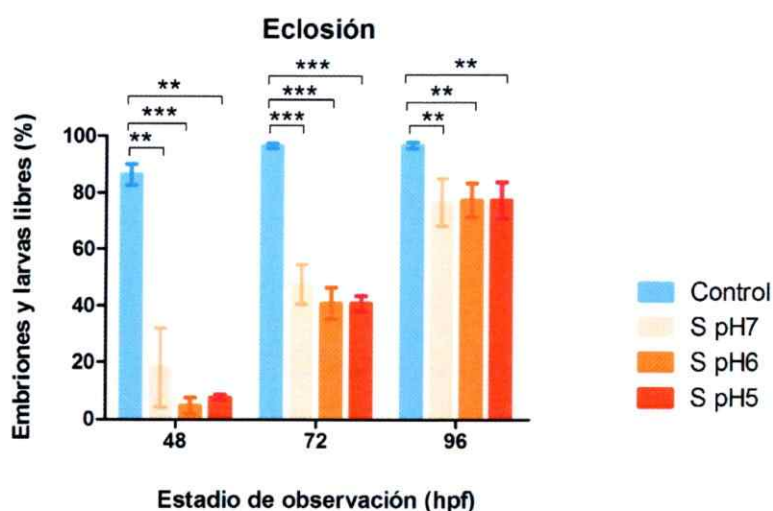


**Figura 34. Sobrevivencia de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observan diferencias significativas a partir del estadio de 72 hpf. En este estadio, las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 tienen una proporción de sobrevivencia menor al control. A las 96 hpf, las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7 también tienen una proporción de sobrevivencia menor al control.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

#### 4.4.2.2.3 Eclosión

La diferencia entre embriones/larvas control y expuestos(as) a sedimentos es significativa en todo estadio de observación (Figura 35). En el último estadio observado, a las 96 hpf, cerca de un 20% de los embriones expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado permanece dentro de su corion (no ha eclosionado).

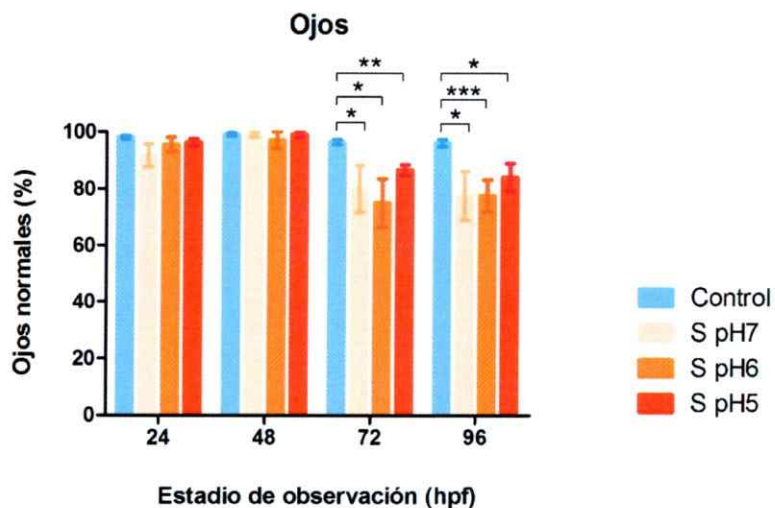


**Figura 35. Eclosión de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.** Embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos presentan una significativa diferencia en la eclosión respecto al control, sin existir diferencias significativas entre éstos. Aproximadamente el 20% de los embriones expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado permanece dentro de su corion incluso en el último estadio observado.

\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,00$

#### 4.4.2.2.4 Ojos

A partir de las 72 hpf las larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor utilizado de pH, presentan una menor proporción de ojos normales que el control, sin existir diferencias significativas entre éstos (Figura 36).

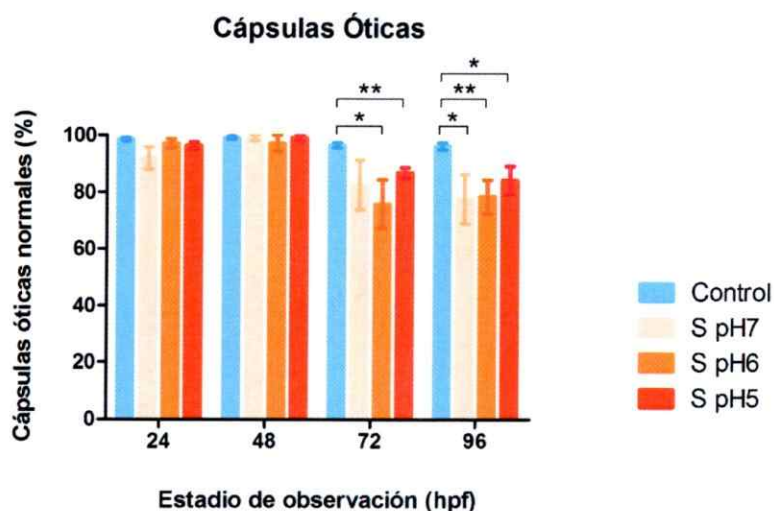


**Figura 36. Ojos de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una diferencia significativa en la proporción de ojos normales en las larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor utilizado de pH respecto a los controles, a partir de las 72 hpf.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.5 Cápsula ótica

Se observan diferencias significativas a partir del estadio de 72 hpf (Figura 37). En este estadio, las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 tienen una proporción de cápsulas óticas normales menor al control. A las 96 hpf, las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7 también tienen una proporción de cápsulas óticas normales menor al control.



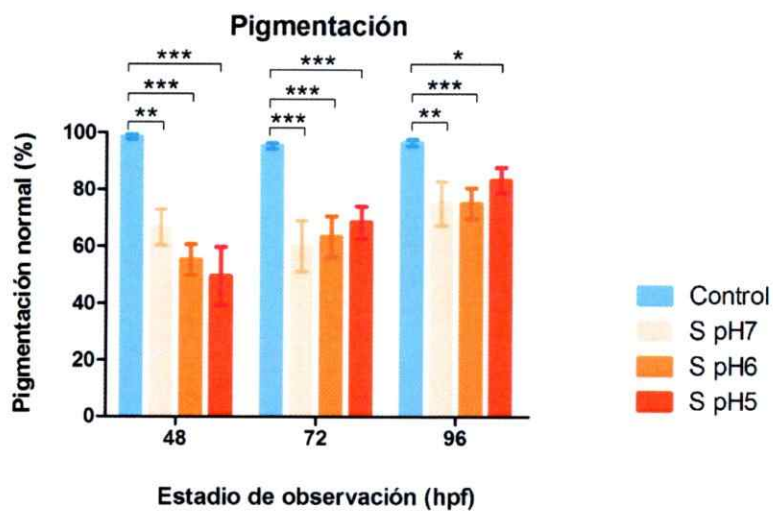
**Figura 37. Cápsulas óticas de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa diferencia en la proporción de cápsulas óticas normales entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y 5 en el estadio de 72 hpf. A las 96 hpf también se observan diferencias entre las larvas control y las expuestas a sedimentos con medio a pH 7.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$



#### 4.4.2.2.6 Pigmentación

En todo estadio observado, la proporción de larvas con pigmentación normal expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado, es significativamente menor al control, mas no se observa diferencia entre éstos (Figura 38).

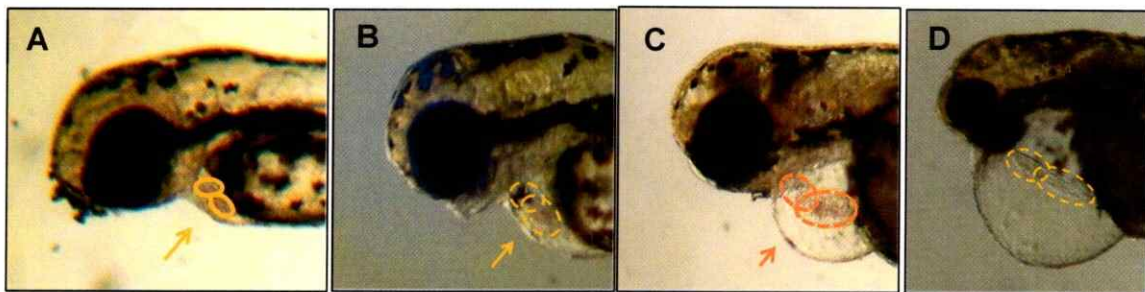


**Figura 38. Pigmentación de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una menor proporción de larvas con pigmentación normal, tras la exposición sedimentos con medio a cualquier valor de pH, respecto al control, en todo estadio observado.

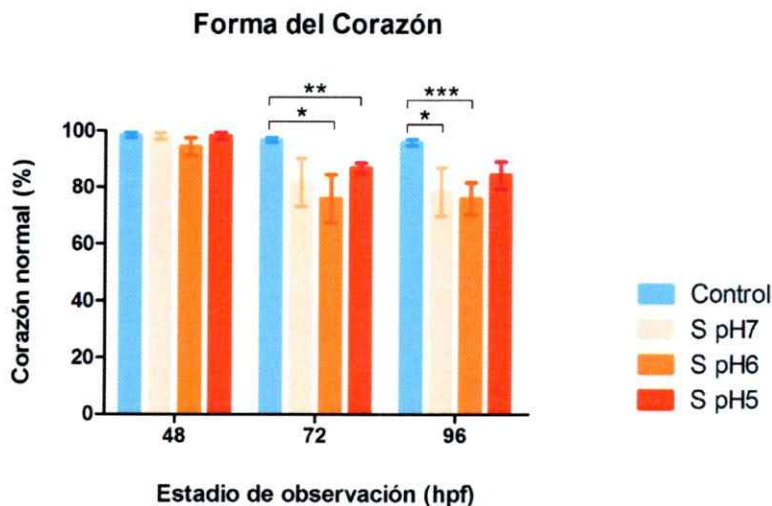
\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.7 Forma del Corazón

A las 72 hpf se observa una diferencia significativa en la proporción de larvas con corazón normal expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 respecto a los controles (Figuras 39 y 40). A las 96 hpf, la diferencia entre larvas control y expuestas a sedimentos con medio a pH 5 se pierde; y se observa diferencia entre larvas control y expuestas a sedimentos con medio a pH 7.



