UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
CENTRO EULA-CHILE

INFORME FINAL PROYECTO:

PROGRAMA DE MONITOREO ECOTOXICOLÓGICO DE LOS EFLUENTES INDUSTRIALES EN EL RIO CRUCES, PROVINCIA DE VALDIVIA CHILE

CAPITULO 4. EVALUACION ECOTOXICOLOGICA MEDIANTE EL USO DE BIOMARCADORES

Julio, 2007

INDICE

CAPITULO 4. EVALUACION ECOTOXICOLOGICA MEDIANTE EL USO DE BIOMARCADORES

1	**INTRODUCCIÓN**	3
2	**MATERIALES Y MÉTODOS**	4
2.1	RECOLECCIÓN DE PECES	4
2.2	PARÁMETROS ANALIZADOS	6
2.2.1.	*Análisis Índices Fisiológicos (IHS, IGS y K)*	6
2.2.2.	*Análisis Actividad Acetilcolinesterasa (AChE) Cerebral*	7
2.2.3.	*Análisis Actividad MFO*	7
2.2.4.	*Genotoxicidad*	8
2.2.4.1.	*Ensayo del cometa en eritrocitos de O. mykiss*	8
2.2.4.2.	*Test del Micronúcleos (MN) en frotis de sangre periférica de O. mykiss*	8
2.3.	**ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**	9
3.	**RESULTADOS**	11
3.1.	**COMPOSICIÓN DEL ENSAMBLE DE PECES**	11
3.2	**ANÁLISIS ÍNDICES FISIOLÓGICOS**	15
3.2.1.	*Descarga de efluentes domiciliarios de Loncoche*	15
3.2.2.	*Descarga de efluentes de celulosa planta Valdivia, Arauco S.A*	16
3.2.3.	*Descarga de efluentes industriales, Lácteos Valdivia.*	18
3.3	**ANÁLISIS ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (ACHE) CEREBRAL**	23
3.3.1.	*Descarga de efluentes domiciliarios de Loncoche y de celulosa planta Valdivia, Arauco S.A.*	23
3.3.2.	*Descarga de efluentes industriales, Lácteos Valdivia*	23
3.4	**ANÁLISIS ACTIVIDAD MFO**	25
3.4.1.	*Descarga de efluentes domiciliarios de Loncoche y de celulosa planta Valdivia, Arauco S.A.*	25
3.4.2.	*Descarga de efluentes industriales, Lácteos Valdivia.*	25
3.5	**FLUORESCENCIA BILIAR TOTAL**	27
3.6	**GENOTOXICIDAD**	27
4.	**DISCUSIÓN**	29
4.1.	**DIVERSIDAD**	29
4.2.	**PARÁMETROS FISIOLÓGICOS**	30
4.3.	**ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (ACHE) CEREBRAL**	31
4.4.	**ACTIVIDAD MFO**	32
4.5.	**GENOTOXICIDAD**	33
5.	**CONCLUSIONES**	34
6.	**BIBLIOGRAFÍA**	35

CAPITULO 4. EVALUACION ECOTOXICOLOGICA MEDIANTE EL USO DE BIOMARCADORES

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la contaminación de los sistemas acuáticos es una de las amenazas más perceptibles, y la naturaleza de los contaminantes varía en las diferentes cuencas, dependiendo de las actividades productivas y urbanas que se desarrollen en esa área enfrentándonos a un reto mayor al tratar de determinar las consecuencias de la amplia ocurrencia de sustancias toxicas en ambientes naturales. Los ecosistemas acuáticos, que se encuentra particularmente en riesgo, consisten de un diverso entramado de especies interactuantes, cada una con características y hábitats propios. Esta diversidad biológica, otorga un reto mayor aun para la evaluación de efectos ecotoxicológicos, debido a que cada especie responde de manera diferente a los mismos compuestos o niveles de exposición de sustancias tóxicas, por lo que para entender y tratar de predecir a tiempo la posibles consecuencias de estas sustancias en las especies, se precisa un gran conocimiento de los factores biológicos y ecológicos que determinan estas sensibilidades (Baird & Van den Brink *In press*).

Si bien, el seguimiento de las características de los ecosistemas acuáticos puede realizarse de varias formas, dentro de las cuales se destacan: cambios en la calidad del agua (aumento o disminución en la concentración de ciertos componentes, características o parámetros del cuerpo de agua receptor) y los efectos sobre los organismos (biota acuática en el área). Los primeros pueden ser evaluados a través de estudios de las características físico-químicas de las distintas matrices asociadas al cuerpo receptor (ej. Agua, sedimentos, biota, etc.), que si bien entregan valiosa información relacionada con la estado y calidad de éstos, no entregan una visión de los efectos de los sustancias en el cuerpo receptor y tampoco información respecto de la biodisponibilidad de los potenciales agentes estresores.

Durante los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de métodos de estudio innovadores tendientes a detectar los impactos sobre los ecosistemas acuáticos provocados por la contaminación derivada de las actividades humanas, con el objetivo de diseñar e implementar medidas preventivas. En la última década, el uso y desarrollo de biomarcadores han cobrado un interés creciente con el objetivo de evaluar el riesgo (probabilidad de producir efectos adversos) de una sustancia o mezcla de sustancias químicas potencialmente tóxicas. Particularmente, los biomarcadores de efecto se constituyen en valiosos parámetros indicativos de la presencia de sustancias exógenas o cambios biológicos como respuestas a distintos xenobióticos (Adams *et al.* 1992; Gibbons *et al.* 1995; West *et al.* 2006).

El fuerte desarrollo que ha experimentado el campo de la Ecotoxicología ha proporcionado un nuevo enfoque metodológico, el cual sustenta la hipótesis de que las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares entregadas por organismos, poblaciones o comunidades servirían como señales de la posible alteración que está sufriendo un ecosistema afectado por actividades de origen antropogénico. Cada una de estas respuestas

o bioindicadores representa una señal integrada de los niveles de contaminación en un área determinada y de esta manera sirve como un indicador del riesgo toxicológico a que una población natural esta siendo expuesta (Van Straalen 2003; Orrego *et al.* 2005; Baird & Van den Brink *In press*).

La gran fortaleza de esta innovadora metodología, radica en el hecho, de que se elimina las limitaciones de las estimaciones tradicionales de contaminación ambiental, como las mediciones de residuos químicos en muestras biológicas y por sobre todo, relaciona los efectos con su posible causa.

En el presente capítulo, se presentan los resultados obtenidos durante muestreo íctico en distintas zonas del río Cruces, expuestas y no expuestas a los efluentes domiciliarios, de celulosa kraft y de productos lácteos, utilizando biomarcadores bioquímicos, respuestas fisiológicas e indicadores de diversidad para evaluar el efecto de la exposición de peces nativos e introducidos a efluentes de aguas servidas e industriales en diferentes locaciones de la cuenca del río Cruces.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 RECOLECCIÓN DE PECES

El estudio de campo fue conducido durante diciembre de 2006 en 10 sitios en el río Cruces (RC1-RC10), con tres sitios de referencia en zonas aguas arriba de la ciudad de Loncoche, un sitio de muestreo bajo la descarga de efluentes provenientes del tratamiento de efluentes domiciliarios, un sitio aguas arriba de la descarga de efluentes de la Planta Valdivia de Arauco S.A., dos sitios aguas abajote la descarga de fluentes de celulosa y tres sitios en un gradiente longitudinal en la zona de descarga de efluentes de Lácteos Valdivia de como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas de los sitios de pesca (diciembre de 2006).

Sitio	Ubicación	Coordenadas
RC1	Sitio de referencia aguas arriba de la ciudad de Loncoche	72º33,483`; 39º22,532`
RC2	Sitio de referencia aguas arriba de la ciudad de Loncoche	72º36,525`; 39º22,673`
RC3	Sitio de referencia en un afluente sin nombre del río Cruces	72º38,456`; 39º22,173`
RC4	Sitio de impacto, aguas abajo de la descarga de aguas servidas de Loncoche	72º39,062`; 39º22,694`
RC5	3 Km. aguas arriba de la descarga de la Planta Valdivia de celulosa Arauco S.A.	72º52,811`; 39º33,388`
RC6	Área de directa influencia de fluente de celulosa y se encuentra ubicado a 200 m aguas debajo de la descarga.	72º53,459`; 39º53,545`
RC7	3 Km. aguas abajo de la descarga de la Planta Valdivia de celulosa Arauco S.A.	72º54,184`; 39º32,948`
RC8	Sitio aguas arriba de la descarga de efluentes de lácteos Valdivia	73º05,891`; 39º43,621`
RC9	Sitio de descarga de efluentes de lácteos Valdivia	73º06,390`; 39º43,494`
RC10	Sitio aguas abajo de la descarga de efluentes de lácteos Valdivia	73º07,437`; 39º43,564`

Las especies bioindicadoras son capaces de dar respuestas a los múltiples estresores ambientales relacionados con su nicho espacial y trófico. Naturalmente, la elección del organismo será relativa a la escala y el objetivo del proyecto en estudio.

Se realizó una evaluación dirigida, entre el 9 y el 14 de diciembre de 2006, tanto en la zona de Loncoche, como en la zona de la descarga de aguas de la planta Valdivia de celulosa Arauco S.A. y Lácteos Valdivia. De esta forma, para la zona de Loncoche, se intensificó el esfuerzo de pesca a las dos especies más comunes presentes en la parte media/alta de este tipo de ríos y de las cuales poseemos información previa relativa a respuestas de biomarcadores a potenciales contaminantes (*Trichomycterus areolatus* y *Percillia gillissi*) sin dejar de identificar las otras especies que aparecieron y evaluar parámetros de talla y peso. Los peces fueron capturados al muestrear en rápidos (0.2-0.3 m/s aprox.), con una profundidad de 0.2-0.4 m, con fondo de bolones (15 cms de diámetro aprox.) y/o rápidos someros (0.1-0.2 m/s aprox.), con una profundidad de 0.1-0.4 m, con fondo de bolones (15 cms de diámetro aprox.) y guijarros. Se colectaron los peces usando redes de bloqueo (6 mm apertura de malla) y una unidad de pesca eléctrica Halltech Electrofisher.

En la zona de Lácteos Valdivia, el río se abre más y posee menor pendiente, dando paso a una zona potamal, con características físicas distintas, por lo que se procedió a capturar individuos de la especie *Cyprinus carpio*, mediante redes agalleras, sin descartar otras especies que aparecieran en la pesca. La mayoría de los peces identificados en terreno,

pesados y medidos para luego devolverlos a los sitios de extracción. Los individuos sacrificados para las especies indicadoras fueron seleccionados sobre la talla de madurez sexual, para *T. areolatus* y *P gillissi* (Manríquez *et al*. 1988; Habit & Belk 2006), mediante corte espinal y medidos para largo total (±0.1 mm *T. areolatus y P. gillissi*; ±0.1 cm *C. carpio*), peso total (± 0.01 g *T. areolatus y P. gillissi*; ± 0.1 g *C. carpio*), peso de hígado (± 0.01 g *T. areolatus y P. gillissi*; ± 0.1 g *C. carpio*) y peso de gónadas (± 0.01 g *T. areolatus y P. gillissi*; ± 0.1 g *C. carpio*), y las muestras de tejidos (hígado, cerebro, gónadas) fueron congeladas en nitrógeno líquido a -80ºC, para el posterior análisis de Biomarcadores a distintos niveles de organización biológica. Para *T. areolatus* y *P gillissi* Tanto el hígado como las gónadas se pesaron nuevamente en laboratorio (± 0,0001 g), para corregir los índices hepatosomáticos (IHS) y gonadosomáticos (IGS).

2.2 PARÁMETROS ANALIZADOS

Los análisis realizados fueron los siguientes:

- Análisis Índices Fisiológicos (IHS, IGS y K)
- Análisis Actividad Acetilcolinesterasa (AChE) Cerebral
- Análisis Actividad MFO
- Genotoxidad

2.2.1. Análisis Índices Fisiológicos (IHS, IGS y K)

Índices fisiológicos de condición derivados de medidas morfométricas como peso y longitud, entregan una visión del estado general de salud estado del individuo. Dentro de éstos tenemos los siguientes:

a) ***Factor de condición (K)*** usado como una estimación aproximada de la robustez de los peces, dado que describe la relación que existe entre la longitud del pez y su peso, por lo que se relaciona directamente con la alimentación, estado reproductivo y estrés a cual se ha sometido.

$K = (\text{peso total} * 100) / (\text{longitud total})^3$

b) ***Índice Hepatosomático (IHS)*** nos da una estimación aproximada del estado de salud, dado que describe la relación entre el tamaño del cuerpo y el tamaño del tejido hepático.

