

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**TESIS DE POSTGRADO  
DOCTOR EN CIENCIAS, ÁREA BIOLOGÍA**



**Cangrejos intermareales como indicadores del estado de  
salud de ambientes estuariales: Metales pesados y sus  
efectos en la reproducción de *Neohelice granulata*  
(Crustacea: Brachyura) en la laguna costera Mar Chiquita**

**Tesista: Lic. Micaela V. Vallina**

**Directora: Dra. Silvia G. De Marco**

**Co- Directora: Dra. María Andrea Gavio**

**Grupo de Investigación de Humedales y Ambientes Costeros  
Estación Costera J. J. Nágera.**

**2015**

## INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Introducción General</b>	5
<b>Capítulo I: Distribución de metales pesados en la laguna costera Mar Chiquita.</b>	
Introducción	16
Materiales y Métodos	20
Resultados	32
Discusión	36
<b>Capítulo II: Variables reproductivas en hembras de <i>Neohelice granulata</i> provenientes de diferentes hábitats de la laguna.</b>	
Introducción	41
Materiales y Métodos	46
Resultados	50
Discusión	56
<b>Capítulo III: Ensayos de toxicidad en hembras de <i>Neohelice granulata</i> y sus posibles efectos sobre las variables reproductivas.</b>	
Introducción	64
Materiales y Métodos	67
Resultados	72
Discusión	83
<b>Capítulo IV: Ensayos de toxicidad en machos de <i>Neohelice granulata</i> y sus posibles efectos sobre el sistema reproductor y la calidad espermática.</b>	
Introducción	91
Materiales y Métodos	94
Resultados	97
Discusión	104
<b>Conclusiones Generales</b>	106
<b>Alcances, Limitaciones y Perspectivas</b>	112
<b>Bibliografía</b>	116

## RESUMEN

El éxito reproductivo de las especies biológicas puede estar alterado por procesos de contaminación, los que pueden ocasionar, entre numerosas perturbaciones, cambios en la calidad y/o cantidad de gametas producidas, y así afectar también la fecundación, el desarrollo embrionario, la viabilidad y supervivencia de larvas y consecuentemente el rendimiento reproductivo. Por otra parte, los metales son de interés particular debido a su alta persistencia, reciclado biogeoquímico y riesgo ecológico. El uso de ciertos organismos como biomonitores/bioindicadores permite una aproximación al escenario ecotoxicológico del sistema bajo estudio. En esta tesis, se estudió la distribución de metales traza en los distintos compartimentos (agua de columna, intersticial y de cuevas, sedimento y material particulado en suspensión) en dos hábitats diferentes (área vegetada y planicie de marea) de la laguna costera de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). Asimismo se estudiaron los parámetros índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) y las variables reproductivas (rendimiento reproductivo, fecundidad, peso seco de la masa de embriones) de hembras del cangrejo cavador *Neohelice granulata* provenientes de los mencionados hábitats. Por otra parte se realizaron experimentos de exposición de hembras a diferentes concentraciones de Zn y a diferentes salinidades, así como de machos a diferentes concentraciones del mismo metal a baja salinidad. Las concentraciones de Zn halladas en las matrices analizadas, particularmente en agua, fueron similares a las que determinaron en  $LC_{50}$  para esta especie, lo que decidió la selección de este metal para los ensayos realizados en laboratorio. Se observaron diferencias significativas para los valores de los IGS calculados entre hábitats; y diferencias significativas tanto entre

hábitats como entre épocas de muestreo para el IHS. El rendimiento reproductivo de las hembras no fue significativamente diferente entre hábitats ni entre épocas de muestreo. Se observaron diferencias significativas en la fecundidad entre hábitats y épocas de muestreo. El peso seco de la masa ovígera mostro diferencias significativas entre hábitats; en tanto que el volumen medio de los huevos no mostró diferencias significativas ni entre hábitats ni entre épocas de muestreo.

En los ensayos de laboratorio, se observaron diferencias cuali y cuantitativas en el desarrollo embrionario de los huevos a la mayor concentración de exposición a Zn. También se observaron diferencias significativas en las variables reproductivas de las hembras expuestas a altas concentraciones de Zn y a baja salinidad. Los machos de esta especie no presentaron alteraciones histopatológicas ni en las células del tejido reproductivo ni en los espermatozoides al ser expuestos a diferentes concentraciones de Zn a baja salinidad.

Resulta muy importante la realización de futuros ensayos para determinar si el Zn causa tanto daños ultraestructurales sobre los espermatozoides como cambios comportamentales involucrados en la reproducción. En esta investigación se demuestra que *N. granulata* resulta ser un excelente bioindicador y/o biomonitor del estado de salud ambiental de la laguna costera Mar Chiquita, al menos en lo que respecta al efecto del Zn sobre las variables reproductivas. Esto se debe a la importancia del papel que esta especie desempeña en los ambientes estuariales del Atlántico sudoccidental.

## ABSTRACT

Reproductive success of biological species can be altered by pollution processes which can cause, among numerous disturbances, changes in the quality and / or quantity of gametes produced, and thus also affect fertilization, embryo development, viability and larval survival and consequently the reproductive success. Moreover, metals are of particular interest because of their high persistence, biogeochemical recycle and ecological risk. The use of target organisms as biomonitors / biomarkers allows an ecotoxicological approach of the system under study. In this thesis, the distribution of trace metals in different compartments (water column and interstitial burrows, sediment and suspended particulate matter) in two different habitats (vegetated area and tidal flat) of the Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina) were studied.

Parameters such as gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic indexes (HSI) and reproductive variables (reproductive performance, fertility, dry weight of embryo masses) of female's *Neohelice granulata* burrowing crabs from the mentioned habitats, was also studied. Furthermore, females were exposed under experimental conditions at different concentrations of Zn and different salinities. Males were exposed to different concentrations of the same metal at low salinity. Zn concentrations found in the matrices analyzed, particularly in water, were similar to those determined in CL<sub>50</sub> for this species, which determined the selection of this metal for the experimental trials. Significant differences for GSI were observed between habitats; and both between habitats and sampling times for the HSI. Female's reproductive performance was not significantly different between habitats and between sampling times. Significant differences in fertility between habitats and sampling times were observed. The dry

weight of the ovigerous masses showed significant differences between habitats; while the average volume of eggs was not significant between habitats or sampling times.

In the experimental trials, qualitative and quantitative differences in embryonic development of eggs at the highest concentration of Zn exposure were observed. Significant differences were found in the reproductive variables of females exposed to high concentrations of Zn and low salinity. Males of this species showed no histopathological or reproductive tissue cells or sperm impairment when exposed to different concentrations of Zn to low salinity.

It would be very important to conduct further tests to determine if the Zn could cause ultrastructural damage on sperm cells or behavioral changes involved in reproduction. This research shows that *N. granulata* turns out to be an excellent biomarker and / or biomonitor of the Mar Chiquita coastal lagoon environmental health, at least in regard to the effect of Zn on reproductive variables. This is due to the important role this species plays in the Southwestern Atlantic estuarine environments.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las lagunas costeras son sistemas estuariales localizados en zonas de transición ubicadas entre ecosistemas terrestres y zonas marinas adyacentes. Estos ecosistemas están controlados por interacciones complejas entre la tierra, los sistemas limnéticos, el océano y la atmósfera, lo cual los convierte en ambientes altamente fluctuantes y vulnerables (Viaroli et al., 2007). Estos ambientes son altamente productivos y relevantes para la conservación de la biodiversidad, pues son refugio de aves, tanto residentes como migratorias y de la biota acuática. Las lagunas costeras son especialmente sensibles a impactos antrópicos y a fenómenos de escala global (como por ejemplo, el fenómeno de El Niño), por ser sistemas generalmente someros, con un alto tiempo de residencia de sus aguas dado que están ubicados al final de las cuencas de drenaje (Kjerfve, 1994). Como resultado, estos ecosistemas han sido caracterizados como complejos y en un estado de frágil estabilidad.

En la costa Sureste de Sudamérica (Este de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil) se encuentra una extensa área de lagunas costeras, las cuales cubren el 12,2 % de sus costas y se conectan con el Océano Atlántico. Muchos de estos sistemas se encuentran legalmente protegidos por su alta diversidad biológica, por ser sitios relevantes para aves migratorias y por representar importantes refugios y zonas de cría de especies de interés comercial. Estos ecosistemas sustentan la pesca artesanal y una importante producción agropecuaria en su cuenca, por lo que suele observarse un gradiente desde lagunas prístinas a eutróficas. Debido a su particular funcionamiento hidrológico, su extensión y su calidad ambiental, estas lagunas son sitios mundialmente singulares para

la conservación y el estudio de procesos naturales y del impacto antrópico (Beltrame, 2008).

En estos ecosistemas, es común la presencia de metales provenientes de procesos naturales (como el desgaste de suelos y rocas), y de cargas antropogénicas (tales como de la agricultura o de actividades domésticas e industriales) (Davutluoglu et al., 2010).

En los ambientes acuáticos, los metales se encuentran en diversas formas (fase disuelta, particulada o en sedimentos). Su comportamiento en estos ambientes es altamente complejo y depende de su forma fisicoquímica específica o de su unión con otras partículas. Los sedimentos son el principal depósito y actúan como transportadores. La biodisponibilidad y removilización de los metales y su transferencia en la cadena alimenticia puede afectar las condiciones ambientales así como pH, potencial redox, salinidad, y concentraciones y tipos de ligandos y agentes quelantes en los sedimentos (Botté et al., 2010; Davutluoglu et al., 2010; Weng y Wang, 2014).

Los metales denominados esenciales resultan imprescindibles en pequeñas concentraciones para la vida ya que desempeñan papeles fisiológicos vitales (por ej. Cu y Zn). Sin embargo, otros, los no esenciales, no son requeridos por los organismos y resultan tóxicos aún en pequeñas concentraciones (por ej. Pb y Cd). En cualquier caso, cuando los metales se encuentran biodisponibles por encima de determinadas concentraciones, ambos, esenciales o no, pueden producir efectos adversos en los organismos (Greenwood y Fielder, 1983; López Greco et al., 2001; Sánchez et al., 2005; Ferrer et al., 2006; Martín -Díaz et al., 2006; Nadella et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2008; Banthita Sawasdee y Heinz-R, Köhler, 2009; Beltrame et al., 2009; Barillet et al., 2010; Revathi et al., 2011; Gonzalo y Camargo, 2012; Shi Ling Chan et al., 2013; Park et al., 2014; Chiodi Boudet et al., 2015; Le Pabic et al., 2015).

Actualmente, el efecto de los metales pesados como contaminantes es ampliamente reconocido y en los ecosistemas marinos costeros constituyen un grave problema debido a los efectos perjudiciales que pueden producir (Giordano et al., 1992).

Cuando éstos ingresan a ecosistemas salobres (Ponce-Velez y Botello, 1991; Shimshock, 1992), el peligro de los metales en su forma iónica (y en particular de los potencialmente tóxicos), es su combinación con compuestos orgánicos presentes en los sedimentos, y su ingreso a las tramas tróficas donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación (Beltrame, 2008; LI et al., 2009; Davutluoglu et al., 2010; Giarratano y Amin., 2010; Zheng et al., 2013; Liu et al., 2014).

La interpretación de los resultados sobre el impacto de un contaminante en investigaciones de campo, puede ser complementada mediante ensayos de laboratorio, en los que las variables pueden ser controladas y los efectos cuantificados. Así, las pruebas de toxicidad en laboratorio, cuya metodología se halla explícitamente tratada - entre otros- en las publicaciones de FAO (1981,1982) y APHA-AWWA-WEF (1998), son ampliamente utilizadas para evaluar la toxicidad real y potencial de sustancias químicas y medir los efectos de la contaminación marina (Ferrero et al., 2001; López Greco et al., 2001; Ferrer et al., 2006; Camacho-Sánchez, 2007; Mendoza-Rodríguez, 2007; Beltrame et al., 2008; Barillet et al., 2010).

El uso de organismos particulares como biomonitores/bioindicadores de la biodisponibilidad de metales traza en aguas costeras permite una descripción comparada en espacio y tiempo y provee un escenario ecotoxicológico integrado del metal seleccionado dentro del sistema de estudio. Market et al. (2008) definió “bioindicador” como un organismo (o parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del ambiente (o parte de él). Por otro lado, definió

“biomonitor” como un organismo (o parte de un organismo o comunidad de organismos) que contiene información sobre los aspectos cuantitativos de la calidad del ambiente. Consecuentemente, los bioindicadores juegan un papel importante dentro de la evaluación de la biodisponibilidad de los metales traza tóxicos en los sistemas estuariales y complementan las mediciones químicas (Camacho-Sánchez, 2007; Beltrame et al., 2011).

Los organismos biomonitores utilizados para la realización de los ensayos, deben cumplir con una serie de criterios, entre los que se destaca su importancia ecológica. Las especies elegidas necesitan ser fáciles de identificar y recolectar, ser sedentarios o residentes y abundantes en el área, tener un ciclo de vida largo y presentar gran cantidad de tejido para analizar. El biomonitor ideal puede también presentar una gran resistencia al “stress”, capaz de tolerar/soportar variaciones en los niveles de contaminantes expuestos, pero por sobre todo debe ser capaz de acumular el contaminante en cuestión. Una correlación simple podría existir entre la concentración del contaminante en los tejidos de la especie elegida y la concentración ambiental en el área que está siendo estudiada (Mc Farlane et al., 2000; Andersen y Melzer, 2004; Elumalai et al., 2007; Maria et al., 2007; Qunfang et al., 2008; Jemec et al., 2009; Beltrame et al., 2011; Sant’Anna et al., 2012; Pinto Rodrigues et al., 2014; Dallas y Jha, 2015).

Los metales trazas, los cuales son tomados y acumulados por los organismos acuáticos, llegan a través de diferentes vías. Los crustáceos, a través de sus superficies permeables, las branquias y otras membranas, incorporan los metales en forma disuelta. La dieta es otra vía de ingreso del metal, dado por el consumo de metales previamente acumulados en la biota o por la ingesta de agua durante su alimentación. Por ejemplo, los cangrejos violinistas (*Uca* spp.) se alimentan empleando sus piezas bucales con las

cuales raspan la materia orgánica proveniente del sustrato. Asimismo, pasan gran parte de su ciclo de vida dentro de sus cuevas, cubiertas por agua. Estas características hacen de éstos cangrejos buenos candidatos para el monitoreo biológico, ya que integran agua, dieta y sedimentos (Andersen y Melzer, 2004).

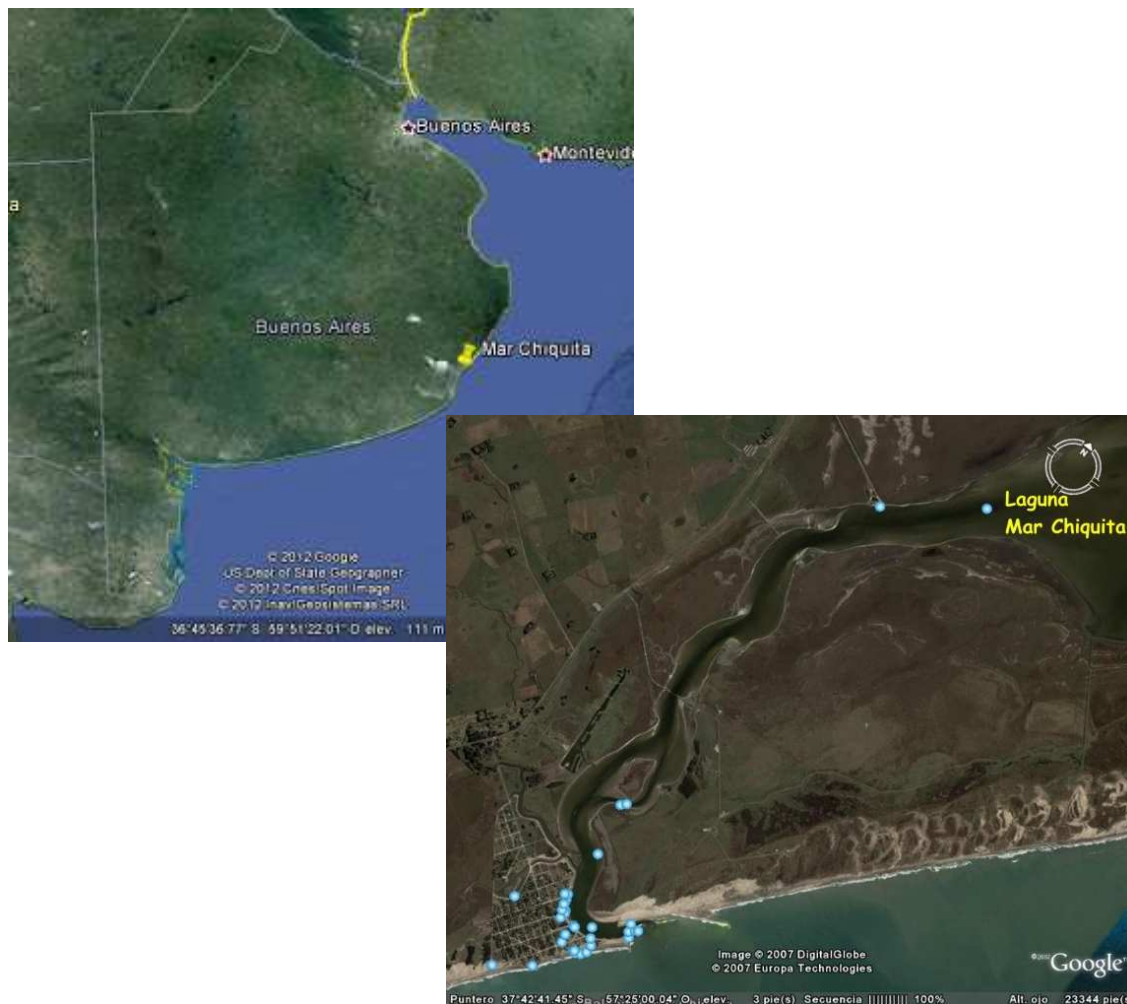
El cangrejo excavador *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) es una especie eurihalina ampliamente distribuida a lo largo de la costa atlántica de América del Sur, desde Río de Janeiro (Brasil) hasta la Patagonia (Argentina), y habita tanto la zona del intermareal como del supramareal de las marismas salobres, los estuarios y las lagunas costeras del sudeste de América del Sur, convirtiendo a estos lugares en los llamados “cangrejales” (Beltrame et al., 2011). Esta especie de cangrejo habita desde el área del intermareal, con sedimentos blandos y planicies desnudas, hasta las áreas vegetadas con *Spartina densiflora*, *Sarcocornia* y *Juncus*. Éstos cangrejos cavan y mantienen sus cuevas abiertas semipermanentemente. La excavación afecta el movimiento de las partículas que operan como trampas pasivas de materia orgánica del sedimento, detritos y contaminantes. Los individuos del área dominada por *Spartina* o del área descubierta, difieren en su modo trófico, tasa de procesamiento del sedimento así como en la arquitectura y dinámica de las cuevas (Daleo e Iribarne, 2009; Beltrame et al., 2011). Esta especie se reproduce durante la primavera y verano, hasta comienzos del otoño. Como especie clave de estos ecosistemas estuariales, este cangrejo juega un papel importante en la transferencia de contaminantes a los niveles tróficos superiores. Estas características de *N. granulata* permiten considerar su uso como un potencial indicador biológico que puede proveer un punto de vista integrado del *stress* originado por contaminantes, tanto en los sedimentos como en el agua (Beltrame et al., 2011).

De esta forma, *N. granulata* es un excelente organismo para llevar a cabo ensayos de toxicidad para evaluar los efectos de los contaminantes presentes en la

laguna Mar Chiquita. Por tratarse de un organismo bentónico que vive íntimamente asociado a los sedimentos, por su gran abundancia e importancia ecológica como estructurador del ecosistema costero, (ya que forma cangrejales de varios kilómetros de extensión y por ser una especie clave en este ecosistema) (Beltrame et al., 2008; Fanjul et al., 2008) entre otras razones, se decidió elegirlo como bioindicador del estado de salud ambiental del ecosistema en estudio, la laguna costera Mar Chiquita.

Mar Chiquita es la única laguna costera del tipo semiobturada de canal largo en la Argentina (Perillo, 1995). Está situada en el partido de Mar Chiquita, al sudeste de la Provincia de Buenos Aires, entre los 37°33' – 37°43' S y los 57°15' – 57°30' O, aproximadamente a 32 km al noreste de la ciudad de Mar del Plata (**Fig. N° 1**). Esta laguna es el resultado de la colmatación y restricción de una bahía; tiene su origen en las oscilaciones sufridas por el nivel del mar durante los últimos 5000 años, en los que se han generado procesos de avance y retroceso. Así, un antiguo seno marino quedó aislado por un cordón litoral arenoso; esta extensa cadena de médanos litorales desarrollados en el Pleistoceno, la separa periódicamente del océano un proceso costero de dinámica muy intensa (Fasano et al., 1982; Piccolo y Perillo, 1999).

**FIGURA. N° 1.** Ubicación geográfica del área de estudio, Laguna costera Mar Chiquita, Pcia. de Bs. As., Argentina.



Por su latitud, la laguna Mar Chiquita, inscripta en la región pampeana, pertenece a una zona templada, y está afectada tanto por la influencia de los vientos del sistema de altas presiones del Atlántico Sur como por los vientos cargados de humedad originados por la proximidad al mar (Reta et al., 2001). Considerando sus rasgos climáticos el área se ubica dentro de los climas “templados con influencia oceánica”, con un continuo intercambio de masas de aire entre la interfase tierra-mar (Barry y Chorley, 1980). Según la clasificación de Thornthwaite, la laguna está dentro del área

correspondiente a un clima “subhúmedo a húmedo mesotermal con escasa o nula deficiencia de agua”. Por otro lado, si se considera exclusivamente la temperatura del aire, la región está comprendida dentro de los “climas de latitudes medias” limitados por las isotermas medias anuales de 10 y 18° C (Strahler, 1981; Beltrame, 2008).

Con respecto a las precipitaciones, el área se ubica dentro del régimen de transición con inviernos lluviosos (Prohaska, 1976), donde el período de máximas precipitaciones corresponde a fines de primavera y verano. El clima predominante es templado húmedo, las temperaturas medias rondan los 19,5 °C en verano (con máximas absolutas superiores a los 30 °C) y 8 °C en invierno (con mínimas de hasta -9°C en invierno). El promedio anual de lluvias es de 850 mm. anuales, de los cuales el 60 %, cae entre Octubre y marzo.

Desde el punto de vista hidrográfico, las aguas de la laguna son mixohalinas, la laguna se subdivide en dos ambientes netamente diferentes (Reta et al., 2001; De Marco, 2002; Marcovecchio et al., 2006): un cuerpo lagunar, de aguas típicamente dulces, donde la acción de la marea no es percibida en circunstancias ordinarias, y un sector de características netamente estuariales, ubicado desde la boca de la laguna hasta donde es percibida la acción de la marea. El límite entre ambos ambientes es sumamente variable y se define por la conjunción de los siguientes parámetros: amplitud de mareas, condiciones meteorológicas y volumen de agua dulce presente en la laguna (Martos y Reta, 1997; Reta et al., 2001; De Marco, 2002; Marcovecchio et al., 2006; Beltrame, 2008).

Las aguas de esta laguna son ricas en nutrientes nitrogenados, de fósforo y de silicio durante todo el ciclo anual. Esta laguna es un cuerpo de agua eutrófico y altamente productivo (De Marco, 2002; De Marco et al., 2005). El aporte de agua dulce es particularmente importante si se tiene en cuenta que su cuenca de drenaje supera los

10.000 km<sup>2</sup>, incluyendo parte de las sierras de Tandilia. Recibe el aporte de gran cantidad de arroyos y canales artificiales, formando una extensa cuenca tributaria, que incluye áreas afectadas por numerosas actividades humanas, principalmente las actividades agrícola-ganaderas. Teniendo en cuenta que en esta zona se realiza un uso intensivo de fertilizantes, plaguicidas y otros agroquímicos, la cuenca de drenaje constituye una fuente potencial de contaminación cuyo destino es esta laguna.

En esta laguna se han desarrollado una fauna y una flora específica relacionadas a sus diferentes subambientes: planicies mareales, llanuras de inundación, marismas (distinguiendo dentro de éstas espartillares, hunquillares, duraznillares), deltas mareales, depresiones intermedanasas y paleoplayas compuestas por valvas de moluscos (Isla y Gaido, 2001; Beltrame, 2008).