**Figura 39. Diferentes defectos en el corazón de larvas de 72 hpf expuestas a sedimentos.** A) Larva control. B) y C) Larvas con corazón hipertrofiado. D) Larva con corazón tubular (completamente estirado).

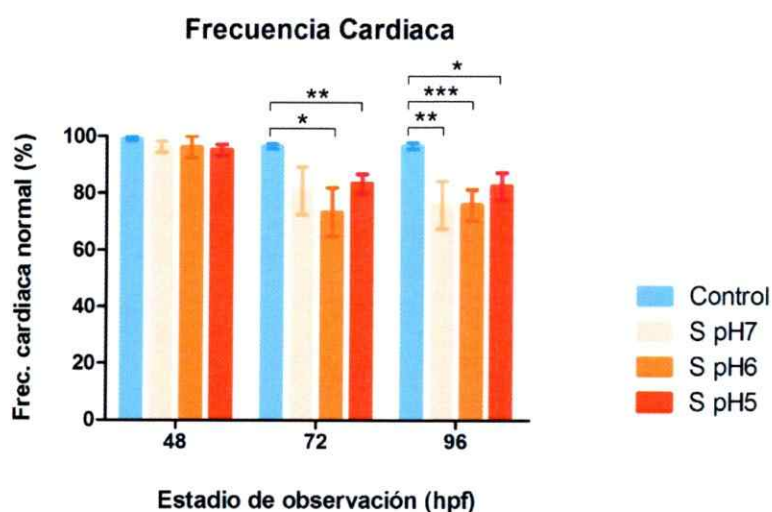


**Figura 40. Forma del corazón de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** A las 72 hpf se observa una diferencia significativa de larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 respecto a las larvas control. A las 96 hpf se observa una diferencia significativa de larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7 y pH 6 respecto a las larvas control.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.8 Frecuencia cardiaca

A partir de las 72 hpf, se observa una diferencia significativa entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 (Figura 41). A las 96 hpf, también se observa una diferencia significativa entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7.

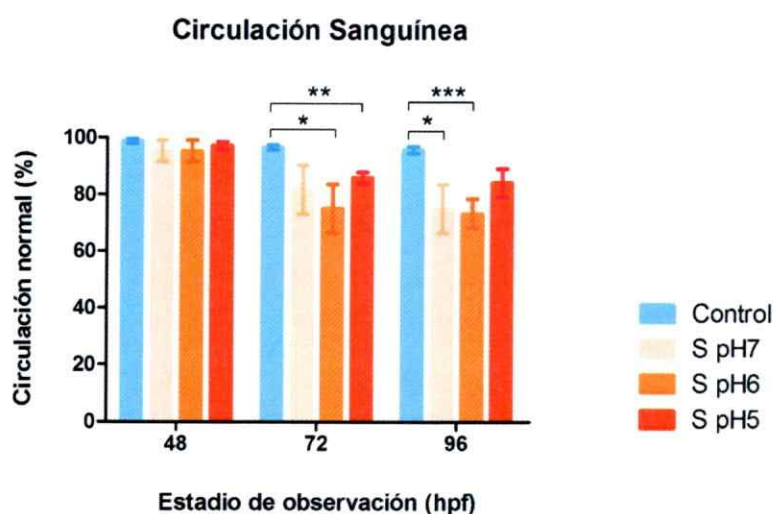


**Figura 41. Frecuencia cardiaca de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** A partir del estadio de 72 hpf se observa una diferencia significativa en las larvas expuestas a sedimentos de con medio a pH 6 y 5. A las 96 hpf además se observa una diferencia significativa entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.9 Circulación sanguínea

A las 72 hpf, se observa una diferencia significativa entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 (Figura 42). A las 96 hpf, la diferencia entre larvas control y expuestas a sedimentos con medio a pH 5 se pierde; y se observa diferencia entre larvas control y expuestas a sedimentos con medio a pH 7 y pH 6.

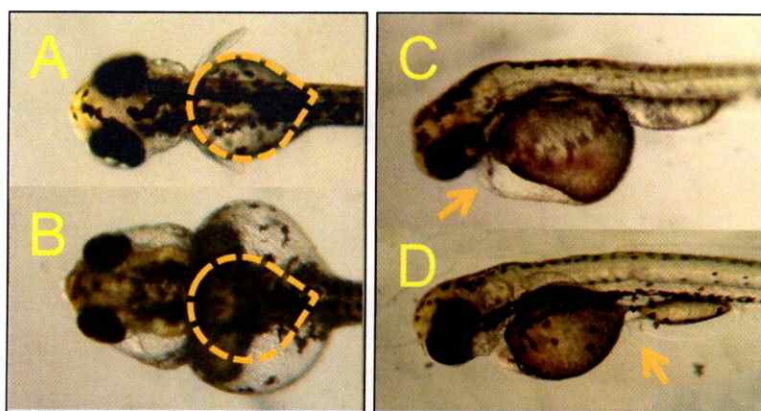


**Figura 42. Circulación corporal de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** Las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 difieren de las larvas control a las 72 y las 96 hpf. A las 72 hpf, las larvas expuestas a medio con pH 5 son significativamente diferentes a las larvas control; sin embargo, a las 96 hpf esta diferencia se pierde y se observa diferencia entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7.

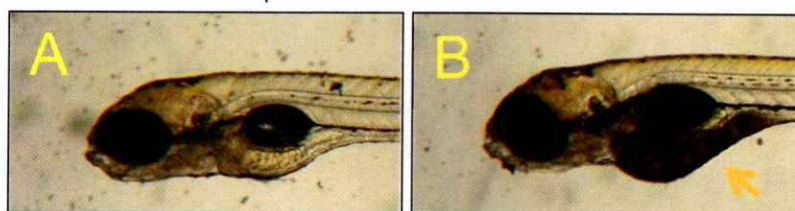
\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.10 Forma del saco vitelino

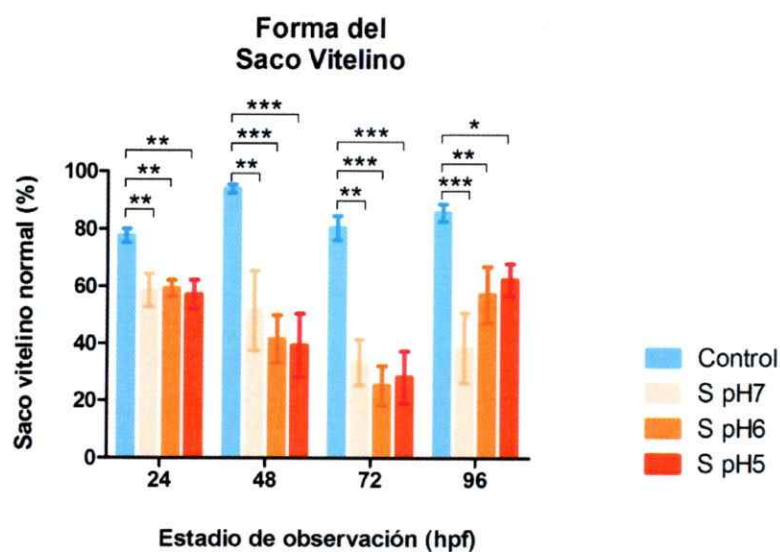
Se observan diferencias significativas entre embriones y larvas control, respecto a los embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado, en todo estadio observado (Figuras 43, 44 y 45).



**Figura 43. Deformación del saco vitelino de larvas de 48 hpf producto de edema(s).** **A)** Larva control. **B)** Larva con un edema enorme que deforma completamente el saco vitelino, aplastándolo hacia anterior. **C)** Larva con edema pericardiaco. **D)** Larva cuyo saco vitelino queda separado de su extensión por un edema entre ambas zonas del vitelo.



**Figura 44. Larvas de 96 hpf con saco vitelino con diferente estado.** **A)** Larva control, cuyo saco vitelino ya ha sido completamente absorbido, observándose el intestino en su lugar. **B)** Larva cuyo saco vitelino no ha sido absorbido y se encuentra en estado de descomposición.



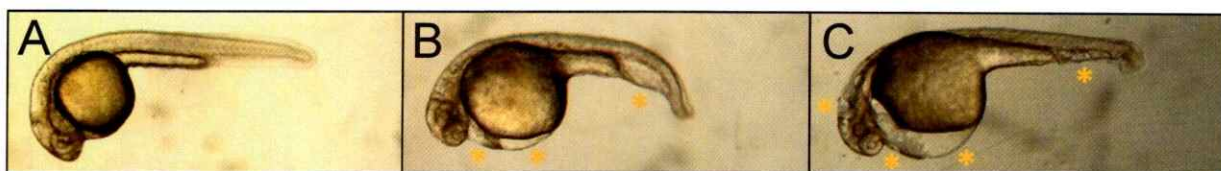
**Figura 45. Saco vitelino de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una diferencia significativa en la proporción de embriones con vitelo normal en los embriones expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH respecto a los controles, en todo estadio observado.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

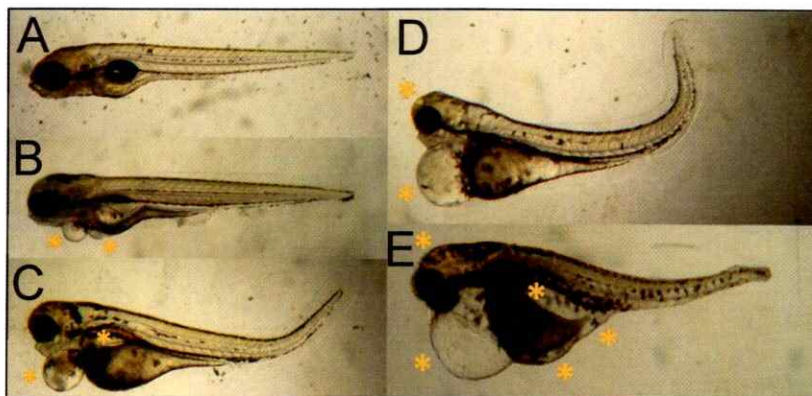
#### 4.4.2.2.11 Formación de edemas

Contrariamente a lo observado en otras características, la proporción de embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos que presentan formación de edemas es mayor en los dos primeros estadios observados: 24 y 48 hpf (Figuras 46, 47 y 48).