IHS = (peso hígado * 100) / peso total

c) ***Índice Gonadosomático*** **(IGS)** nos da una estimación aproximada del estado de madurez gonadal, dado que proporcional la relación entre el tamaño del cuerpo y el tamaño de la gónada.

IGS = (peso gónada * 100) / peso total

2.2.2. Análisis Actividad Acetilcolinesterasa (AChE) Cerebral

Las muestras de cerebro obtenidas fueron conservadas en nitrógeno líquido para su transporte al Laboratorio de Biomarcadores del Centro EULA-Chile Universidad de Concepción, donde posteriormente fueron homogenizadas en tampón TRIS/HCL 0,1 M, 0,1% Triton pH 8 en la proporción de 1ml por 0,06 g de tejido; centrifugándose a 1000 rpm por 10 min.

La actividad de la AChE cerebral fue analizada por el método de Ellman *et al*. (1961). Se utilizó como substrato acetiltiocolina yodada y la subsecuente detección de la liberación de tiocolina por reacción con 5,5-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). Fue monitoreada después de un periodo de 5 min. y registrada en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV/VIS) a 410 nm. La actividad fue expresada como µmol/min./mg de tejido (todos los análisis se realizaron en duplicado).

2.2.3. Análisis Actividad MFO

Las muestras de hígado obtenidas fueron conservadas en nitrógeno líquido para su transporte al Laboratorio de Biomarcadores del Centro EULA-Chile Universidad de Concepción, las que posteriormente fueron homogenizadas en tampón Sacarosa 0,25 M (pH 7,5) en la proporción 1:5 (p/v), con un Potter-Elvehjem. Luego, estos homogenizados fueron centrifugados a 9000 rpm por 20 min a 4ºC, obteniéndose el sobrenadante post-mitocondrial (PMS, Post Mitocondrial Supernatant).

Para medir la actividad de esta enzima se utilizó el sobrenadante postmitocondrial de las muestras de hígado. Se preparó inicialmente un estándar de resorufina (5µl en 3ml de tampón TRIS 50mM pH 8,2), con la que se realizó una curva estándar desde 0,01 a 0,75 nmol/ml (leída en el fluorímetro λex =522 y λem = 586). La mezcla de reacción (volumen final 2,5 ml) se preparó añadiendo a una alícuota de 100 µl sobrenadante (muestra) un volumen de tampón TRIS-HCL 50mM + 25mM de $MgCl_2$, 10 µl de 7-ethoxyresorufina (EROD) (0,1mg/ml de Dimetil-sulfóxido) como sustrato. Iniciada la medición, se agregan 10 µl NADPH 125µM. La actividad es medida espectrofluorimétricamente según el método de Lubert *et al*. (1985), en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B, a una longitud de onda de emisión de λem= 586 nm y una longitud de onda de excitación de λex=522 nm por un periodo de 5 min. a 25 ºC. La actividad de esta MFO fue expresada en pmol/min./mg de proteína. La concentración de proteínas en el tejido hepático fue medida mediante el método de Bradford (1976).

2.2.4. Genotoxicidad

2.2.4.1.Ensayo del cometa en eritrocitos de O. mykiss

Se realizó el ensayo del cometa en eritrocitos de *O. mykiss*, empleando la metodología descrita por Singh *et al*. (1988), con modificaciones menores. Los portaobjetos fueron cubiertos con 100 µl de agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 1%, disuelta en Buffer fosfato salino (PBS) libre de calcio y magnesio e inmediatamente cubierto con un cubreobjeto y refrigerados a 4°C por 10 min. Posteriormente se agregan 50 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) al 0.7 % en PBS mezclada con igual volumen de células sanguíneas, inmediatamente se cubre y refrigera a 4°C por 10 min. Finalmente se agregan 100 µl de agarosa NMA al 0.5% en PBS y se refrigeró a 4°C por 10 min.

Luego de la solidificación de la agarosa, los portaobjetos son inmersos en una solución de lisis fría (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 12, 1% de Laurylsarcosinato de Na, 1% de Tritón X-100 y 10% de DMSO) por 1 hora a 4ºC. Después de la lisis los portaobjetos son inmersos en un buffer de electroforesis (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH 10) por 20 min, para permitir el desenrrollamiento de la hebra de ADN (unwinding). Pasado este tiempo se realiza la electroforésis a 15V y 180 mA, por 20 min. Luego los portaobjetos son puestos en una placa de vidrio y cubiertos con buffer de neutralización (0.4 M Tris, pH 7.5) por 5 min, este paso se repite tres veces. Finalmente se tiñen con Bromuro de etidio (20ug/ml).

Las células fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515 nm y de emisión 560 nm. Cincuenta células fueron analizadas por duplicado para cada individuo.

2.2.4.2.Test del Micronúcleos (MN) en frotis de sangre periférica de O. mykiss

La sangre para los frotis fue obtenida de la vena de la aleta caudal de los especímenes estudiados. Luego de fijar los portaobjetos en etanol absoluto por 20 min., éstos son secados al aire libre. Finalmente, los portaobjetos son teñidos con solución Giemsa al 10% por 25 min.

Para el conteo de MN, los portaobjetos deben ser codificados y el recuento se realiza en ciego. En cada portaobjeto se contabilizan 1000 células eritrocitarias por animal para luego calcular la frecuencia de células micronucleadas en 1000 células.

Debido a que los eritrocitos de peces son nucleados, en cada portaobjeto, en este caso, se contabilizan el número de MN presentes en 2000 células eritrocitarias por animal (análisis por duplicado). Solo las células bien individualizadas, con núcleos y membranas citoplasmáticas bien definidas fueron contabilizados (Mersh *et al*., 1996; Rodríguez-Cea *et al*., 2003).

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los test estadísticos se realizaron siempre entre individuos del mismo sexo y entre sitios de descarga de efluentes y las zonas control o referencia, situadas aguas arriba de esta. Así, se analizó la normalidad de los datos mediante un análisis de varianza (ANOVA), para luego mediante un test paramétrico ($p \leq 0,05$), determinar si existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control y tiempo 0. Posteriormente los resultados fueron confirmados a través de un test Tukey ($p \leq 0,05$).

En los casos en que la distribución de los datos no fue normal, se procedió a la transformación de los datos para normalizar su distribución. En aquellos casos en que se violó los supuestos del ANOVA se utilizó un análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) evaluando la significancia de la hipótesis nula según el valor-P del estadístico H, realizando las comparaciones con el test de U Mann-Whitney. Todos los test se efectuaron considerando un límite de 95% de confianza.

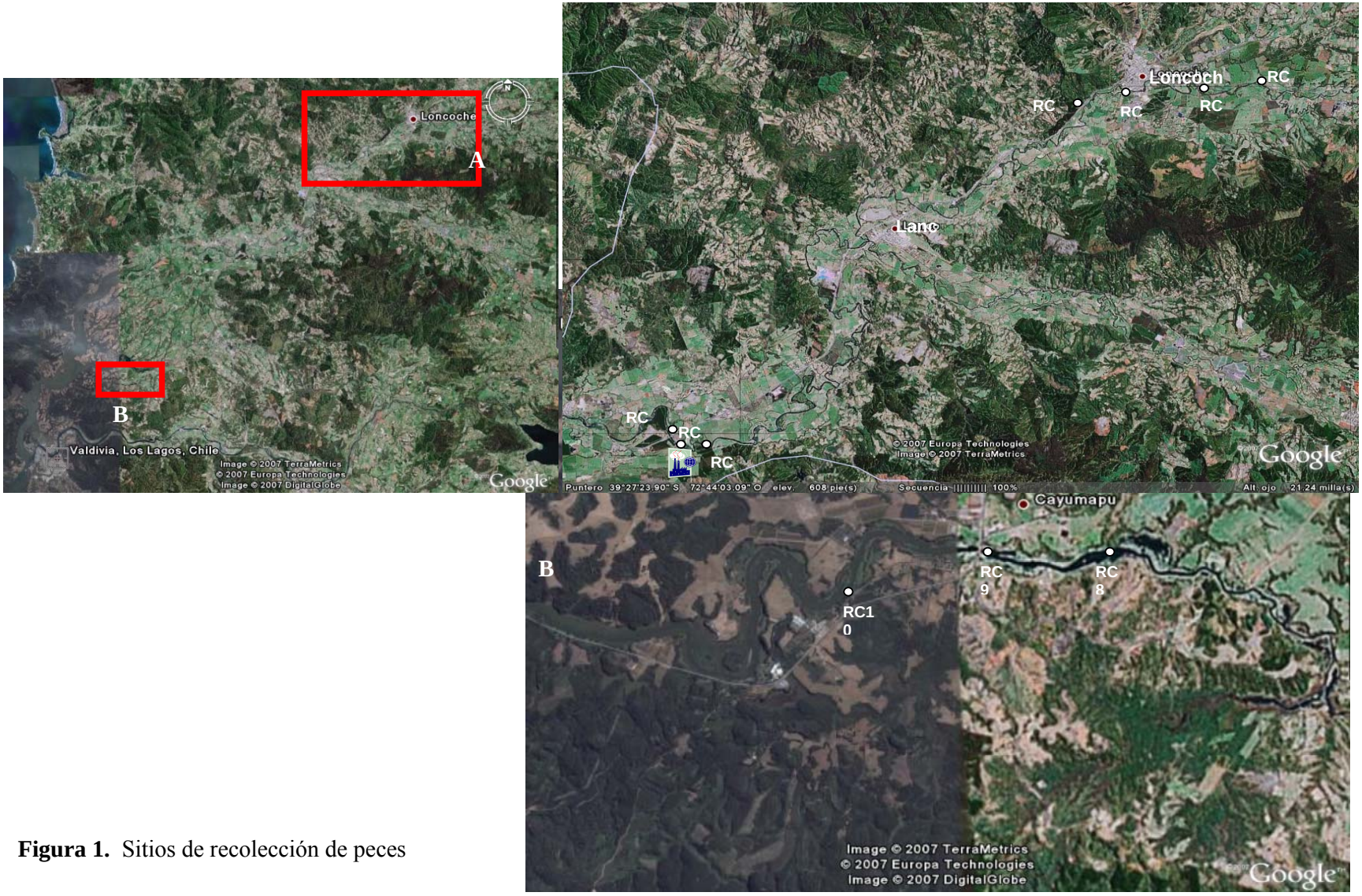

Figura 1. Sitios de recolección de peces

3. RESULTADOS

3.1. COMPOSICIÓN DEL ENSAMBLE DE PECES

Los sitios muestreados no muestran grandes diferencias en sus habitats, dentro de las dos distintas zonas estudiadas dentro del río Cruces. Las estaciones RC1-RC7, corresponden a una zona de mayor pendiente y velocidad de corriente, junto con profundidades y temperaturas menores, con un sustrato mucho más grueso, característico de la zona ritral de los ríos de Chile. Por otra parte los sitios RC8-RC10, corresponden a ambientes de mayor profundidad, temperatura y turbidez, menor velocidad de corriente, junto con sustratos más finos y vegetación acuática presente, que además posee una influencia de las mareas notable, característico de la parte baja de la zona potamal de los río del sur de Chile (Tabla 2).

Durante la recolección de peces se capturaron un total de 7 especies diferentes en los sitios de muestreo, de las cuales 5 estaban presentes en los sitios de la zona ritral (RC1-RC7) y tan solo 2 especies en la zona potamal del río Cruces (RC8-RC10). De las especies presentes, en la zona ritral solo *T. areolatus* y *P. gillissi* se presentaron en todos los sitios de muestreo, con un aumento de su abundancia desde aguas arriba a aguas debajo de la descarga de efluentes urbanos de la ciudad de Loncoche y planta Valdivia de celulosa Arauco S.A., observándose un incremento en la abundancia de *T. areolatus* en la zona de impacto y mayor dominancia en los sitios de mayor influencia antrópica (Tabla 3, Figura 2).

Por otra parte, en los sitios RC8-RC10, solo se recolectaron dos especies (*Cyprinus. carpio* y *Mugil. cephalus*), y con una clara dominancia de *C. carpio* en esta zona del río, sobre todo en el sito cercano a la descarga del efluente industrial. La presencia en numero y tamaño de esta especie (*C. carpio*) es un claro indicativo del deterioro del sistema en esta zona del río, pues la carpa común presenta una amplio rango de tolerancia a variables abióticas, así como a compuestos nocivos para otras especies de peces o fauna acompañante, además de ser considerada una especie peste, por sus hábitos alimenticios y de comportamiento, junto con su gran capacidad de colonización (Tabla 3, Figura 2).