La laguna costera Mar Chiquita fue declarada Reserva Mundial de Biosfera por el Programa “Man and Biosphere” de la UNESCO en el año 1996. Además, en el año 1999 fue declarada Reserva Natural de Usos Múltiples, por el gobierno provincial (Beltrame, 2008). Sin embargo, este ecosistema recibe contaminantes de origen antrópico, entre los que se incluyen los metales. Éstos son de interés particular debido a sus propiedades no-biodegradables y a sus efectos tóxicos cuando son acumulados en altas concentraciones en los organismos. Es por ello que se encuentran dentro de la lista de contaminantes prioritarios de todas las agencias de control ambiental. (Davutluoglu et al., 2010).

#### Objetivo general:

La presente investigación tiene como objetivo general evaluar la pertinencia del uso del cangrejo *Neohelice granulata* (Crustacea: Brachyura) como bioindicador de la calidad ambiental de sistemas estuariales.

Particularmente, se evalúa la distribución de metales pesados y sus efectos en las variables reproductivas de *N. granulata* en la laguna costera Mar Chiquita mediante estudios de campo y experimentos en laboratorio.

## CAPÍTULO I

**Distribución de metales pesados en la laguna costera**

**Mar Chiquita.**

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de los ecosistemas marinos ha aumentado a través de los años debido fundamentalmente a las actividades antrópicas. El desarrollo económico y demográfico de las regiones costeras a través de indicadores tales como el aumento de asentamientos urbanos, industriales y portuarios generó grandes descargas de agua en el mar. Los estuarios, caracterizados por una lenta tasa de intercambio relativo de sus aguas, son más susceptibles al ingreso de contaminantes. Estos ecosistemas costeros son complejos y dinámicos y tienen una gran importancia, tanto económica como ecológica, asociada a su gran biodiversidad (Simonetti, et al., 2012). Son sitios importantes para la conservación y producción, no sólo por su productividad pesquera, sino también por sus roles como áreas de cría para diversas especies de peces, y como sitios temporales para aves migratorias (Vasconcelos et al., 2011). En estos ecosistemas la productividad primaria es alta, y la eficiencia con la cual materia y energía son transferidas a los consumidores resulta de una alta productividad en los ambientes inmediatos o adyacentes (Beltrame et al., 2008; 2009).

En los estuarios, la existencia de diversos contaminantes a los que pueden estar expuestos los organismos, y en especial los invertebrados, los torna vulnerables. Estos organismos son capaces de incorporar y acumular metales pesados, esenciales o no esenciales, ya sea desde el agua, los sedimentos o mediante su alimentación, y es de esperar que puedan bioacumular dichos tóxicos en sus propios tejidos (Simonetti et al., 2012). La biodisponibilidad del metal para los invertebrados marinos está influenciada por un número de factores fisicoquímicos o extrínsecos (especiación del metal, salinidad y temperatura) como de factores biológicos o intrínsecos (tamaño, edad, dieta y sexo)

(Beltrame et al., 2009). Diferentes condiciones ambientales en los sistemas estuarinos pueden afectar la especiación del metal traza, la tasa de remoción y los flujos de los metales traza que se reciben del océano. De esta manera, los estuarios constituyen un reactor natural en el cual los procesos heterogéneos en la interfase entre la fase disuelta y el material particulado en suspensión (MPS) constituyen una parte importante de los ciclos biogeoquímicos de los elementos traza. Los procesos de redistribución son claves para la determinación de la movilidad y la toxicidad de los metales dentro de los estuarios y las lagunas costeras. La composición química del MPS en los estuarios está influenciada por los procesos de mezcla físicos, acompañados por procesos biogeoquímicos que ocurren en aguas transitorias. Asimismo, la composición química del MPS está relacionada con la composición química o mineralógica de los suelos subyacentes o sedimentos, los cuales son la fuente principal del MPS de estos sistemas. Los estuarios pueden ser eficientes filtros del MPS y de elementos traza, debido principalmente a la interacción partícula/soluto, floculación y coagulación, y sedimentación de las partículas de metales traza. La química estuarial es muy compleja debido a la intensa dinámica natural del ambiente, y a las reacciones heterogéneas e hidrodinámicas a escala temporal. Por ello, el comportamiento de metales traza no es un patrón universal dentro de los estuarios (Beltrame et al., 2009).

Los elementos traza de origen natural y/o antrópico, incluyendo los metales pesados, son transportados por los ríos y transferidos a los sistemas marinos costeros, incluyendo los estuarios. Dentro de los variados contaminantes, los metales son de interés particular debido a su alta persistencia, reciclado biogeoquímico y riesgo ecológico. Los metales como el Zn (zinc), Fe (hierro) y Cu (cobre) son nutrientes biológicos esenciales necesarios para el crecimiento de los organismos acuáticos. Estos micronutrientes pueden ser tóxicos en altas concentraciones. Otros metales, como Pb

(plomo) y Cd (cadmio), no son requeridos para el crecimiento y son altamente tóxicos en concentraciones traza. Por ejemplo, se ha estudiado que el Cd produce daños ecotoxicológicos en pequeñas concentraciones (Beltrame et al., 2008). Por lo tanto, los tipos y niveles de metales pesados que ingresan dentro de las lagunas costeras son críticamente importantes; por ello el monitoreo de los niveles de estos metales en los sistemas acuáticos resulta esencial (Beltrame et al., 2008; 2009).

La laguna costera Mar chiquita constituye un ambiente estuarino con un comportamiento muy particular de sus parámetros físico-químicos. En comparación con otros estuarios y áreas costeras, ésta laguna presenta un elevado ingreso de metales, tanto en las fases disueltas como en el material particulado.

Altas concentraciones de metales pesados, especialmente Zn, Cu y Pb han sido reportadas dentro de esta laguna (Marcovecchio et al., 2001, 2006; De Marco et al., 2004, 2006; Beltrame et al., 2007). También, se informaron altas concentraciones en la fase particulada de los metales Mn (manganeso) y Cr (cromo). Otros, como el Cd, fueron encontrados en niveles más bajos. La concentración de contaminantes reportados en los sedimentos de la laguna Mar Chiquita, en términos generales, es similar o mayor a la reportada en estudios realizados sobre otros sistemas estuariales (Bilos et al., 1998; Vazquez et al., 1998, 1999; Hatje et al., 2003; Wang y Liu, 2003; Zhou et al., 2003; Botté, 2005; Jiann et al., 2005; Censi et al., 2006; Duquesne et al., 2006; Beltrame et al., 2009; Fernández Severini et al., 2009; Botté et al., 2010; Marcovecchio et al., 2010; Feng et al., 2012; Zheng et al., 2013; Weng y Wang, 2014).

La actividad agrícola es considerada la principal responsable del impacto de los metales en la laguna; los altos niveles de Zn reportados estarían relacionados con el uso intensivo de agroquímicos y pesticidas dentro de su cuenca (Beltrame et al., 2009).

Teniendo en cuenta los antecedentes sobre el tema y la importancia del monitoreo de este estuario, se propuso contrastar la siguiente hipótesis:

- En la laguna costera Mar Chiquita, la distribución de los metales traza (Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn y Fe) varía entre los distintos compartimentos [agua de columna (AC), intersticial (AI) y del interior de las cuevas (ACu.), sedimentos y material particulado en suspensión (MPS)] y hábitats (ESPARTILLAR Y CONFLUENCIA).

Considerando las siguientes observaciones:

- La laguna Mar Chiquita se caracteriza por presentar diferentes condiciones ambientales (salinidad, pH, cobertura vegetal de las planicies de marea, concentración de nutrientes, entre otras) en sus diferentes hábitats.
- Se ha detectado la presencia de algunos metales pesados en matrices abióticas (agua de columna, agua intersticial, agua de cuevas, sedimentos y material particulado en suspensión) como bióticas en esta laguna costera.

Objetivo:

- Comparar la distribución de los metales pesados mencionados en diferentes hábitats de la laguna costera Mar Chiquita, y en cada una de las diferentes matrices analizadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron campañas de muestreo desde noviembre de 2009 a enero de 2011. Se eligieron dos sitios de muestreo, uno denominado Arroyo de los cangrejos (Espartillar) y el otro Confluencia o Puente CELPA (ver Marcovecchio et al., 2006). El primer sitio constituye un área predominantemente cubierta por *Spartina densiflora*, mientras que el segundo, es una planicie de marea descubierta, que se encuentra dentro del cuerpo principal de la laguna, próximo a la zona de la boca (**Fig. N° 1.1**).

En cada una de las campañas se tomaron muestras de agua de columna (AC), intersticial (AI) y del interior de las cuevas (ACu.), y de sedimentos. Los metales pesados analizados en cada una de las matrices se muestran en la **Tabla N° 1.1**

**FIGURA N° 1.1.** Sitios de muestreo: Espartillar (zona vegetada) y Confluencia (planicie de marea).



**TABLA N° 1.1.** Metales analizados en cada una de las matrices de los sitios de muestreo estudiados.

Metales	Agua de Columna	Agua Intersticial	Agua de Cuevas	Material Particulado en Suspensión (MPS)	Sedimento
<b>Cd</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Pb</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Cr</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Ni</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Cu</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Zn</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Fe</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Mn</b>	-	-	-	✓	✓

Toma de las muestras:

Las muestras de agua para la determinación de metales pesados se recolectaron en envases plásticos de PET (polietilentereftalato) con una capacidad de 1.5 lts, lavados previamente con agua más detergente no iónico, enjuagados varias veces con agua común, lavados con ácido nítrico al 0.7%, y enjuagados varias veces con agua destilada. Antes de la toma de las muestras, estos envases fueron enjuagados con agua del mismo sitio de muestreo.

Las muestras de AC se obtuvieron empleando directamente los envases plásticos, a una profundidad de ~15cm por debajo de la superficie del agua. Para la obtención de AI se realizaron varios pozos en planicies de marea de aproximadamente 40 cm de profundidad y 30 cm de ancho y se dejó drenar el agua en su interior. La misma fue recolectada mediante el uso de pipetas de 250 ml previamente acondicionadas. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en conservadoras

y en oscuridad. En el laboratorio las mismas fueron almacenadas a 4° C en oscuridad hasta su inmediato análisis. Para la toma de muestras de ACu, el agua fue recolectada directamente desde las mismas, utilizando las pipetas mencionadas anteriormente. Las muestras fueron transportadas en frío (8°C) inmediatamente hacia el laboratorio.

La toma de muestras de sedimento superficial se realizó empleando tubos tipo saca-testigos (corers) de PVC de 5 cm de diámetro y 15 cm de longitud, introduciéndolos hasta una profundidad de ~10cm. Luego las muestras fueron retiradas de los tubos, colocadas en bolsas plásticas, y transportadas hasta el laboratorio en conservadoras y en oscuridad.

#### Procesamiento de muestras de agua y material particulado en suspensión:

En el laboratorio, las muestras de agua fueron filtradas para la determinación de metales pesados, tanto en la fracción o matriz disuelta como en la fracción del material particulado en suspensión (MPS). Durante la filtración las muestras fueron mantenidas a 4°C y en oscuridad, para retardar la acción biológica y la posible hidrólisis de compuestos y complejos químicos. Cada muestra de agua filtrada fue recogida en envases de PET pre-acondicionados, acidificada hasta pH < 2 – utilizando ~1.5 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado por litro y conservada a 4° C hasta su análisis.

Para el filtrado se utilizaron membranas de acetato de celulosa, Millipore HAWP 04700, de 0.45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, previamente acondicionadas y pesadas en balanza analítica. Posteriormente, los filtros fueron secados hasta peso constante (48 hs) dentro de capsulas de Petri acondicionadas en estufa a 50 ± 5° C. Una vez secos los filtros con el material retenido, fueron pesados nuevamente en balanza analítica. De esta manera, por diferencia de pesos, se obtuvo el peso seco de la muestra de MPS. El volumen del filtrado varió entre 250-600 ml,

dependiendo de cada muestra. Finalmente, los filtros fueron colocados dentro de bolsas de polietileno hasta su posterior análisis (determinación de metales pesados en MPS).

#### Procesamiento de muestras de sedimento:

Las muestras fueron colocadas en cápsulas de Petri de vidrio acondicionadas y secadas en estufa a 60 °C, hasta su peso constante (72 hs aproximadamente). Una vez secas, los bioclastos y el material orgánico (animal o vegetal) fueron separados manualmente con pinzas plásticas, y las muestras homogeneizadas con un mortero de porcelana. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas dentro de un desecador para evitar el ingreso de humedad hasta su posterior análisis.

#### Metodología analítica:

##### *Determinación de metales pesados disueltos*

Para la determinación de los metales pesados disueltos Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn y Fe se siguió el método descrito por Botté et al. (2008), basado en el previamente propuesto por Koirtiyohann y Wen (1973), que consiste en la formación de un complejo metal-agente quelante y una extracción con solvente orgánico. Para esta determinación cada muestra de agua filtrada fue trasvasada a un erlenmeyer y el pH fue ajustado a 4, utilizando amonio o ácido clorhídrico según correspondiese. Luego fue colocada, por duplicado, una muestra de 500 ml en embudos de separación de vidrio borosilicato de 1000 ml de capacidad, a los que se les agregaron 10 ml de solución acuosa al 1% del complejo pirrolidín ditiocarbamato de amonio (APDC) y 20 ml del solvente orgánico metil isobutilcetona (MIBK). Se procedió a la agitación mecánica de las ampollas durante 30 minutos a velocidad media y se dejaron reposar aproximadamente 12 horas. Pasado este lapso se procedió a la separación de las fases orgánica y acuosa.

Para eliminar el error causado por las variaciones en el volumen de la fase orgánica, la misma fue recuperada en vasos de precipitado de 100 ml, los que se colocaron tapados con vidrios de reloj en plancha calefactora a 120° C hasta reducir su volumen a 8 ml aproximadamente. Luego los extractos obtenidos fueron trasvasados a tubos de centrífuga graduados con tapón esmerilado, enjuagando los vasos de precipitados y llevando a un volumen final de 10 ml con MIBK-saturado en agua.

En todos los casos la lectura de las muestras se realizó conjuntamente con 2 blancos de reactivos y 4 tratamientos con concentraciones crecientes conocidas, tal de obtener una curva de calibración para cada metal, procurando -en todos los casos- mantener la linealidad para asegurar la relación absorbancia-concentración (Ley de Lambert-Beer). El agua usada para preparar los blancos de reactivos y los estándares fue “agua libre de metales”, la cual se obtuvo realizando tres extracciones consecutivas (sobre la fase acuosa) al agua colectada en el ambiente bajo estudio.

#### *Determinación de metales pesados en MPS*

Las concentraciones de los metales Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn, Mn y Fe fueron determinadas mediante el método propuesto por Marcovecchio y Ferrer (2005). La metodología se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en las muestras por “mineralización húmeda” con una mezcla de ácidos. Se trabajó a temperatura controlada, con reducción del volumen hasta casi sequedad y luego dilución con ácido nítrico al 0.7%.

Para llevar a cabo esta determinación, los filtros de membrana con el MPS (peso conocido) fueron colocados en tubos de ensayo. A cada tubo se le agregaron 5 ml de ácido nítrico concentrado y 1 ml de ácido perclórico concentrado. La mineralización de las muestras se llevó a cabo en un baño de glicerina sobre una plancha calefactora, a una

temperatura de  $110 \pm 10^{\circ}\text{C}$  y agitando suavemente cada 20-30 minutos. En los casos en que fue necesario, se agregaron cantidades adicionales de ácido nítrico concentrado. Una vez completada la mineralización y obtenido un extracto de 1 ml aproximadamente, los tubos fueron retirados del baño y se dejaron enfriar. Cada extracto fue trasvasado con pipeta Pasteur a tubos de centrifuga graduados con tapa esmerilada. Cada tubo de ensayo fue enjuagado 3-4 veces con solución acuosa de ácido nítrico 0.7% v/v y cada enjuague fue trasvasado al tubo graduado enrasando a un volumen final de 10 ml.

En cada tanda de lectura se trabajó con dos blancos de reactivo y dos blancos de filtros de membrana sin muestra. Todos los blancos se trataron de igual forma que las muestras.

#### *Determinación de metales en sedimento*

La metodología utilizada fue la misma mencionada en el apartado correspondiente a metales en MPS. La cantidad de muestra utilizada en este caso fue de  $500 \pm 50$  mg.

#### Acondicionamiento del material:

- Todo el material utilizado durante la toma, procesamiento y análisis de las muestras en cada una de las matrices analizadas estuvo previamente acondicionado, mediante la metodología propuesta por APHA-AWWA-WEF (1998).
- Los reactivos utilizados en todos los casos fueron ultrapuros, para evitar cualquier tipo de contaminación e interferencias en las determinaciones.
- Todos los análisis se realizaron por duplicado.

La determinación de las concentraciones de metales en las matrices de MPS y sedimento fue realizada midiendo la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES, Perkin Elmer Optima 2100 DV). Para todos los metales se trabajó con visión axial, excepto para el Mn, que requirió el uso de visión radial.

La determinación de las concentraciones de metales (Cd, Cu, Pb, Zn, Ni, Fe y Cr) en muestras procesadas de agua se realizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin- Elmer AA-2380 (la mezcla de gases para la generación de la llama fue aire-acetileno).

Todos los análisis fueron realizados en el laboratorio de Química Marina, del Área de Oceanografía Química (AOQ) del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), Bahía Blanca.

#### Condiciones de lectura para cada metal por absorción atómica

Se utilizaron lámparas de cátodo hueco específicas para cada metal. En la **Tabla N° 1.2** se indican las condiciones de lectura para cada metal.

**TABLA N° 1.2.** Condiciones fijas de lectura por absorción atómica, para cada metal.

	<b>Longitud de onda</b> <b>(nm)</b>	<b>Hendidura</b> <b>(nm)</b>	<b>Energía lámpara</b> <b>(mA)</b>	<b>Tipo de llama</b>
<b>Cd</b>	228.8	0.7	4	azul oxidante
<b>Pb</b>	283.3	0.7	10	azul oxidante
<b>Cr</b>	357.9	0.7	27	amarilla reductora
<b>Ni</b>	232.0	0.2	33	azul oxidante
<b>Cu</b>	324.7	0.7	20	azul oxidante
<b>Zn</b>	213.8	0.7	17	azul oxidante
<b>Fe</b>	248.3	0.2	30	azul oxidante

Calibración y cálculos:

Para validar la eficiencia de la metodología empleada y la certidumbre de la determinación analítica realizada, se determinó la concentración de los metales pesados estudiados en material de referencia internacionalmente certificado (pond sediments, R.M. N°2) provisto por el National Institute for Environmental Studies (NIES), de Tsukuba, Japón. Los porcentajes de recuperación en los análisis de cada metal en el material de referencia se muestran en la **Tabla N° 1.3**.

La curva de calibración se construyó con los blancos y patrones utilizados en simultáneo en cada tanda de muestras, y para cada metal en particular. Se utilizó la recta de regresión obtenida como el mejor estimador de la curva de calibración.

**TABLA N° 1.3.** Porcentajes de recuperación en los análisis del material de referencia certificado (NIES) para determinar la calidad analítica (RANGOS).

<b>Metal analizado</b>	<b>Sedimentos</b>
<b>Cu</b>	95,5 – 99,4 %
<b>Zn</b>	97,4 – 101,5 %
<b>Cd</b>	91,4 – 99,3 %
<b>Pb</b>	94,7 – 98,8 %
<b>Cr</b>	96,9 – 99,8 %
<b>Fe</b>	97,4 – 101,3 %

Límite de detección y sensibilidad:

El límite de detección y la sensibilidad de cada metal fueron calculados para los extractos medidos bajo las condiciones estándares de lectura descriptas anteriormente.

El límite de detección del instrumento (LDI) queda definido como la mínima concentración que produce una absorbancia equivalente al doble de la magnitud de la fluctuación de fondo (APHA-AWWA-WEF, 1998) y que puede ser distinguida de un ensayo en blanco.

La sensibilidad de un instrumento para medir la concentración de un determinado elemento es la concentración que produce una señal de 1% de absorbancia.

El intervalo de concentración óptimo se refiere al rango de concentración de los estándares internos o de los patrones de trabajo, que se extiende desde varias veces la concentración del LDI hasta la concentración a la cual la curva de calibración empieza a ser plana. En este rango se conserva una relación lineal entre conservación y absorbancia. Estos parámetros se muestran en la **Tabla N° 1.4.**

**TABLA N° 1.4.** Límite de detección, sensibilidad y rango de concentración óptimo, expresados en µg/ ml de extracto.

	<b>Intervalo de concentración óptimo (µg/ ml)</b>	<b>LDI µg/ ml de extracto</b>	<b>Sensibilidad µg/ ml de extracto</b>
<b>Cu</b>	hasta 10	0.02	0.09
<b>Zn</b>	0.20 - 10	0.015	0.05
<b>Cd</b>	0.05 - 5	0.001	0.04
<b>Pb</b>	hasta 20	0.07	0.7
<b>Cr</b>	hasta 5	0.003	0.1
<b>Fe</b>	hasta 5	0.05	0.12
<b>Ni</b>	hasta 5	0.05	0.15

Límite de detección del método:

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

Para el cálculo de estos límites fueron tomados en cada caso 12 ensayos de blanco de reactivo sometidos a los mismos pasos de procesamiento de las muestras y se obtuvieron los valores de absorbancia. Con éstas fueron calculadas las concentraciones finales teniendo en cuenta los algoritmos específicos para cada método y matriz. Los LDM fueron calculados multiplicando la desviación estándar (DS) de las doce réplicas (n) por el valor apropiado obtenido de la tabla de “t- Student” para n-1 grados de libertad y un alfa de 0.01. Los LDM para cada metal en cada una de las matrices se muestran en la **Tabla N° 1.5**.

**TABLA N° 1.5.** Límite de detección del método (LDM), según el método aplicado en la matriz analizada.

Matriz		Cd	Pb	Cr	Ni	Cu	Zn	Fe
Disuelto	µg/ ml	0.01	0.02	0.04	0.04	0.02	0.08	0.15
	µg/L	0.18	0.38	0.89	0.81	0.44	1.6	3.10

Condiciones de lectura para cada metal por espectrofotómetro de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES)

Límites de detección y calidad analítica de datos:

El límite de detección del método (LDM) es la concentración mínima de un elemento que cuando es procesado completamente a través del método correspondiente puede ser detectada por encima del ruido de fondo con un nivel de confianza del 99%.

Para estimar los LDM de cada metal se trabajó con los resultados de la concentración de los diferentes metales obtenidos a partir de 10 blancos de reactivo, los cuales fueron sometidos a los mismos pasos de procesamiento de las muestras. Se calcularon las desviaciones estándar de los datos para cada metal y se incorporaron en la fórmula:

$$\text{LDM} = t(n-1, 1-\alpha) \times \text{DS}$$

donde:

**DS** es la desviación estándar obtenida de los 10 blancos de reactivo ( $n = 10$ ); y,

**t (n-1, 1- α)** es el valor obtenido de la tabla de “t-Student” para n-1 grados de libertad y  $\alpha$  de 0,01.

En el presente estudio los resultados obtenidos con concentraciones por debajo de este límite se reportan como “no detectados” (nd). Los LDM de la metodología analítica empleada para cada metal en la fracción particulada (MPS) ( $\mu\text{g/g}$ ) fueron:

<b>Matriz</b>	<b>Cd</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
<b>Fracción Particulada (MPS) (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	0.99	2.2	3.5	12	2.9	6.7	9.3	4.0

## RESULTADOS

Los siguientes resultados reflejan la presencia y distribución de los metales analizados en las diferentes matrices, en ambos sitios de muestreos, en el momento de captura de las hembras de *Neohelice granulata* para la determinación de las variables reproductivas en campo (Capítulo II). Por esta razón constituyen una referencia de la situación puntual y específica de muestreo. A pesar de ello, estos resultados serán comparados con los obtenidos en estudios previos realizados también en la laguna costera Mar Chiquita y servirán para poner en contexto la situación ambiental de este ecosistema en estudio.

### Metales pesados disueltos:

En la **Tabla N° 1.6** se muestran las concentraciones de **metales disueltos** en agua de columna (AC), intersticial (AI) y de cuevas (ACu.) provenientes de la planicie de marea (Confluencia) y del área vegetada (Espartillar). El Fe es el metal esencial encontrado en mayor concentración en todas las matrices analizadas, mientras que el Cd no presentó variaciones ni entre matrices ni entre sitios de muestreos, y fue detectado en concentraciones de 0.05 µg/ L.

En general, el orden de concentración de metales fue el siguiente: Fe > Zn > Cr > Cu > Ni > Cd > Pb; y las mayores concentraciones fueron encontradas en el agua proveniente de las cuevas de los cangrejos.

**TABLA N° 1.6.** Concentraciones ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ ) de metales disueltos encontrados en las distintas matrices muestreadas de la Laguna de Mar Chiquita en noviembre de 2009. \*nd= no detectable por el instrumento de medición.