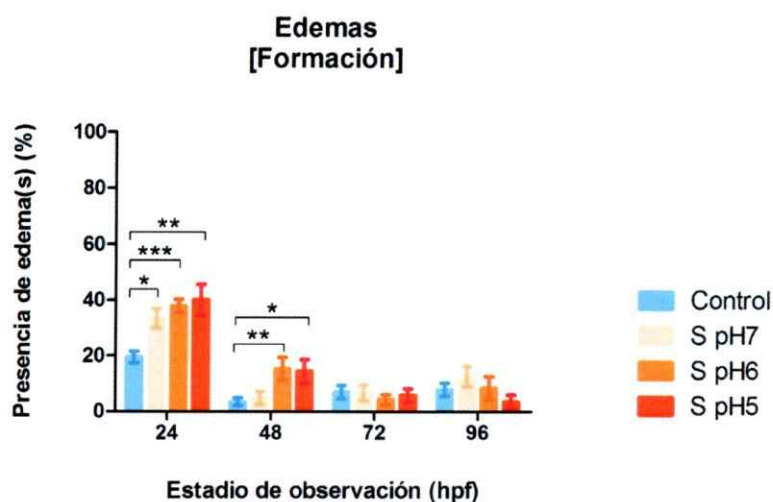
A las 24 hpf, se observa una diferencia significativa entre embriones control y embriones expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado. A las 48 hpf se observan diferencias entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5.



**Figura 46. Embriones de 24 hpf con edemas de diferentes tamaños y ubicación. A)** Embrión control. **B)** Embrión con edemas pericardiaco, en el saco vitelino y vena caudal. **C)** Embrión que, además de los edemas que presenta el embrión Bm presenta un pequeño edema cerebral.



**Figura 47. Larvas de 96 hpf con edemas de diferentes tamaños y ubicación. A)** Larva control. **B)** y **C)**. Edemas pericardiacos y en el saco vitelino. **D)** Larva con gran edema pericardiaco y pequeño edema cerebral. **E)** Larva con enorme edema pericardiaco, gran edema cerebral y varios edemas en el saco vitelino.

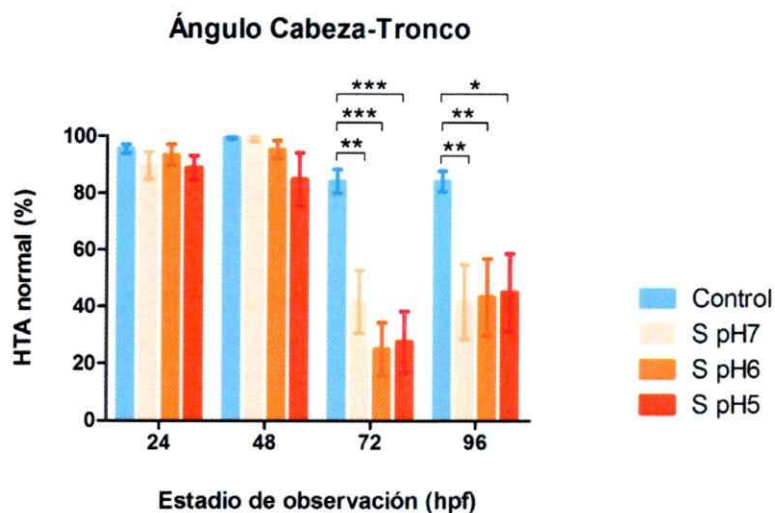


**Figura 48. Formación de edemas en embriones y larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** A las 24 hpf se observa una diferencia significativa entre embriones control y expuestos a sedimentos con medio a cualquiera valor de pH utilizado. A las 48 hpf se pierde la diferencia entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7. A las 72 y 96 hpf no existen diferencias significativas entre larvas control y larvas expuestas a sedimentos.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.12 Ángulo cabeza-tronco (HTA)

A partir de las 72 hpf las larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor utilizado de pH, presentan una menor proporción de HTA normal que el control, sin existir diferencias significativas entre éstos (Figura 49).



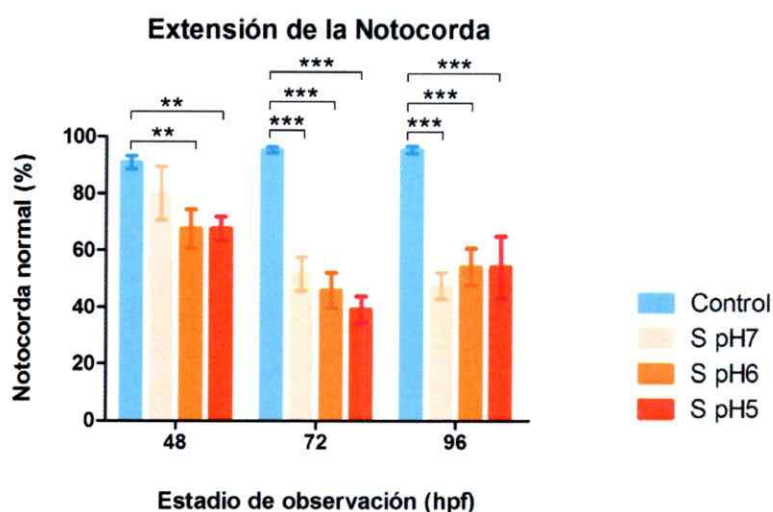
**Figura 49. Ángulo cabeza-tronco (*head-trunk angle*, HTA) de embriones y larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** A partir del estadio de 72 hpf, se observa una significativa diferencia en la proporción de larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado con HTA normal respecto a los controles.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$



#### 4.4.2.2.13 Extensión de la notocorda

A las 48 hpf existen diferencias significativas en la proporción de larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 respecto a las larvas control (Figura 50). A las 72 y 96 hpf, existen diferencias significativas en la proporción de larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado respecto a las larvas control, pero no entre tratamientos.

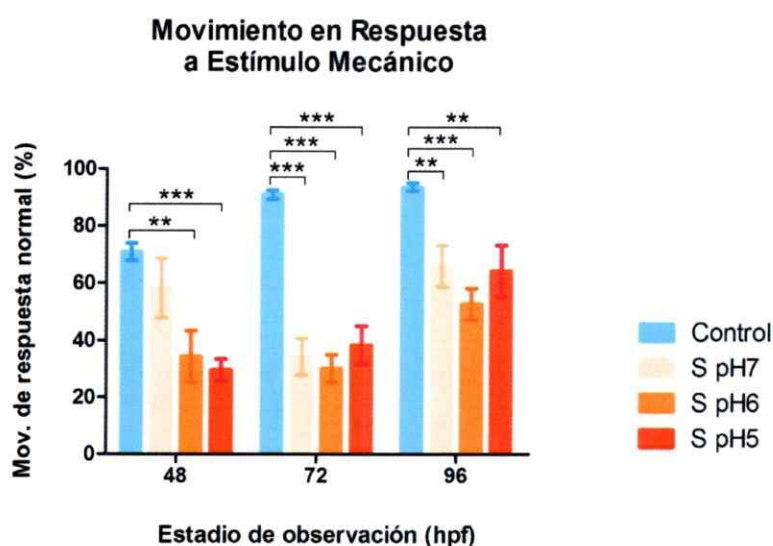


**Figura 50. Notocorda de embriones y larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una diferencia significativa en la proporción de embriones con notocorda normal en los embriones expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado respecto a los controles, en todo estadio observado; exceptuando la diferencia entre controles y larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7, que no es significativa a las 48 hpf.

\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.14 Movimiento en respuesta a estímulo mecánico

Exceptuando la respuesta motora de las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7 a las 48 hpf, que no difiere significativamente de las larvas control; en todos los estadios observados existe una diferencia significativa entre controles y larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado (Figura 51).

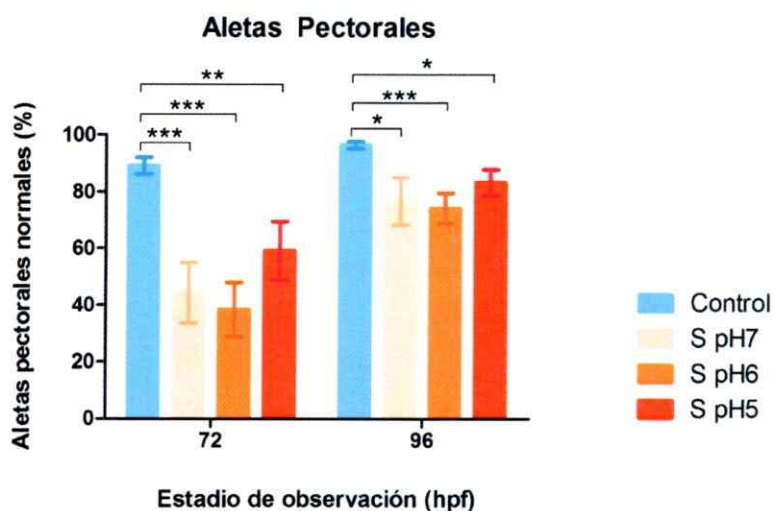


**Figura 51. Movimiento en respuesta a estímulo mecánico de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una diferencia significativa en la proporción de larvas con movimiento normal en los embriones expuestos a sedimentos de cualquier intervalo de pH respecto a los controles, en todo estadio observado; exceptuando la diferencia entre controles y embriones expuestos a sedimentos pH 7, que no es significativa a las 48 hpf.