Las características del ensamble de peces en las dos distintas zonas muestreadas se reflejan en los índices de diversidad ictiofaunística, con una disminución desde las zonas de referencia a los sitios de impacto, tanto en la riqueza de especies (d: Margalef), equidad (J`: Pielou) y diversidad de Shannon (H`) y cuya equidad va en disminución con un aumento en el numero de individuos de una especie en la zona de descarga de aguas urbanas de Loncoche y planta de celulosa Valdivia (aportada por *T. areolatus*) y una disminución en la zona de descarga de efluentes industriales provenientes de la planta de Lácteos Valdivia (Tabla 4).

Tabla 2. Variaciones de las características físicas, químicas y estructurales del hábitat seleccionado en el río Cruces.

Parámetro	**Sitio de muestreo**									
	RC1	**RC2**	**RC3**	**RC4**	**RC5**	**RC6**	**RC7**	**RC8**	**RC9**	**RC10**
Profundidad media (cm)	40	40	30	100	20	20	20	150	150	120
Temperatura (°C)	13,8	16,3	13,7	17,2	20,4	17,8	19,8	21,5	23,7	21,3
Conductividad (µS)	22	29	18	30	31	57	69	41	42	36
pH	7,58	7,69	7,18	7,57	7,81	7,55	7,73	6,46	6,64	6,5
Sólidos disueltos totales (ppm)	14	14	9	13	15	28	73	21	21	19
Tipo sustrato	Bolón	Bolón	Bolón	Bolón	Bolón	Bolón y gravilla	Bolón	Fango	Fango	Fango
Vegetación acuática	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
Entorno al río	Vegetación nativa	Vegetación nativa y ganadería	Vegetación nativa y carretera	Pastizales y plantaciones agrícolas, descarga de efluentes de aguas servidas	Vegetación exótica	Vegetación exótica, planta de celulosa Valdivia	Vegetación exótica	Vegetación nativa y pastizales	Vegetación nativa y pastizales, descarga de efluentes de planta lechera	Vegetación nativa y pastizales

Tabla 3. Capturas totales (CPUE: * número de peces 50m^2/20min; + número de peces en 50m^2/1 noche) de la ictiofuna en ambientes de rápido y pozón del río Cruces, mediante pesca eléctrica y red agallera.

Especie	**Sitio de muestreo**									
	RC1	**RC2**	**RC3**	**RC4**	**RC5**	**RC6**	**RC7**	**RC8**	**RC9**	**RC10**
**Diplomystes camposensis*	44,4	12		133,3						
**Trichomycterus areolatus*	22,2	30	533,3	1133,3	8250	720	1987,5			
**Percilia gillissi*	74,1	132	466,7	200	1050	144	37,5			
**Percichthys trucha*		18								
**Oncorhynchus mykiss*	7,4									
+Cyprinus carpio								1152	224	3850
+Mugil cephalus								384		384

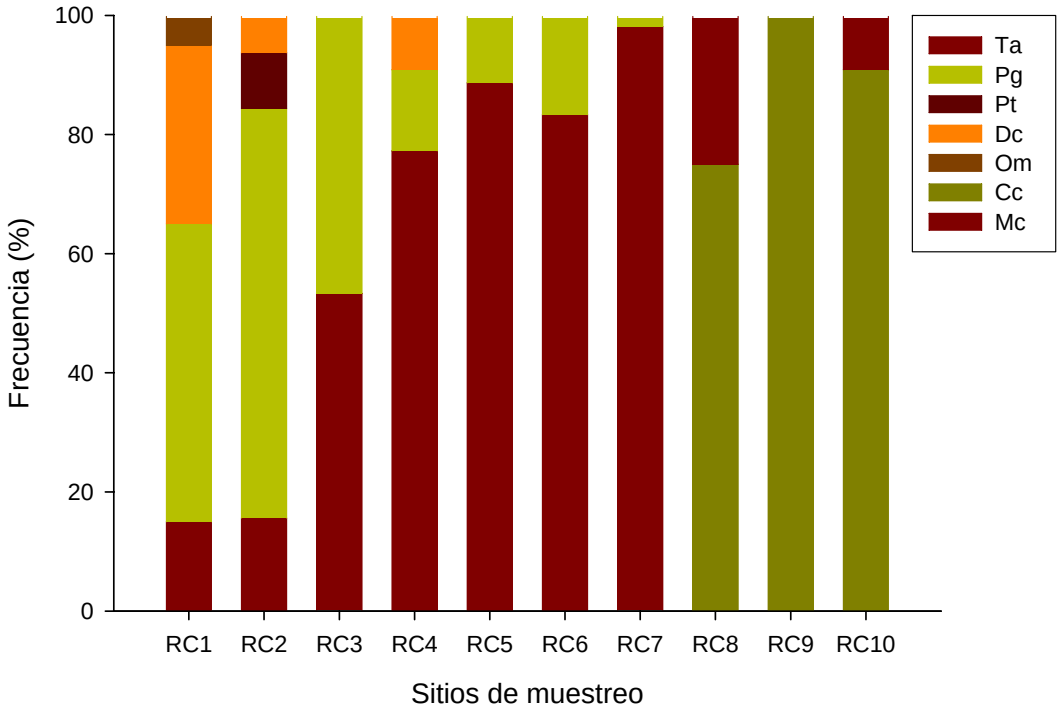

Figura 2. Composición porcentual del ensamble de peces en los sitios de muestreo, río Cruces. (Ta: *Trichomycterus areolatus*; Pi: *Percilia gillissi*; Pt: *Percichthys trucha*; Dc: *Diplomystes camposensis*; Om: *Oncorhynchus mykiss; Cc: Cyprinus carpio; Mg: Mugil cephalus*).

Tabla 4. Diversidad ictiofaunística de los sitios muestreo en el río Cruces (basada en CPUE).

ESTACION	S[a]	N[a]	d[a]	J´[a]	H´(log10) [a]
RC1	4	148,1	0,600	0,824	0,496
RC2	4	192	0,571	0,680	0,409
RC3	2	1000	0,145	0,997	0,300
RC4	3	1466,7	0,274	0,627	0,299
RC5	2	9300	0,109	0,509	0,153
RC6	2	864	0,148	0,650	0,196
RC7	2	2025	0,131	0,133	0,040
RC8	2	1536	0,136	0,811	0,244
RC9	1	224	0	0	0
RC10	2	4224	0,119	0,439	0,132

[a] S: total de especies; N: total de individuos; d: riqueza de especies (Margalef); J`: equidad (Pielou); H`: diversidad de Shannon

3.2. ANÁLISIS ÍNDICES FISIOLÓGICOS

3.2.1. Descarga de efluentes domiciliarios de Loncoche

Al realizar un análisis de los parámetros morfológicos de *P. gillissi* no se observa una diferencia en la talla o peso en el total de los individuos entre sitios de muestreo, si bien la talla y peso promedio es levemente mayor en el sitio directamente aguas abajo de la descarga de efluentes urbano de Loncoche (RC4), no existen diferencias estadísticamente significativas en este parámetro o en el peso total (Tabla 6). Esto se evidencia en el factor de condición (K, Figura 3A), cuya variabilidad es tal que no se observan diferencias significativas entre sitios, a pesar de observarse valores promedio menores en el sitio de descarga. De igual forma no se evidencia un efecto en los peces aguas abajo de la descarga, en el índice hepatosomático (IHS) a pesar de que es algo mayor en el sitio aguas abajo de la descarga de efluentes (Tabla 6), que sin ser estadísticamente significativos, pueden señalar una tendencia que debe ser ratificada. Por otra parte, el índice gonadosomático (IGS) exhibe valores promedio mayores en el sitio de impacto, aunque sin diferencias estadísticamente significativas debido a la alta variabilidad presente en los peces a la fecha de muestreo.

Al separar los datos por sexo, observamos que en las hembras de *P. gillissi* tanto la talla como el peso total del sitio RC4 se encuentran por sobre la media para los sitios de aguas arriba de la descarga aunque con un factor de condición levemente menor (Tabla 5, Figura 3A). De forma contraria, el IGS e IHS (Figuras 4A y 5A) exhiben valores mayores a la media para el área de estudio, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Lamentablemente no se recolectaron machos en el sitio de aguas debajo de la descarga de aguas servidas de Loncoche para esta especie por lo que un análisis preciso debiera ser ratificado con posteriores estudios, con datos reproductivos de esta especie, para verificar su presencia.

En cuanto a los parámetros analizados para *Trichomycterus areolatus*, no hay diferencias significativas entre talla y peso total del sitio de impacto (RC5) con respecto a las otras zonas muestreadas (Tabla 7), a pesar de que si se evidencia valores promedio mayores tanto en talla como en peso de los individuos recolectados. En el total de individuos se evidencia que el crecimiento es menos robusto que la mayoría de individuos recolectados en las estaciones restantes (Tabla 7). Si bien, para el total de individuos el IGS e IHS fueron mayores en el área bajo la descarga de efluentes (Tabla 7), no hay diferencias estadísticamente significativas con los otros sitios.

Al realizar el análisis por sexo, se observa en los machos la misma tendencia que para el análisis mixto, con tallas mayores a la media y peso total superior al de cualquier otra zona (Tabla 7), pero con una robustez, dada por el factor de condición, medio a bajo entre todos los sitios, es decir a igual talla presentan un peso menor al de los otros sitios (Figura 3B). En cuanto al IGS, el área bajo la descarga (RC4) tienen valores medios-altos entre las zonas (Figura 4B), y presentan valores de IHS medio-bajos con respecto a las zonas de referencia (Figura 5B).

La hembras por otra parte, presentan las tallas y peso total más altos en RC4 (Tabla 7), junto con un factor de condición (k) mayor al de los individuos aguas arriba de la descarga del efluentes urbanos (Figura 3B, Tabla 7). Contrario a los machos, los valores de IGS e IHS en los individuos de este sitio (RC4), son medios (IGS, Figura 5B) o bastante mayores a los sitios aguas arriba de la descarga, presentando diferencias estadísticamente significativas en este último parámetro (IHS, Figura 4B).

3.2.2. Descarga de efluentes de celulosa planta Valdivia, Arauco S.A.

Los parámetros morfológicos de *P. gillissi* no presentan diferencias en la talla o peso en el total de los individuos entre sitios de muestreo, si bien la talla promedio es levemente mayor en el sitio directamente aguas debajo de la descarga de efluentes de celulosa (RC6), no existen diferencias estadísticamente significativas en este parámetro o en el peso total (Tabla 6, Figura 3A). Esto se evidencia en el factor de condición (K, Figura 3A), que es similar entre todos los sitios de muestreo para el total de los individuos, observándose un patrón de crecimiento similar para todos los peces. Si bien estos parámetros no evidencian un efecto en los peces aguas abajo de la descarga, el índice hepatosomático es algo mayor en los dos sitios aguas abajo de la descarga de efluentes (Figura 4A), que sin ser estadísticamente significativos, pueden señalar una tendencia que debe ser ratificada.

Al separar los datos por sexo, observamos que en las hembras de *P. gillissi* tanto la talla como el peso total del sitio RC6 se encuentran dentro de la media para los sitios de aguas arriba de la descarga aunque con un factor de condición levemente menor. Sólo en el sitio aguas abajo de la descarga (RC7) presenta valores menores de talla y peso total (Tabla 6). De igual forma, el índice gonadosomático (Figura 5A) se encuentra en la media para el área de estudio. Por otra parte, el índice hepatosomático (Figura 4A) es mayor en la zona de impacto (RC6) y aguas debajo de la descarga de efluentes de celulosa (RC7) para las hembras de *P. gillissi*.

Al contrario de las hembras, los machos de *P. gillissi* del sitios de impacto (RC5), a pesar de no presentar diferencias significativas, tiene una talla y peso menor al promedio (Tabla 6), pero un factor de condición mayor el encontrado para los sitios de referencia (Figura 3A). Por otra parte, tanto el índice gonadosomático como el hepatosomático no presentan alteraciones con respecto a los sitios de referencia (Figuras 4A y 5A).