Metal Analizado $\mu\text{g/L}$	Agua de Columna Espartillar	Agua de Columna Confluencia	Agua Intersticial Espartillar	Agua Intersticial Confluencia	Agua de Cuevas Espartillar	Agua de Cuevas Confluencia
<b>Cu</b>	1.4	3.11	2.28	1.50	2.38	3.26
<b>Zn</b>	nd *	nd *	nd *	nd *	49.55	nd *
<b>Cr</b>	0.50	3.70	2.96	nd *	0.01	4.44
<b>Ni</b>	nd *	1.89	nd *	1.17	2.03	0.45
<b>Fe</b>	10.13	nd *	nd *	2.46	278.64	273.84
<b>Pb</b>	nd *	nd *	nd *	nd *	nd *	nd *
<b>Cd</b>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

Metales pesados en sedimentos:

En la **Tabla N° 1.7** se expresan las concentraciones ( $\mu\text{g/ g}$  de muestra) de **metales pesados** encontrados en los **sedimentos** provenientes de los dos sitios de muestreo en primavera-verano 2009-2010. En general, el orden de concentración de metales fue el siguiente:  $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Cr}$ .

Las concentraciones más altas se registraron durante el verano, en ambos sitios de muestreo, lo cual puede estar asociado con una mayor descarga antrópica al ambiente, mayor contenido de materia orgánica en el sedimento y/o un aumento en el uso de productos agroquímicos provenientes de las áreas de cultivos. Asimismo, es importante tener en cuenta que durante el verano el comportamiento reproductivo de *N. granulata* requiere una mayor demanda metabólica, ya que entre otras actividades, los

cangrejos aumentan la tasa de remoción de los sedimentos en pos de la construcción y el mantenimiento de sus cuevas (Ituarte et al., 2004; Escapa et al., 2008).

**TABLA N° 1.7.** Concentraciones de metales en sedimento encontrados en las áreas muestreadas de la laguna Mar Chiquita en noviembre 2009 y febrero 2010. \*nd= no detectable por el equipo.

Metal Analizado	Estación Confluencia		Estación Espartillar	
	µg/g		µg/g	
	Nov. 2009	Feb. 2010	Nov. 2009	Feb. 2010
<b>Cd</b>	0.4895	2.3215	0.157	0.6795
<b>Pb</b>	5.779	13.5735	4.4585	6.217
<b>Cr</b>	nd *	nd *	nd *	nd *
<b>Ni</b>	nd *	nd* - 7.22	nd *	nd *
<b>Cu</b>	11.9035	18.42	9.2885	11.54
<b>Zn</b>	nd*- 13.14	38.1	3.863	nd * - 37.01
<b>Mn</b>	168.4	230.05	137.2	129.4
<b>Fe</b>	7963	13540	10066	8830.5

Metales pesados en material particulado en suspensión (MPS):

En cuanto a los **metales en MPS**, las mayores concentraciones se encontraron en el Espartillar, tanto en agua de cuevas como de columna. Tanto el Fe como el Mn presentaron los valores más altos; las concentraciones registradas fueron mayores al límite de detección del equipo. El orden decreciente de concentración de los metales fue el siguiente: Fe > Mn > Zn > Ni > Cr > Cu > Pb > Cd.

La **Tabla N° 1.8** expresa los resultados obtenidos del análisis realizado para la campaña de enero de 2011.

**TABLA N° 1.8.** Concentraciones de metales en material particulado en suspensión (MPS) encontrados en las áreas muestreadas de la laguna costera Mar Chiquita en enero de 2011. \*nd= no detectable por el equipo.

Metal Analizado	Estación Confluencia		Estación Espartillar	
	µg/g		µg/g	
	Agua de Cuevas	Agua de Columna	Agua de Cuevas	Agua de Columna
<b>Cd</b>	0.146	nd *	1.537	8.326
<b>Pb</b>	1.923	nd *	10.7	49.39
<b>Cr</b>	10.48	nd *	81.31	846.5
<b>Ni</b>	8.205	nd *	83.84	1032
<b>Cu</b>	8.507	nd *	38.54	109.2
<b>Zn</b>	14.95	nd *	156.4	2062
<b>Mn</b>	101	1206	229.6	924.1
<b>Fe</b>	5573	20310	12880	20950

## DISCUSIÓN

En las últimas décadas ha aumentado el interés por el estudio de los estuarios por diversos factores: i) su rol en el mantenimiento de la biodiversidad en el mar, especialmente de peces, ii) su significancia en la modificación del flujo de los elementos trazas o alcalinos desde la tierra al océano y iii) su importancia económica debido al desarrollo del transporte y de las actividades comerciales e industriales sobre los bancos de sus ríos (Amigo et al., 2012). La laguna costera Mar Chiquita, un estuario muy particular, recibe flujos de agua dulce provenientes del sistema de Tandilia; junto con ellos, una gran descarga de pesticidas, fertilizantes, metales particulados y disueltos provenientes de la intensa actividad agrícola desarrollada en el área adyacente a ésta (Kopprio et al., 2014); es por ello, que los resultados aquí presentes permiten conocer las concentraciones de metales en las distintas matrices de la laguna y relacionar sus posibles efectos sobre las variables reproductivas de *Neohelice granulata*, analizadas en los siguientes capítulos.

El análisis de las concentraciones de los **metales pesados disueltos** obtenidas en este estudio permite concluir que las mismas se encuentran dentro de los rangos ya informados por Beltrame et al. (2009). Los niveles de **Cd disuelto** no presentaron variaciones ni en AC, AI ni en ACu; y fueron menores al LDM ( $0.18 \mu\text{g. L}^{-1}$ ). Las concentraciones de **Cu disuelto** se encontraron entre  $1.4 - 3.26 \mu\text{g. L}^{-1}$ ; el **Pb disuelto** no fue detectado en las muestras, mientras que las concentraciones de **Zn, Fe, Ni y Cr** variaron entre nd – hasta  $\sim 49, 280, 2$  y  $4.4 \mu\text{g. L}^{-1}$  respectivamente. Todas las concentraciones fueron menores a las informadas por Beltrame et al. (2009), y en comparación con otros estuarios del mundo, afectados por las actividades antrópicas, y con diversos grados de contaminación (Botté, 2005; Hatje et al., 2003; Wang y Liu,

2003), la laguna Mar Chiquita presenta importantes concentraciones de metales pesados.

En cuanto a los **metales pesados en sedimentos**, se encontraron en concentraciones superiores al límite de detección. No se registraron diferencias significativas entre sitios de muestreos, pero las concentraciones más elevadas fueron medidas durante el verano.

El metal en mayor concentración fue el **Fe** ( $> 7963 \mu\text{g. L}^{-1}$ ), y en menor concentración se registraron el **Cd**, el **Ni** y el **Pb**. El **Cr** no fue detectado. A pesar de ello, los metales determinados en sedimentos presentaron concentraciones en varios órdenes de magnitud superior a los metales disueltos, al igual que lo registrado por Beltrame et al. (2009).

Los **metales pesados en MPS**, se presentaron en concentraciones superiores a las determinadas en las fases disuelta o en sedimento. Se registraron diferencias entre las matrices analizadas y entre los sitios de muestreo. En la matriz AC de Confluencia, la mayoría de los metales no fueron detectados. En cuanto al Espartillar, las mayores concentraciones de metales se registraron en AC, con respecto a ACu.; y entre sitios de muestreo, el Espartillar se caracterizó por presentar concentraciones de metales mayores, en varios órdenes de magnitud, en ACu.

Al igual que lo mencionado para las otras fases analizadas, las concentraciones de **metales en MPS** se encuentran dentro de los rangos informados por Beltrame et al. (2009), y en comparación con otros estuarios del mundo (Feng et al., 2002; Zhou et al., 2003; Jiann et al., 2005; Duquesne et al., 2006), las concentraciones registradas en la laguna costera Mar Chiquita, son elevadas.

Las desembocaduras de ríos, estuarios y zonas costeras funcionan como trampas de material particulado terrígeno, donde el 90% del MPS transportados por los ríos es depositado, y el 10 % restante es transportado hacia el mar (Martin et al., 1994). Las elevadas concentraciones de metales presentes en MPS, podrían deberse a la resuspensión de los mismos provenientes del sedimento, por acción de las corrientes y del viento que actúan en esta laguna somera. Asimismo, la poca profundidad hace que los metales resuspendidos queden disponibles en la columna de agua (Beltrame, 2008). Las formas inmovilizadas de los metales dentro del sedimento estuarial constituyen un riesgo potencial sobre la calidad del agua, ya que ellos pueden ser reincorporados al ambiente acuático debido a sus cambios químicos (cambios de la salinidad y/o de pH, actividad microbiana, etc.) (Botté et al., 2010).

Comparado con otros estuarios y áreas costeras del mundo, la laguna Mar Chiquita presenta un gran “*input*” de metales, tanto en la fase disuelta como en la particulada. Las actividades humanas, especialmente la agricultura, son consideradas como las principales responsables del ingreso de estos metales al ecosistema. La biodisponibilidad de los mismos está influenciada por varios factores (especiación del metal, salinidad, temperatura, características granulométricas del sedimento, etc.), todos ellos muy variables en esta laguna (Beltrame et al., 2009).

Si bien se sabe que estos ecosistemas tiene la capacidad de actuar como “*buffer*” frente a presiones externas (Marcovecchio et al., 1997, 2006), cambios de gran magnitud en algún parámetro ambiental, durante un tiempo prolongado pueden causar el deterioro irreversible del ambiente (Viaroli et al., 2007). Es por ello que se recomienda el monitoreo constante de esta laguna costera ya que los contaminantes son incorporados, bioacumulados y biomagnificados por los organismos a través de las

tramas tróficas, afectando no sólo el ambiente sino potencialmente también la salud humana.

## CAPÍTULO II

**Variables reproductivas en hembras de *Neohelice granulata* provenientes de diferentes hábitats de la laguna.**

## INTRODUCCIÓN

La reproducción en los crustáceos es un proceso complejo, regulado hormonalmente, el cual puede estar afectado por diversos compuestos xenobióticos (metales, TBT, pesticidas). El éxito reproductivo es uno de los factores claves que determina la supervivencia de las especies. Éste puede estar alterado por la presencia de contaminantes y manifestarse en cambios en la calidad y/o cantidad de gametas producidas, lo cual puede afectar la fecundación, el desarrollo embrionario, la viabilidad y supervivencia de larvas y consecuentemente el éxito reproductivo de las especies (Au et al., 2001).

Los metales pesados pueden afectar distintas etapas de este proceso (Revathi et al., 2011). Algunos de los efectos negativos causados por exposición de los crustáceos a los metales incluyen las siguientes manifestaciones: el zinc y el plomo producen severas alteraciones morfológicas durante el desarrollo embrionario y la eclosión larval, así como una mortalidad significativa en estadios larvales y postlarvales (Jackson et al., 2005). El cobre y el cadmio interfieren las hormonas que estimulan la reproducción y afectan el crecimiento del ovario (Medesani et al., 2004). Por su parte, el cobre afecta la capacidad de los machos de detectar hormonas femeninas para la formación de pares reproductivos (Krang y Ekerholm, 2006). El mercurio produce alteraciones morfológicas en los apéndices en regeneración (Weis et al., 1992) y retraso en el desarrollo embrionario (Sanchez et al., 2005).

En síntesis, los efectos subletales, producto de la exposición a los metales en el ambiente, se miden generalmente, como respuestas de uno o algunos sistemas bioquímicos o fisiológicos de los organismos. Sin embargo, la supervivencia de un individuo está determinada por una respuesta integrada del funcionamiento de todos sus sistemas (Hebel et al., 1997). Así, las respuestas pueden ser analizadas en diferentes niveles de organización, desde el molecular hasta el de organismos, desde lesiones físicas, hasta modificaciones en el comportamiento, que redundan en aspectos poblacionales. Las respuestas en el comportamiento pueden incluir reacciones de evasión, cambios en el comportamiento alimenticio, reproductivo y actividad locomotora (Hebel et al., 1997) y cambios en el cuidado parental de los embriones.

Los cangrejos costeros, particularmente Ocypodidae y Grapsoidea han demostrado ser excelentes especies centinela para el monitoreo de las condiciones de los hábitats costeros (Andersen y Melzer, 2004). Así, *Pachygrapsus crassipes* - un cangrejo grápsido intermareal- es un bioindicador efectivo de las condiciones del hábitat de marismas de la costa de California, tanto a pequeña como a gran escala. La exposición de embriones en desarrollo a niveles de contaminantes resultó en anomalías, fácilmente detectadas, las cuales son indicadoras de los efectos producidos por los contaminantes. Además, la frecuencia de las anomalías fue mayor en la porción externa de las masas ovígeras analizadas, lo que sugiere que esto se debe a que la misma está en contacto directo con el sedimento. La demografía (tamaño poblacional, tallas y proporción de sexos) en la población estudiada, fue un indicador pobre de los efectos tóxicos en los cangrejos de esa especie. Se ha informado que las variables reproductivas tales como, el rendimiento reproductivo, el tamaño del embrión, el tiempo de desarrollo, las anomalías en el desarrollo, el éxito en la eclosión y la supervivencia de las

larvas difieren acorde al grado de contaminación presente en tres marismas estudiadas. Los metales, y otros contaminantes se relacionaron con la prevalencia de anomalías en el desarrollo entre áreas vegetadas y no vegetadas y lodosas (Morgan et al., 2006).

La característica más sobresaliente de las planicies de la laguna costera Mar Chiquita, es la presencia de cuevas abiertas y semipermanentes construidas por el cangrejo cavador *Neohelice granulata*, considerado “ingeniero ecosistémico”, cuya actividad incrementa la oxigenación de los sedimentos, aumenta el drenaje y altera las propiedades físicas y el contenido de materia orgánica (Botto e Iribarne 2000; Menone et al., 2006; Canepuccia et al., 2008; Escapa et al., 2008; Daleo e Iribarne, 2009; Fanjul et al., 2011; Méndez Casariego et al., 2011). Los cangrejos que se encuentran en las planicies son alimentadores de depósito pero cambian su dieta y se comportan como herbívoros cuando se encuentran habitando las áreas vegetadas (Iribarne et al., 1997). La biología de este cangrejo, incluyendo su historia de vida, los parámetros demográficos, la reproducción y su papel ecológico ha sido ampliamente estudiada por varios autores (Spivak et al., 1994, 1996; Bas y Spivak 2000, 2003; Giménez y Anger, 2001; Luppi et al., 2002, 2004; Ituarte et al., 2004, 2006; Bas et al., 2005, 2007, 2008, 2009; Silva et al., 2007, 2009; Anger et al., 2008; Beltrame et al., 2009, 2011; Spivak 2010; Sal Moyano et al., 2012; 2014).

Además, se han realizado estudios toxicológicos sobre individuos de la población de esta especie en el estuario del Río de la Plata, que permitieron determinar efectos letales y crónicos en larvas, juveniles y adultos, así como también daños en células y órganos vitales debidos a la exposición a diferentes metales pesados (Rodríguez et al., 2007). Por otra parte, se ha determinado la presencia de metales pesados en los cangrejos presentes en la Bahía de San Antonio, Río Negro (Gil et al.,

2006), mientras que Beltrame et al. (2009), estudiaron por primera vez los efectos de zinc y cadmio en la supervivencia de individuos de esta especie en Mar Chiquita. En síntesis, algunos aspectos de las respuestas fisiológicas de *N. granulata* a la exposición de diferentes metales han sido estudiadas por: Amin et al. (1998), Vitale et al. (1999), Kogan et al. (2000), Pinho et al. (2000), Ferrero et al. (2001), López Greco et al. (2001), Medesani et al. (2004), Sánchez et al. (2005), Vázquez (2005), Ferrer et al. (2006), Rodríguez et al. (2007), Beltrame et al. (2008, 2009).

El gran volumen de información publicada acerca de la biología de *Neohelice granulata*, la dinámica de la laguna costera Mar Chiquita –el ecosistema bajo estudio-, el papel ecológico en diferentes marismas de la costa argentina, y los resultados de la exposición a diferentes metales se ha convertido en el marco referente para realizar este estudio y así incorporar un parámetro efectivo de medición a tener en cuenta para una propuesta integrada de conservación y manejo del ecosistema.

Objetivo:

- Comparar variables reproductivas de hembras de *Neohelice granulata* provenientes de diferentes hábitats de la laguna (una región vegetada y una planicie de marea descubierta).

En particular, interesa analizar los índices gonadosomático y hepatosomático, el rendimiento reproductivo, la fecundidad y el peso seco, tamaño y volumen de los embriones en la masa ovígera.

Las hipótesis planteadas en el marco de este capítulo son:

- Los índices gonadosomático y hepatosomático y las variables reproductivas (rendimiento reproductivo, fecundidad y peso seco, tamaño y

volumen de los embriones en la masa ovígera) de hembras de *N. granulata* difieren de acuerdo a los hábitats estudiados (región vegetada: Espartillar y planicie de marea descubierta: Confluencia) y entre las estaciones del año (primavera y verano).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para comparar las variables reproductivas entre los dos hábitats, Espartillar (área vegetada) y Confluencia (planicie de marea), se recolectaron manualmente hembras en estadio ovígero en las campañas de noviembre de 2009 (primavera) y febrero de 2010 (verano) (N= 20) (**Fig. N° 1.1.** Capítulo I). Aquellos organismos que presentaban pérdidas de miembros u otras anomalías fueron descartados. Se midió la salinidad en la columna de agua en cada sitio de muestreo, para tener un valor de referencia.

Los cangrejos fueron transportados al laboratorio en recipientes plásticos, cubiertos con agua y con sedimento proveniente de los sitios de muestreo. Una vez allí, fueron colocados sobre hielo con el fin de crioanestésarlos.

Se tomaron medidas de precaución para prevenir la contaminación de las muestras durante la disección, de manera que todo el material utilizado fue lavado previamente con ácido nítrico y acondicionado, siguiendo las recomendaciones propuestas por APHA-AWWA-WEF (1998).

Se analizaron 10 hembras provenientes de cada hábitat, a cada una se le midió el ancho de caparazón (AC), el cual se tomó como variable de referencia. Se realizó cuidadosamente la disección de cada hembra, y se le extrajo el ovario y el hepatopáncreas. Ambos órganos fueron secados a estufa a 80°C durante 48 hs para la determinación del índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS). En ambos casos, los índices se calcularon como la proporción entre el peso seco del órgano (ovario o hepatopáncreas) y el peso seco total del organismo incluyendo dichos órganos (Ituarte et al., 2006).

A cada hembra se le identificó el estadio de desarrollo del ovario según Ituarte et al. (2004):

**Estadio I:** ovario filiforme y translúcido, gris pálido;

**Estadio II:** ambos ovarios son tubulares, filamentosos y angostos; naranjas, rojos o marrones;

**Estadio III:** ambos ovarios son filamentosos, tubulares y más anchos, pero sin diferencias entre la región anterior y posterior; a veces granulares, marrones a violetas;

**Estadio IV:** la región anterior expandida, cubriendo parte del estómago cardíaco o hepatopáncreas; la región posterior con filamentos visibles; siempre granular; naranjas a violetas;

**Estadio V:** todo el ovario expandido cubriendo el estómago cardíaco o hepatopáncreas; siempre granular; bordó a violeta oscuro.

De acuerdo con la clasificación descrita por Bas y Spivak (2000) se estableció el estadio de desarrollo de los huevos con embriones en:

temprano (estadios I, II y III),

intermedio (estadios IV, V y VI)

tardío (estadios VII, VIII, IX).

**Estadio I:** el vitelo ocupa el 100% del volumen, no se observan estructuras.

**Estadio II:** Aparecen dos comisuras blancas en un extremo, primer indicio de embrión.

**Estadio III:** Las comisuras se unen formando una media luna blanca. 95-90 % del volumen ocupado por vitelo.

**Estadio IV:** Se distinguen rudimentos de apéndices. 80-60 % del volumen ocupado por vitelo.

**Estadio V:** Aparecen los ojos, como líneas rojizas. 50 % del volumen ocupado por vitelo.

**Estadio VI:** el vitelo tiene forma de trébol, aparecen cromatóforos, los ojos comienzan a redondearse. Latido cardíaco claro. 40 % del volumen ocupado por vitelo.

**Estadio VII:** el vitelo está distribuido en dos masas centrales 30 % del volumen ocupado por vitelo.

**Estadio VIII:** Hay movimientos larvales. Los ojos y cromatóforos están totalmente formados. < 20 % del volumen ocupado por vitelo.

**Estadio IX:** sin vitelo, listos para eclosionar.

El resto del exoesqueleto, y su contenido, fue secado en estufa a 80 °C durante 48 hs, para obtener el peso seco de la muestra.

#### Análisis de las variables reproductivas

La estimación de las variables reproductivas se realizó de acuerdo con Stella et al. (1996), Lardies y Castilla (2001) y Brante et al. (2003).

Rendimiento reproductivo: Se estimó como la razón entre el peso de la masa ovígera y el peso de la hembra (Hines, 1982).

Fecundidad: Se tomaron submuestras de 500 huevos frescos del borde de cada masa de embriones, se contaron bajo el microscopio, se lavaron con agua destilada y se transfirieron a mini cápsulas para su secado en estufa a 80°C durante 24 hs. La fecundidad de cada hembra se estimó extrapolando la razón entre el número de huevos y el peso seco de la muestra con respecto al peso de la masa ovígera total.

Peso seco de la masa de embriones, tamaño y volumen de los huevos: Se determinó el peso seco de la masa ovígera de cada hembra de los diferentes hábitats. Las muestras fueron lavadas con agua destilada y secadas en estufa a 60 °C durante 48 hs. El volumen medio (mm<sup>3</sup>) de los embriones se estimó a partir de embriones obtenidos al azar de la masa ovígera. Se midió el diámetro mayor y menor de cada embrión. El volumen del embrión se calculó como el volumen de una esfera y se estimó el valor medio de cada submuestra.

Tratamiento estadístico: Todos los datos fueron contrastados para normalidad y homocedasticidad. Se utilizó la transformación arcoseno para los valores porcentuales (Zar, 1999). Las diferencias entre el rendimiento reproductivo, la fecundidad, el volumen y número de huevos, y peso seco de los embriones entre los diferentes hábitats se compararon mediante test de ANOVA paramétrico o no paramétrico según correspondiese. En el caso de que las diferencias resultaran estadísticamente significativas, se aplicó el test de Tukey o de Kruskal-Wallis según correspondiese (Zar, 1999).

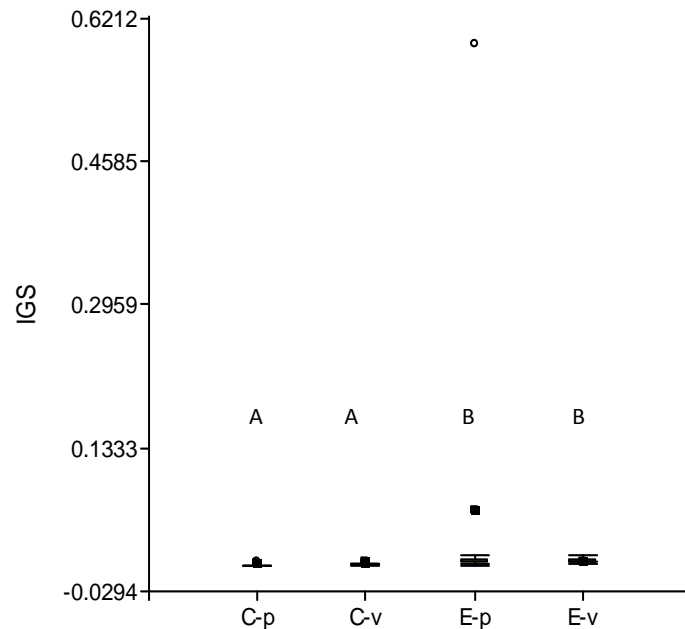
## RESULTADOS

La salinidad en la columna de agua en el muestreo de primavera fue de 34 ups para la zona del Espartillar (área vegetada) y 30 ups para Confluencia (planicie de marea); en el muestreo de verano, la salinidad fue de 28 ups en el Espartillar y 30 ups en Confluencia. Éste último muestreo fue posterior a un día de lluvia y tormenta.