\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

## 4.4.2.2.15 Aletas pectorales

En ambos estadios observados existe una diferencia significativa entre controles y larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado (Figura 52).

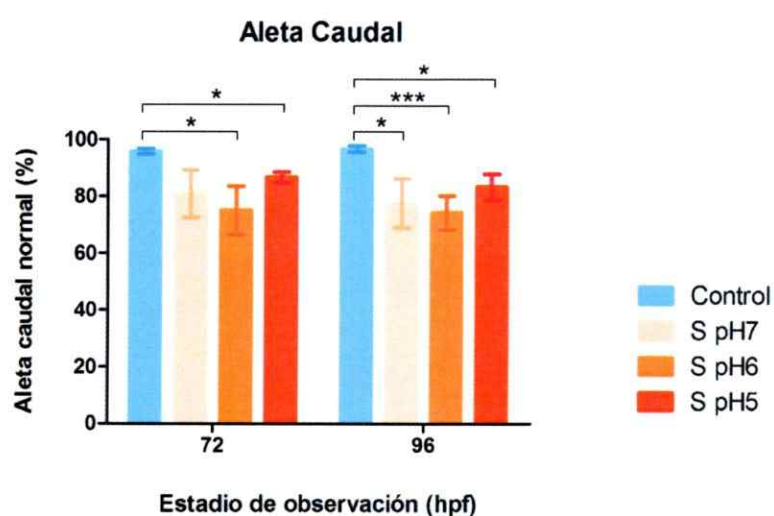


**Figura 52. Aletas pectorales de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una diferencia significativa en la proporción de larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado con aletas pectorales normales respecto a las larvas control.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.16 Aleta caudal

Exceptuando la proporción de larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7 con aleta caudal normal a las 72 hpf, que no difiere significativamente de las larvas control; en ambos estadios observados existe una diferencia significativa entre controles y larvas expuestas a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado (Figura 53).



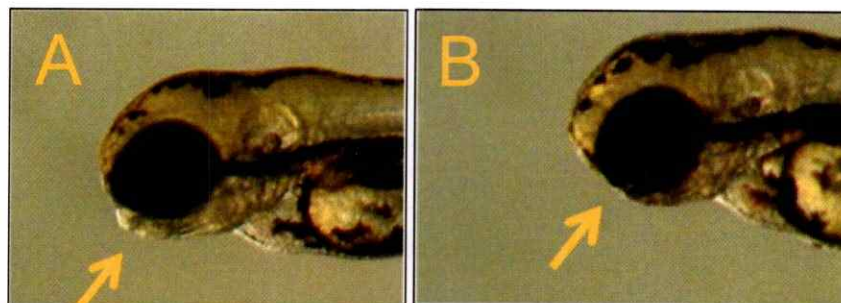
**Figura 53. Aleta caudal de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** Se observa una diferencia significativa en la proporción de embriones con aleta caudal normal en los embriones expuestos a sedimentos de cualquier intervalo de pH respecto a los controles, en ambos estadios observados; exceptuando las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 7 a las 72 hpf.

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

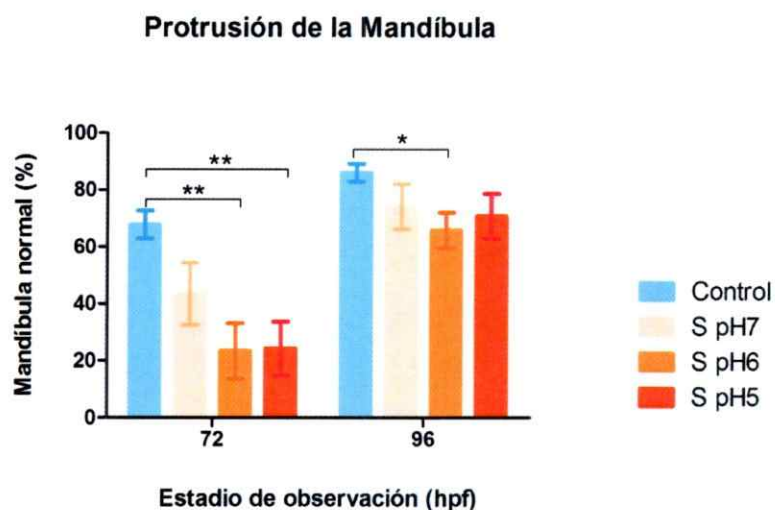
#### 4.4.2.2.17 Protrusión de la mandíbula

A las 72 hpf existe una diferencia significativa entre larvas control y expuestas a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5. A las 96 hpf la diferencia entre larvas control y larvas expuestas a medio con pH 5 se pierde, permaneciendo sólo la diferencia de los

controles respecto a las larvas expuestas a sedimentos con medio a pH 6 (Figuras 54 y 55).



**Figura 54. Protrusión de la mandíbula de larvas de 72 hpf. A) Larva control. B) Larva expuesta a sedimentos, cuya mandíbula no sobresale.**



**Figura 55. Mandíbula de larvas expuestas a sedimentos con medio a distinto pH. Sólo en el estadio de 72 hpf se observan diferencias significativas entre el control y los embriones expuestos a sedimentos pH 6 y pH 5.**

\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

#### 4.4.2.2.18 Límite entre cerebro medio y posterior (MHB)

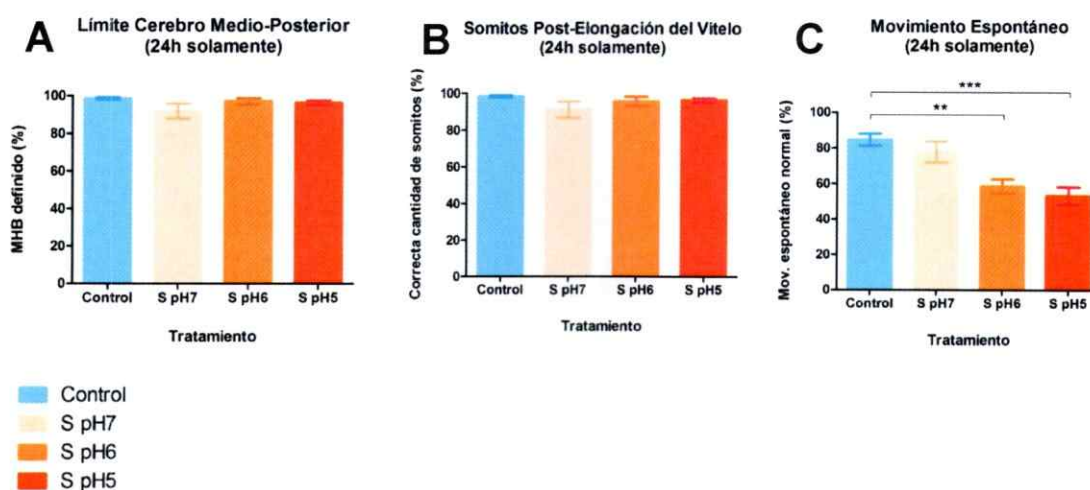
No existen diferencias significativas entre embriones control y los expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado (Figura 56-A).

#### 4.4.2.2.19 Somitos post-extensión del vitelo

No existen diferencias significativas entre embriones control y los expuestos a sedimentos con medio a cualquier valor de pH utilizado (Figura 56-B).

#### 4.4.2.2.20 Movimiento espontáneo

Alrededor del 60% de los embriones expuestos a sedimentos con medio a pH 6 y pH 5 presenta un movimiento espontáneo normal (figura 56-C).

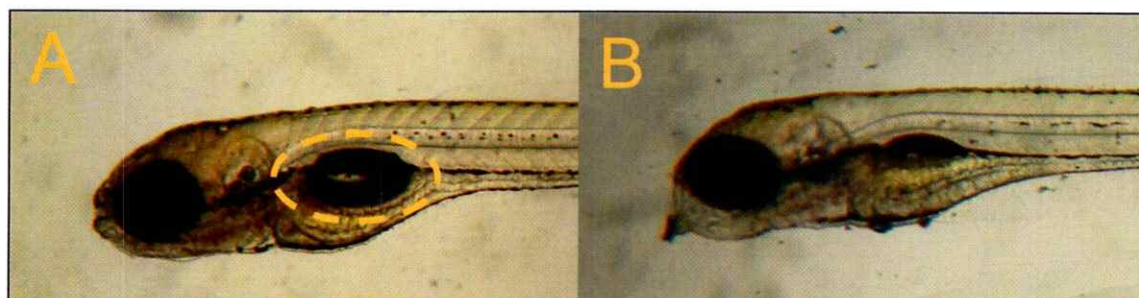


**Figura 56. Características observadas sólo a las 24 h. A) Límite entre cerebro medio y posterior (MHB) de embriones expuestos a sedimentos con medio a distinto pH. No se observan diferencias entre embriones control y expuestos a sedimentos. B) Somitos (post-elongación del vitelo) de embriones expuestos a sedimentos con medio a distinto pH. No se observan diferencias entre embriones control y expuestos a sedimentos. C) Movimiento espontáneo de embriones expuestos a sedimentos con medio a distinto pH. Se observa una diferencia significativa en la proporción de embriones que se mueven espontáneamente entre los controles y los embriones expuestos a sedimentos a pH 6 y pH 5.**