Tabla 5. Parámetros morfológicos e índices fisiológicos (promedio + error std) de *Percilia gillissi* en sitios de referencia y de descarga de efluentes domiciliarios e industriales. ( ): tamaño de muestra. (Valores resaltados indican zona de descarga de efluentes de aguas servidas y celulosa)

Sexo	Sitio	Largo total (mm)	Peso Total (g)	K	IGS	IHS
Hembras	RC1	59,1±4,4(2)	2,58±0,47(2)	1,240±0,049(2)	10,32±0,24(2)	1,68±0,41(2)
	RC2	61,7±0,6(2)	2,88±0,26(2)	1,227±0,078(2)	8,03±6,09(2)	2,61±0,67(2)
	RC3	54,3±3,1(4)	1,89±0,43(4)	1,109±0,091(4)	9,16±1,51(4)	2,29±0,47(4)
	RC4	**63,7(1)**	**2,83(1)**	**1,095(1)**	**14,131(1)**	**2,801(1)**
	RC5	52,2±3,8(4)	2,31±0,56(4)	1,51±0,07(4)	5,58±1,76(4)	2,27±0,59(4)
	RC6	**56,2±2,4**(4)	**2,02±0,23**(4)	**1,147±0,108**(4)	**11,26±1,31**(4)	**3,155±0,514**(4)
	RC7	47,1(1)	1,43(1)	1,37(1)	10,99(1)	3,94(1)
Machos	RC1	75,1(1)	4,23(1)	0,999(1)	2,18(1)	0,82(1)
	RC2	62,7±0,9(4)	2,64±0,19(4)	1,08±0,11(4)	13,96±6,89(4)	1,82±0,43(4)
	RC3	54,4±5,6(3)	2,09±0,57(3)	1,226±0,043(3)	2,85±1,05(3)	1,29±0,18(3)
	RC4	---	---	---	---	---
	RC5	60,5±4,4(3)	3,15±0,58(3)	1,391±0,039(3)	3,19±0,44(3)	1,67±0,24(3)
	RC6	**55,3±1,0(2)**	**2,22±0,13(2)**	**1,319±0,148(2)**	**3,19±0,43(2)**	**1,49±0,004(2)**
	RC7	---	---	---	---	---
Total	RC1	55,6±3,7(11)	2,21±0,39(11)	1,156±0,033(11)	7,61±2,72(3)	1,39±0,37(3)
	RC2	52,6±1,6(22)	1,85±0,16(22)	1,234±0,027(22)	11,98±4,79	2,08±0,36
	RC3	54,3±2,7(7)	1,98±0,32(7)	1,159±0,056(7)	6,46±1,56	1,87±0,33
	RC4	**63,7(1)**	**2,83(1)**	**1,095(1)**	**14,131(1)**	**2,801(1)**
	RC5	55,8±3,1(7)	2,67±0,41(7)	1,460±0,047(7)	4,56±1,07	2,01±0,35
	RC6	**56,1±1,5(6)**	**2,26±0,20(6)**	**1,245±0,043(6)**	**8,57±1,89**	**2,60±0,48**
	RC7	47,1(1)	1,43(1)	1,369(1)	10,99(1)	3,94(1)

Tabla 6. Parámetros morfológicos e índices fisiológicos (promedio + error std) de *Trichomycterus areolatus* en sitios de referencia y de descarga de efluentes domiciliarios e industriales. (Valores resaltados indican zona de descarga de efluentes de aguas servidas y efluentes de celulosa).

Sexo	Sitio	Largo total (mm)	Peso total (g)	K	IGS	IHS
Hembras	RC1	---	---	---	---	---
	RC2	89,6±1,7(2)	4,05±0,71(2)	0,559±0,067(2)	12,44±8,91(2)	1,69±0,14(2)
	RC3	90,7(1)	4,31(1)	0,578(1)	12,67(1)	3,00(1)
	RC4	**87,5±3,8(7)**	**4,41±0,59(7)**	**0,634±0,013(7)**	**14,34±3,00**	**3,46±0,26**
	RC5	73,3±1,3(10)	2,45±0,11(10)	0,628±0,036(10)	6,89±1,611(10)	2,32±0,26(10)
	RC6	**71,4±3,3(7)**	**2,32±0,20(7)**	**0,641±0,044(7)**	**10,25±2,59(7)**	**2,09±0,27(7)**
	RC7	73,6±2,1(13)	2,64±0,18(13)	0,660±0,023(13)	9,12±1,72(13)	2,67±0,17(13)
Machos	RC1	---	---	---	---	---
	RC2	---	---	---	---	---
	RC3	57,4±1,3(4)	1,19±0,04(4)	0,633±0,025(4)	0,59±0,16(4)	1,35±0,68(4)
	RC4	**81,4±4,9(3)**	**3,243±0,63(3)**	**0,583±0,017(3)**	**1,23±0,01(3)**	**0,97±0,05(3)**
	RC5	64,8±5,9(3)	1,89±0,38(3)	0,691±0,049(3)	0,43±0,12(3)	1,29±0,25(3)
	RC6	**55,8±4,2(3)**	**1,19±0,31(3)**	**0,654±0,039(3)**	**0,65±0,29(3)**	**0,94±0,08(3)**
	RC7	67,4±0,9(4)	1,91±0,04(4)	0,628±0,039(4)	0,69±0,12(4)	0,84±0,18(4)
Total	RC1	60,0±4,0(3)	1,30±0,17(3)	0,601±0,041(3)	---	---
	RC2	68,9±8,6(5)	2,52±0,73(5)	0,708±0,061(5)	---	---
	RC3	57,6±5,2(8)	1,42±0,42(8)	0,668±0,043(8)	3,00±2,42(5)	1,68±0,39(5)
	RC4	75,5±3,7(17)	3,04±0,41(17)	0,639±0,014(17)	11,56±2,93(9)	2,71±0,42(9)
	RC5	58,9±1,3(55)	1,41±0,09(55)	0,623±0,019(55)	5,40±1,46(13)	2,09±0,24(13)
	RC6	**60,5±1,7(30)**	**1,49±0,11(30)**	**0,654±0,015(30)**	**7,37±2,30(10)**	**1,75±0,26(10)**
	RC7	62,0±1,5(45)	1,90±0,13(45)	0,667±0,013(45)	7,58±1,62(17)	2,24±0,24(17)

3.2.3. Descarga de efluentes industriales, Lácteos Valdivia.

En cuanto a los parámetros analizados para *Cyprinus carpio*, no se observaron diferencias en la talla o peso de los individuos en el total de estos, presentando valores medios entre los tres sitios muestreados. El factor de condición fue similar en todos los sitios, mientras que el IGS e IHS estuvieron por debajo de la media para el sitio de impacto (Tabla 8).

Si separamos los datos por sexo, podemos observar que las hembras poseen tallas, peso total y factor de condición (k) medios con respecto a los sitios aguas arriba y abajo de la descarga de efluentes (Tabla 8, Figura 3C). Tanto el IGS como el IHS exhiben valores promedio inferiores a los observados en los sitios de referencia, aunque ningún parámetro observado presentó diferencias estadísticas.

Por su parte, los machos presentaron tendencias similares a las hembras en cuanto a tallas, peso y factor de condición, con valores medios entre todos los sitios de muestreo (Tabla 8, Figura 3C). De igual forma el IGS presentó valores promedio inferiores a los observados en los sitios de referencia y el IHS valores medios, sin diferencias estadísticas en ningún parámetro observado.

Tabla 7. Parámetros morfológicos e índices fisiológicos (promedio + error std) de *Cyprinus carpio* en sitios de referencia y de descarga de efluentes de Lácteos Valdivia. (Valores resaltados indican zona de descarga de efluentes de Lácteos Valdivia)

Sexo	Sitio	Largo total (cm)	Peso total (g)	K	IGS	IHS
Hembras	RC8	48,2(1)	3538,6(1)	3,16(1)	4,4205(1)	0,6942(1)
	RC9	**47,6±6,5(3)**	**3787,4±1384,0(3)**	**3,16±2,37E-06(3)**	**1,43±0,69(3)**	**0,59±0,15(3)**
	RC10	52,8(1)	4651,5(1)	3,16 (1)	3,09(1)	0,61(1)
Machos	RC8	49,7±2,2(2)	3902,1±515,5(2)	3,16±1,25E-06(2)	1,77±0,16(2)	0,58±0,04(2)
	RC9	**48,0±3,9(4)**	**3701,2±817,3(4)**	**3,16±1,57E-06(4)**	**1,22±0,35(4)**	**0,62±0,07(4)**
	RC10	43,6±2,5(9)	2808,8±389,8	3,16±8,88E-07(9)	1,35±0,20(9)	0,64±0,08(9)
Total	RC8	49,2±1,4(3)	3780,9±321,4(3)	3,16±1,24E-06(3)	2,66±0,89(3)	0,62±0,04(3)
	RC9	**47,8±3,2(7)**	**3738,1±681,8(7)**	**3,16±1,23E-06(7)**	**1,31±0,32(7)**	**0,61±0,32(7)**
	RC10	44,5±2,4(10)	2993,1±365,8(10)	3,16±0,07(10)	1,52±0,25(10)	0,64±0,07(10)

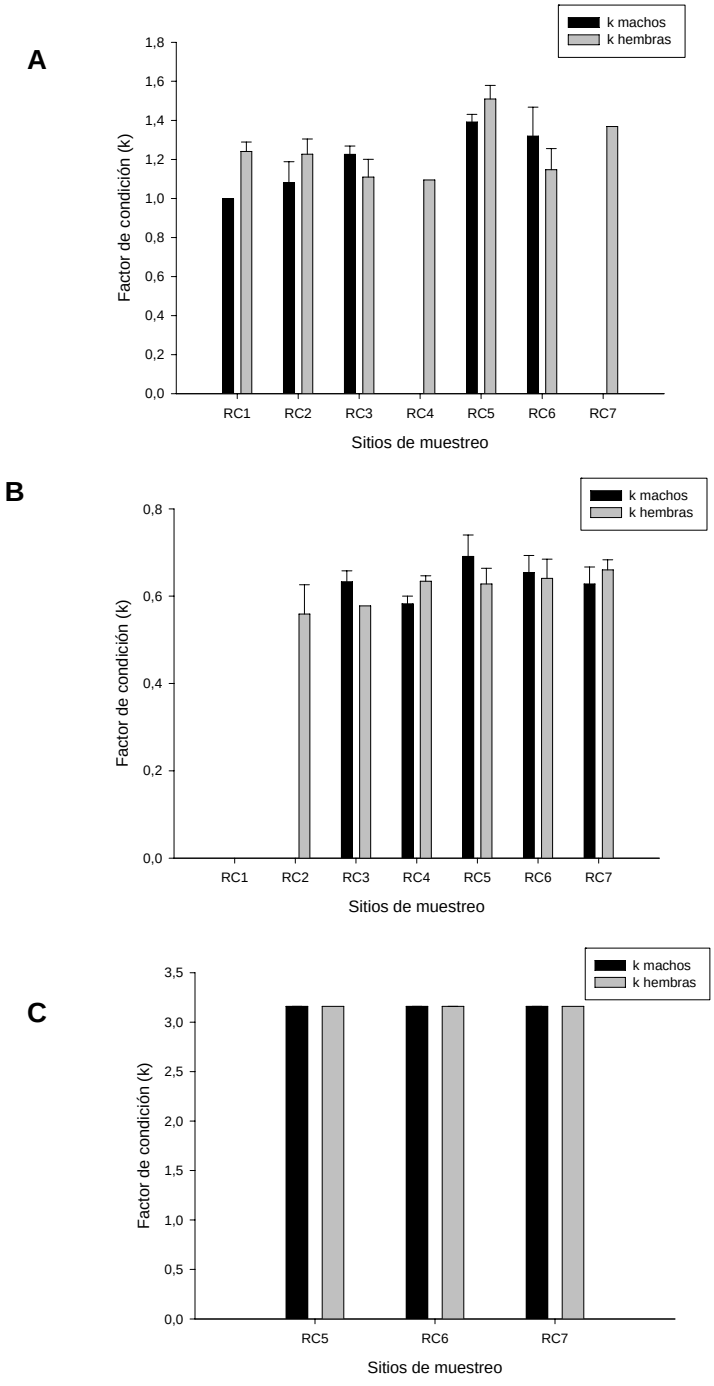

Figura 3. Factor de condición (promedio $\pm$ error std). A: *Percilia gillissi*; B: *Trichomycterus areolatus*, C: *Cyprinus carpio*