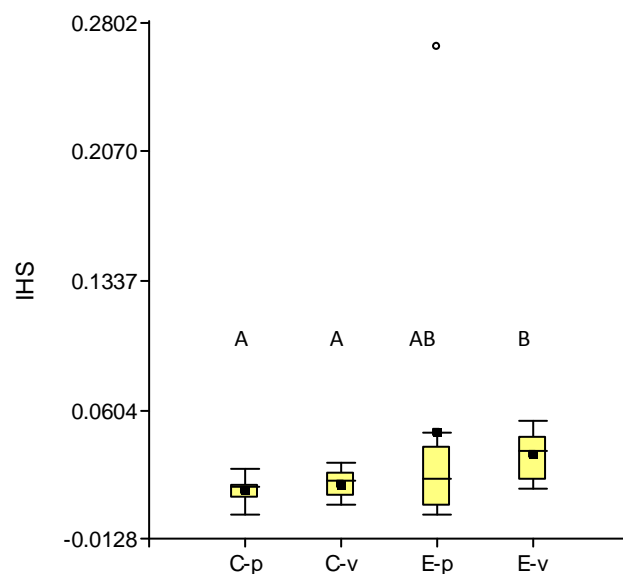
Las hembras correspondientes al **Espartillar** se caracterizaron por presentar tallas de ancho de caparazón (AC) entre  $22-30 \pm 2.28$  mm, **ovarios** en **estadios I, II y III** de madurez y **embriones** en estadios **tempranos, intermedios y tardíos** de desarrollo. Respecto del cangrejal de **Confluencia**, las hembras presentaron tallas menores (AC:  $18-27 \pm 2.69$  mm), los **ovarios** analizados se encontraron más en **estadios I y II** de desarrollo, y los **embriones** presentaron, al igual que los del Espartillar, los **tres estadios** de desarrollo. Durante los análisis se observó que en las hembras del Espartillar, los ovarios en **estadio I** se encontraron más frecuentemente en noviembre que en febrero; estas diferencias no se observaron en la zona de **Confluencia**. En cuanto al desarrollo embrionario, se observó que los huevos en **estadio I** fueron más frecuentes en el Espartillar, mientras que en Confluencia se encontraron en mayor frecuencia huevos en **estadio III**.

Por otra parte, se observaron diferencias significativas para los valores de los **IGS** calculados entre hábitats (Confluencia y Espartillar) (**Fig. N°2.1**. ANOVA,  $F = 18.16$ ,  $p < 0.0001$ ,  $gl = 37$ ,  $N_{total} = 40$ ), pero no entre las épocas de muestreo (primavera - verano) (**Fig. N° 2.1**. ANOVA,  $F = 0.25$ ,  $p > 0.05$ ,  $gl = 37$ ,  $N_{total} = 40$ ). En tanto, para el **IHS** se observaron diferencias significativas tanto entre Confluencia y Espartillar, como entre épocas de muestreo (**Fig. N° 2.2**. Kruskal-Wallis,  $H = 9.21$ ,  $p < 0.05$ ,  $gl = 3$ ,  $N_{total} = 38$ ).

**FIGURA N° 2.1.** *Neohelice granulata*. Índices gonadosomáticos (IGS) de las hembras provenientes de los dos cangrejales (Espartillar y Confluencia) en dos épocas de muestreo (primavera – verano). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).



**FIGURA N° 2.2.** *Neohelice granulata*. Índices hepatosomáticos (IHS) de las hembras provenientes de los dos cangrejales (Espartillar y Confluencia) en dos épocas de muestreo (primavera – verano). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). E: Espartillar; C: Confluencia; p: primavera; v: verano.

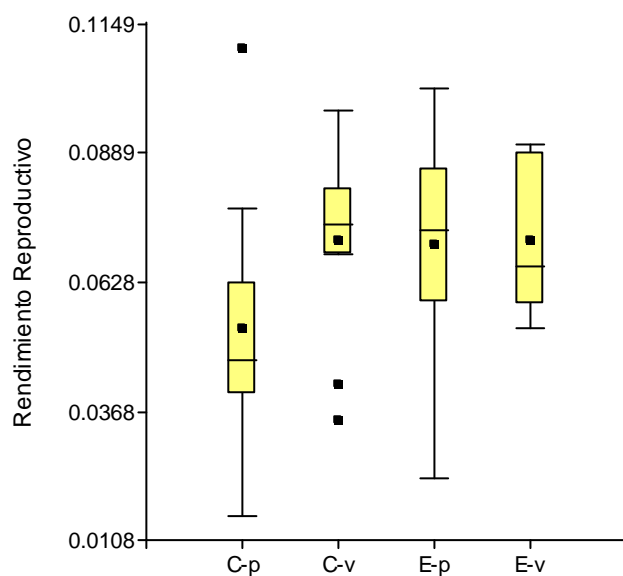


## Análisis de las Variables Reproductivas

### Rendimiento reproductivo:

Los valores del rendimiento reproductivo de las hembras no mostraron diferencias significativas entre hábitats (**Fig. N° 2.3.** ANOVA,  $F= 1.56$ ,  $p > 0.05$ ,  $gl= 37$ ,  $N_{total}=40$ ), ni entre épocas de muestreos (**Fig. N° 2.3.** ANOVA,  $F= 1.78$ ,  $p > 0.05$ ,  $gl= 37$ ,  $N_{total}=40$ ).

**FIGURA N° 2.3.** *Neohelice granulata*. Rendimientos reproductivos de las hembras provenientes de los dos cangrejales (Espartillar y Confluencia) en dos épocas de muestreo (primavera – verano). E: Espartillar; C: Confluencia; p: primavera; v: verano.

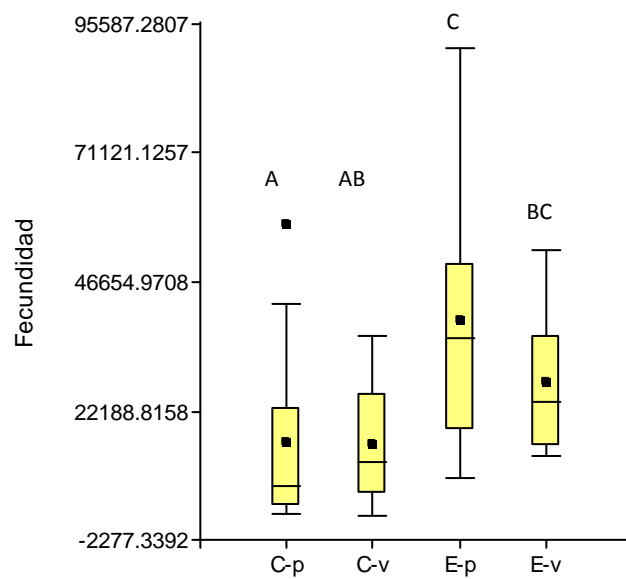


### Fecundidad:

El cálculo de la fecundidad fue estimado para un total de 20 hembras provenientes de cada cangrejal (10 capturadas en primavera y 10 en verano).

El análisis de los valores de fecundidad indica diferencias significativas entre los dos cangrejales y entre épocas de muestreo (**Fig. N° 2.4**, Kruskal- Wallis, H: 9.79,  $p < 0.05$ ,  $gl= 3$ ,  $N_{total} = 40$ ).

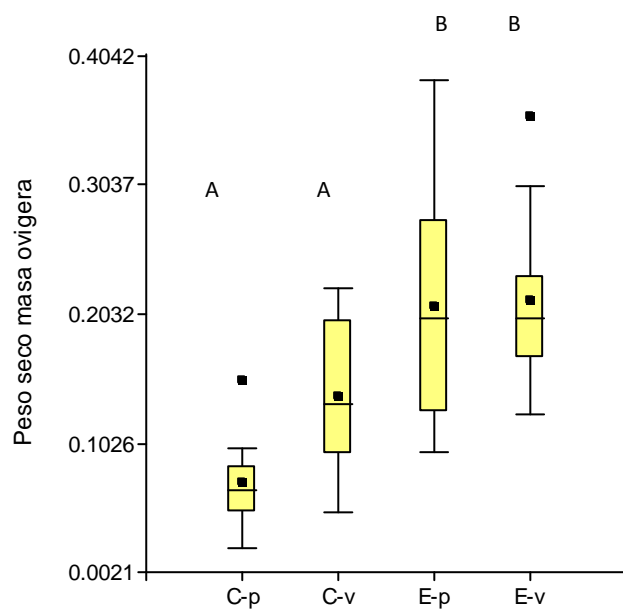
**FIGURA N° 2.4.** *Neohelice granulata*. Fecundidades de las hembras provenientes de los dos cangrejales (Espartillar y Confluencia) en dos épocas de muestreo (primavera – verano). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). E: Espartillar; C: Confluencia; p: primavera; v: verano.



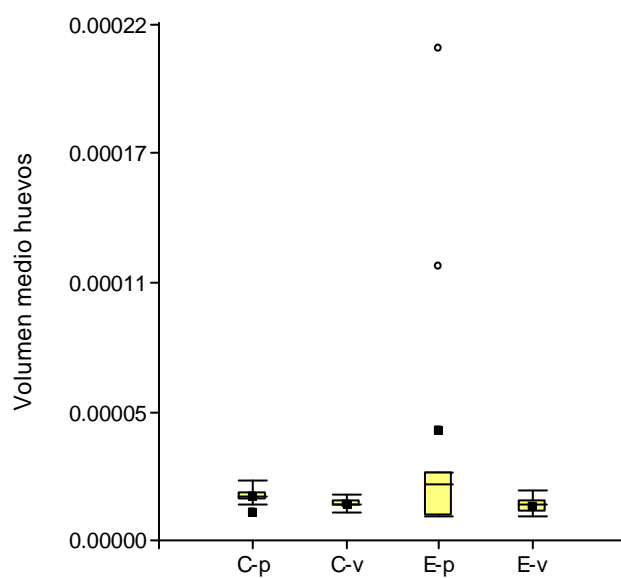
Peso seco de la masa de embriones, tamaño y volumen de los huevos:

El análisis del peso seco de la masa ovígera demostró que sólo hay diferencias significativas entre Confluencia y Espartillar (**Fig. N° 2.5**, ANOVA,  $F= 23.11$ ,  $p < 0.0001$ ,  $gl= 37$ ,  $N_{total} = 40$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el volumen medio de los huevos ni entre hábitats ni entre épocas muestreadas (**Fig. N° 2.6**, Kruskal – Wallis,  $H= 5.54$ ,  $p > 0.05$ ,  $gl= 3$ ,  $N_{total} = 40$ ).

**FIGURA N° 2.5.** *Neohelice granulata*. Pesos secos de la masas ovígeras de las hembras provenientes de los dos cangrejales (Espartillar y Confluencia) en dos épocas de muestreo (primavera – verano). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). E: Espartillar; C: Confluencia; p: primavera; v: verano.



**FIGURA N° 2.6.** *Neohelice granulata*. Volumen medio de los huevos de las hembras provenientes de los dos cangrejales (Espartillar y Confluencia) en dos épocas de muestreo (primavera – verano). E: Espartillar; C: Confluencia; p: primavera; v: verano.



## DISCUSIÓN

En los crustáceos, la duración y frecuencia del ciclo del ovario (maduración del mismo) puede variar entre poblaciones de una misma especie, y estas variaciones son más notables si la especie tiene un amplio rango de distribución o si las condiciones ambientales son muy variables dentro de ese rango. Entre los factores ambientales que producen efectos en el ciclo del ovario y en la estación reproductiva, se destacan la temperatura, el fotoperiodo, la salinidad, la disponibilidad de alimento, estructura del hábitat (sustrato), entre otros; todos parámetros con muy amplio rango de variación estacional y diario, en la laguna costera de Mar Chiquita (Ituarte et al., 2004; Beltrame et al., 2008, 2009). El desarrollo ovárico, proceso regulado por hormonas, sirve como indicador del estado de las gónadas y puede ser determinado a través de la variación del índice gonadosomático (IGS). Por otro lado, el rol del hepatopáncreas también es de vital importancia en los crustáceos, es el principal órgano de detoxificación y de almacenamiento de una gran cantidad de metales (Pourang et al., 2005; Martín-Díaz et al., 2006; Beltrame et al., 2008, 2009; Revathi et al., 2011; Lauer et al., 2012). En los decápodos, su adecuado funcionamiento es importante para la salud, el crecimiento y la supervivencia (Beltrame et al., 2009). La relación entre el desarrollo del ovario y el hepatopáncreas, y su dependencia con los procesos regulados por hormonas, hacen del hepatopáncreas objeto de estudio al mismo tiempo que el ovario, motivo por el cual el índice hepatosomático (IHS) también puede utilizarse como un buen indicador (Martín-Díaz et al., 2006).

Las actividades reproductivas de las hembras de cangrejos braquiuros comienzan antes de la muda de madurez; el crecimiento inicial y el desarrollo de los ovocitos están sustentados por material autóctono (**vitelogénesis primaria**), y después de la muda, el

crecimiento de los ovocitos involucra la contribución del material alóctono (**vitelogénesis secundaria**) (Ituarte et al., 2004).

Ha sido demostrado, al menos en algunas especies, que las reservas almacenadas en el hepatopáncreas son movilizadas hacia el ovario durante la vitelogénesis secundaria. Las hembras de estos cangrejos son capaces de tener varias puestas durante el período de intermuda, desarrollando nuevas cohortes de ovocitos una vez que los huevos fecundados fueron extruidos. De esta manera, las hembras ovígeras pueden tener ovarios en vitelogénesis primaria o secundaria. Cuando la eclosión finaliza, la vitelogénesis secundaria de la segunda cohorte se completa casi totalmente, así una nueva puesta de huevos puede ser extruida (Ituarte et al., 2006).

En el presente estudio, ambos índices calculados, IGS e IHS presentaron diferencias significativas. El IGS varió entre hábitats (Espartillar y Confluencia), lo cual podría deberse a diferencias en la madurez de los ovarios, lo que implica diferencias en su desarrollo y peso. En este estudio se observó que los ovarios correspondientes a las hembras del área vegetada (Espartillar) se encontraron más desarrollados que los de las hembras de la planicie de marea (Confluencia). Ituarte et al. (2006) reportaron que *N. granulata* se reproduce durante la primavera, el verano y hasta comienzos del otoño; las hembras presentan ovarios maduros durante el invierno alcanzando diferentes estadios de desarrollo a lo largo la estación reproductiva, por lo cual el tamaño de los mismos y el peso se ven modificados.

En cuanto al IHS, se detectaron diferencias tanto entre hábitats como entre épocas de muestreo (primavera-verano). Los valores más altos pertenecen a la región del Espartillar, durante el verano. Como los cangrejos de ambos sitios difieren en su modo trófico y en la tasa de procesamiento del sedimento (los cangrejos de las

planicies de marea presentan una alimentación primordialmente del tipo detritívora mientras que los de las áreas vegetadas mayoritariamente del tipo herbívora) las diferencias encontradas en este índice podrían relacionarse a variaciones en la cantidad de reservas acumuladas en el hepatopáncreas; como lo sugiere también Beltrame et al. (2008, 2009).

En estudios realizados en la laguna Mar Chiquita, Ituarte et al. (2004) han encontrado diferencias en ambos índices, al comienzo del ciclo reproductivo de las hembras. También se han encontrado diferencias entre áreas geográficas distantes (San Antonio, Río Negro - Mar Chiquita, Buenos Aires), y en diferentes momentos del ciclo reproductivo. Las hembras ovígeras presentan un IHS más bajo que las hembras no-ovígeras, lo cual se debería a que las hembras ovígeras administran su energía entre el mantenimiento, el desarrollo de los ovocitos y el cuidado parental (ej: batido del pleon para oxigenación de la masa de huevos, limpieza de los mismos); todas estas actividades ocurren de manera simultánea, con lo cual las reservas energéticas almacenadas en el hepatopáncreas están dirigidas para abastecer dicha demanda (Ituarte et al., 2006).

En base a estos antecedentes, se puede sugerir que las diferencias aquí encontradas podrían estar relacionadas a: a) Diferencias tróficas; b) Diferencias en el estadio de desarrollo gonadal (ovarios más maduros, presentan mayor tamaño y peso) y c) Diferencias en la cantidad de reservas energéticas y/o a la concentración metales almacenados en el hepatopáncreas, lo cual también influye en el peso de éste órgano. Futuros estudios serán necesarios para abordar este último ítem.

La presencia y dinámica de algunos metales pesados en la laguna costera Mar Chiquita ha sido estudiada por Beltrame et al. (2008, 2009). Su concentración en los diferentes compartimentos (material particulado en suspensión,

sedimento o columna de agua) es fluctuante a lo largo del año (mayores concentraciones detectadas durante la primavera y el verano). Los metales pesados, presentan un comportamiento y una distribución diferencial en su concentración entre planicies de marea y áreas vegetadas. La fase disuelta es el principal medio de transporte de Cd, Cu, Ni, Pb y de C orgánico, mientras que el Fe y Mn son transportados en la fase particulada. Las concentraciones de Zn, Ni y Cu en material particulado en suspensión o disuelto son mucho más elevadas, en comparación con otros ambientes contaminados (Beltrame et al., 2009).

A pesar de ello, la biodisponibilidad de los metales es similar en ambos cangrejales (Beltrame et al., 2009), aunque se ha encontrado, por ejemplo, que el Zn se concentra más en el hepatopáncreas de las hembras que en el de los machos (Beltrame et al., 2009). El período reproductivo genera un gran consumo de energía, produciendo un decrecimiento estacional en la capacidad de detoxificación, lo cual favorecería la bioacumulación del metal en dicho órgano (Beltrame et al., 2009).

Los metales pesados acumulados en el organismo afectan de manera diferencial a los órganos, por ejemplo: la acumulación de Zn en el hepatopáncreas produce pérdida de peso y disminución del crecimiento de los crustáceos, se han detectado efectos de este metal tanto en embriones (aumento de la mortalidad, disminución del tiempo de desarrollo embrionario, anomalías morfológicas en las larvas, etc.) como en adultos (disminución del peso corporal, prolongación del periodo de intermuda, etc.), lo cual finalmente afecta su desarrollo y reproducción. Metales como el Cd y el Hg, producen alteraciones en el desarrollo gonadal. Por ejemplo, el Cd inhibe la muda, produce alteraciones patológicas en los ovocitos primarios y secundarios en juveniles de *Neohelice granulata* (Kogan et al., 2000; Beltrame et al.,

2009). También produce daños estructurales en el hepatopáncreas, los cuales afectan las funciones de absorción, secreción y digestión (Revathi et al., 2011). El Cu produce efectos fisiológicos y bioquímicos, afecta la glucólisis, el Ciclo de Krebs, la excreción de amonio, el consumo de oxígeno, el crecimiento, etc. (Lauer et al., 2012) y provoca anormalidades morfológicas en *N. granulata* (Beltrame et al., 2009). La presencia de metales como Pb y Zn en los huevos de las hembras ovígeras se ha podido relacionar con el mecanismo de detoxificación y transferencia de la hembra (Lavradas et al., 2014).

En cuanto al rendimiento reproductivo, no se encontraron diferencias significativas entre las hembras provenientes de ambos cangrejales en las distintas épocas de muestreo. Resultados similares fueron registrados por Silva et al. (2009) en su estudio realizado en los mismos cangrejales; y en estudios anteriores que compararon distintas poblaciones de la misma especie (Stella et al., 1996; Luppi et al., 1997; Bas et al., 2007).

La fecundidad ha sido tradicionalmente definida como el número de huevos puestos por hembra y ha permitido estudios comparativos entre poblaciones de la misma especie a nivel intraespecífico o entre taxones superiores. En *N. granulata*, la fecundidad puede variar ampliamente entre poblaciones, estaciones y años. Los resultados del presente estudio demuestran que hay diferencias significativas entre los valores medidos para cada cangrejal durante el verano; los valores mayores se obtuvieron en las hembras del Espartillar. A diferencia de lo encontrado por Silva et al. (2009) en la población de Mar Chiquita, y por Barutot et al. (2009) en la población de la Lagoa dos Patos, en Brasil, en cuyos resultados mencionan que la fecundidad no presentó diferencias significativas entre los diferentes hábitats estudiados.

Al analizar los valores del peso seco de la masa ovígera, sólo se detectaron diferencias entre hábitats. Los mayores pesos secos fueron encontrados en los huevos de las hembras del Espartillar; mientras que el volumen de los mismos no difirió ni entre ni dentro de los hábitats en primavera y verano.

Efectos estacionales han sido identificados como otro recurso de la variación intraespecífica en la reproducción de invertebrados marinos en poblaciones separadas (ej.: en el número y tamaño de los huevos, en la composición bioquímica de los embriones, en la fecundidad, etc.) (Bas et al., 2008).

El tamaño, la biomasa y la composición de los huevos y larvas son caracteres de historia de vida relevantes de las especies. Tamaños y biomasas grandes, aumentan las probabilidades de los descendientes a sobrevivir, debido a la capacidad para la alimentación y/o para resistir a los periodos de inanición. Variaciones en estos caracteres pueden tener una base genética, o pueden representar una respuesta plástica a variaciones en las condiciones ambientales, en cuyo caso es considerado como adaptativo, si el *fitness* de los embriones o larvas aumenta. Los huevos que portan las hembras de *N. granulata* están expuestos a un amplio rango de temperaturas dado que, los ambientes intermareales, donde viven los adultos muestran fuertes variaciones diarias y estacionales en la temperatura del aire, y como en todos los animales ectotermos, el tiempo de desarrollo embrionario se incrementa con el descenso de la temperatura (Bas et al., 2008). La temperatura y la salinidad son factores que pueden afectar la producción de huevos, la embriogénesis y la calidad de las larvas de los crustáceos. Estos factores son muy variables en Mar Chiquita, pero el grado de variación difiere entre hábitats, y es más estable en las regiones vegetadas que en las planicies de marea (Silva et al., 2009).

La variabilidad intraespecífica en el número y tamaño de los huevos producidos por especies de invertebrados bajo condiciones ambientales oscilantes puede resultar para la optimización de los recursos energéticos destinados a crecimiento y reproducción, así como a supervivencia, dispersión o reclutamiento de los descendientes. Algunas diferencias han sido relacionadas a gradientes de temperatura latitudinal, a variaciones interanuales de temperatura, a variación regional de la salinidad, entre otros factores (Bas et al., 2007).

En este estudio, las diferencias encontradas en las variables reproductivas de las hembras provenientes de los dos cangrejales con características distintivas, están relacionadas con la fecundidad y el peso seco de la masa de huevos. En el Espartillar, el número de huevos por puesta, por hembra, fue mayor, por lo cual su masa ovígera fue de mayor peso que las de Confluencia. Estas diferencias podrían deberse a la pérdida de huevos de la masa ovígera. En los crustáceos decápodos, dicha pérdida está asociada con temperaturas y salinidades extremas, el efecto de parásitos en los huevos, predadores e infecciones microbianas. Las hembras ovígeras de *N. granulata* pierden parte de sus huevos, quizás, como consecuencia del cierre incompleto del pleon, quedando así parte de la masa ovígera en contacto directo con el entorno (Silva et al., 2007, 2009).

La variabilidad encontrada en el mismo hábitat y en diferentes meses, podría deberse a variaciones en pequeña escala de factores físicos (salinidad, ph, temperatura, régimen de lluvias, etc) tal como lo sugieren Beltrame et al. (2009) y Silva et al. (2009).

## CAPÍTULO III

**Ensayos de toxicidad en hembras de *Neohelice granulata* y sus posibles efectos sobre las variables reproductivas**

## INTRODUCCIÓN

La reproducción es una variable sensible a la exposición a contaminantes, y constituye el eslabón más frágil del ciclo de vida y por lo tanto, una medida del éxito reproductivo. En las últimas décadas se ha incrementado el estudio de los disruptores endocrinos químicos en el ambiente [tributilestaño (TBT), bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), dioxinas y metales como cobre (Cu), plomo (Pb), zinc (Zn), cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg)], los cuales consideran la capacidad de los mismos de afectar el sistema endocrino de los organismos expuestos. Los disruptores, generan anomalías en la diferenciación de sexos, en el desarrollo y la reproducción (Lye et al., 2005; Krang y Ekerholm, 2006; Yang et al., 2008; Hakan Olsén, 2011; Schvezov y Amín, 2011; Davies y Vethaak, 2012; Prato et al., 2013; Chiarelli y Roccheri, 2014; Rodríguez y Pardal, 2014; Weis, 2014). El efecto de los contaminantes (metales como As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn; pesticidas organoclorados como DDT) sobre el desarrollo gonadal ha sido documentado en estudios con equinodermos, moluscos, crustáceos, peces y anfibios (Páez-Osuna, 1995; Kogan et al., 2000; Au et al., 2001; Mouneyrac et al., 2001, 2003; Medesani et al., 2004; Levent Bat, 2005; Martin-Díaz et al., 2006; Abascal et al., 2007; Rodríguez et al., 2007; Viarengo et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2008; LI et al., 2008; Yamaguchi et al., 2008; Yang et al., 2008; Banthita Sawasdee y Heinz-R, Köhler, 2009; Yurchenko et al., 2009, 2010; Fabrocini et al., 2010; Revathi et al., 2011; Ling Chan et al., 2013; Ma et al., 2013; Papoulias et al., 2013).