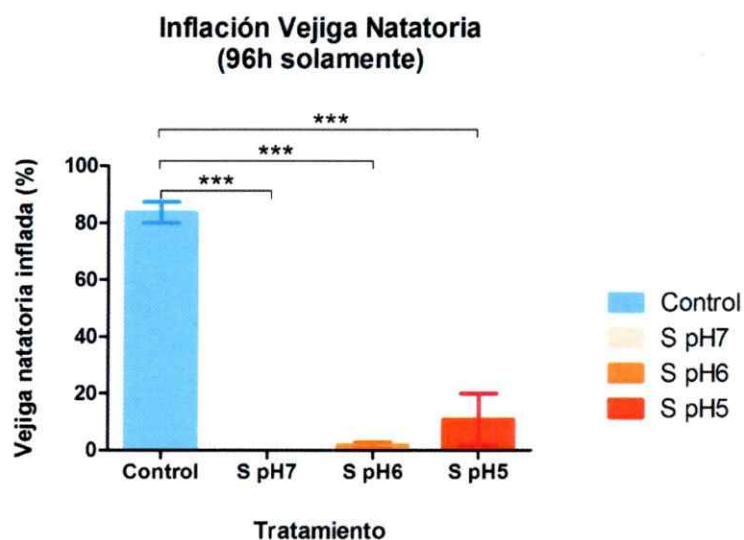
\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

#### 4.4.2.2.21 Vejiga natatoria

Prácticamente ninguna larva expuesta a sedimentos presenta vejiga natatoria inflada (Figuras 57 y 58).



**Figura 57. Inflación de la vejiga natatoria. A)** Larva de 96 hpf, con vejiga inflada y funcional. **B)** Larva de 96 hpf cuya vejiga no se encuentra inflada.



**Figura 58. Vejiga natatoria de larvas de 96 h expuestas a sedimentos con medio a distinto pH.** A las 96 hpf, prácticamente el 80% de los embriones presenta una vejiga natatoria inflada y funcional, sin embargo, en este estadio prácticamente ningún embrión expuesto a sedimentos pH 7 y pH 6 presenta una vejiga natatoria visible. Aunque la proporción pareciera ser mayor en embriones expuestos a pH 5, los resultados estadísticos son concluyentes sólo respecto a su diferencia en comparación a los controles.

\*\*\*  $p \leq 0,001$

## V. DISCUSIÓN

### 5.1 Observaciones en terreno y Medición de parámetros químicos

Se observa que tanto el agua de los puntos de muestreo, como los sedimentos bajo ella, presentan pH neutro (ver Tabla 3). Esta condición es ideal para el desarrollo de los embriones, como evidencia el pH, también neutro, del E<sub>3</sub> (*embryo medium 3*), diseñado específicamente con este propósito. Esto permite descartar que los efectos observados en los embriones y larvas expuestos a sedimentos, sean producto de un pH distinto al neutro. El pH del polvo de cuarzo, sin embargo, es levemente alcalino (ver Tabla 3); lo que podría explicar, en parte, que los embriones y larvas expuestos/as a éste presenten diferencias respecto a los embriones y larvas control.

La conductividad tanto del polvo de cuarzo como la de los sedimentos, es menor a la del E<sub>3</sub>. La conductividad de los sedimentos es prácticamente la mitad de la que presenta el E<sub>3</sub> (ver Tabla 3). Esto permite descartar que los efectos observados en embriones y larvas expuestos/as a sedimentos y polvo de cuarzo, sean producto de un exceso de sales disueltas.

Por último, la declinación de oxígeno es mayor en el polvo de cuarzo que en los sedimentos (ver Tabla 3); lo que podría explicar que algunos efectos dañinos se observen con mayor frecuencia en embriones y larvas expuestos/as a polvo de cuarzo que en sedimentos.



## 5.2 Análisis químico de metales presentes en sedimentos

Que no existan diferencias notorias entre la concentración de metales encontradas en la muestra tomada post época seca y la tomada post época lluviosa, indica que los metales permanecen en los sedimentos, a pesar del aumento invernal de caudal (Figura 13).

El drástico aumento de concentración total de Cd, Cu, Fe y Pb encontrada en el punto de derrame del relave, en relación al punto aguas arriba, indica que ese aumento es muy probablemente de origen antrópico, es decir, debido al accidente minero (Figura 13).

Respecto a la solubilidad de estos metales, se observa que el porcentaje del total que pasa al medio acuático es mayor en las condiciones naturales (punto "Aguas Arriba") para los metales Cd y Cu (Figura 14-A y 14-B). Para los metales Fe y Pb en cambio, es mayor la proporción del total que pasa al medio acuático en el punto del derrame, lo que, sumado a su mayor presencia en estado lábil, vuelve a estos metales más bioaccesibles y por ende, probablemente más dañinos (Figura 14-C y 14-D).

Cabe destacar que, a pesar de encontrarse similares concentraciones de Fe total en ambos puntos de muestreo, aguas arriba y cerca del relave; en el punto del derrame se produce una mayor proporción de éste metal que pasa al medio acuático; lo que indicaría que en este punto existen condiciones que favorecen su disolución (figura 14-C).

El caso del Pb es remarcable, pues en el tranque de relaves se encuentra una cantidad de Pb total más de 60 veces mayor a la que se encuentra en las condiciones naturales. Respecto al Pb lábil, en el tranque de relaves se encuentra una cantidad de Pb 355 veces mayor a la que se encuentra en el punto aguas arriba (Figura 14-D).

Respecto a las formas en la que se encuentran los metales en función del pH (Figura 15), se observa en principio que a pH 7, 6 y 5, se encuentra una amplia gama de metales en forma soluble (catiónica o hidróxido); sin embargo, debido a las altísimas concentraciones de Cu, Fe y Pb lábil encontrados en el punto del derrame del tranque; probablemente estos metales se encuentran precipitados en su forma insoluble (Figuras 15-B, 15-C y 15-D), lo que explicaría también el nulo cambio en sus concentraciones tras la estación lluviosa.

### **5.3 Análisis biológico de sedimentos**

#### **5.3.1 Ensayos de optimización**

Ambas variaciones al bioensayo de contacto clásico (BCC) revierten en gran medida los efectos de la declinación de oxígeno (atraso en el desarrollo) sobre los embriones y larvas. Decidir cuál es más idónea, requiere un análisis integral del conjunto de características observadas.

Tomando en cuenta el estadio aparente de los embriones y larvas (Figura 17), el bioensayo de contacto con sistema de aireación constante (SAC) es más adecuado, pues prácticamente no existe diferencia etaria entre los embriones y larvas tratados/as y los embriones y larvas control. En el bioensayo de contacto con menor volumen de agua (MVA) en cambio, no todos los embriones expuestos a sedimentos alcanzan a desarrollar las características correspondientes al estadio de 72 hpf.

Esto podría deberse a la diferencia que existe entre ambas variaciones: en el SAC los embriones y larvas se encuentran en la misma cantidad de medio acuático que en el BCC, pero la aireación pone a disposición de éstos el oxígeno suficiente para

no atrasarse en el desarrollo; mientras que en el MVA, los embriones obtienen suficiente oxígeno desde la atmósfera, pero se encuentran en un menor volumen de agua que en el BCC, aunque con la misma cantidad de sedimentos, por lo que podrían estar expuestos a una mayor concentración de metales disueltos que en el BCC, lo que le impediría a todos los embriones y larvas desarrollarse a la velocidad normal.

Considerar la sobrevivencia de los embriones y larvas (Figura 19) no permite decidir con seguridad sobre la idoneidad de ninguno de los métodos, pues prácticamente no existen diferencias entre la sobrevivencia de los embriones y larvas control y los tratados, en ninguna de las metodologías, lo que es congruente con el hecho de que se espera observar efectos subletales en este tipo de ensayos. Por otra parte, llama la atención el caso de los embriones expuestos a polvo de cuarzo en el SAC, cuya sobrevivencia a las 72 hpf es del 70% aproximadamente (Figura 19-B). La posible explicación de este 30% de mortalidad será detallada más adelante, luego de revisar otros aspectos estudiados.

La eclosión (Figura 21) es una de las características que mejor refleja la mejoría que implica la variación al método de BCC. La nula eclosión de los embriones expuestos a sedimentos en este bioensayo es revertida en más del 20% en el SAC (Figura 21-B), y en más del 50% en el MVA (Figura 21-C). Esta diferencia entre las variaciones al método clásico puede explicarse por el hecho de que justamente la hipoxia es uno de los mecanismos que gatilla la eclosión (Czerkies et al. 2001; Oppen-Berntsen et al. 1990; Petranka et al 1982), por ende, al no haber limitación de oxígeno en el medio utilizado en el SAC, los embriones se encuentran en una situación menos estimulante de la eclosión. Esta explicación puede parecer contradictoria, pues, dado que la hipoxia sería un factor favorecedor de la eclosión, podría esperarse que en las

condiciones hipóxicas del BCC todos los embriones se vieran forzados a salir de su corion. Sin embargo, la cantidad de oxígeno presente en el medio de exposición a sedimentos es mayor a la necesaria para que se produzca un desarrollo normal (2,5 mg/L). Por otra parte, si consideramos también el movimiento (Figura 22-A), se observa que en el BCC prácticamente ninguno de los embriones expuestos a sedimentos presenta movimientos normales después de las 48 hpf, estadio a partir del cual se espera que se produzca la eclosión. Esto lleva a pensar que posiblemente, en el caso de los embriones y larvas expuestos(as) a sedimentos contaminados y además a las condiciones hipóxicas que conlleva el BCC, éstos permanecen dentro del corion no por falta de estímulos ambientales, si no por una incapacidad motora de responder adecuadamente a dichos estímulos, lo que podría deberse, en parte, el retraso en su desarrollo.