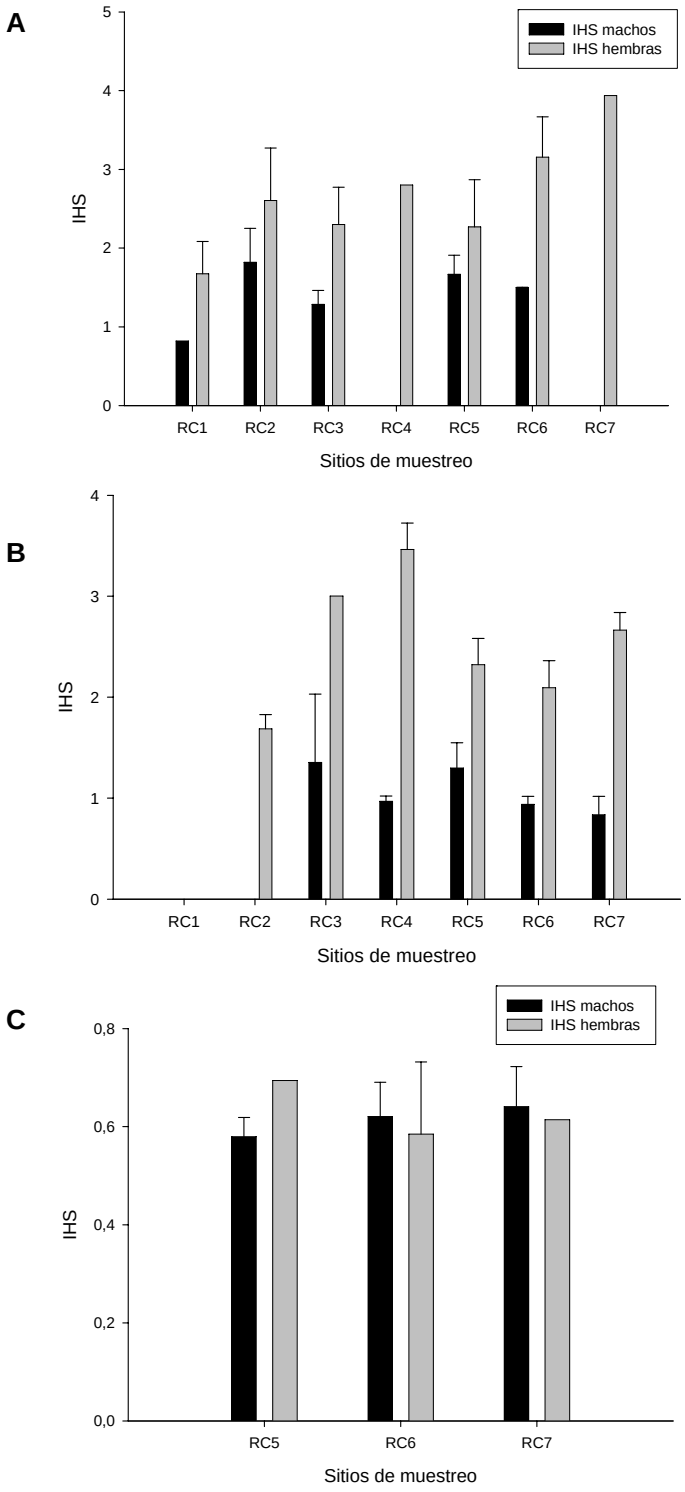

Figura 4. Índice hepatosomático, IHS (promedio ± error std). A: *Percilia gillissi*; B: *Trichomycterus areolatus*, C: *Cyprinus carpio.*

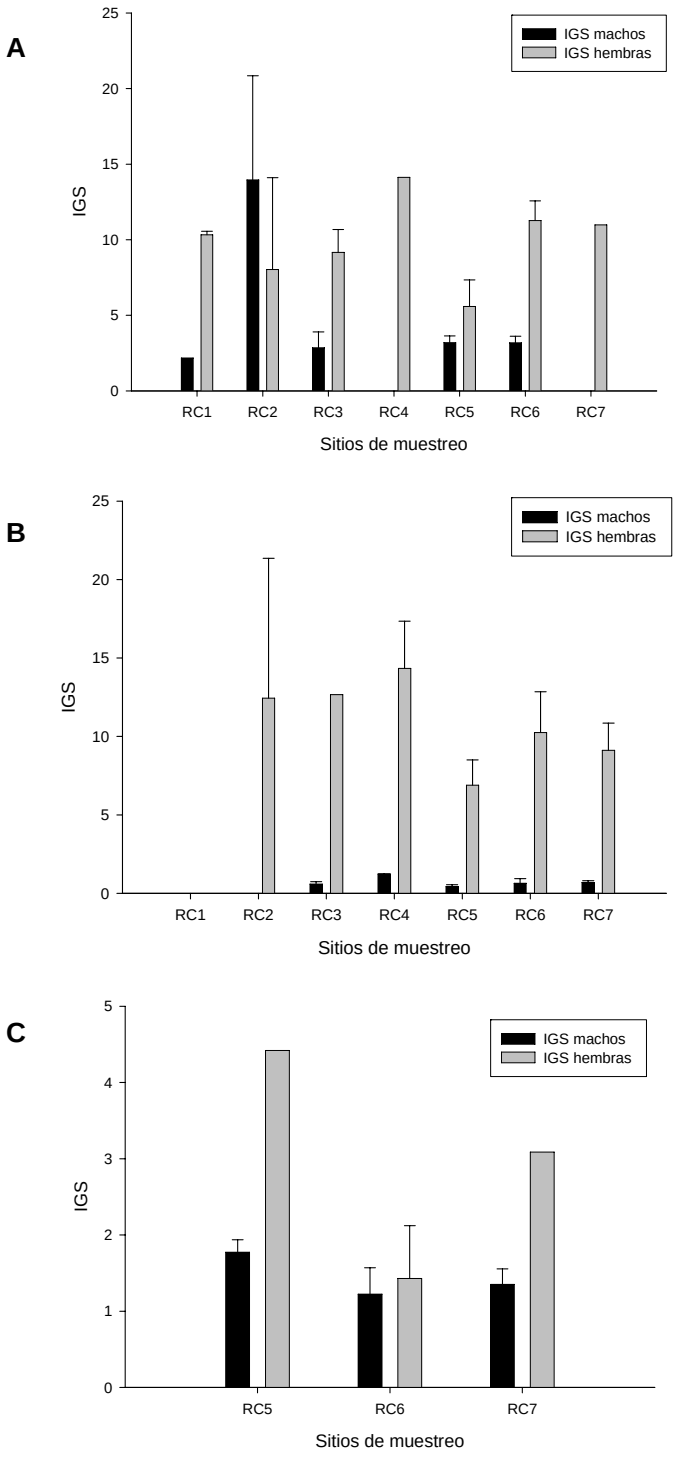

Figura 5. Índice gonadosomático, IGS (promedio ± error std). A: *Percilia gillissi*; B: *Trichomycterus areolatus*, C: *Cyprinus carpio.*

3.3. ANÁLISIS ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (ACHE) CEREBRAL

3.3.1. Descarga de efluentes domiciliarios de Loncoche y de celulosa planta Valdivia, Arauco S.A.

La actividad de colinesterasa cerebral en ambas especies (Figura 6A y B) se mantiene en un rango de amplia variabilidad entre los sitios de muestreo, sin diferencias estadísticamente significativas en el análisis. El análisis por sexo, nos sugiere una actividad de AChE cerebral, similar para machos y hembras, presentándose indistintamente valores mayores o menores en ambos sexos en *Percilia gillissi* y *Trichomycterus areolatus*. En los individuos recolectados en la zona de descarga de efluentes urbanos de Loncoche, a pesar de observarse valores promedio inferiores (*P. gillissi*), no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a los sitios de referencia, pues la variabilidad de la actividad de esta enzima es muy alta, además de la gran capacidad de recuperación de este sistema, siempre y cuando no llegue a los umbrales (Figura 6 A y B).

3.3.2. Descarga de efluentes industriales, Lácteos Valdivia

En cuanto a la zona de descarga de efluentes industriales, los machos de *C. carpio* presentan valores promedio inferiores a los otros sitios, mientras que las hembras exhiben una actividad de colinesterasas cerebrales promedio entre sitios. En ambos casos no se aprecian diferencias estadísticamente significativas (Figura 6 C).

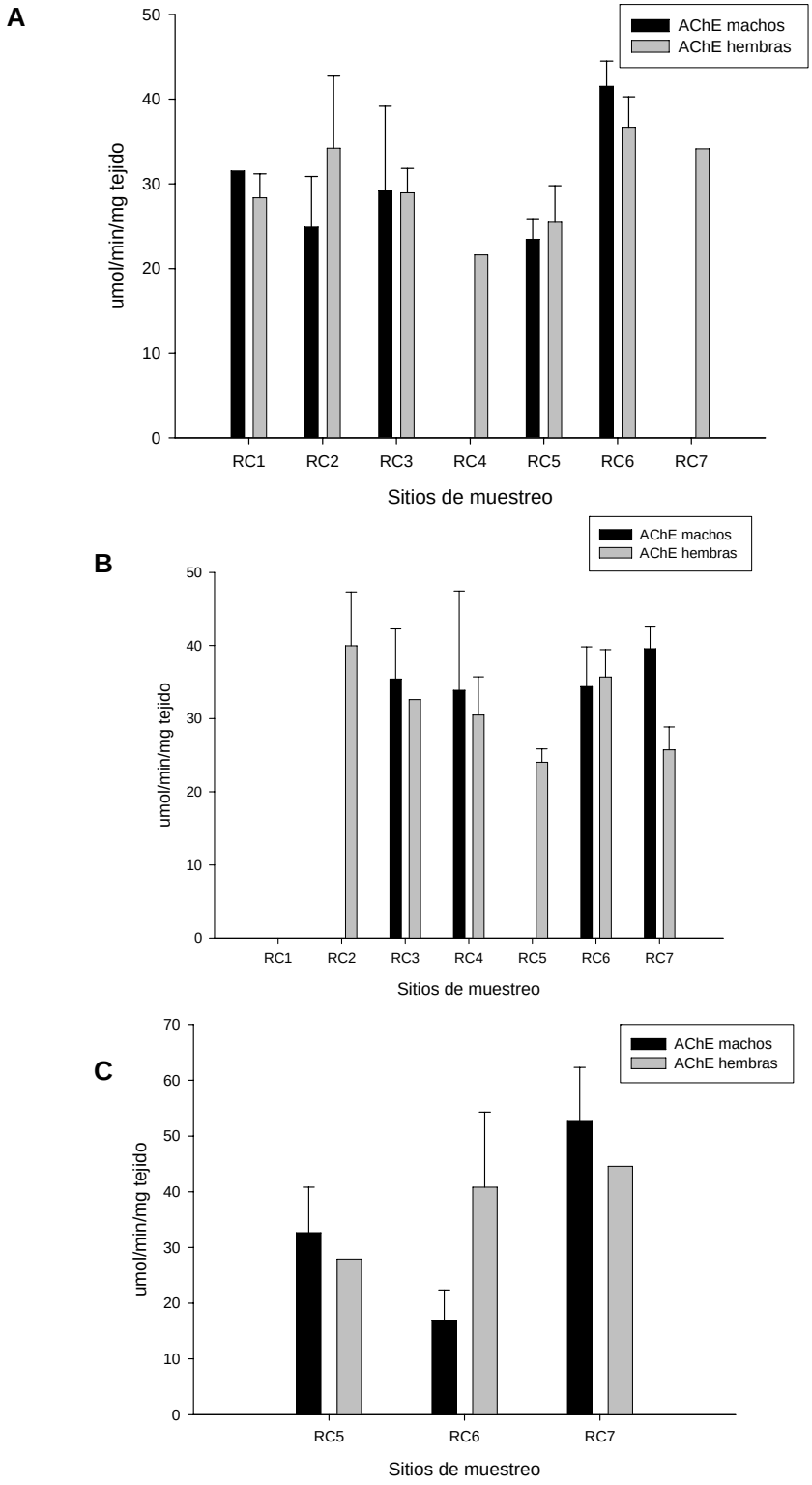

Figura 6. Actividad AChE cerebral (promedio $\pm$ error std). A: *Percilia gillissi*; B: *Trichomycterus areolatus,* C: *Cyprinus carpio.*

3.4. ANÁLISIS ACTIVIDAD MFO

3.4.1. Descarga de efluentes domiciliarios de Loncoche y de celulosa planta Valdivia, Arauco S.A.

La actividad CYP4501A1 de *Percilia gillissi*, cuantificada mediante análisis de inducción de actividad EROD, evidencia una alta variabilidad dentro de los distintos sitios de muestreo. En el sitio de descarga de efluentes urbanos, existe una leve tendencia al incremento de la actividad EROD para ambas especies recolectadas en alguno de los sexos analizados. Así, para las hembras de *P. gillissi* se observa una tendencia al alza de la actividad detoxificadora desde RC2 a RC4, aunque con valores bastante bajos, y sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 7A). En la zona de descarga de efluentes de celulosa, sólo en los machos se observa esta tendencia al aumento de la actividad EROD desde la RC2 a la zona de impacto (RC6), y sólo este sitio presenta diferencias estadísticamente significativas en la actividad EROD, con respecto a los demás sitios, pero no con respecto al sitio RC1, que corresponde a un sitio de referencia (Figura 7A).