El Zn es el segundo elemento traza más importante en los organismos, es un importante cofactor enzimático de 200 enzimas, regula importantes funciones biológicas: entre ellos procesos fisiológicos que incluyen síntesis de ADN, respuestas comportamentales y de reproducción, y el ion es considerado, en los últimos años, como un neurotransmisor (Banthita Sawasdee y Heinz-R, Köhler, 2009). Su excesiva absorción

puede suprimir la absorción de cobre y de hierro, además de inhibir la ovogénesis y espermatogénesis, producir severas alteraciones morfológicas durante el desarrollo embrionario y la eclosión larval, así como una mortalidad significativa en estadios larvales y postlarvales en invertebrados (Jackson et al., 2005; Beltrame et al., 2008, 2009; LI et al., 2008; Banthita Sawasdee y Heinz-R, Köhler, 2009).

En la laguna costera Mar Chiquita, se ha analizado la distribución de metales traza potencialmente tóxicos como Cd, Zn, Cu, Cr y Pb en sedimentos superficiales y en material particulado, como así también el fraccionamiento geoquímico de los mismos, lo que permite predecir la biodisponibilidad de los metales en el ambiente, es decir, potencialmente incorporables a los organismos (Marcovecchio et al., 2001, 2006; De Marco et al., 2006). Asimismo, se han detectado niveles de Hg asociados a transporte atmosférico como fuente principal, ya que éste no ha sido registrado en las cercanías (Marcovecchio et al., 2001; De Marco et al., 2004, 2006). Además, se registraron concentraciones de Zn disueltos en agua de columna equivalentes a las LC<sub>50</sub> en ensayos de toxicidad en juveniles y adultos del cangrejo *Neohelice granulata* (Crustacea, Brachyura) (Beltrame et al., 2007).

Dado que la mayoría de los estudios sobre infertilidad han sido realizados en distintos grupos de vertebrados (Yang et al., 2008) la información sobre el efecto en invertebrados es limitada (Rodríguez et al., 2007; Yamaguchi et al., 2008; Yurchenko et al., 2009, 2010).

En este capítulo se propone testear como hipótesis de carácter general que guiará la investigación, la siguiente consideración:

- La exposición a concentraciones crecientes de Zn alteran parámetros reproductivos de hembras de *N. granulata*, reduciendo así el éxito reproductivo. Estos efectos son mayores a menor salinidad.

- Objetivo general:

Identificar cambios en las variables reproductivas de hembras de *Neohelice granulata* de la laguna costera Mar Chiquita por efecto de la exposición al metal Zn.

Considerando el rol ecológico de *N. granulata* en los ambientes estuariales del Atlántico Sudoccidental (Spivak et al., 1994, 1996; Luppi et al., 2002; Bas et al., 2003, 2007; Ituarte et al., 2006; Silva et al., 2007; Sal Moyano et al., 2012, 2013, 2014), los resultados de esta investigación, podrán ser incorporados como parámetros indicadores de potenciales riesgos ambientales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ensayos de Toxicidad con hembras

#### Obtención y aclimatación de los organismos:

Las hembras ovígeras utilizadas en los bioensayos fueron recolectadas manualmente en la región vegetada por *Spartina densiflora* (Espartillar) de la laguna costera Mar Chiquita durante las estaciones reproductivas (primavera-verano) de 2010 a 2012.

Las hembras capturadas se encontraron en estadio temprano de desarrollo embrionario (huevos con 100% vitelo, ver Capítulo II). Se descartaron aquellos individuos que carecían de apéndices o presentaban otras anomalías. Los cangrejos fueron trasladados al laboratorio en cajas plásticas, cubiertos por agua de la zona de muestreo y con fondo de sedimento.

Una vez en el laboratorio, las hembras fueron colocadas en acuarios de vidrio, cubiertos con agua de la laguna, dentro de una cámara de cultivo para su aclimatación, bajo las mismas condiciones ambientales a ser utilizadas durante los ensayos de toxicidad. El período de aclimatación de los ejemplares fue de 24 hs, y durante el mismo fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado.

#### Preparación del agua de dilución:

Para los ensayos de toxicidad se utilizó como agua de dilución agua natural proveniente de la misma región de muestreo de la laguna. En el laboratorio, el agua fue almacenada en bidones plásticos para permitir la decantación del material particulado en suspensión. Luego fue filtrada por una serie de filtros de tamaño decreciente de poro: filtración por algodón y papel de filtro y filtración por sucesivas membranas hasta la de 0.45

$\mu\text{m}$  de tamaño del poro (filtración por vacío). El agua filtrada fue guardada en bidones plásticos con carbón activado en polvo (2 gr por litro) para remover metales pesados y compuestos orgánicos disueltos (Kremling, 1999; Marsh y Rodríguez-Reynoso, 2006; Beltrame, 2008), fue agitada y reposada por 24 hs. La misma fue nuevamente filtrada con filtros de membrana Millipore HA de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Una vez finalizado el proceso, el agua fue almacenada en un lugar fresco, en tanques de plástico oscuros, previamente acondicionados y tapados para evitar su evaporación y mantenerla libre de toda posible contaminación.

#### Preparación de soluciones stock y de trabajo:

Antes de cada ensayo de toxicidad la salinidad fue ajustada mediante el agregado de agua destilada o agua hipersalina según la demanda. El agua hipersalina se obtuvo a partir de agua de mar evaporada hasta reducir su volumen inicial a la cuarta parte.

El agua fue oxigenada durante las 24 hs anteriores a ser utilizada para los ensayos.

Las soluciones stock de metales fueron preparadas empleando sales de calidad analítica y agua destilada. Las sales utilizadas fueron  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  Biopack® (Argentina). Las soluciones stock fueron preparadas a una concentración de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , con el fin de lograr una concentración varios órdenes de magnitud mayor que las soluciones de trabajo y minimizar los volúmenes a utilizar, y consecuentemente la introducción de errores aleatorios y/o sistemáticos. A partir de éstas fueron preparadas las soluciones de trabajo de menor concentración.

Todo el material usado en la preparación de las soluciones stock y de trabajo fue acondicionado según los protocolos propuestos por APHA-AWWA-WEF (1998).

### Protocolo para los ensayos de toxicidad:

En todos los casos la exposición a Zn se efectuó siguiendo las recomendaciones y procedimientos propuestos por FAO (Ward y Parrish, 1982; Reish y Oshida, 1987) y APHA-AWWA-WEF (1998).

Se realizaron ensayos de tipo semiestático, con renovación periódica del medio. Esto permitió que las concentraciones de exposición permanecieran constantes, evitó la acumulación de productos de excreción y aseguró la saturación de oxígeno en el agua de tratamiento. Las observaciones fueron realizadas cada 24 horas y la renovación del medio cada 72 horas. En todos los casos se utilizó un control de agua, utilizando sólo el agua de dilución. La duración de los ensayos fue el lapso correspondiente al de desarrollo de los huevos hasta previa eclosión larval (estadio tardío, ver Capítulo II).

Para llevar a cabo los ensayos de toxicidad se utilizaron acuarios de vidrios cerrados individuales de 600 ml de capacidad, provistos con 500 ml de solución y con aireación constante.

Las hembras fueron colocadas al azar en cada tratamiento, dentro de la cámara de cultivo, y durante los ensayos no fueron alimentadas. En todos los ensayos se realizó el recuento diario de individuos y se removieron los organismos muertos. El criterio de mortalidad adoptado fue la inmovilidad total luego de un pequeño estímulo táctil y laxitud de apéndices.

Las condiciones ambientales utilizadas en los ensayos fueron: temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C, salinidad  $5 \pm 1$  y  $25 \pm 1$  ups, respectivamente, y fotoperiodo de 12 hs L: 12 hs O (luz fluorescente).

Las soluciones de trabajo evaluadas fueron: 1,4 y 10 mg Zn<sup>+2</sup> L<sup>-1</sup>.

Un total de 15 hembras fueron asignadas a cada tratamiento y cada control.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones utilizadas en cada una de las salinidades de trabajo:

TRATAMIENTOS	SALINIDAD 5 UPS (S1)	SALINIDAD 25 UPS (S2)
<b>Control (T0)</b>	X	X
<b>1 mg de Zn (T1)</b>	X	X
<b>4 mg de Zn (T2)</b>	X	X
<b>10 mg de Zn (T3)</b>	X	X

Las concentraciones seleccionadas se basaron en estudios previos de toxicidad aguda realizados sobre juveniles de esta misma especie y concentraciones observadas en este ambiente (Beltrame et al., 2008).

Se tomaron todas las precauciones necesarias para prevenir la contaminación de las muestras durante la disección, de manera que todo el material utilizado fue lavado previamente con ácido nítrico y acondicionado, siguiendo las recomendaciones propuestas por APHA-AWWA-WEF (1998).

A cada hembra se le midió el ancho de caparazón (AC) y se tomó como variable de referencia. Se realizó la disección de cada hembra cuidadosamente y se les extrajeron los ovarios y el hepatopáncreas. Ambos órganos fueron secados a estufa a 80°C durante 48 hs para la determinación del índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) (Ituarte et al., 2006).

A cada hembra se le identificó el estadio de desarrollo del ovario (Capítulo II) y de acuerdo con la clasificación descrita en el Capítulo II, se clasificó el estadio de desarrollo de los huevos en temprano, intermedio o tardío. Se analizó el posible efecto de la exposición al Zn a diferentes concentraciones y a ambas salinidades en el desarrollo embrionario de los huevos.

El resto del exoesqueleto, y su contenido, fue secado en estufa a 80 °C durante 48 hs, para obtener el peso seco de la muestra.

#### Análisis de las variables reproductivas:

Se analizaron las siguientes variables reproductivas de acuerdo con la descripción realizada en el Capítulo II: rendimiento reproductivo, fecundidad, peso seco de la masa de embriones, tamaño y volumen de los huevos.

#### Análisis estadístico:

Todos los datos obtenidos sobre las variables reproductivas de *N. granulata* registrados en los ensayos realizados fueron contrastados para normalidad y homocedasticidad (Zar, 1999). Las diferencias entre las distintas concentraciones y el control fueron comparadas mediante test de ANOVA paramétrico o no paramétrico, según correspondiese. Cuando las diferencias entre las medias fueron significativas ( $p < 0.05\%$ ), se realizó el test de Tukey o el test de Kruskal–Wallis correspondiente (Zar, 1999).

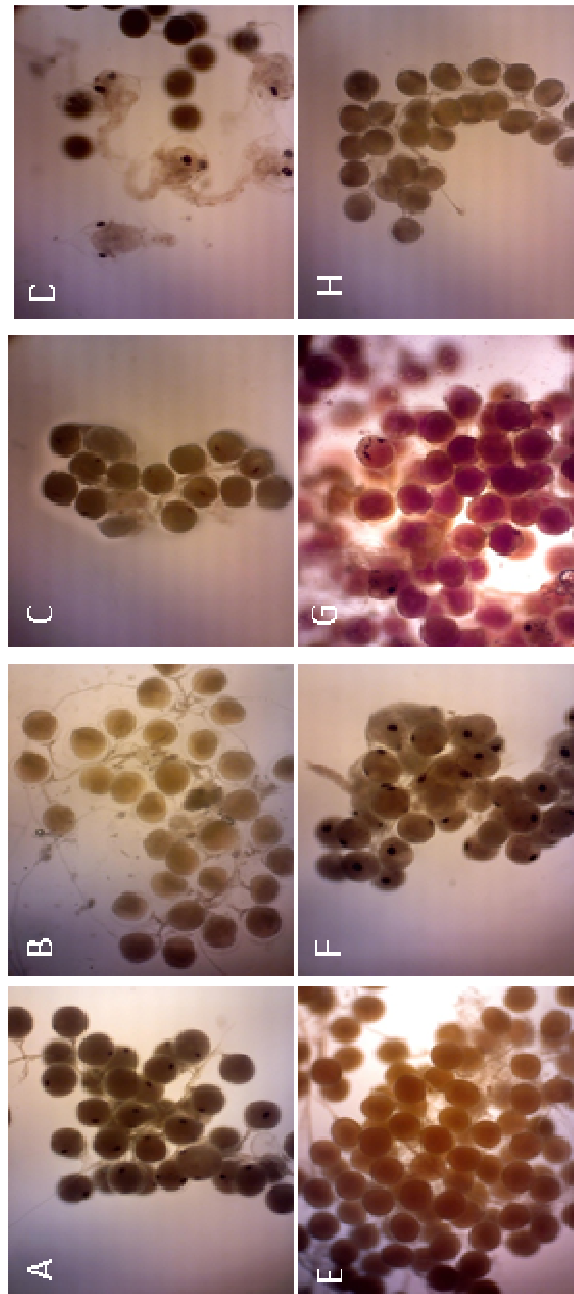
## RESULTADOS

Los AC variaron entre: 18-31 mm, sus ovarios presentaron estadios I a V y el peso seco del cuerpo completo de cada hembra varió entre 1.01 y 7.14 gr.

Los estadios registrados en los huevos de la masa ovígera, mostraron diferencias en su grado de desarrollo (huevos en estadios temprano, intermedio o tardío) e incluso se detectó la presencia de larvas libres entre los huevos (**Fig. N° 3.1**).

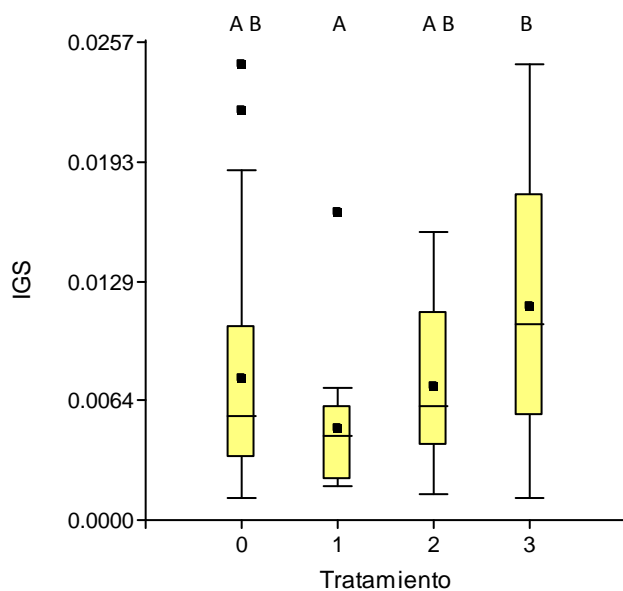
Los resultados del ensayo correspondiente al T3 s2 no fueron utilizados para los análisis por inconvenientes producidos durante el transcurso del mismo (cortes eléctricos consecutivos en la Estación Costera J. J. Nágera, lo cual modificó las condiciones establecidas en la cámara de cultivo, por ej: aireación y fotoperiodo, afectando así el comportamiento químico de los metales en solución). A partir de lo sucedido se decidió realizar la comparación de los resultados teniendo en cuenta por un lado, los tratamientos correspondientes a la salinidad más baja (s1); y luego comparar entre tratamientos a ambas salinidades sin tener en cuenta el T3 s2.

**FIGURA N° 3.1.** *Neohelice granulata*. Imágenes de los huevos de las hembras expuestas a los distintos tratamientos. A) Hembra control s1. B) Hembra T1 s1. C y D) Hembra T2 s1. E) Hembra T3 s1. F) Hembra control s2. G) Hembra T1 s2. H) Hembra T3 s2. T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn; s1= 5 ups; s2= 25 ups.

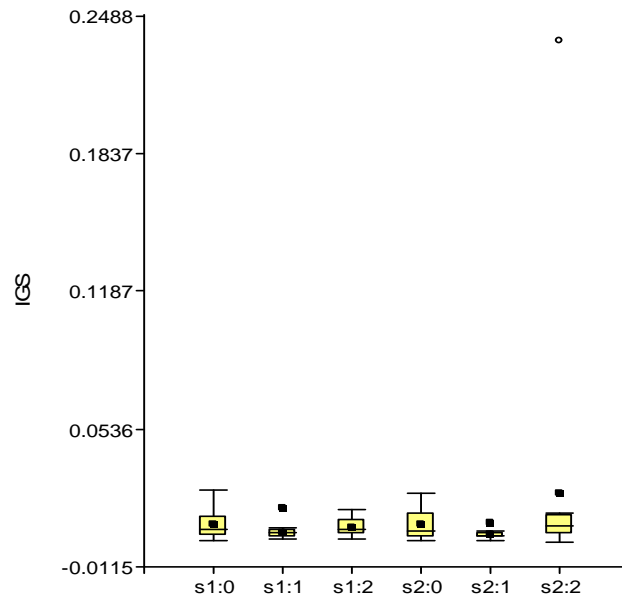


Los resultados obtenidos demuestran sólo diferencias significativas entre los IGS de los tratamientos a la salinidad de 5 ups. Los IGS más bajos se corresponden con los de las hembras del T1 con respecto al T0y el resto de los tratamientos a la misma salinidad (**Fig. N°3.2.** ANOVA,  $F = 2.78$ ,  $p = 0.0457$ ,  $gl = 85$ ). No se detectaron diferencias significativas al comparar las salinidades (**Fig. N° 3.3.** Kruskal-Wallis,  $H = 10.76$ ;  $p = 0.0564$ ;  $gl = 5$ ). En cuanto al IHS, no se encontraron diferencias significativas ni entre los tratamientos a s1 (**Fig. N° 3.4.** Kruskal-Wallis,  $H = 3.4$ ,  $p = 0.1868$ ,  $gl = 3$ ) ni entre tratamientos comparando s1 y s2 (**Fig. N° 3.5.** Kruskal-Wallis,  $H = 5.1$ ,  $p = 0.4042$ ,  $gl = 5$ ).

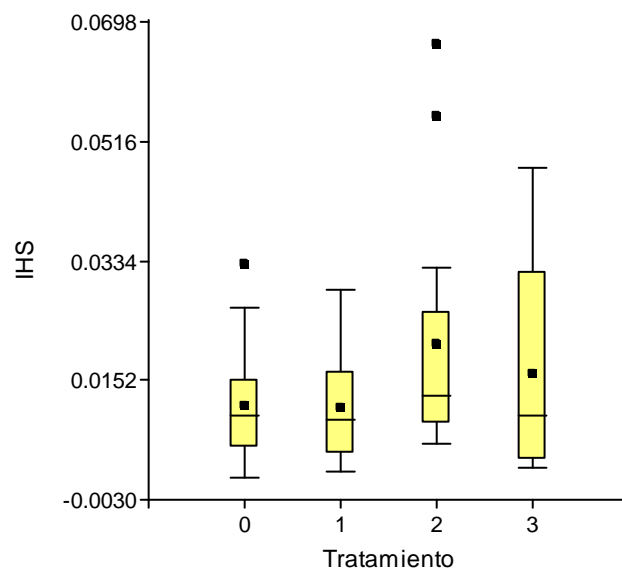
**FIGURA N° 3.2.** *Neohelice granulata*. Índices gonadosomáticos (IGS) obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



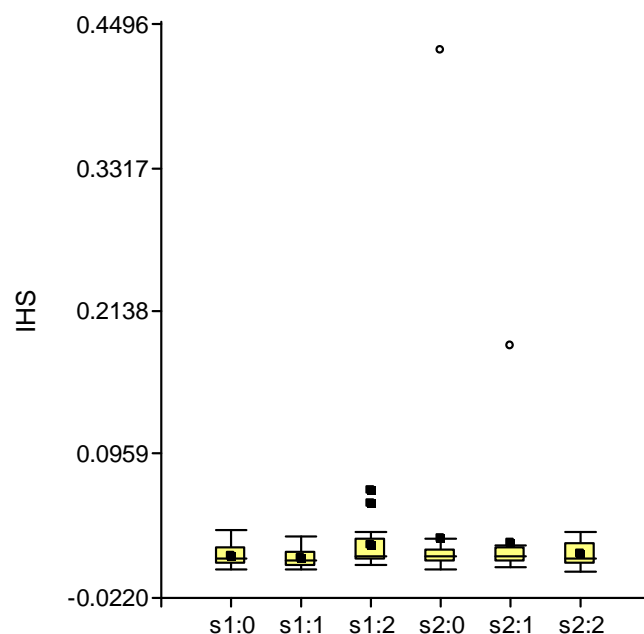
**FIGURA N° 3.3.** *Neohelice granulata*. Índices gonadosomáticos (IGS) obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn) a 5 (s1) y 25 (s2) ups.



**FIGURA N° 3.4.** *Neohelice granulata*. Índices hepatosomáticos (IHS) obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups.



**FIGURA N° 3.5.** *Neohelice granulata*. Índices hepatosomáticos (IHS) obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn) a 5 (s1) y 25 (s2) ups.



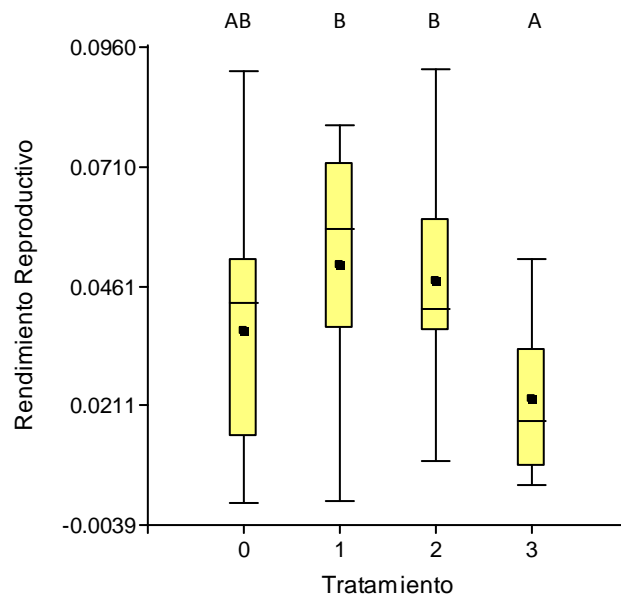
Las observaciones en el desarrollo embrionario de los huevos, permitió detectar diferencias significativas entre el T3 s1 con respecto a todos los demás tratamientos. Las diferencias no sólo son cuantitativas, sino también cualitativas, ya que durante el transcurso de dicho ensayo se han observado diferencias en la coloración de la masa ovígera, desde un color inicial violeta intenso (indicativo del estadio de desarrollo I de los embriones), a coloraciones rojizas, anaranjadas y amarillas, y en muchos de los huevos observados al microscopio se detectó vitelo en su interior, y no el embrión (**Fig. N° 3.1**).

## Análisis de las Variables Reproductivas

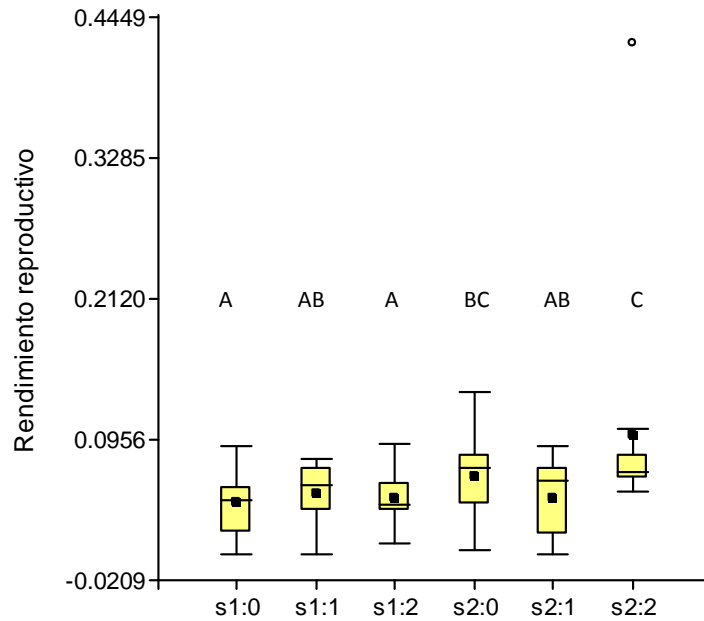
### Rendimiento reproductivo:

La comparación de los valores del rendimiento reproductivo de las hembras de los ensayos a s1 permitió detectar diferencias significativas entre las hembras del T 3 con respecto al resto de los tratamientos. (**Fig. N° 3.6.** Kruskal-Wallis,  $H = 10.67$ ,  $p = 0.0137$ ,  $gl = 3$ ). Respecto del análisis comparativo entre salinidades y concentraciones de Zn, se encontraron diferencias entre T0 y T2 a s1, con respecto al T 2 a s2 (**Fig. N° 3.7.** Kruskal- Wallis,  $H = 16.14$ ,  $p = 0.0064$ ,  $gl = 5$ ).