En relación al movimiento de los individuos (Figura 22), en las variaciones al método clásico, se observa que, a pesar de que en ninguna de las dos existen diferencias significativas entre controles y embriones y larvas tratados(as), una mayor proporción de embriones presenta movimiento normal a las 72 hpf al usar el MVA (Figura 22-C). La posible explicación de este menor movimiento usando el método con SAC será detallada más adelante, luego de revisar otros aspectos estudiados.

Considerando el saco vitelino (Figura 23), ambas variaciones revierten en medida similar la nula proporción de vitelos normales en embriones expuestos a sedimentos en el BCC. Sin embargo, respecto a los embriones expuestos a polvo de cuarzo, los que también se ven afectados fuertemente en el BCC, se observa que en el SAC la proporción de embriones con saco vitelino normal es incluso menor a la de embriones expuestos a sedimentos (Figura 23-B); mientras que en el MVA, los embriones

expuestos a polvo de cuarzo no exhiben diferencias respecto a los controles (Figura 23-C). La explicación de esta peculiaridad puede tener relación con la elevada y prematura eclosión de los embriones expuestos a polvo de cuarzo en el SAC (Figura 21-C), como también a la menor proporción de embriones con movimiento normal (Figura 35-C) y su alta mortalidad a las 72 hpf utilizando polvo de cuarzo en esta misma metodología (Figura 19-C). Lo que podría explicar todos estos fenómenos es el hecho de que las partículas de polvo de cuarzo fueran ligeramente mayores en tamaño a lo recomendado. La diferencia de 12  $\mu\text{m}$  produjo drásticas consecuencias, pues este ligero aumento en magnitud se vio reflejado en la presencia de muchas partículas con aspecto corto-punzante bajo la lupa, las que, al ser agitadas por el flujo de aire en el SAC, punzaron y rasgaron el corion externamente, facilitando enormemente la eclosión; y luego, al encontrarse los embriones privados de esta protección física, representada por el corion, probablemente fueron heridos, lo que provocó defectos no sólo en el saco vitelino, si no también produjo el desgarramiento de las aletas, especialmente la caudal (ver Figura S2 en el Anexo), lo que se encuentra probablemente relacionado con un peor desempeño en el movimiento y eventualmente también con el aumento de la mortalidad.

Respecto al patrón de pigmentación (Figura 24), se observa que en el BCC ninguno de los embriones expuestos a polvo de cuarzo o sedimentos presenta pigmentación normal. Esto se explicaría en los estadios tempranos por la ausencia de melanina, producto de un atraso en el desarrollo. Por otra parte, en el caso de las larvas que alcancen los estadios tardíos, esto se explicaría por el hecho de que la melanina protege a las células pigmentadas y los tejidos adyacentes adsorbiendo los contaminantes, para luego ir liberándolos lentamente en dosis no tóxicas (Larsson

1993). Sin embargo, tras largos períodos de exposición, existe una excesiva cantidad de contaminantes tóxicos almacenados en la melanina, lo que finalmente puede producir la degeneración de las células contenedoras de melanina y los tejidos cercanos (Larsson 1993), sugiriendo que el polvo de cuarzo utilizado posee cierto grado de toxicidad que interfiere en la correcta pigmentación.

Ambas variaciones en la metodología del bioensayo revierten los defectos en la pigmentación de embriones expuestos a sedimentos en similar medida, sugiriendo que la leve hipoxia puede estar produciendo un efecto sinérgico junto a la toxicidad de los metales pesados que determina una menor pigmentación. En el caso de los embriones expuestos a polvo de cuarzo, se observa que a las 72 hpf, en el SAC la deficiencia en la pigmentación es incluso mayor a la de los embriones expuestos a sedimentos (Figura 25-B), mientras que en el MVA no sucede lo mismo (Figura 25-C). Esto se podría explicar nuevamente por el aumento en el efecto dañino de las partículas de polvo de cuarzo producto del flujo constante existente en el SAC. Por último, los defectos en la pigmentación se encuentran asociados en gran medida a un atraso general en el desarrollo de los embriones, lo que explica la nula cantidad de embriones expuestos a polvo de cuarzo y sedimentos correctamente pigmentados en el BCC (Figura 25-A), los que exhibían una edad aparente significativamente menor respecto a los controles (nunca superaron el estadio de 48 hpf).

En relación a la formación del límite entre cerebro medio y posterior (MHB) (24 h, Figura 27), ambas variaciones al método clásico revierten totalmente los defectos en la definición del límite entre cerebro medio y posterior, sugiriendo que este defecto es producto del atraso o detención del desarrollo provocado por la hipoxia o toxicidad, y no una malformación.

Respecto a la correcta extensión de la notocorda (48 h, Figura 28), se observa que ambas variaciones al método clásico revierten el drástico efecto de los sedimentos en el BCC, y que no existen grandes diferencias entre los tratamientos de los embriones dentro de cada método. Sin embargo, llama la atención que sólo alrededor del 50% de los controles del MVA presentan una extensión normal de la notocorda (Figura 28-C). Esto se relaciona directamente con la menor proporción de embriones eclosionados en este estadio (48 hpf, Figura 21-C). Los embriones que permanecen dentro de su corion un tiempo mayor al normal, exhiben una respuesta motora menos vigorosa, en concordancia con lo observado respecto al movimiento (Figura 22-C). Esto se observa en la incapacidad de los embriones eclosionados manualmente de estirarse completamente durante los primeros minutos. Éstos permanecen lateralmente curvos (como si permanecieran dentro del corion) incapaces de nadar direccionalmente y a velocidades normales, y se van estirando poco a poco a medida que intentan nadar libremente, hasta alcanzar la configuración perfectamente extendida que les permite moverse correctamente.

El patrón de respuesta de las aletas pectorales (72 h, Figura 30) se encuentra determinado en el BCC por el atraso de los embriones expuestos a polvos de cuarzo o sedimentos, pues recordemos que no superan el estadio de 48 hpf, en el cual las aletas pectorales se encuentran en forma de primordios difíciles de distinguir. Esto explica la nula proporción de embriones con aletas pectorales normales para su estadio. Por su parte, ambas variaciones al método clásico revierten en forma similar este defecto en los embriones expuestos a sedimentos. En relación a los embriones expuestos a polvo de cuarzo, una vez más nos encontramos con el inconveniente del tamaño de sus partículas y su efecto dañino en el SAC, pues éstos presentan una

menor proporción de aletas normales (bajo la lupa se observan rasgadas, incompletas o contraídas, ver Figura S2 en el Anexo) que los expuestos a polvo de cuarzo en el MVA.

### 5.3.2 Resumen ensayos de optimización

De todas estas observaciones se puede concluir que ambas variaciones al método bioensayo de contacto clásico aquí descritas, generan una evidente compensación de la declinación de oxígeno que resulta beneficiosa y útil para distinguir los efectos en el desarrollo producidos por hipoxia de los producidos por toxicidad de metales pesados.

El factor que distingue a ambas variaciones sin embargo, no guarda relación con los efectos de los sedimentos contaminados sobre los embriones, si no a los efectos de lo que se esperaba fuera un control más directo que la simple utilización del medio de cultivo: el polvo de cuarzo. Los efectos observados de este "sedimento control" se relacionan enormemente a su disposición física, por lo que se recomienda atenerse estrictamente al tamaño de partículas recomendado en bibliografía a la hora de realizar bioensayos de contacto con cualquier tipo de sustancia; como también a su composición química, pues al no ser un polvo de cuarzo de nivel analítico, se observó en éste una altísima demanda química de oxígeno (Tabla 3).

Por último, en relación a la continuación de esta investigación, se decidió realizar los experimentos en intervalo de pH utilizando el bioensayo de contacto con mínimo volumen de agua (MVA), tanto porque se observaron menos problemas respecto al tamaño de las partículas de cuarzo y a su demanda de oxígeno, como porque se observa una mayor proporción de embriones expuestos a sedimentos con características normales de desarrollo. Además se consideraron otros aspectos



prácticos relacionados con una mayor facilidad de manipulación y mantención del montaje del sistema con mínimo volumen de agua (MVA), respecto a la variación con sistema de aireación constante (SAC).

### 5.3.3 Experimentos en valores de pH

Aparentemente, los embriones de pez cebra pueden desarrollarse sin problemas dentro de cierto rango de pH ácidos, lo que se observa en la prácticamente nula diferencia significativa de las características observadas entre los embriones expuestos a E3 a pH 7, pH6 y pH5. La única diferencia encontrada reside en la formación de edemas, que aumenta levemente a medida que aumenta la acidez del medio acuoso.

Tampoco se observan diferencias significativas entre los embriones expuestos a sedimentos con medio a pH 7, pH 6 y pH 5, lo que sugiere que, al menos en el sedimento muestreado, no aumenta significativamente la cantidad de metales disueltos al disminuir el pH, lo que confirmaría la condición de "buffer" que presentan los sedimentos en general (Dillaha & Inamdar 1996).

Resulta interesante observar que la mayoría de los efectos observados se manifiestan generando una diferencia significativa entre larvas control y tratadas en estadíos tardíos (72 y 96 hpf); a excepción de la formación de edemas, característica que presenta diferencias significativas entre embriones y larvas control versus tratadas a las 24 y 48 hpf, para luego desaparecer. Esto podría explicarse por el hecho de que la formación de edemas tiene relación con defectos en el sistema circulatorio, por lo que, una vez formado éste, las larvas pueden regular la disposición de líquido en su cuerpo.