Por su parte *T. areolatus* presenta valores promedio de actividad EROD similares entre sexos, aunque la variabilidad de las hembras es marcadamente mayor. En la zona de Loncoche las hembras no presentan diferencias con los otros sitios, mientras que los machos recolectados presentan promedios mayores y diferencias estadísticamente superiores en el sitio de descarga de aguas domiciliarios (Figura 7B). Por su parte, en la zona de influencia de efluentes de celulosa, se observa una disminución de la actividad EROD en el sitio de impacto (RC6), tanto para machos como hembras. A pesar de que los valores son relativamente más bajos, no se aprecian diferencias significativas en las hembras de esta especie. Este valor se observa mayormente inhibido en los machos del sitio RC6, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, sobre todo con respecto al sitio aguas arriba de la descarga (RC5), con el cual sí presenta valores significativamente más bajos (Figura 7B).

3.4.2. Descarga de efluentes industriales, Lácteos Valdivia.

Para la descarga de efluentes industriales, la situación es similar. Los machos de *C. carpio* presentan valores similares a los otros dos sitios, mientras que las hembras exhiben valores promedio de actividad EROD muy superiores a los otros sitios, pero con una variabilidad tan alta que no permite diferencias estadísticas en el análisis (Figura 7C).

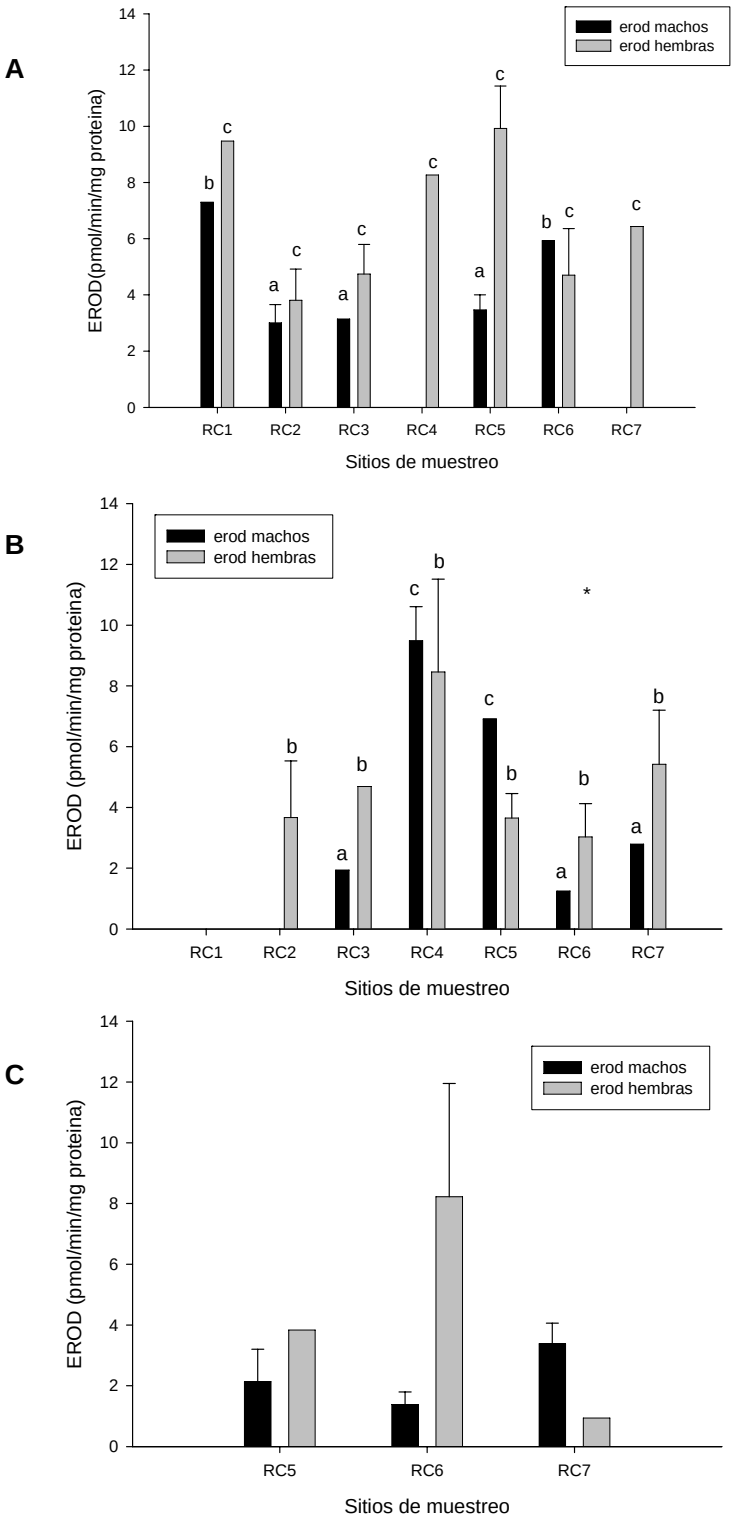

Figura 7. Actividad EROD hepática (promedio ± error std) A: *Percilia gillissi*; B: *Trichomycterus areolatus*, C: *Cyprinus carpio.* (ANOVA p<0,05, letras similares indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas).

3.5 FLUORESCENCIA BILIAR TOTAL

Debido a el volumen de muestra requerido para este análisis, solo se analizaron las bilis de los individuos de *C. carpio* obtenidos en los sitios RC8-RC10. En la figura 8 se observa la Fluorescencia total biliar (tres metabolitos principales, Pireno, Benzo (a) pireno y Naftaleno), en los cuales no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, es más se observa una menor Fluorescencia de los metabolitos en el sitio de descarga directa del efluente proveniente de la plantas de Lácteos Valdivia (Figura 8).

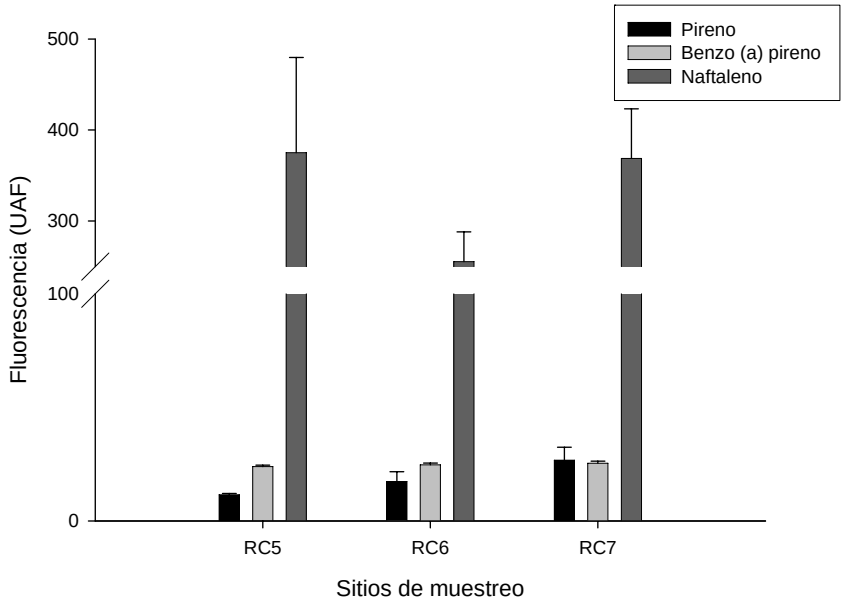

Figura 8. Fluorescencia biliar total, UAF (promedio ± error std) *Cyprinus carpio.*

3.6 GENOTOXICIDAD

El ensayo del cometa no reveló daño clastogénico en eritrocitos nucleados en ninguna de las especies evaluadas. Por otra parte el test de micronúcleos no muestra un incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos nucleados provenientes de las 7 estaciones del río Cruces.

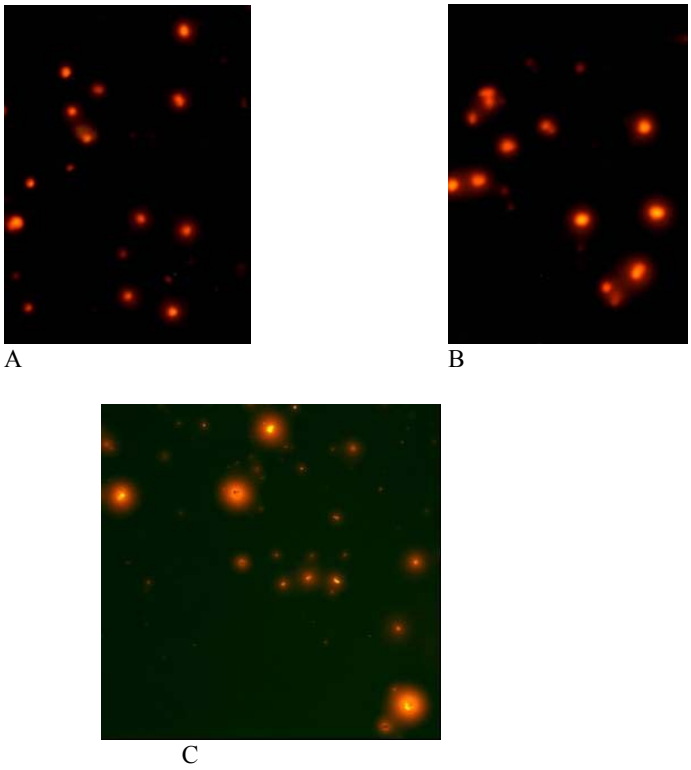

Figura 9. Núcleos de Eritrocitos sometidos al ensayo del cometa. A: Trichomycterus areolatus, B: Percilia gillissi, C: *Cyprinus carpio*. Muestras teñidas con bromuro de etidio.

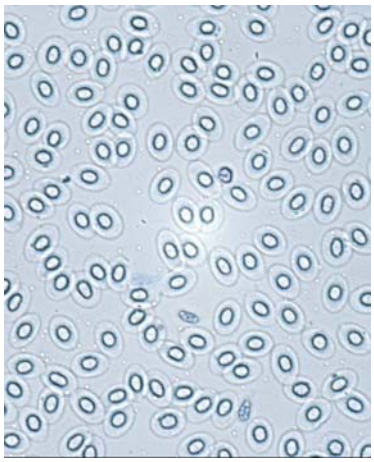

Figura 10. Eritrocitos nucleados sometidos al Test de micronúcleos. *Cyprinus carpio*. Frotis sanguíneos teñido con Giemsa (aumento 400X).

4. DISCUSIÓN

4.1. DIVERSIDAD

Existe una disminución en el número de especies que se encuentran en los sitios de referencia (*D. camposensis y O. mykiss*) y que son típicas de ambientes de velocidades moderadas y bajo contenido de materia orgánica (Habit & Victoriano 2005), con un aumento del numero de *Trichomycterus areolatus* en el sitio de descarga de efluentes urbanos. Estas alteraciones podrían estar reflejando un empobrecimiento de la ictiofauna en la cuenca del río Cruces, tanto en su riqueza de especies como en la abundancia de estas en las zonas de muestreo con mayor influencia antrópica, lo que representa un efecto a largo plazo característico (Wolter *et al.* 2000 *fide* Habit *et al*. 2005).

La disminución en los índices de riqueza de especies y diversidad de Shannon desde los sitios de referencia a los sitios aguas abajo, con mayor influencia humana son evidencia de un deterioro del ecosistema dulceacuícola y resultaron ser contrarios a los patrones normales en los ríos, donde la abundancia aumenta junto con el caudal de los ríos (Habit *et al.* 2006). En el sitio de descarga de efluentes urbanos existe un aumento en la abundancia y dominancia de dos especies (*T. areolatus* y *P. gillissi*), pero de igual forma se recolectaron individuos de *D. camposensis*, una especie denominada "clave" en los ensambles de peces chilenos (Habit 2007, comentario personal). Por su parte el estudio de la Universidad Austral de Chile (2005) encontró hasta 7 especies aguas arriba de la descarga y hasta ocho especies de peces aguas debajo de la descarga de similares condiciones a las del RC5 y RC6, mientras la línea de base de ARAUCO S.A. planta Valdivia (fide Universidad Austral de Chile 2005), arrojó resultados muy inferiores en sitios similares, con máximos de 4 especies, tanto en sitios aguas arriba de la descarga como aguas debajo de ésta. Valores en ambos casos, superiores a los encontrados en el presente estudio.

A pesar de que las especies encontradas en la parte media-alta del río Cruces son mayoritariamente nativas, demostrando un grado de alteración menor al de otros sistemas intervenidos, en los cuales la presencia y extensión de especies exóticas tolerantes como *Gambusia affinis* y *Cyprinus carpio* es considerablemente mayor (Habit *et al.* 2006; Dyer *et al*. 2003, Gafny *et al.* 2000), la presencia de *T. areolatus* y *P. gillissi* en ambientes alterados (Habit & Parra 2001, Habit *et al.* 2002), es una evidencia más de la diferencia en el *status* no tan desfavorable, de los sitios muestreados aguas debajo de la descarga de efluentes en la zona ritral del río Cruces, dada la capacidad colonizadora de estas especies en estos hábitats (Habit *et al.* 2002).