**FIGURA N° 3.6.** *Neohelice granulata*. Rendimientos reproductivos obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



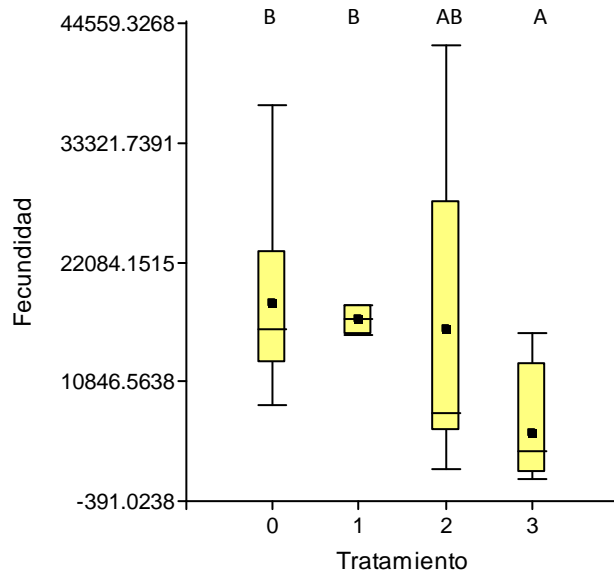
**FIGURA N° 3.7.** *Neohelice granulata*. Rendimientos reproductivos obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn) a 5 (s1) y 25 (s2) ups. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



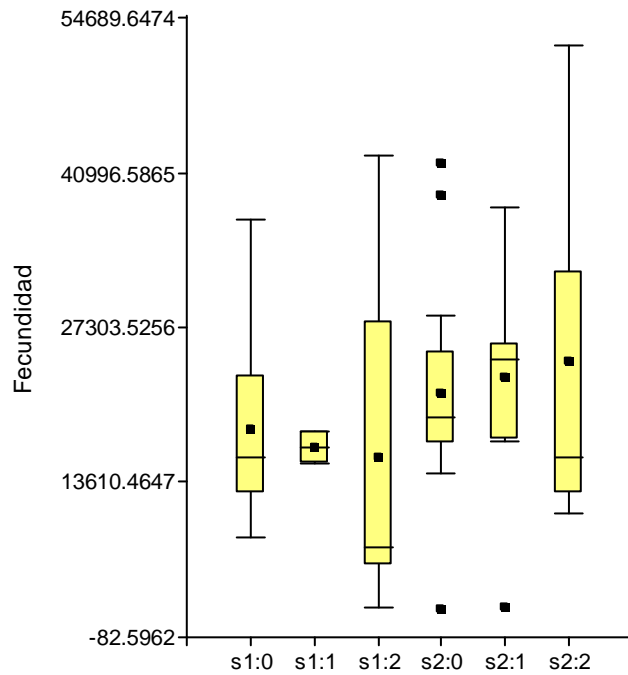
Fecundidad:

El cálculo de la fecundidad fue estimado para un total de 67 hembras entre control y tratamientos a ambas salinidades. El análisis de los valores de fecundidad indica diferencias significativas, entre las hembras del T3 s1 con respecto a las hembras control y los demás tratamientos a la misma salinidad (**Fig. N° 3.8.** Kruskal- Wallis, H: 10.78,  $p = 0.013$ ,  $gl=3$ ). No se detectaron diferencias entre los tratamientos a ambas salinidades (**Fig. N° 3.9.** Kruskal-Wallis. H= 4.56,  $p= 0.4725$ ,  $gl= 5$ ).

**FIGURA N° 3.8.** *Neohelice granulata*. Fecundidades obtenidas para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**FIGURA N° 3.9.** *Neohelice granulata*. Fecundidades obtenidas para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn) a 5 (s1) y 25 (s2) ups.



Peso seco de la masa de embriones, tamaño y volumen de los huevos:

El análisis del peso seco de la masa ovígera demostró que las diferencias más significativas a s1 se encuentran entre las hembras del T3 con respecto a las hembras control y a las del T1 (**Fig. N° 3.10**. ANOVA, F= 6.52, p= 0.0022, gl= 24). En cuanto a las comparaciones entre salinidades y tratamientos, las diferencias significativas se encontraron entre las salinidades (**Fig. N° 3.11**. ANOVA, F= 12.27; p= 0.001; gl= 51). A pesar de las diferencias encontradas en el peso seco de la masa ovígera, no se encontraron diferencias estadísticas en el volumen de los huevos de las hembras de los T0, T1, T2 y T3 a s1 (**Fig. N° 3.12**. ANOVA, F= 1.61; p= 0.2007; gl= 44) como tampoco diferencias entre tratamientos (**Fig. N° 3.13**. ANOVA, F= 2.25, p= 0.1122, gl= 81) a ambas salinidades (5 y 25 ups) (**Fig. N° 3.13**. ANOVA, F= 1.66; p= 0.2006; gl= 81).

**FIGURA N° 3.10.** *Neohelice granulata*. Pesos secos de las masas ovigeras obtenidas para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05).

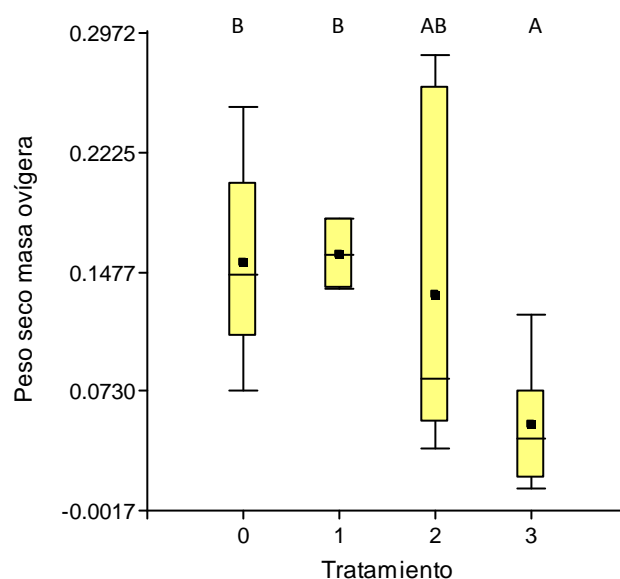


Figura N° 3.11. *Neohelice granulata*. Pesos secos de las masas ovígeras obtenidas para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn) a 5 (s1) y 25 (s2) ups. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

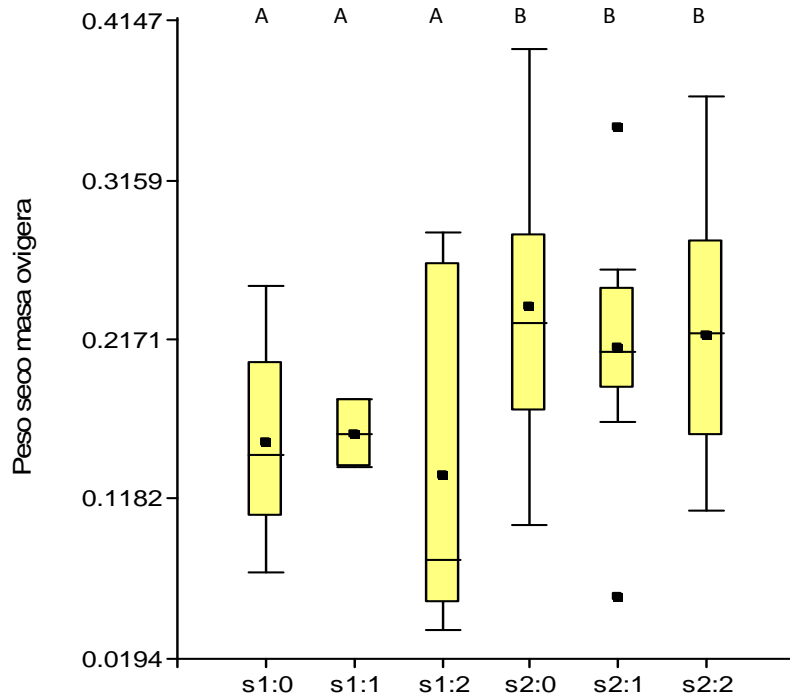
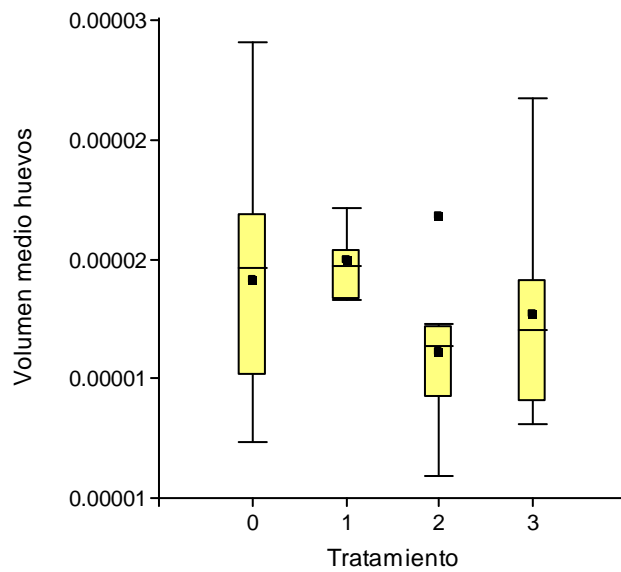
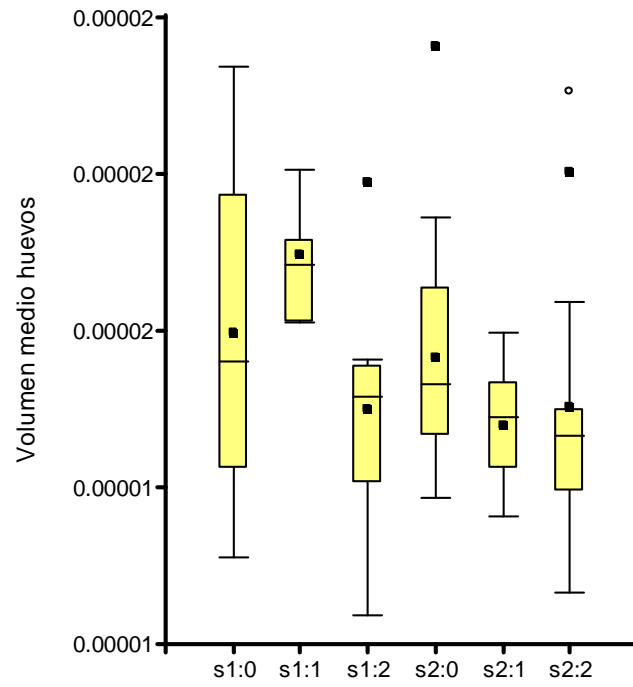


FIGURA N° 3.12. *Neohelice granulata*. Volumen Medio de los huevos obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups.



**FIGURA N° 3.13.** *Neohelice granulata*. Volumen medio de los huevos obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn) a 5 (s1) y 25 (s2) ups.



## DISCUSIÓN

Existen algunos estudios sobre los efectos de los metales en el desarrollo gonadal y la reproducción de los crustáceos (Kogan et al., 2000; Rodríguez et al., 2000; Lavolpe et al., 2004; Sánchez et al., 2005; Martin-Díaz et al., 2006; Revathi et al., 2011; Park et al., 2014). Este es el primer trabajo que analiza, específicamente, el efecto del Zn sobre las variables reproductivas de las hembras de *Neohelice granulata*.

Como se mencionó en el Capítulo II, los Índices hepatosomáticos (IHS) y gonadosomáticos (IGS) son utilizados como biomarcadores y bioindicadores en el estudio de especies bajo condiciones ambientales adversas (Ituarte et al., 2006; Martin-Díaz et al., 2006).

En este estudio, se observó que las hembras expuestas a Zn mostraron diferencias significativas en sus IGS sólo cuando fueron expuestas al T1s1 (1mg de Zn<sup>1</sup> a 5 ups). Dichos índices presentaron los menores valores.

Las diferencias en este índice pueden deberse a diferencias en el peso del cuerpo de la hembra o en el peso y estadio de desarrollo de los ovarios. Si se compara en igual estadio de maduración de los ovarios, las diferencias podrían deberse a menor desarrollo de ovocitos, lo cual afectaría la fecundidad (Martin-Díaz et al., 2006). En nuestros resultados, las hembras con los IGS estadísticamente significativos se caracterizaron por presentar los menores valores en el peso seco de sus cuerpos y en el peso seco de los ovarios, a pesar de tener tallas similares (ancho de caparazón) con respecto al resto de las hembras. Por lo tanto, las diferencias encontradas se deberían en este caso a diferencias en pesos de las muestras y no al efecto del metal en sí. Futuros estudios serán necesarios para ver si existe alguna tendencia entre el efecto de la exposición al Zn y el desarrollo del ovario, ya que la bibliografía existente para crustáceos está referida principalmente al efecto de otros metales, como por ejemplo Cd, As, entre otros

(Kogan et al., 2000; Rodríguez et al., 2000; Yamaguchi et al., 2008; Revathi et al., 2011).

El hepatopáncreas es un órgano vital y relevante en crustáceos decápodos, ya que combina varias de las funciones del hígado, páncreas, intestino y otros órganos en los vertebrados. Sus funciones específicas son importantes para la salud, crecimiento y supervivencia de los decápodos, y es utilizado como órgano monitor para evaluar la salud y el buen estado de los organismos. La alta concentración de metales acumulados en este órgano, podría llegar a producir impactos negativos sobre éste y, consecuentemente, serios efectos en el peso y crecimiento de los individuos (Beltrame et al., 2008). Los resultados de este estudio indican que no hay diferencias significativas en el IHS de las hembras control o tratamiento, en ninguna de las salinidades utilizadas en los ensayos, con lo cual se descartaría el efecto negativo del Zn sobre el funcionamiento de dicho órgano, a las concentraciones estudiadas.

Las diferencias encontradas en el desarrollo embrionario de los huevos de las hembras T3 a s1, indican claramente el efecto del metal sobre este proceso que tiene enorme implicancia a nivel poblacional. La presencia de huevos con vitelo en su interior al final del ensayo indicaría el detenimiento del desarrollo embrionario. Lavradas et al. (2014) en su investigación con especies del cangrejo azul, *Callinectes sp*, menciona que las concentraciones altas de Zn halladas en los huevos de las hembras ovígeras, sería parte del mecanismo de detoxificación. Beltrame et al. (2008) compararon la concentración de metales pesados, entre ellos Zn, en el hepatopáncreas y en los huevos de hembras ovígeras del cangrejo excavador *Neohelice granulata* proveniente de dos áreas diferentes (un área vegetada y una planicie de marea) de la laguna costera Mar Chiquita. Sus resultados mostraron una mayor concentración de dicho metal en los

huevos, con lo cual se demostraría no sólo la exposición directa de los huevos al metal presente en el ambiente, sino también la posible transferencia materna.

Numerosos son los estudios que mencionan la transferencia de metales desde hembras ovígeras a sus huevos en aves y reptiles (cocodrilos), pero es muy escasa la literatura publicada acerca de los metales y los huevos de crustáceos (Lavradas et al., 2014). Futuros ensayos son necesarios para determinar la posible transferencia de metales desde la hembra de *N. granulata* hacia sus huevos.

En cuanto al rendimiento reproductivo, por un lado se observaron diferencias significativas entre T0 y T1, T2 y T3 a s1, en los que hembras del T3 s1 presentaron los menores valores. Por otro lado, al analizar el posible efecto del Zn a distintas concentraciones y a distintas salinidades, y la posible interacción entre tratamientos y salinidad, los resultados de esta investigación demostraron que las diferencias significativas se encontraron entre el T2 a s1 y s2. Los menores rendimientos reproductivos se correspondieron con los de las hembras expuestas a la menor salinidad; cuyas masas ovígeras presentaron menores valores en el peso.

Como se ha mencionado, la salinidad es un factor muy importante que influye en la fisiología así como en la distribución de las especies de los sistemas marinos y estuariales. Variaciones en la misma pueden afectar la supervivencia, el crecimiento y desarrollo de los organismos, así como también el comportamiento de los metales traza. Numerosos estudios han demostrado el aumento en la entrada de metales a los organismos a salinidades bajas, lo cual está relacionado con un aumento en la concentración del ion metálico libre. Esto se debe a que la principal forma de ingreso al cuerpo de los invertebrados marinos es en estado iónico libre (Blackmore y Wang, 2003; Beltrame et al., 2008).

En este caso, las diferencias significativas en el rendimiento reproductivo pueden deberse a diferencias en el peso seco de la masa de huevos y/o a diferencias en el peso seco del cuerpo de la hembra. Los resultados de esta investigación muestran que las hembras expuestas a la mayor concentración de Zn y a la menor salinidad (T3 s1), presentaron menor peso de sus masas ovígeras al final del ensayo, en comparación con las hembras control (T0) y las de los tratamientos restantes (T1 y T2). Esto podría deberse a la pérdida de huevos aumentada durante el transcurso del ensayo, causada por el efecto del Zn y/o a la eclosión de las larvas. Las observaciones diarias realizadas durante el transcurso del ensayo, corroboran esta afirmación, ya que se observaron huevos libres en el fondo de los acuarios de las hembras expuestas a la mayor concentración del metal, al igual que variaciones en la coloración de la masa ovígera (del color violeta fuerte observado el primer día del ensayo, variaron hacia el color anaranjado, amarillo, rojizo). En muchos casos, los huevos no presentaron larvas en su interior sino sólo vitelo, lo cual podría sugerir, como ya se ha mencionado, que el desarrollo embrionario podría haberse interrumpido por el efecto tóxico del Zn (Verriopoulos y Hardouvelis, 1988).

Como lo demostró Beltrame et al. (2008) en sus ensayos de toxicidad, la exposición de hembras ovígeras a elevadas concentraciones de Zn ( $10 \text{ mg Zn}^{+2} \text{ L}^{-1}$ ) afecta la duración del desarrollo embrionario, disminuyendo el tiempo del mismo; esto ha sido mencionado también en otros trabajos en los cuales las hembras fueron expuestas a otros metales (Rodríguez y Medesani, 1994; Zapata et al., 2001; Sánchez et al., 2005). Asimismo, la exposición a elevadas concentraciones de Zn produce también malformaciones en las larvas, una significativa mortalidad y asincronía en su eclosión (Beltrame et al., 2008).

En cuanto a la fecundidad (número de huevos puesto por hembra), los valores mínimos se corresponden con los del T3 a s1. El análisis comparativo de la exposición a iguales concentraciones de Zn (T1 y T2) pero a diferentes salinidades (s1 y s2), mostró que no hay diferencias significativas entre los valores de fecundidad correspondientes al control y a los tratamientos. Esto sugiere que las bajas concentraciones de Zn utilizadas en dos tratamientos no producirían efecto sobre la fecundidad, como tampoco se registrarían interacciones entre salinidad y tratamiento. Al igual que lo expresado para el rendimiento reproductivo, el efecto tóxico del metal a baja salinidad, induciría la pérdida de huevos de la masa ovígera. Esto podría estar relacionado con el mecanismo de detoxificación utilizado por la hembra, ya que se ha comprobado que la concentración media del Zn no varía durante el desarrollo embrionario de los huevos (Beltrame et al., 2008). Futuros bioensayos serán necesarios para determinar si las hembras expuestas al Zn presentan mayor concentración de dicho metal en sus vísceras o en sus huevos.

Las diferencias encontradas en el peso seco de la masa ovígera entre control y tratamientos a s1 o comparando ambas salinidades (s1 y s2) principalmente se debe a la cantidad de huevos retenidos en la masa ovígera de las hembras al momento final del ensayo. La pérdida de los mismos durante el transcurso del ensayo o la eclosión de las larvas modifica las variables a cuantificar, reduciendo el peso de la masa ovígera y, por ende, modificando el rendimiento reproductivo y la fecundidad. Sin embargo, merece destacarse que, pesar de hallar diferencias en el peso de los huevos, el volumen medio de los mismos no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las hembras control y las expuestas a los tratamientos, lo cual permitiría anticipar que ni la salinidad ni la exposición al metal modificaron las propiedades estructurales y de permeabilidad de la membrana coriónica de los huevos, es decir, no ocurrió un ingreso

diferencial de agua. Durante el último período del desarrollo embrionario, la permeabilidad del huevo aumenta, permitiendo así la eclosión de las larvas (Beltrame, 2008). Estos resultados demostrarían que aún en presencia de Zn, los huevos viables continuaron normalmente con su desarrollo.

*Neohelice granulata*, como muchas de las especies de crustáceos decápodos de ambientes costeros templados, tiene la capacidad de adaptar su fisiología en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales a lo largo de su ciclo de vida (Bas et al., 2008). El peso seco de los huevos y el volumen de los mismos presenta variaciones a lo largo del desarrollo embrionario. En este crustáceo decápodo, la variabilidad intrapoblacional en el contenido de agua y el tamaño de los huevos puede ser causado por variaciones, en pequeña escala, de parámetros físicos como la salinidad, y posiblemente del pH y la temperatura del medio donde habita (Silva et al., 2009). En este estudio, las condiciones de salinidad y temperatura se mantuvieron constantes durante el desarrollo de los ensayos, y no se analizaron las diferencias en las variables reproductivas entre el comienzo y el final del mismo ya que el objetivo fue analizar los posibles efectos del Zn sobre parámetros reproductivos, incluyendo el desarrollo embrionario, previo a la eclosión de las larvas. Por esta razón, las diferencias aquí mencionadas expresan las respuestas de las hembras y de sus embriones al posible efecto causado por la exposición al metal a baja salinidad.

Teniendo en cuenta la importancia de *N. granulata* como ingeniero ecosistémico (Rodríguez et al., 2007; Beltrame et al., 2008, 2009; Canepuccia et al., 2008; Escapa et al., 2008; Fanjul et al., 2008, 2011; Daleo e Iribarne, 2009; Spivak 2010; Alberti et al., 2011; Méndez Casariego et al., 2011; Lavradas et al., 2014), su rol en la trama trófica, principalmente por la transferencia de materia y energía que realiza al alimentarse en el ambiente costero semiterrestre y al incursionar en el ambiente netamente acuático,

donde tanto larvas como adultos de cangrejos pueden ser presa de alevinos y adultos de peces respectivamente, y teniendo la capacidad de bioacumular metales en sus órganos y/o de transferirlos a su progenie es de gran importancia llevar a cabo medidas que permitan utilizar a esta especie como bioindicador y/o biomonitor del estado de salud ambiental de la laguna costera Mar Chiquita, que constituye un complejo ecosistémico en el que se tienen múltiples usos y constituye un área protegida no sólo a escala provincial sino a también a escala mundial (Reserva de Biosfera del programa MAB, UNESCO).

## CAPÍTULO IV

**Ensayos de toxicidad en machos de *Neohelice granulata* y sus posibles efectos sobre el sistema reproductor y la calidad espermática.**

## INTRODUCCIÓN

Los cangrejos juegan un papel importante en el mantenimiento, modificación y regulación del ambiente en el que se encuentran, y sus actividades tienen efecto tanto en los compartimentos abióticos como en los bióticos (Siddon y Witman, 2004). Muchas especies de cangrejos cavadores alteran las características del sustrato y juegan un papel importante en el ciclo de los nutrientes (Pandya, 2011). Existe un número importante de estudios sobre hábitats acuáticos en los que los resultados muestran a los macroinvertebrados como especies indicadoras, y entre ellos, los cangrejos braquiuros resultan indicadores eficaces de cambios en los factores tanto abióticos como bióticos.

En algunas especies de macroinvertebrados tales como equinodermos, crustáceos y moluscos, como así también de vertebrados (peces y anfibios) se ha documentado un desarrollo gonadal defectuoso asociado al efecto que producen los contaminantes sobre los mismos. Los efectos directos que éstos producen sobre los machos de estas especies incluyen disrupción en la proliferación y diferenciación de células espermáticas y aquellas implicadas en el control de la espermatogénesis, apoptosis, cambios en la síntesis de testosterona, atrofia gonadal, disminución en el número de las células espermáticas, disfunción espermática y cambios en la morfología tanto de células somáticas (accesorias) como sexuales (Au et al., 2003; Abascal et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2008; Yurchenko et al., 2009,2010; Fabrocini et al., 2010).

El sistema reproductor de los cangrejos braquiuros machos consiste en testículos, vasos deferentes y ductos eyaculadores pares. Los testículos son órganos tubulares que se ubican en la región anterior del cuerpo y se extienden hacia los costados del estómago, generalmente están unidos por una comisura media entre la región posterior del estómago y la región anterior del corazón en forma de H. La pared

está compuesta por dos capas: una externa de tejido conectivo y una capa delgada interna de epitelio. Las espermatogonias están generalmente concentradas en bandas a lo largo de la periferia de los lóbulos o túbulos, mientras que los espermatozoides están acompañadas de células accesorias y se encuentran ubicados en la región central (Simeó et al., 2009).