La diferencia entre embriones y larvas control versus tratados(as) en relación a los estadios observados en los que se observa diferencia, permite distinguir cuáles son las características que, en este caso, fueron las más sensibles a la contaminación por metales:

1.- Característica sensible sólo en los primeros estadios observados (24 y 48 hpf): formación de edemas.

2.- Características sensibles sólo en los dos últimos estadios observados (72 y 96): sobrevivencia, ojos, cápsulas óticas, forma del corazón, frecuencia cardíaca, circulación sanguínea, HTA,

3.- Características sensibles en todos los estadios observados: eclosión (24 a 96 hpf), pigmentación (48 a 96 hpf), forma del saco vitelino (24 a 96 hpf), extensión de la notocorda (48 a 96 hpf), movimiento espontáneo (24 hpf), movimiento en respuesta a estímulo mecánico (48 a 96 hpf), aletas pectorales (72 y 96 hpf), aleta caudal(72 y 96 hpf), protrusión de la mandíbula (72 y 96 hpf), inflación vejiga natatoria (96 hpf).

4.- Característica sensible en algunos de los estadios observados: estadio aparente (no sensible a las 24 hpf; sensible en los demás: 48 a 96 hpf).

\*Características que no son sensibles a la presencia de metales pesados en sedimentos con medio acuoso a distinto pH: formación del MHB y somitos post-extensión del vitelo.

Esto permite sugerir que, con el objetivo de estandarizar la metodología de bioensayo de contacto, sería preferible hacer el ensayo evaluando los dos últimos estadios (72 y 96 hpf); pues las diferencias observadas en los primeros estadios (24 y 48 hpf) probablemente tengan efectos en los estadios posteriores.

## VI. CONCLUSIONES

- Ambas variaciones al bioensayo de contacto clásico, bioensayo con sistema de aireación constante y bioensayo con mínimo volumen de agua, revierten en gran medida los efectos de la declinación de oxígeno sobre los embriones, permitiendo distinguir entre los efectos producidos por hipoxia de los producidos por toxicidad de metales pesados presentes en sedimentos
- La diferencia en la respuesta de los embriones entre ambas variaciones pareciera referirse en mayor medida a las características del supuesto "sedimento control" (partículas de polvo de cuarzo de mayor tamaño al adecuado; alta demanda química de oxígeno), pues no existen mayores diferencias en la respuesta de los embriones expuestos a sedimentos
- La variación MVA es mejor que la variación SAC respecto al bioensayo de contacto clásico, en relación a la facilidad de manipulación y mantención del montaje y menor efecto negativo del polvo de cuarzo sobre embriones y larvas
- Contrariamente a lo esperado, no se observan diferencias significativas entre los embriones expuestos a sedimentos con medio a pH 7, pH 6 y pH 5

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ASTM, American Society for Testing and Materials. 1995. Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates E1706-95a. Annual book of ASTM standards, vol. 11.05, p. 1204-1285. Philadelphia, PA.
- Bat, Levent. 2005. A Review of Sediment Toxicity Bioassays Using the Amphipods and Polychaetes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **5**: 119-139.
- Burton, G. Allen. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* **10(12)**: 1585-1627.
- Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C., Persoone G. & Allen, H.E. 1998. Ecotoxicology of metals in in aquatic sediments: binding and release, bioavailability risk assessment, and remediation. *Can J Fisheries Aquat Sci* **55(10)**: 2221-2243
- CONAMA, Comisión Nacional del Medio Ambiente. 2004. Guía CONAMA para el establecimiento de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para Aguas Continentales Superficiales y Marinas. pp 1-18.
- Czerkies, P., Brzuzan, P., Kordalski, K. & Lukzynski, M. 2001. Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula* embryos. *Aquaculture* **196**: 151-158.
- Dillaha, T.A. & Inamdar, S.P. (1996). Buffer zones as sediment traps or sources. Samara Publishing Limited, Samara House, Tresaith, Cardigan SA43 2JG, United Kingdom.
- Embry M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T. & Whale, G. 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* **97(2)**: 79-87.
- Feiler, U., Ahlf, W., Hoess, S., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Meller, M., Weber, J. & Heining, P. 2005. The SeKT Joint Research Project: Definition of Reference Conditions, Control Sediments and Toxicity Thresholds for Limnic Sediment Contact Tests. *Environmental Science and Pollution Research* **12(5)**: 257 - 258.
- Golterman H.L., Sly P.G. & Thomas R.L. (1983). Study of the relationship between water quality and sediment transport: A guide for the collection and interpretation of sediment quality data. 231 pp. UNIPUB, New York.

- Hallare, A.V., Seiler, T.B. & Hollert, H. 2011. The versatile, changing, and advancing roles of fish in sediment toxicity assessment—a review. *Journal of Soils and Sediments* **11(1)**: 141-173.
- Hallare, A.V., Kosmehl, T., Schulze, T., Hollert, H., Köhler, H.L. & Triebkorn, R. 2005. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos." *Science of the Total Environment* **347**: 254-271.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M. & Braunbeck, T. 2003. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils and Sediments* **3(3)**: 197–207.
- Keddy, C.J, Greene, J.C. & Bonnell, M.A. 1995. Review of whole-organism bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **30**: 221-251.
- Keiter, S., Peddinghaus, S., Feiler, U., von der Goltz, B., Hafner, C., Ho, N.Y., Rastegar, S., Otte, J.C., Ottermanns, R., Reifferscheid, G., Strähle, U., Braunbeck, T., Hammers-Swirtz, M. & Hollert, H. 2010. DanTox—a novel joint research project using zebrafish (*Danio rerio*) to identify specific toxicity and molecular modes of action of sediment-bound pollutants. *Journal of Soils and Sediments* **10(4)**: 714-717.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish" *Developmental Dynamics* **203(3)**: 253-310.
- King, C.K., Dowse, M.C., Simpson, S.L. & Jolley, D.F. 2004. An assessment of five Australian polychaetes and bivalves for use in Whole-Sediment Toxicity Tests: Toxicity and accumulation of copper and zinc from water and sediment. *Archives of environmental contamination and toxicology* **47(3)**: 314-323.
- Küster, E. & Altenburger, R. 2008. Oxygen Decline in Biotesting of Environmental Samples—Is There a Need for Consideration in the Acute Zebrafish Embryo Assay? *Environmental toxicology* **23(6)**: 745–750.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E. & Braunbeck, T. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol., Part C* **149 (2)**, 196–209.
- Larsson, Bengt S. 1993. Interaction Between Chemicals and Melanin. *Pigment Cell Research* **6**: 127-133.
- McBride, M.B. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press. New York, USA, 406 pp.

- MMA, Ministerio del Medio Ambiente. 2012. "Tabla pública - Estado de Avance de los Procesos de Dictación y Revisión de Normas de Calidad Ambiental y de Emisión, correspondientes al Medio Hídrico." 1-6.
- Molina, X. & Vila, I. 2006. Manual de Evaluación de la Calidad del Agua. Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA). Lab. Limnología, Fac. de Ciencias, U. de Chile. Fondo de Mejoramiento del Patrimonio Sanitario, Servicio Agrícola Ganadero (SAG), Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. 93p.
- Neumann, T., Leipe, T. & Shimmield, G. 1998. Heavy-metal enrichment in surficial sediments in the Oder River discharge area: source or sink for heavy metals? *Applied Geochemistry* **13**: 329-337.
- Nüsslein-Volhard C. & Dahm R. (2002) Zebrafish. Primera edición. Oxford University Press. En Chapter 1: Keeping and raising zebrafish, pp: 7-38.
- OECD. 2006. OECD guideline for the testing of chemicals - Draft proposal for a new guideline: Fish Embryo Toxicity (FET) Test. 1-11.
- Oppen-Berntsen, D.O., Bogsnes, A. & Walther, B.T. 1990. The Effects of Hypoxia, Alkalinity and Neurochemicals on Hatching of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Eggs. *Fisheries Research* **86**: 417-430.
- Petranka, J.W., Just, J.J. & Crawford, E.C. 1982. Hatching of amphibian embryos: the physiological trigger. *Science (New York, N.Y.)* **217(4556)**: 257-259.
- Rocha, P.S., Bernecker, C., Strecker, R., Mariani, C.F., Pompêo, M.L.M., Storch, V., Hollert, H. & Braunbeck, T. 2011. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (Sao Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**: 1951-1959.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T. & Voelker, D. 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* **15(5)**: 394-404.
- Steevens, J.A., Vansal, S.S., Kallies, K.W., Knight, S.S., Cooper, C.M. & Benson, W.H. 1998. Toxicological evaluation of constructed wetland habitat sediments utilizing *Hyalella azteca* 10-day sediment toxicity test and bacterial bioluminescence. *Chemosphere* **36(15)**: 3167-3180.
- Stesevic, D., Feiler, U., Sundic, D., Mijovic, S., Erdinger, L., Seiler, T.B., Heininger, P. & Hollert, H. 2007. Application of a new sediment contact test with *Myriophyllum aquaticum* and of the aquatic *Lemna* test to assess the sediment quality of Lake Skadar. *Journal of Soils and Sediments* **7(5)**: 342-349.