Dados los antecedentes, no se puede arrojar una conclusión definitiva a la variación en la composición de ictiofauna en este tramo del río Cruces y se recomienda corroborar los resultados.

La alteración del sistema acuático en la parte baja del río Cruces es aún mayor, dada por los índices de riqueza de especies y diversidad de Shannon, muy inferiores a los de los sitios de aguas arriba, y contrarios a la teoría (Habit *et al.* 2006). De igual forma, se considera a *C. carpio* es una de las 100 Especies Exóticas Invasivas (EEI), más dañinas

de acuerdo a la Global Invasive Species Database (2006) (disponible en http://www.issg.org), debido a sus hábitos alimenticios, a que remueven constantemente el substrato, su tolerancia a calidades de agua deterioradas y gran capacidad reproductiva, lo que en conjunto las ubica en condiciones favorables de competencia frente a especies nativas de peces.

Cyprinus carpio se encuentra abundantemente en ríos enriquecidos por descargas industriales o domiciliarias, o con aporte substancial de escorrentía desde zonas agrícolas, siendo ausente en aguas claras, frías y en ríos con gradiente muy elevado (Trautman 1981, Nico 1999). De hábitos betopelágicos, se encuentra preferentemente en aguas estancadas o de baja velocidad de corriente, con fondos de arena y/o sedimentos más finos, encontrándose de igual forma en estuarios de aguas salobres y bahías (Barus et al. 2001). Para Chile, *C. carpio* se ha encontrado en elevadas abundancias y dominancia en lagos costeros con ambientes de elevada trofía (Parra *et al.* 2002), al igual que el incremento de esta especie, junto con el desplazamiento de peces nativos en zonas de pozones del río Biobío bajo influencia de efluentes de celulosa (Habit *et al.* 2006b), pero no existen datos cuantitativos que correlacionen la presencia o aumento de abundancia/rango de distribución de *C. carpio* en estas zonas con la desaparición de hábitat o ictiofauna nativa.

4.2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Tanto para la descarga de efluentes urbanos como para la descarga de efluentes industriales observamos que los machos y hembras de *las tres especies* tienen comportamientos distintos para el factor de condición a lo largo del tramo estudiado en la cuenca del río Cruces. Lamentablemente no se obtuvo individuos machos en el sitio de descarga de efluentes urbanos de Loncoche, pero en las hembras de *T. areolatus* se observa una tendencia al alza en el valor del factor de condición conforme bajamos por el río hasta llegar al sitio de impacto (RC4). Las hembras de *P. gillissi* y machos de *T. areolatus* poseen una amplia variabilidad a lo largo de la zona de muestreo, con valores mucho mayores para las Carmelitas en el sitio de descarga de efluentes urbanos (RC4) y efluentes de celulosa (RC6), mientras que los bagres machos presentan valores promedio con una tendencia a disminuir con respecto a los sitios de referencia. Por otra parte, las carpas (hembras y machos) presentan valores similares entre sitios. Los valores de factor de condición no tienen diferencias significativas entre el sitio de descarga de efluentes y los sitios de referencia para ninguna de las tres especies, descartándose una alteración del uso y almacenamiento de energía en los peces, a pesar de que las carmelitas y bagres presentan tallas y pesos mayores a los sitios de referencia (machos y hembras, RC4 y RC6), mientras que las carpas (RC9) exhiben valores menores, pero todas las especies poseen factores de condición que tienen valores promedio (Munkittrick *et al*. 2000). La presencia de un número mayor de bagres y de mayores tallas en el sitio de la descarga de efluentes domiciliarios (RC4), puede deberse a un enriquecimiento de la zona o por falta de hábitat para individuos de tallas menores, lo que resulta como una respuesta similar a lo que generalmente se reporta para los sitios aguas abajo de plantas tratamiento de aguas servidas, que presentan individuos de mayor talla y peso, junto con hígados más grandes, debido a un efecto indirecto en la trama trófica provocado por el aumento en los niveles de nutrientes, mientras que en la zona de descarga de efluentes de celulosa se observa este fenómeno en el sitio aguas

arriba de la descarga (RC5), puede deberse a un enriquecimiento de la zona por fuentes difusas o por falta de hábitat para individuos de esas tallas en el sitio más cercano a la descarga y aguas abajo de este, debido a una mayor tasa de relleno del sustrato, lo que resulta como una respuesta contraria a lo que generalmente se reporta para los sitios aguas abajo de plantas de celulosa, que presentan individuos de mayor talla y peso, debido a un aumento de la temperatura y/o a un efecto indirecto en la trama trófica debido al aumento en los niveles de nutrientes (Galloway *et al* 2003, Gibbons *et al*. 1998). Se observa un aumento del IHS solo en las hembras de *P. gillissi* y *T. areolatus* que poseen valores en promedio mayores en la zona de impacto de efluentes domiciliarios (RC4), pero que solo son significativamente superiores en *T. areolatus*. Para otros estudios en zonas de descarga de efluentes de celulosa (McMaster *et al*. 1991, Munkittrick *et al.* 1991, Munkittrick *et al.* 1992), se observan patrones similares, con menor talla, peso, disminución de IGS y aumento del IHS, este ultimo parámetro sólo se observa en las hembras de *P. gillissi* que poseen valores, a pesar de no ser significativamente diferentes, mayores en promedio en la zona de impacto y aguas abajo, mientras que para los machos de esta especie y ambos sexos de *T. areolatus* el IHS no varia con respecto a los sitios de referencia. Por otra parte para los machos de *T. areolatus* (RC4) y para ambos sexos de *C. carpio* el IHS presenta valores medio-bajos con respecto a los sitios de referencia. El IGS no tiene una variación relevante con respecto a los sitios de referencia para ambos sexos de *C. carpio* (RC9) y las hembras de *P. gillissi*, aunque estas ultimas poseen un leve aumento del tamaño gonadal en el sitio de impacto (RC4 y RC6) con respecto a los sitios de referencia. Por su parte, *T. areolatus* no presenta variación estadística en el IGS de machos y hembras, debido a la gran variabilidad de las zonas de referencia, si se observa un pequeño aumento en el sitio RC4 y RC6. Esta variabilidad puede deberse a la época de recolección, ya que Manríquez y colaboradores (1998), reportan diciembre como época de desove-postdesove en la cual podríamos tener individuos aun en estado de gravidez, mientras otros individuos ya habrían desovado. Si bien no fue posible estimar efectos reproductivos directos, se aprecia una disminución en la captura de Carmelitas en el sitio RC4, y un aumento de Bagres en el sitio RC4 (como CPUE, Tabla 4), reflejando un cambio de las condiciones, más favorable para los bagres. Por su parte la ausencia de alteraciones en los parámetros de *C. carpio* puede deberse a su gran tolerancia a condiciones abióticas desfavorables, así como a compuestos que para otras especies pueden ser tóxicos (Barus et al. 2001; Habit et al 2006).

4.3. ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (ACHE) CEREBRAL

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) cerebral, responsable de modular la inervación de la acetilcolina en las terminaciones nerviosas, previniendo un continuo impulso nervioso, lo que es vital para el funcionamiento de los sistemas sensoriales y neuromusculares (van der Oost *et al* 2003). La liberación intencional o involuntaria de diferentes compuestos a la naturaleza (i.e. pesticidas organofosforados y/o carbamatos) puede provocar alteraciones neurológicas. No solo los pesticidas anteriormente nombrados son inhibidores de esta enzima, sino que existen variadas mezclas complejas de contaminantes que pueden tener efectos neurotóxicos similares, como lixiviados de madera poseen capacidad inhibitoria de la actividad AChE, que bien podrían encontrarse en los efluentes urbanos o por escorrentía en la subcuenca. Este efecto no se

observa en el estudio de campo, por lo que no se puede atribuir una actividad neurotóxica al efluente de aguas servidas de Loncoche o de la planta Lácteos Valdivia.

4.4. ACTIVIDAD MFO

La actividad EROD se ha usado por más de tres décadas como un parámetro indicador de la exposición a descargas de efluentes (Soimasou *et al.* 1998), sirviendo como indicador de la exposición a ligandos AhR (Kloepper-Sams & Benton 1994). Si bien, el incremento de la actividad EROD es una típica respuesta de los peces expuestos a distintas concentraciones de los efluentes o en distintas zonas de la pluma de las descargas en distintos sistemas acuáticos (Adams *et al.* 1996, Ahokas *et al.* 1994, Jones *et al.* 1995, Munkittrick *et al.* 1991), se observa una respuesta diferencial en las tres especies estudiadas.

Los individuos de *Percilia gillissi* (hembras) exhiben una tendencia, sin diferencias estadísticamente significativas, al aumento en la actividad EROD desde RC2 a RC5, pero con valores muy por debajo a los obtenidos en el primer sitio de muestreo (RC1), mientrasque los machos tienes valores superiores tanto en el primer sitio de referencia (RC1) como en el sitios de descarga de efluentes de celulosa (RC6). Por su parte *Trichomycterus areolatus* posee actividades EROD en machos en el sitio de impacto de efluentes domiciliarios (RC4) muy superiores a los demás sitios de referencia, mientras que en la zona de descarga de efluentes de celulosa (RC6), esta actividad se ve muy deprimida. Las hembras por su parte poseen una tendencia a valores mayores desde aguas arriba de la descarga hacia el sitio de impacto, aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas, debido a la amplia variabilidad en la respuesta de las hembras de esta especie. Por su parte, *Cyrpinus carpio* evidencia valores promedio sin diferencias en los machos, pero mayores para las hembras en la zona de descarga de efluentes de Lácteos Valdivia, aunque sin diferencias significativas entre sitios de muestreo.

Hugla y colaboradores (1995) nos indican una clara diferencia en la actividad EROD entre especies de peces, sobretodo en especies bentónicas, cuando los contaminantes se asocian más al sedimento y pueden ingerirse directamente o a través de la dieta. De esta forma, era de esperarse una mayor actividad EROD en *T. areolatus* y *C. carpio* que en *P. gillissi*, pero se observan valores tan solo levemente mayores en los machos y hembras de las especies bentónicas en los sitios de impacto directo de la descarga de efluentes domiciliarios y plantas de productos lácteos, y es más una inhibición de esta actividad en la zona de descarga de de efluentes de celulosa. Este hecho podría deberse a que a un tiempo de exposición mayor resulta en una actividad catalítica reducida del CYP1A en los individuos, ya que una vez inducida la actividad y es capaz de metabolizar las sustancias químicas, la enzima declina a un estado estacionario (Munkittrick *et al* 1995, Whyte *et al* 2000). Por otra parte, el estado reproductivo de los peces podría afectar los resultados de los análisis, tal cual lo resaltan Stegeman & Hahn (1994), "la actividad EROD es mayor y más similar en peces machos activos reproductivamente, inactivos reproductivamente y en hembras inactivas reproductivamente". Se ha observado que la actividad EROD declina hacia la ovulación y aumenta en el período de desove (Elskus *et al.* 1989; Larsen *et al.* 1992, Arukwe & Goksør 1997), caso en el cual pueden estar los individuos hembra de *C. carpio* y *T.*

areolatus. Esta variación de la actividad EROD se relaciona con los altos niveles de estradiol (E_2) en las hembras en desove (Arukwe & Goksør 1997, Stegeman *et al.* 1992). Esta actividad es evidencia de que en los efluentes podrían existir compuestos capaces de activar la maquinaria detoxificadora. De esta manera, los valores de actividad EROD registrados en la zona de descarga de efluentes de celulosa pueden variar con la actividad hormonal propia de los peces o debido a compuestos xenoestrógenos, que imitan los niveles de E_2 y pueden modificar la actividad EROD por el mismo mecanismo del E_2 en las hembras. Otros investigadores han evidenciado esta respuesta en *Ictalurus punctatus* (Schlenk *et al.* 1997) y en *Salmo salar* (Aruwke *et al.* 1997), con reducciones significativas de actividad EROD en individuos inyectados con compuestos conocidos con actividad estrogénica. Así bien, la actividad EROD de los peces examinados, a pesar de que en la mayoría de los casos no presenta diferencias significativas, puede estar enmascarada por efectos de E_2 en el desove o por compuestos xenoestrogénicos en los sedimentos, sobre todo en *T. areolatus*.

4.5. GENOTOXICIDAD

El objetivo general de este estudio fue evaluar si existe algún grado de daño genotóxico en eritrocitos nucleados de algunas especies de peces nativos e introducidos que habitan a lo largo del río Cruces. Dado el tamaño de los peces nativos seleccionados para el sacrificio y el volumen de sangre que fue posible extraer se utilizo sólo una técnica muy sensible que permite detectar de manera rápida y confiable si existe algún grado de daño sobre el ADN, mientras que en el caso de *C. carpio* se utilizaron 2 ensayos diferentes para la evaluación.