Los vasos deferentes (VD) son túbulos elongados y enroscados que continúan generalmente a los testículos, y se extienden longitudinalmente en la región posterior del cuerpo. Según el criterio morfológico y funcional, están divididos en 3 regiones: anterior (VDA), media (VDM) y posterior (VDP). Funcionalmente los VDA son la región de formación de espermatozoides, mientras que los VDM y VDP, son sitios de almacenamiento de fluido seminal y espermatozoides. La pared de los vasos deferentes está compuesta por una capa externa de tejido conectivo, una capa muscular intermedia y una capa interna de epitelio secretor (Simeó et al., 2009).

De acuerdo con lo expuesto en el Capítulo III, el Zn regula procesos biológicos relacionados con la reproducción y su excesiva absorción puede provocar alteraciones en la espermatogénesis y por lo tanto en la calidad espermática. En el caso de los crustáceos, la mayoría de los trabajos evalúan el efecto del Zn en parámetros reproductivos de las hembras (ver Capítulo III). Particularmente, en *Neohelice granulata* no existen estudios anteriores que aborden el efecto del Zn en los órganos reproductores ni en la calidad de los espermatozoides producidos. El examen histopatológico se ha reconocido cada vez más como una herramienta valiosa para la evaluación del impacto de los contaminantes en los animales acuáticos (Saravana Bhavan y Geraldine, 2009, Maharajan et al., 2012, Manosathiyadevan et al., 2012, Chourpagar y Kulkarani, 2014 y Paruruckumani et al., 2015).

El objetivo del presente capítulo es:

- Determinar si diferentes concentraciones de Zn producen alteraciones histopatológicas en los vasos deferentes y en la calidad espermática de los machos de *N. granulata*.

Este objetivo se plantea sobre la base de la siguiente hipótesis de trabajo:

- Concentraciones crecientes de Zn producen alteraciones histopatológicas en los vasos deferentes y deterioran la calidad espermática de los machos de *N. granulata*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ensayos de Toxicidad con machos

#### Obtención y aclimatación de los organismos:

Los organismos utilizados en los bioensayos fueron recolectados manualmente en la laguna costera Mar Chiquita, en la región vegetada cubierta por *Spartina densiflora* (Espartillar), en enero 2015.

Los machos capturados se encontraron en estadio de intermuda, y se consideraron sólo aquellos individuos con ancho de caparazón (AC) mayor a 12 mm (talla mínima de madurez funcional) (López Greco et al., 1997; López Greco y Rodríguez, 1998). Se descartaron aquellos individuos que carecían de apéndices o presentaban otras anomalías. Los cangrejos fueron trasladados al laboratorio en cajas plásticas, cubiertos por agua de la zona de muestreo y con fondo de sedimento.

En el laboratorio, los individuos fueron colocados en acuarios de vidrio, cubiertos con agua de la laguna dentro de una cámara de cultivo para su aclimatación, bajo las mismas condiciones ambientales a utilizarse durante los ensayos de toxicidad. El período de aclimatación de los ejemplares fue de 4 días y durante el mismo fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado.

Para los ensayos se utilizaron 12 machos control (en agua de dilución sin el agregado de metal; denominado T0) y 12 machos para cada uno de los tratamientos realizados (T1= 1, T2= 4 y T3= 10 mg Zn<sup>+2</sup> L<sup>-1</sup>) a la salinidad de trabajo de 5 ups.

#### Preparación del agua de dilución:

El procedimiento para la obtención del agua de dilución fue el mismo que el utilizado en los ensayos de las hembras (Capítulo III).

#### Preparación de soluciones stock y de trabajo:

Las soluciones utilizadas fueron las mismas que las empleadas en los ensayos de las hembras (Capítulo III).

#### Protocolo para los ensayos de toxicidad:

En todos los casos la exposición al metal se efectuó siguiendo las recomendaciones y procedimientos propuestos APHA (1992) y sus posteriores modificaciones, Rodríguez Grau y Esclapés, (1995) y Nascimento et al., (2002).

Los ensayos fueron del tipo semiestático, con renovación periódica del medio. Las observaciones se realizaron cada 24 horas y la renovación del medio cada 72 horas. En todos los casos se utilizó un control de agua, utilizando sólo el agua de dilución. La duración de los ensayos fue de 25 días (Au et al., 2001, 2003).

Para llevar a cabo los ensayos de toxicidad se utilizaron acuarios de vidrios cerrados, individuales, de 600 ml de capacidad, provistos con 300 ml de solución y con aireación constante. Los machos fueron colocados al azar en cada tratamiento, dentro de la cámara de cultivo, y durante los ensayos fueron alimentados horas previas al recambio del agua. En todos los ensayos se realizó el recuento diario de individuos y se removieron los organismos muertos. El criterio de mortalidad adoptado fue la inmovilidad total luego de un pequeño estímulo táctil y laxitud de apéndices.

Las condiciones ambientales utilizadas en los ensayos fueron: temperatura ambiente de  $19 \pm 1$  °C, salinidad  $5 \pm 1$  ups y fotoperiodo de 12 hs L: 12 hs O (luz fluorescente).

Las soluciones de trabajo evaluadas fueron: 1,4 y 10 mg  $Zn^{+2}$  L<sup>-1</sup>.

Las concentraciones seleccionadas fueron las mismas que las empleadas en los bioensayos con hembras (Capítulo III), y se basaron en estudios previos de toxicidad aguda

realizados sobre juveniles de esta misma especie (Beltrame et al., 2008) y concentraciones observadas en este ambiente (Beltrame et al., 2009)

Finalizados los ensayos, los cangrejos fueron colocados en *freezer*, con el objetivo de crioanestésiarlos para luego diseccionarlos.

#### Análisis histológico:

Los testículos y/o vasos deferentes fueron rápidamente extraídos, pesados para obtener el peso fresco de cada muestra y fijados en Solución Bouin durante 24 hs a 20°C. Las muestras fueron pasadas secuencialmente por etanol 70, 80, 96 y 100 % durante 30-40 min en cada concentración, finalizando con un pasaje por xilol. Finalmente, fueron embebidas en parafina durante 24 hs y se cortaron secciones de 5 µm las cuales fueron preparadas para su tinción con hematoxilina-eosina. Las muestras fueron observadas bajo la luz del microscopio óptico (MO) para la determinación de alteraciones histológicas y/o morfológicas de las células.

## RESULTADOS

Los tamaños de los machos variaron entre: 23-38 mm AC y el peso de los vasos deferentes corregido por talla (Peso Total Vasos Deferentes frescos/AC), varió entre 0.00045– 0.0057 gr.

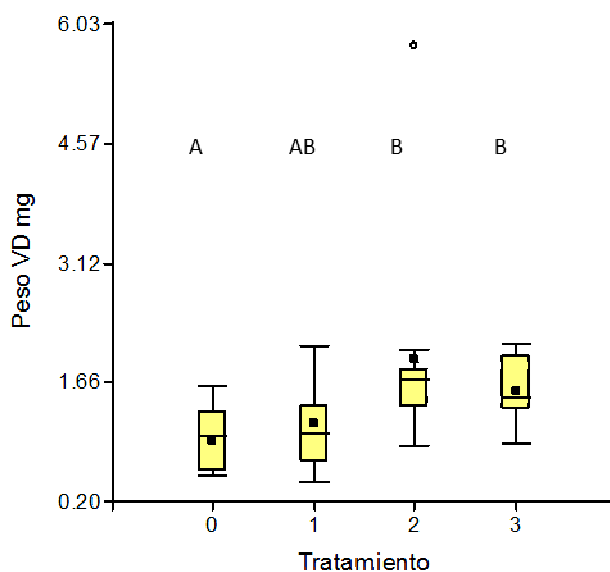
A continuación se muestran los rangos de tallas, pesos de los vasos deferentes y diámetros de espermátóforos y espermatozoides medidos en los machos de cada uno de los tratamientos:

Tratamiento	AC (mm)	Peso Vasos Deferentes (gr.)	Diámetro Espermátóforos (mm)	Diámetro espermatozoides (mm)
<b>Control (T0)</b>	23 - 34	0.00051 – 0.0016	0.027 – 0.125	0.0018 – 0.0027
<b>T 1 (1 mg de Zn / L)</b>	23 - 31	0.00045 – 0.0021	0.0178 – 0.0714	0.0009 – 0.0027
<b>T 2 (4 mg de Zn / L)</b>	24 - 36	0.0005 – 0.0057	0.045 – 0.1071	0.0018 – 0.0027
<b>T 3 (10 mg de Zn /L)</b>	27 - 38	0.00091 – 0.0021	0.0357 – 0.1339	0.0009 – 0.00227

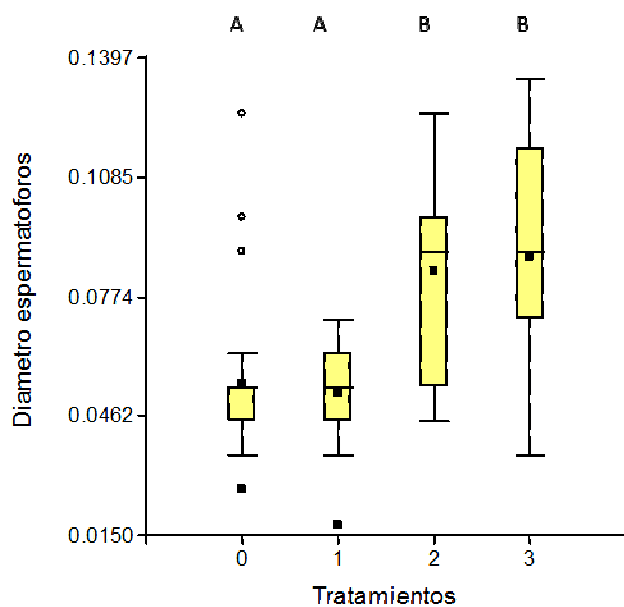
Los resultados del análisis del peso de los vasos deferentes indican diferencias significativas entre los machos control (T0) y los de los T2 y T3 (**Fig. N° 4.1.** ANOVA, F= 5.20; p= 0.0041; gl= 39). Cuando se realizó el análisis del diámetro de los

espermátóforos, se encontraron diferencias significativas entre machos T0 y T1, con respecto a los T2 y T3 (**Fig. N° 4.2.** K-W, H= 19.47; p= 0.0002; gl= 3). Cuando se realizó la cuantificación de espermátóforos encontrados en un área de 1 mm<sup>2</sup> dentro del vaso deferente, no se han encontrado diferencias significativas entre control y tratamientos (**Fig. N° 4.3.** ANOVA, F= 0.97; p= 0.4671; gl= 6), como tampoco en el diámetro del espermatozoide entre control y tratamiento (**Fig. N° 4.4.** K-W, H= 3.28; p= 0.6446; gl= 3).

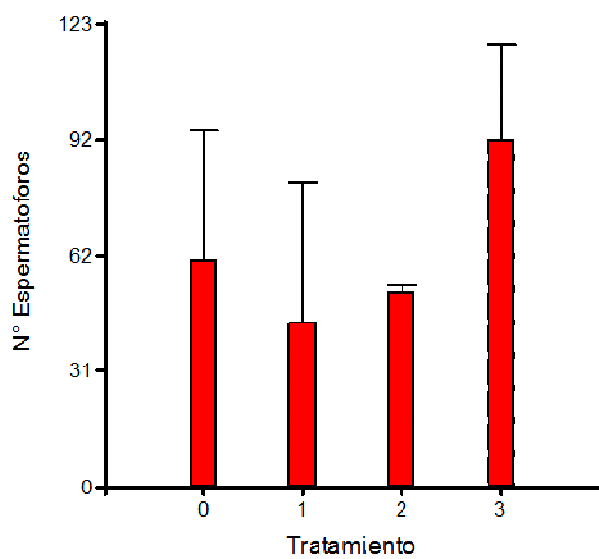
**FIGURA N° 4.1.** *Neohelice granulata*. Peso fresco de los vasos deferentes (VD) obtenidos para cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05).



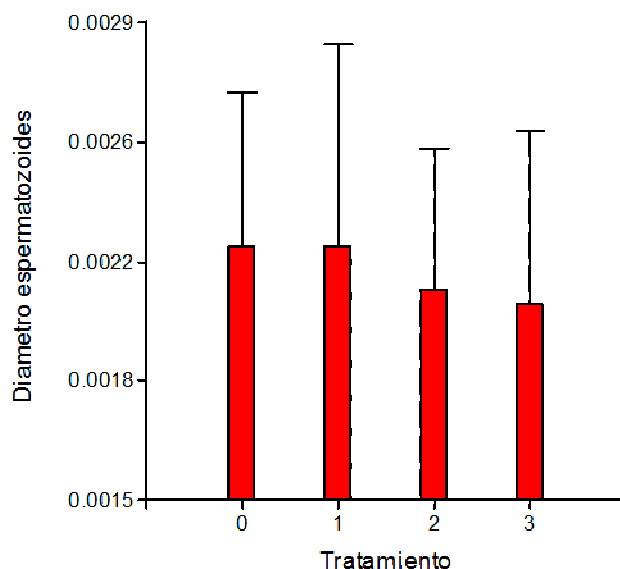
**FIGURA N° 4.2.** *Neohelice granulata*. Diámetro de los espermatozoides medidos en machos de cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**FIGURA N° 4.3.** *Neohelice granulata*. Número de espermatozoides medidos en un área de  $1 \text{ mm}^2$  del vaso deferente de machos de cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups.



**FIGURA N° 4.4.** *Neohelice granulata*. Diámetro de los espermatozoides medidos en machos de cada uno de los tratamientos (T0= control; T1= 1 mg de Zn; T2= 4 mg de Zn; T3= 10 mg de Zn) a 5 ups.



Análisis histológico:

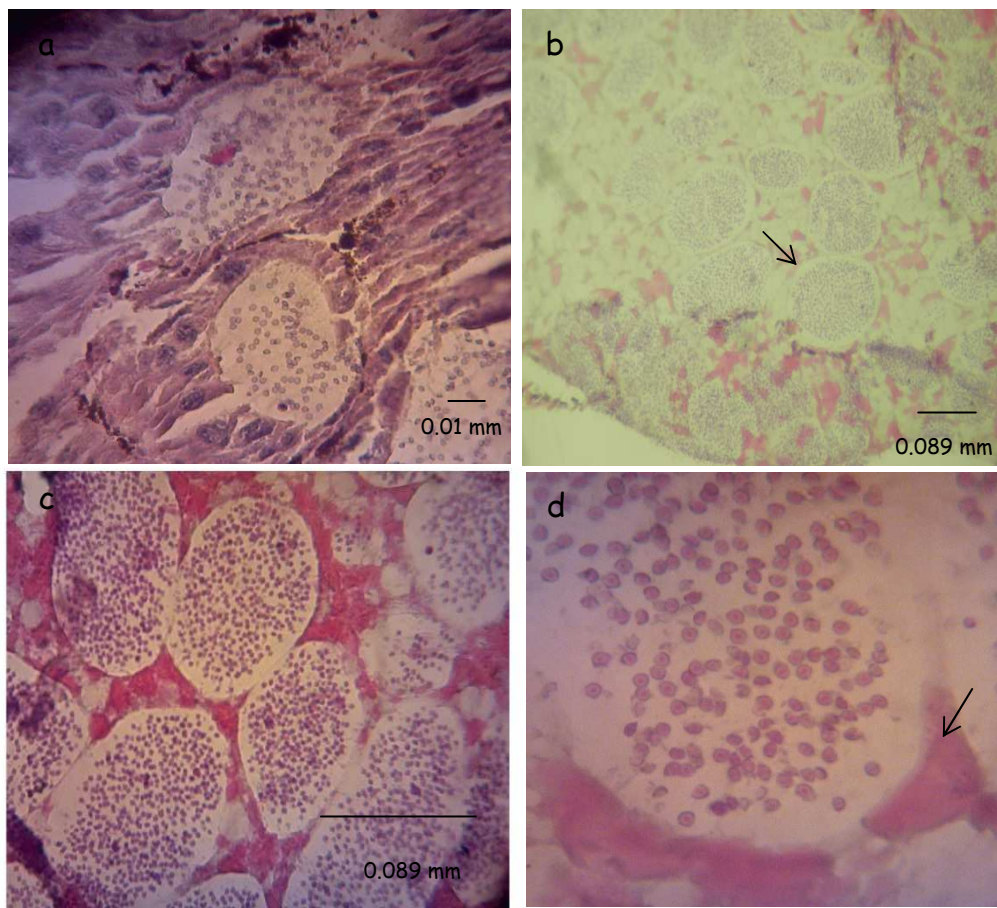
El conducto deferente es morfológicamente enrollado e internamente se encuentra revestido con epitelio escamoso-cúbico (**Fig. N° 4.5. a**). Internamente, la luz presenta secreciones homogéneas eosinófilas y espermatozoides empaquetados en espermatóforos (**Fig. N° 4.5. b y c**). El tamaño de los espermatóforos varió entre 0.027– 0.125 mm.

El examen de microscopía de luz de los conductos deferentes tanto de los cangrejos del control como en los tratamientos mostró una estructura normal. Histológicamente no se observaron alteraciones morfológicas ni en células epiteliales del tejido reproductor ni en los espermatozoides observados bajo microscopio óptico.

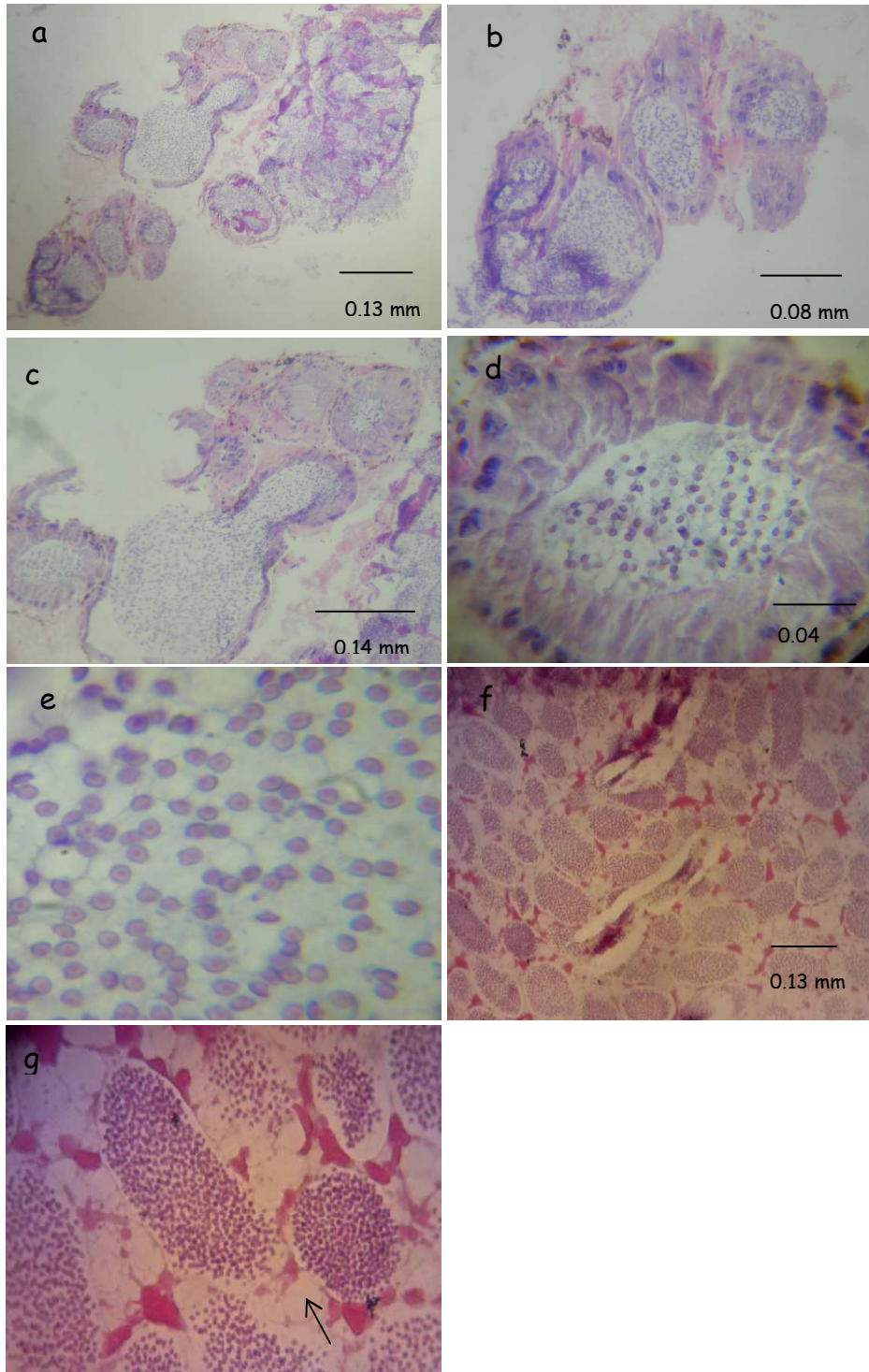
En las **Fig. N° 4.5 a 4.8** se detallan diferentes cortes histológicos, de machos control como de los que fueron expuestos a las distintas concentraciones de Zn. En ellas

se pueden observar cortes transversales en distintas porciones de los vasos deferentes (VD), espermatóforos, fluido seminal y espermatozoides.

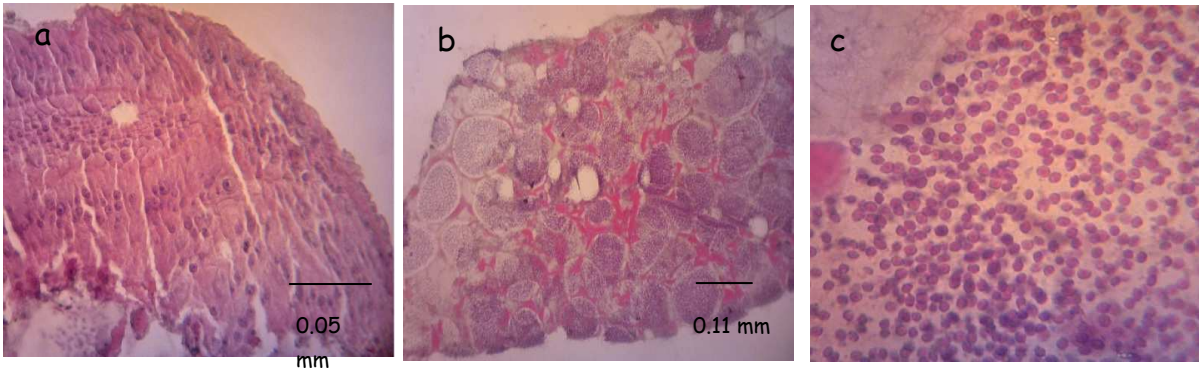
**FIGURA N° 4.5.** *Neohelice granulata*. Macho control. a) Corte transversal del VDA. Se observa el epitelio escamoso-cúbico que lo constituye, conteniendo espermatozoides libres en su interior. b) Corte transversal de VDM. La flecha indica la presencia de espermatóforos en su interior. c) Detalle de los espermatóforos y del fluido seminal que los rodea. d) Ampliación de uno de los espermatóforos con espermatozoides en su interior. La flecha indica la presencia de fluido seminal entre los espermatóforos.