- Strecker, R., Seiler, T.B., Hollert, H. & Braunbeck, T. 2011. Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. *Comparative biochemistry and physiology* **153**: 318-327.
- Traunspurger, W., Haitzer, M., Hoess, S., Beier, S., Ahlf, W. & Steinberg, C. 1997. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda) - A method for testing liquid medium and whole-sediments samples. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16(2)**: 245-250.
- Ure, A.M., Quevauviller, P.H., Muntau, H., Griepink, B. 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **51**: 135-151.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA 600/R- 94/024. Duluth, MN.
- Wang, F., Goulet, R.R. & Chapman, P.M. 2004. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyaella azteca*: the gap between laboratory and nature. *Chemosphere* **57(11)**: 1713-1724.
- Wedekind, C., von Siebenthal, B. & Gingold, R. 2007. The weaker points of fish acute toxicity tests and how tests on embryos can solve some issues. *Environmental Pollution* **148(2)**: 385-389.
- Westerfield, M. (1994) "The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)" Edition 2.1. Eugene, OR University Oregon Press.
- Wölz, J., Engwall, M., Maletz, S., Takner, H.O., van Bavel, B., Kammann, U., Klemt, M., Weber, R., Braunbeck, T. & Hollert, H. 2008. "Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine - a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis." *Environmental Science and Pollution Research International* **15(7)**: 536-553.
- Wölz, J., Cofalla, C., Hudjetz, S., Roger, S., Brinkmann, M., Schmidt, B., Schäffer, A., Kammann, U., Lennartz, G., Hecker, M., Schüttrumpf, H. & Hollert, H. 2009. In search for the ecological and toxicological relevance of sediment re-mobilisation and transport during flood events. *Journal of Soils and Sediments* **9(1)**: 1-5.

## VIII. ANEXO

## a. Fichas de muestreo

Tabla S1. Tabla de observaciones en terreno, 1er muestreo, punto AD-Mar.

Fecha:	16/03/2011
Hora:	15:50
Lugar de muestreo:	Nacimiento Estero Los Ladrones, VII Región
Condiciones climáticas:	Despejado y Soleado
Temperatura ambiente (aproximada):	28 °C ± 1 °C
Tipo de muestra:	Sedimento superficial (10 cm)
Tipo de muestreo:	Puntual
<u>Características de la columna de agua</u> Color: Olor: Presencia de sólidos: Profundidad: Pendiente:  Temperatura: pH:	No No No suspendidos, sí al remover 10-70 cm Media  18°C ± 1 °C 7,0 ± 0,5
Observaciones generales:	Estero de régimen intermitente. Agua detenida en un pequeño pozón ubicado entre arbustos en zona de plantación de pinos. Sin perturbación se aprecia transparente, al tocar el fondo se ve un polvillo café oscuro que corresponde a sedimentos finos y humus. Presencia de ramas y hojas en la superficie del agua.



**Tabla S2. Tabla de observaciones en terreno, 1er muestreo, punto DD-Mar.**

Fecha:	16/03/2011
Hora:	14:43
Lugar de muestreo:	Derrumbe Tranque de Relaves en Estero Los Ladrones, VII Región
Condiciones climáticas:	Despejado y Soleado
Temperatura ambiente:	28 °C ± 1 °C
Tipo de muestra:	Sedimento superficial (10 cm)
Tipo de muestreo:	Puntual
<u>Características de la columna de agua</u>	
Color:	No
Olor:	No
Presencia de sólidos:	No suspendidos, sí al remover
Profundidad:	10-30 cm
Pendiente:	Muy leve
Temperatura:	18°C ± 1 °C
pH:	7,0 ± 0,5
Observaciones generales:	Estero se separa en charcos. Muestra tomada en un charco amplio. Sin perturbación se aprecia transparente, al tocar el fondo se ve un polvillo blanco que corresponde a material de relave depositado.

Tabla S3. Tabla de observaciones en terreno, 2do muestreo, punto AD-Oct.

Fecha:	20/10/2011
Hora:	13:54
Lugar de muestreo:	Estero Los Ladrones, VII Región, Aguas Arriba Tranque de Relaves
Condiciones climáticas:	Despejado y Soleado
Temperatura ambiente (aproximada):	27,0 °C ± 0,1 °C
Tipo de muestra:	Sedimento superficial (10 cm)
Tipo de muestreo:	Puntual
<u>Características de la columna de agua</u> Color: Olor: Presencia de sólidos: Profundidad: Pendiente:  Temperatura: pH: Conductividad (uS/cm):	No No No suspendidos, sí al remover 10-60 cm Leve  17,3 °C ± 0,1 °C 7,30 ± 0,01 284
Observaciones generales:	Estero caudaloso y poco profundo de 1,5-2,5 metros de ancho. Se observa abundante vegetación en ribera y fondo. Se observan numerosos macroinvertebrados (1-2 cm de longitud); también un camarón de río (5-6 cm de longitud).

**Tabla S4. Tabla de observaciones en terreno, 2do muestreo, punto AD-Oct.**

Fecha:	20/10/2011
Hora:	16:54
Lugar de muestreo:	Derrumbe Tranque de Relaves en Estero Los Ladrones, VII Región
Condiciones climáticas:	Despejado y Soleado
Temperatura ambiente (aproximada):	± 28°C
Tipo de muestra:	Sedimento superficial (10 cm)
Tipo de muestreo:	Puntual
<u>Características de la columna de agua</u> Color: Olor: Presencia de sólidos: Profundidad: Pendiente:  Temperatura: pH: Conductividad (uS/cm):	No No No suspendidos, sí al remover 10-30 cm Leve  22,3 °C ± 0,1 °C 6,00 ± 0,01 285
Observaciones generales:	Estero tranquilo y poco profundo de 3 - 4 metros de ancho. Se observa fondo gris por material de relave depositado. Muy escasa vegetación en ribera y fondo. Se observan algunos macroinvertebrados pasar flotando.

**b. Resultados químicos polvo de cuarzo y sedimentos**

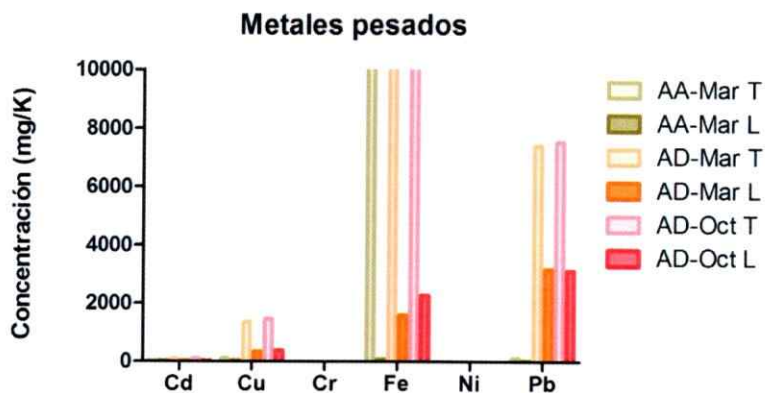
**Tabla S5. Resultados medición de oxígeno en el medio acuático con polvo de cuarzo y sedimentos, en un punto inicial y 24 h después.** Se utilizaron 12 g de polvo de cuarzo o sedimentos con 28 mL de ddH<sub>2</sub>O; siguiendo la proporción 3:7 sólido:líquido descrita en la literatura para bioensayos de contacto (Keiter et al. 2010; Feiler et al. 2005)

	O <sub>2</sub> (mg/L)
Polvo de Cuarzo	6,32 <sub>i</sub> – 1,79 <sub>f</sub>
Sedimentos (DD-Marzo)	6,45 <sub>i</sub> – 4,60 <sub>f</sub>

### c. Resultados químicos metales pesados de sedimentos

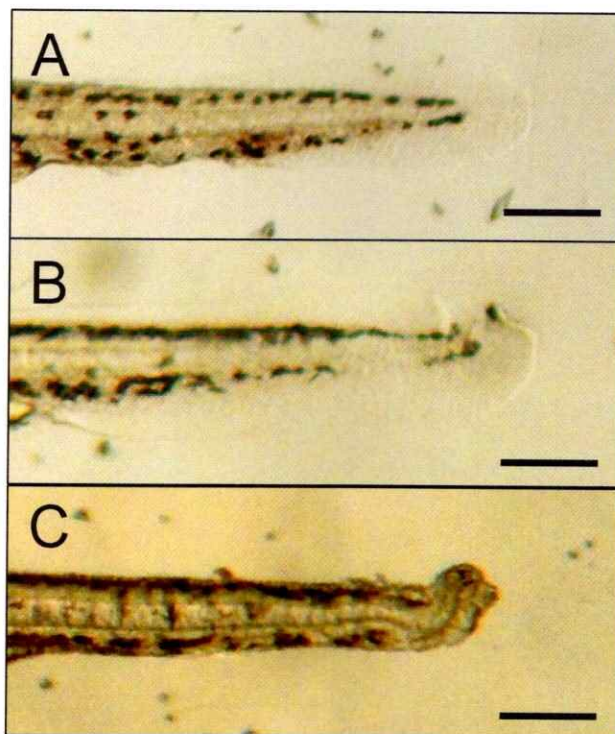
Tabla S6. Resultados análisis químicos de metales.

	Aguas Arriba (mg/K)		Tranque-Mar (mg/K)		Tranque-Oct (mg/K)	
	Total	Lábil	Total	Lábil	Total	Lábil
Cadmio (Cd)	14,93	9,219	107,869	13,508	108,347	15,111
Cobre (Cu)	115,056	44,646	1357,519	326,190	1454,564	378,638
Cromo (Cr)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Hierro (Fe)	29980,276	89,545	30096,618	1580,481	29720,280	2273,146
Níquel (Ni)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Plomo (Pb)	118,132	8,534	7406,311	3169,975	7533,168	3117,704



**Figura S1. Metales pesados medidos, a la misma escala.** Notar que el Hierro total supera los límites del gráfico (concentración alrededor de 30.000 mg/Kg). Las concentraciones correspondientes a Cromo y Níquel se encuentran por debajo del límite de detección del método usado. T: Total; L: Lábil.

d. Foto extra, ensayos de optimización, bioensayo de contacto SAC.



**Figura S2. Parte posterior del cuerpo de larvas de 48 hpf expuestas a polvo de cuarzo. A) Aleta caudal contraída en la parte ventral. B) Aleta caudal rasgada. C) Aleta caudal incompleta o totalmente contraída. Barra de referencia: 20  $\mu\text{m}$ .**