El test o ensayo del cometa alcalino (pH>13) detecta, no solo la rotura de la hebra, sino múltiples clases de daño del ADN y sitios de reparación incompleta del ADN. Si las células expuestas son sometidas a electroforesis, los fragmentos de ADN migran fuera del núcleo, con la clásica formación de un cometa, siendo la longitud del cometa el indicador del grado de actividad del genotóxico (Fairbairn, 1995; Monteith y Vanstone, 1995).

Por su parte, el ensayo de micronúcleos (MN) (Rodriguez-Cea *et al*., 2003). Los MN son fragmentos de cromatina localizados en el citoplasma con la apariencia de un núcleo pequeño (Heddle et al., 1983). Estos micronúcleos son consecuencia de una fractura a nivel cromosómico, lo que dará un fragmento acéntrico o bien por el funcionamiento anómalo de las proteínas del huso mitótico que dejan cromosomas retrasados en la segregación y desfasados en la condensación del resto del material nuclear (Heddle *et al*., 1991).

Los resultados del ensayo del cometa y micronúcleos arrojados en este estudio no revelan la formación de cometas en Eritrocitos nucleados de ninguna de las especies evaluadas en este monitoreo.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos con el test de micronúcleos, se concluye que no existe daño clastogénico en eritroctios nucleados en las especies obtenidas en este monitoreo.

5. CONCLUSIONES

En el estudio de campo no se observan actividad neurotóxica o daño clastogénico de ninguno de los dos efluentes.

En cuanto a la actividad EROD en las tres especies, *P. gillissi* no presenta variaciones de la actividad catalítica del CYP1A en hembras en el sitio de impacto de efluentes domiciliarios, mientras que los machos de *T. areolatus* presentan un claro aumento, aunque con valores bajos de esta en este sitio, mientras que en la zona de descarga de efluentes de celulosa se observan algunas diferencias, aunque sin ser estadísticamente significativas. Las hembras de *C. carpio* presentan un alza sin diferencias estadísticamente significativas, mientras los machos no presentan variación. Las diferencias observadas se pueden deber a las vía de exposición y ciclo de vida de los especies.

Existe una disminución en el número de especies en los sitios de descarga de efluentes similar a lo observado en otros ríos de Chile, sin embargo, en relación a la abudancia de especies se observa una reducción a medida que se avanza hacia la desembocadura, lo que es contrario a lo observado en otros ríos de Chile cuya abundancia de especies va normalmente en aumento con el caudal. A pesar de esto, la dominancia de peces nativos con cierto grado de sensibilidad a la contaminación es indicativo de un *status* no tan desfavorable para la ictiofauna en la zona de Loncoche. Por otra parte la presencia y abundancia de *C. carpio* es indicativo de un alto grado modificación del sistema acuático en la zona potamal de la subcuenca del río Cruces.

Por ultimo, no se observan variaciones estadísticamente significativas en los parámetros fisiológicos de los peces. Solo los machos de *T. areolatus* presentan hígados de mayor tamaño en el sitio de impacto. Si bien estos resultados permiten evidenciar la ausencia de impacto negativos de la descarga de efluentes de sobre la ictiofauna nativa, medida a través de los indicadores utilizados en el estudio, se observan tendencias (sin diferencias estadísticas) en el los parámetros evaluados que deben ratificarse en estudios futuros, debido a que pueden acarrear alteraciones en la distribución y almacenamiento de la energía en los peces con consecuencias para las poblaciones y estructura del ensamble íctico.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adams, S. M., W. D. Crumby, M. S. J. Greeley, L. R. Shugart & C. F. Saylor (1992). "Responses of fish populations ans communities to pulp mill effluents: A holistic assesment." Ecotoxicology and Environmental Safety **24**: 347-360.

Ahokas, J.T., Holdway, D.A., Brennan, S.E., Goudey, R.W. & H.B. Bibrowska (1994). MFO activity in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated pulp and paper mill effluent in Lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX, and muscle PCDD/PCDF. Environ Toxicol Chem **13**:41–50.

Arukwe, A. & A. Goksøyr (1997) Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L). The J Exp Zool **277**:313–25.

Arukwe, A., Förlin, L., & A. Goksøyr (1997). Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon *(Salmo salar)* liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. Environ Toxicol Chem **16**:2576–83.

Baird, D. J. & P. J. Van den Brink (*In press*). "Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances." Ecotoxicology and Environmental Safety.

Dyer, S., C. Peng, D. Mcavoy, N. Fendinger, P. Mass-cheleyn, L. Castillo & J.M. Lim (2003). The influence of untreated wastewater to aquatic communities in the Balatuin River, The Philippines. Chemosphere, **52**(1):43-53.

Elskus, A.A. & J.J. Stegeman (1989). Further consideration of phenobarbital effects on cytochrome P-450 activity in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Comp Biochem Physiol **92C**:223-30.

Fairbairn, D.W., O´Neill, K.l. & M.D. Standing (1993). Application of confocal laser scanning microscopy to analysis of H2O2 induced DNA damage in human cells. Scanning **15**: 136-139.

Gafny, S., M. Goren & A. Gasith (2000). Habitat condition and fish structure in a coastal mediterranean stream (Yarqon, Israel) receiving domestic effluent. Hidrobiología, **422/423**: 319-330.

Galloway, B. J., K. Munkittrick, S. Currie, M. A. Gray, R. A. Curry & C. S. Wood (2003). "Examination of the responses of Slimy Sculpin (*Cottus cognatus*) and White Sucker (*Catostomus commersoni*) collected on the Saint John river (Canada) downstream of pulp mill, paper mill, and sewage discharges." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(12): 2898-2907.

Gibbons, W. N., K. R. Munkittrick, M. E. McMaster & W. D. Taylor (1998a). "Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species 2: comparison between responses of trout-perch (*Percopsis omiscomaycus*) and white

sucker (*Catostomus commersoni*) downstream of a pulp mill." Environmental Toxicology and Chemistry **17**(11): 2238-2245.

Gibbons, W. N., K. R. Munkittrick & W. D. Taylor (1998b). "Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species 1: response of Spoonhead sculpin (*Cottus ricei*) downstream of a bleached-kraft pulp mill." Environmental Toxicology and Chemistry **17**(11): 2227-2237.

Gibbons, W. N., W. D. Taylor & K. R. Munkittrick (1995). Suitability of small fish species for monitoring the effects of pulp mill effluent on fish populations of the Fraser river, Environment Canada**:** 99 pp.

Habit, E. & M. C. Belk (*In press*). "Threatened fishes of the world: *Percilia gillissi* Eigenmann, 1927 (Perciliidae)." Environmental Biology of Fishes.

Habit, E., M. C. Belk, R. C. Tuckfield & O. Parra (2006). "Response of the fish community to human-induced changes in the Biobío River in Chile." Freshwater Biology **51**: 1-11.

Habit, E., Parra, O. & C. Valdovinos (2005). Ictiofauna de un sistema fluvial receptor de aguas servidas: respuestas a una nueva planta de tratamiento (Río Quilque, Chile Central). Gayana **69**(1): 94-103.

Habit, E., O. Parra, C. Valdovinos, S. Basualto, G. Azócar & P. Victoriano (2002). Programa de Seguimiento Ambiental de la Central Hidroeléctrica Rucúe. Informe Final Ejecutivo. Oficina de Asistencia Técnica, Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción, 50 pp.

Habit, E. & O. Parra (2001). Impactos ambientales de los canales de riego sobre la fauna de peces. Ambiente y Desarrollo, 27(3): 50-56.

Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourin, K., MacGregor, J.T.Y., Newell, G.W. & M.F Salamone (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, A report of the U.S. environmental protection agency, Gene tox program. Mutation Research **123**:61-118.

Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P.H., MacGregor, J.T. (1991). Micronucleus test as an index of cytogenetic damage: present, past and future. Environmental and Molecular Mutagenesis **18**:277–291.

Hugla, J.L., Philippart, J.C., Kremers, P., Goffinet, G. & J.P. Thome (1995). PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the River Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change. Neth J Aquat Ecol **29**:135–45.

Jones, P.D., Hannah, D.J., Buckland, S.J., Power, F.M., Gardner, A.R. & C.J. Randall (1995). The induction of EROD activity in New Zealand freshwater fish species as an indicator of environmental contamination. Aust J Ecotoxicol **1**:99–105.

Kloepper-Sams, P.J. & E. Benton (1994). Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. II. Induction of hepatic cytochrome P4501A in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and other species. Environ Toxicol Chem **13**:1483–96.

Larsen, H., Celander, M., & A. Goksøyr (1992). The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. Fish Physiol Biochem **10**:291–301.

Manriquez, A., L. Huaquín, M. Arellano & G. Arratia (1988). "Aspectos reproductivos de *Trichomycterus areolatus* Valenciennes, 1846 (Pisces: Teleostei: Siluriformes) en río Angostura, Chile." Studies in Neotropical Fauna and Environment **23**(2): 89-102.

McMaster, M. E., G. J. Van Der Kraak, C. B. Portt, K. R. Munkittrick, P. K. Sibley, I. R. Simth & D. G. Dixon (1991). "Changes in hepatic mixed-function oxigenase (MOF) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker population (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft pulp mill effluent." Aquatic Toxicology **21**: 199-218.

Monteith, D.K. & J. Vanstone (1995). Comparision of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. Mutation Research **345**:97-103.

Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Van Der Kraak, G., Portt, C., Gibbons, W.N., Farwell, A. & M. Gray (2000). Development of Methods for Effects-Driven Cumulative Effects Assessment Using Fish Populations: Moose River Project**.** SETAC, Pensacola, FL, USA.

Munkittrick, K.R., Blunt, B.R., Legget,t M., Huestis, S., & L.H. McCarthy (1995). Development of a sediment bioassay to determine bioavailability of PAHs to fish. *J Aquat Ecosyst Health* **4**:169–81.

Munkittrick, K. R., M. E. McMaster, C. B. Portt, G. J. Van Der Kraak, I. R. Smith & D. G. Dixon (1992). "Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed function oxygenase activity, and presence of external lesions in lake white sucker (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent." Can. J. Fish. Aquat. Sci **49**: 1560-1569.

Munkittrick, K. R., C. B. Portt, G. J. Van Der Kraak, I. R. Smith & R. D.A. (1991). "Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population." Canadian Journal of Fish Aquatic Science **48**: 1371-1380.

Orrego, R., G. Moraga-Cid, M. González, R. Barra, A. Valenzuela, A. Burgos & J. F. Gavilán (2005). "Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(8).

Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W. & L.L. Fancey (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Mar. Pollut. Bull. **32**, 225-231.

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

Schlenk, D., Stresser, D.M., McCants, J.C., Nimrod, A.C., & W.H. Benson (1997). Influence of beta-naphthoflavone and methoxychlor pretreatment on the biotransformation and estrogenic activity of methoxychlor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Toxicol Appl Pharmacol **145**: 349–56.

Soimasuo, M.R., Karels, A.E., Leppanen, H., Santti, R., & A.O.J. Oikari (1998). Biomarker responses in whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.1.) experimentally exposed in a large lake receiving effluents from pulp and paper industry. Arch Environ Contam Toxicol **34**:69–80.

Stegeman, J.J. & M.E. Hahn (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC and Ostrander GK (Eds.) Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 87–206.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. & P.A. Van Veld (1992). Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Keystone, CO, USA, July 23 to July 28, 1989. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Proceedings of the Eighth Pellston Workshop. **33**:111–20.

Universidad Austral de Chile (2005). Informe final: Estudios sobre origen de mortalidades y disminución poblacional de aves acuáticas en el santuario de la naturaleza Carlos Anwandter, en la provincia de Valdivia. Direccion regional CONAMA X región de Los Lagos-Universidad Austral de Chile. 539 pp.

Van der Oost R., Beyer J. & N. P.E. Vermeulen (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Tox. and Pharm. **13**: 57-149.

Van Straalen, N. M. (2003). "Ecotoxicology becomes Stress Ecology." Environmental Science and Technology: 324-331.

West, D. W., N. Ling, B. J. Hicks, L. A. Tremblay, N. D. Kim & M. R. van den Heuvel (2006). "Cummulative impacts assessment along a large river, using brown bullhead catfish (*Ameiurus nebulosos*) populations." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(7): 1868-1880.

Whyte, J.J., Karrow, N.A., Boermans, H.J., Dixon, D.G., & N.C. Bols (2000) Combined Methodologies for Measuring Exposure of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Creosote Contaminated Microcosms. Polycyclic Aromatic Compounds **18**, 71-98.