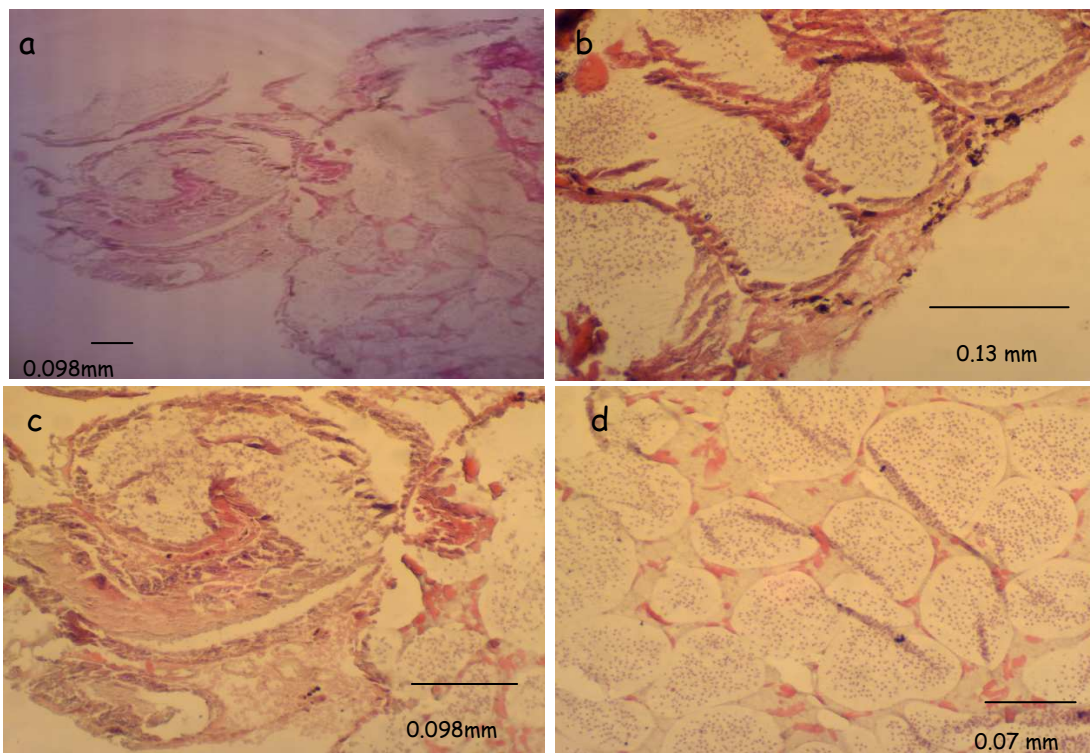
**FIGURA N° 4.6.** *Neohelice granulata*. Macho expuesto a 1 mg de Zn/L. a) b) y c). Vista general de la región anterior de los vasos deferentes (VDA). d) Corte Transversal del VDA, se observa el epitelio escamoso-cúbico del mismo, con sus núcleos en posición basal. e) Detalle de los espermatozoides libres localizados en el interior del VDA. f) Espermátóforos localizados en el interior del VDM. g) Detalle de los espermátóforos, la flecha indica la presencia de fluidos seminal entre ellos.



**FIGURA N°4.7.** *Neohelice granulata*. Macho expuesto a 4 mg de Zn/L. a) Corte Transversal del VDA, se observa el epitelio escamoso-cúbico del mismo, con sus núcleos en posición basal o media. b) Espermátóforos localizados en el interior del VDM, rodeados por fluido seminal (rosa). c) Detalle de los espermatozoides en el interior del espermátóforo.



**FIGURA N° 4.8.** *Neohelice granulata*. Macho expuesto a 10 mg de Zn/L. a) Vista general de VDA y VDM. . b) Detalle de una región del VDA con espermatozoides libres en su interior. c) Detalle de la zona de conexión entre VDA y VDM. d) Detalle de espermátóforos localizados en el VDM.



## DISCUSIÓN

Debido a su alta sensibilidad, las gametas y los embriones de especies acuáticas son ampliamente utilizados en la realización de bioensayos toxicológicos (Fabbrocini et al., 2010). La mayoría de los estudios de infertilidad se han llevado a cabo con especies de vertebrados, y en el caso de los invertebrados, éstos incluyen principalmente a moluscos y equinodermos.

En el caso de los crustáceos decápodos adultos, Maharajan et al. (2015) documentaron alteraciones histológicas en los vasos deferentes y reducción en el número de espermatozoides del cangrejo *Paratelphusa jacquemontii* expuestos a insecticidas como cipermetrina pero no existen estudios que den cuenta de alteraciones morfológicas o histológicas en las gónadas por el efecto de metales tales como Zn.

En el presente estudio las diferencias encontradas entre los machos *Neohelice granulata* control y los que han sido expuesto a distintas concentraciones de Zn, se reflejan en el peso fresco de los vasos deferentes y en el diámetro de los espermátóforos.

En cuanto al peso de los vasos deferentes (VD), las diferencias encontradas podrían estar atribuidas a las diferencias de tallas entre los machos. Todos ellos presentaban los VD desarrollados y con contenido espermático. Las condiciones del ensayo fueron las mismas para todos, la única diferencia encontrada fue el tamaño de los individuos utilizados en cada uno de los tratamientos. No hay antecedentes que mencionen diferencias en el peso de los VD causada por la exposición a metales, motivo por el cual no se puede concluir que la exposición a Zn haya producido tal efecto.

Respecto del diámetro de los espermátóforos, este es el primer estudio en el que se considera dicho parámetro. Las diferencias encontradas podrían estar atribuidas al efecto del Zn. A pesar de ello, la cantidad de espermatozoides por unidad de superficie ( $\text{mm}^2$ ) y el diámetro de los mismos no presentaron variación entre los distintos tratamientos. Serán necesarios futuros ensayos para determinar si el Zn causa daños ultraestructurales sobre los espermatozoides, como ha sido mencionado para otros contaminantes (Maharajan et al. 2015).

## **CONCLUSIONES GENERALES**

En la presente tesis doctoral se estudió el posible uso del cangrejo cavador *Neohelice granulata* como bioindicador y/o biomonitor del estado de salud de los ambientes estuariales del Atlántico sudoccidental, específicamente de la laguna costera Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina), y se analizó el efecto de los metales pesados, particularmente Zinc, sobre sus variables reproductivas. De este trabajo se desprender las siguientes conclusiones:

1. La concentración de metales pesados fue diferente entre las distintas matrices analizadas (agua de columna, intersticial y de cuevas, sedimento y material particulado en suspensión) y también entre hábitats (Espartillar: región vegetada o Confluencia: planicie de marea) y entre épocas de muestreo (primavera-verano). En general, las mayores concentraciones se detectaron en verano, en el Espartillar. Las concentraciones de algunos metales, como por ejemplo el Zn, fueron superiores a las concentraciones medidas en otros importantes estuarios del mundo, principalmente en sedimento y MPS.
2. Los valores de los Índices hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS) de hembras reflejaron diferencias entre hábitats y entre las épocas de muestreo. Las diferencias aquí halladas podrían estar relacionadas a: a) diferencias tróficas; b) diferencias en el estadio de madurez del ovario y c) a diferencias en la cantidad de reservas energéticas almacenadas en el hepatopáncreas, lo cual influye en el peso de los órganos en cuestión.
3. En cuanto a las variables reproductivas de las hembras provenientes de ambos hábitats mencionados, sólo la fecundidad y el peso seco de la masa ovígera presentaron diferencias significativas en verano. Los

mayores valores se corresponden a los de las hembras del Espartillar, coincidiendo con los mayores pesos medidos de masas ovígeras. La variabilidad encontrada dentro de un mismo hábitat y en diferentes épocas del año podría deberse a las variaciones registradas en pequeña escala de los parámetros que gobiernan la dinámica de la laguna (salinidad, pH, temperatura, régimen de lluvias).

4. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad, se observó que las hembras expuestas a la mayor concentración mostraron diferencias significativas en sus IGS a la menor salinidad (5 ups). Las hembras con los IGS estadísticamente significativos se caracterizaron por presentar los menores valores en el peso seco de sus cuerpos y en el peso seco de los ovarios, a pesar de tener tallas similares (ancho de caparazón) con respecto al resto de las hembras. Por lo tanto, las diferencias encontradas se deberían a diferencias en el peso de las muestras y no al efecto del metal en sí.
5. Los resultados de este estudio indican que no hay diferencias significativas en el IHS de las hembras control o tratamientos, en ninguna de las salinidades utilizadas en los ensayos, con lo cual se descartaría el efecto negativo del Zn sobre el funcionamiento de dicho órgano.
6. Las diferencias encontradas en el desarrollo embrionario de los huevos de las hembras de T3 a 5 ups, indican claramente el efecto del metal.
7. La presencia de huevos con vitelo en su interior al final del ensayo indicaría el detenimiento del desarrollo embrionario.

8. En cuanto al rendimiento reproductivo, por un lado se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos a la menor salinidad, en los que las hembras expuestas a la mayor concentración presentaron los menores valores.
9. En el contexto del análisis de la posible interacción entre tratamientos y salinidad, los resultados de esta investigación demostraron que las diferencias significativas se encontraron entre las hembras expuestas a 4 mg de Zn a ambas salinidades. En este caso, diferencias significativas en el rendimiento reproductivo pueden deberse a diferencias en el peso seco de la masa de huevos y/o a diferencias en el peso seco del cuerpo de la hembra.
10. En cuanto a la fecundidad, los valores mínimos se corresponden con los de las hembras expuestas a la mayor concentración de Zn y a la menor salinidad. El análisis comparativo de la exposición a iguales concentraciones de dicho metal pero a diferentes salinidades, mostró que no hay diferencias significativas entre los valores de fecundidad.
11. Las diferencias encontradas en el peso seco de la masa ovígera entre control y tratamientos a la menor salinidad o comparando ambas salinidades, principalmente se debe a la cantidad de huevos retenidos en la masa ovígera de las hembras al momento final del ensayo. La pérdida de los mismos durante el transcurso del ensayo o la eclosión de las larvas modifica las variables a cuantificar, reduciendo el peso de la masa ovígera y, por ende, modificando el rendimiento reproductivo y la fecundidad.

12. El volumen medio de los huevos no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las hembras control y las expuestas a los diferentes tratamientos, a ambas salinidades. Esto permitiría anticipar que ni la salinidad ni la exposición al metal modificaron las propiedades estructurales y de permeabilidad de la membrana coriónica de los huevos. Durante el último período del desarrollo embrionario, la permeabilidad de la membrana aumenta para permitir la eclosión de las larvas.
13. Las diferencias en el tamaño de los huevos aquí mencionadas expresarían las respuestas de las hembras y de sus embriones al posible efecto causado por la exposición al metal a baja salinidad.
14. Las diferencias encontradas entre los machos control y los expuestos a los distintos tratamientos se reflejan en el peso fresco de los vasos deferentes y en el diámetro de los espermatozoides.
15. En cuanto al peso de los vasos deferentes (VD), las diferencias encontradas entre los machos control y los expuestos a las diferentes concentraciones de Zn podrían estar atribuidas a las diferencias de tallas entre los machos. No hay antecedentes que mencionen diferencias en el peso de los VD causada por la exposición a metales, motivo por el cual no se puede concluir que la exposición a Zn haya producido dicho efecto.
16. Las diferencias encontradas en el diámetro de los espermatozoides podrían estar atribuidas al efecto del Zn; sin embargo, la cantidad de espermatozoides por  $\text{mm}^2$  y el diámetro de los mismos no presentaron variaciones entre los distintos tratamientos. Este es el primer estudio en

abordar dicha temática del que se tenga registro al momento de concluir esta investigación.

17. Del análisis histológico surge que no se observaron alteraciones morfológicas ni en las células epiteliales del tejido reproductivo, ni en los espermatozoides observados bajo microscopio óptico.

## ALCANCES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

La utilización de bioensayos de toxicidad del tipo semiestático, con renovación periódica de medio, permite disponer del control de determinadas variables (concentraciones del metal, temperatura, fotoperiodo y salinidad), evitar la acumulación de los productos de excreción y asegurar la saturación de oxígeno en el agua de tratamiento.

Aunque las condiciones bajo las que se realizan los bioensayos son específicas y controladas, dada la complejidad del medio ambiente, no pueden reproducir con exactitud la variedad de factores que intervienen en la toxicidad de un agente liberado al ambiente. Además de esto, las especies utilizadas para los ensayos son modelos de estudio que representan ciertas funciones dentro del ecosistema, mas no al ecosistema en conjunto, por tanto los bioensayos se pueden solamente considerar como un referente.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha tratado de llevar a cabo cada uno de los objetivos planteados en cada capítulo. A pesar de ello, han surgido inconvenientes en su realización, como por ejemplo, la ruptura de la cámara de cultivo y los reiterados cortes de luz en la estación Costera J.J. Nágera. Por esto último, los resultados obtenidos en el marco del tratamiento 3 (10 mg de Zn) a 25 ups (T3S2) no pudieron ser tenidos en cuenta, ya que las condiciones experimentales establecidas (aireación, temperatura, fotoperiodo) se vieron modificadas, probablemente afectando así el comportamiento químico del metal en estudio.

El trabajo con especies con periodos reproductivos estacionales (primavera-verano) también es un factor limitante a la hora de desarrollar los bioensayos, ya que algún desperfecto técnico o error humano, implica una demora en la recolección de los individuos. Por ende, se desencadena un efecto cascada, que retrasa el desarrollo de los

bioensayos. A modo de ejemplo, es más difícil encontrar hembras con huevos en estadio inicial de desarrollo embrionario, ya que la sincronía de puestas se va modificando a lo largo de los meses.

A pesar de ello, se han podido superar dichos inconvenientes y llevar a cabo los bioensayos, obteniendo resultados interesantes con respecto a las variables reproductivas de las hembras y machos de *Neohelice granulata*, y abriendo camino a futuras líneas de investigación que permitan ampliar el conocimiento en relación con el efecto de contaminantes, como los metales, y particularmente el Zn, sobre la fisiología y comportamiento reproductivo de este cangrejo, ingeniero ecosistémico de la laguna costera Mar Chiquita.

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, resulta necesaria la realización de futuros ensayos que permitan evaluar:

- Los posibles efectos de la exposición al Zn sobre el desarrollo del ovario de hembras de *N. granulata*.
- La posible transferencia de metales desde la hembra de *N. granulata* hacia sus huevos.
- Los posibles efectos del Zn en los VD de machos y los posibles daños ultraestructurales sobre los espermatozoides, como ha sido mencionado para otros contaminantes ambientales (por ejemplo Cd, pesticidas, entre otros).

En esta investigación se demuestra que *N. granulata* resulta ser un excelente bioindicador y/o biomonitor del estado de salud ambiental de la laguna costera Mar

Chiquita, al menos en lo que respecta al efecto del Zn sobre las variables reproductivas. Esto se debe a la importancia del papel que esta especie desempeña en los ambientes estuariales del Atlántico sudoccidental.

## BIBLIOGRAFÍA

Abascal, F.J., Cosson, J. y Fauvel, C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology* 70 (2): 509-522.

Alberti, J., Cebrian, J., Méndez Casariego, A., Canepuccia, A., Escapa, M. e Iribarne, O. 2011. Effects of nutrient enrichment and crab herbivory on a SW Atlantic saltmarsh productivity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 405: 99–104.

Amigo, J.M., Gredilla, A., Fdez-Ortiz de Vallejuelo, F., de Diego, A. y Madariaga, J.M. 2012. Study of parameters affecting the behaviour of trace elements in a polluted estuary. Canonical correlation analysis as a tool in environmental impact assessment. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 119: 1–10.

Amín O., Rodríguez, E.M., Hernando, M., Comoglio, L.I., López, L.S. y Medesani, D.A. 1998. Effects of lead and cadmiun on hatching of the southern King crab *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Invertebrate Reproduction and Development*, 33(1): 81-85.

Andersen, L. y Melzer, A. 2004. Intertidal crabs as potencial biomonitors in Port Curtis. Cooperative Research Centre for Coastal Zone Estuary and Waterway Management. Technical report 12: 1-24.

Anger, K., Spivak, E., Luppi, T., Bas, C. y Ismael, D. 2008. Larval salinity tolerance of the South American salt-marsh crab, *Neohelice* (Chasmagnathus) *granulata*: physiological constraints to estuarine retention, export and reimmigration. *Helgoland Marine Research* 62: 93–102.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) y WPCF (Water Pollution Control Federation). 1992. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, 18th Edition, Washington DC, 1200 pp.

Au, D.W.T., Lee, C.Y., Chan, K.L., y Wu R.S.S. 2001. Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality. *Environmental Pollution* 111: 1-9.

Au, D.W.T., Yurchenko, O.V. y Reunov, A.A. 2003. Sublethal effects of phenol on spermatogenesis in sea urchins (*Anthocidaris crassispina*). *Environmental Research* 93: 92–98.

Banthita Sawasdee y Heinz-R. Köhler 2009. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). *Chemosphere* 75: 1539–1547.

Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A. y Adam-Guillermin, C. 2010. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquatic Toxicology* 100: 295–302.

Barry, R. G. y Chorley, R. 1980. *Atmósfera, tiempo y clima*. Editorial Omega, Barcelona.

Barutot, R., D’Incao, F. y Fonseca, D.B. 2009. Reproductive biology of *Neohelice granulata* (Decapoda: Varunidae) in two salt marshes of the estuarine region of the Lagoa dos Patos Lagoon, southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89(4): 769–774.

Bas, C., Luppi, T. y Spivak, E. 2005. Population structure of the South American Estuarine crab, *Chasmagnathus Granulatus* (Brachyura: Varunidae) near the southern limit of its geographical distribution: comparison with northern populations. *Hydrobiología* 00: 1-12.

Bas, C., Luppi, T., Spivak, E., y Schejter, L. 2009. Larval dispersion of the estuarine crab *Neohelice granulata* in coastal marine waters of the Southwest Atlantic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83: 569–576.

Bas, C. y Spivak, E. 2000. Effect of salinity on embryos of two Southwestern Atlantic estuarine grapsid crab species cultured in vitro. *Journal of Crustacean Biology* 20 (4): 647–656.

Bas, C. y Spivak, E. 2003. “Effects of embryonic salinity exposure on larval development in two populations of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustacea: Brachyura)”. *Invertebrate Reproduction and Development* 43: 117-123.

Bas, C., Spivak, E. y Anger, K. 2007. “Seasonal and interpopulational variability in fecundity, egg size, and elemental composition (CHN) of eggs and larvae in a grapsoid crab, *Chasmagnathus granulatus*”. *Helgoland Marine Research* 61: 225–237.

Bas, C., Spivak, E. y Anger, K. 2008. Variation in early developmental stages in two populations of an intertidal crab, *Neohelice* (*Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgoland Marine Research*. DOI 10.1007/s10152-008-0128-5

Beltrame, M.O. 2008. Dinámica biogeoquímica de nutrientes y metales pesados en ambientes intermareales de la laguna costera Mar Chiquita: potenciales efectos

ecotoxicológicos sobre especies claves del ecosistema. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio, J.E. 2008. Cadmium and Zinc in Mar Chiquita Coastal Lagoon (Argentina): Salinity Effects on Lethal Toxicity in Juveniles of the Burrowing Crab *Chasmagnathus granulatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55: 78-85.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio, J.E. 2009 b. Influences of sex, habitat, and seasonality on heavy-metal concentrations from a coastal lagoon in Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 746-756.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio, J.E. 2009. Dissolved and particulate heavy metals distribution in coastal lagoons. A case study from Mar Chiquita Lagoon, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 45-56.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio, J.E. 2011. The burrowing crab *Neohelice granulata* as potential bioindicator of heavy metals in estuarine systems of the Atlantic coast of Argentina. *Environmental Monitoring Assess* 172: 379–389.

Bilos C., Colombo, J. C. y Rodriguez Presa, M. J. 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Pollution*, 99: 1-11.

Blackmore, G. y Wang, W-X. 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se, and Zn accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at different salinities. *Aquatic Toxicology* 62: 205-218.

Botté S., 2005. El rol de la vegetación en el ciclo biogeoquímico de humedales del estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

Botté, S., Freije, R. y Marcovecchio, J.E. 2010. Distribution of Several Heavy Metals in Tidal Flats Sediments within Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Water, Air and Soil Pollution* 210: 371-388.

Botto, F. e Iribarne, O. 2000. Contrasting effects of two burrowing crabs (*Chasmagnathus granulata* and *Uca uruguayensis*) on sediment composition and transport in estuarine environments. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 51: 141- 151.

Brante, A., Cifuentes, S., Pörtner, H-O., Arntz, W, y Fernández, M. 2003. Latitudinal comparisons of reproductive traits in five Brachyuran species along the Chilean coast. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 15-27.

Brante, A., Fernández, M., Eckerle, L., Mark, F., Pörtner, H-O. y Arntz, W. 2003. Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal cline: egg production, embryo losses and embryo ventilation. *Marine Ecology Progress Series* 251: 221-232.

Camacho-Sánchez, M.I. 2007. Bioconcentración y toxicidad de metales en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Revista Toxicológica* 24: 14-17.

Canepuccia, A., Fanjul, M.S., Fanjul, E., Botto, F. e Iribarne, O. 2008. The Intertidal Burrowing Crab *Neohelice* (=Chasmagnathus) *granulata* Positively Affects Foraging of Rodents in South Western Atlantic Salt Marshes. *Estuaries and Coasts* 31:920–930.

Censi, P., Spoto, S.E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Di Geronimo, S.I., Punturo, R. y Ottonello, D. 2006. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere*, 64: 1167–1176.

Chiarelli, R. y Roccheri, M.C. 2014. Marine Invertebrates as Bioindicators of Heavy Metal Pollution. *Open Journal of Metal* 4: 93-106.

Chiodi Boudet, L.N., Polizzi, P., Romero, M.B., Robles, A., Marcovecchio, J.E. y Gerpe, M.S. 2015. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium in white shrimp, *Palaemonetes argentinus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 231–240.

Chourpagar, A.R. y Kulkarani, G.K. 2014. Effect of mercuric chloride on gill structure of a freshwater female crab, *Barytelphusa cunicularis* (Westwood). *Journal of Global Bioscience* 3 (2): 423–427.

Daleo, P. e Iribarne, O. 2009. The burrowing crab *Neohelice granulata* affects the root strategies of the cordgrass *Spartina densiflora* in SW Atlantic salt marshes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 373: 66–71.

Dallas, L.J. y Jha, A.N. 2015. Applications of biological tools or biomarkers in aquatic biota: A case study of the Tamar estuary, South West England. *Marine Pollution Bulletin*. Article in Press.

Davies, I.D. y Vethaak, D. 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. International Council for the Exploration of the Sea. Cooperative Research Report N° 315 (22): 162-163.

Davutluoglu, O.I., Seckin, G., Kalat, D.G., Yılmaz, T. y Ersu, C.B. 2010. Speciation and implications of heavy metal content in surface sediments of Akyatan Lagoon–Turkey. *Desalination* 260: 199–210.

De Marco S.G. 2002. Características hidrológicas y bioópticas de las aguas de la laguna costera Mar Chiquita y su relación con el fitoplancton. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

De Marco, S.G., Botté, S. y Marcovecchio, J.E. 2004. Mercury distribution in estuarine wetlands and salt-marshes from Argentina: an overview. In: *Health and Environmental Effects of Mercury*, K.Eto (ed), National Institute for Minamata Disease (Minamata, Japan), 1: 1-15.

De Marco, S.G., Beltrame, M.O., Freije, R. y Marcovecchio, J.E. 2005. “Phytoplankton dynamic in Mar Chiquita Coastal Lagoon (Argentina), and its relationship with potential nutrient sources”. *Journal of Coastal Research* 21: 818-825.

De Marco, S.G., Botté, S. y Marcovecchio, J.E. 2006. “Mercury distribution in abiotic and biological compartments within several estuarine systems from Argentina: 1980 – 2005 period”. *Chemosphere* 65: 213-223.

Duquesne S., Newton, L.C., Giusti, L., Marriott, S.B., Stärk, H. y Bird, D.J. 2006. Evidence for declining levels of heavy-metals in the Severn Estuary and Bristol Channel, U.K. and their spatial distribution in sediments. *Environmental Pollution*, 143: 187-196.

Elumalai, M., Antunes, C. y Guilhermino, L. 2007. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere* 66: 1249–1255.

Escapa, M., Perillo, G.M.E. e Iribarne, O. 2008. Sediment dynamics modulated by burrowing crab activities in contrasting SW Atlantic intertidal hábitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 80: 365–373.

Fabrocini, A., Di Stasio, M. y D'Adamo, R. 2010. Computerized sperm motility analysis intoxicity bioassays: A new approach to pore wáter quality assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1588–1595.

Fanjul, E., Grela, M.A., Canepuccia, A. e Iribarne, O. 2008. The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal área. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79: 300–306.

Fanjul, E., Bazterrica, M.C., Escapa, M., Grela, M.A. e Iribarne, O. 2011. Impact of crab bioturbation on benthic flux and nitrogen dynamics of Southwest Atlantic intertidal marshes and mudflats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92: 629–638.

Fasano J. L., Hernández, M.A., Isla, F.I y Schnack, E.J. 1982. Aspectos evolutivos y ambientales de la laguna Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, Argentina). *Oceanologica Acta* N° SP: 285-292.

Feng, Y., Huang, X., Zhang, D., Tian, L. y Zeng, Y. 2012. Distribution of heavy metals in sediments of the Pearl River Estuary, Southern China: Implications for sources and historical changes. *Journal of Environmental Sciences* 24(4): 579–588.

Fernández Severini, M.D., Botté, S.E., Hoffmeyer, M.S. y Marcovecchio, J.E. 2009. Spatial and temporal distribution of cadmium and copper in water and zooplankton in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 57–66.

Ferrer, L., Andrade, S., Asteasuain, R. y Marcovecchio, J.E. 2006. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 209–217.

Ferrero, A., Gutiérrez, M.M. y Cervellini, P.M. 2001. Evaluación en laboratorio de la toxicidad aguda de los insecticidas malatión y deltametrina en *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Investigaciones Marinas Valparaíso*, 29(1): 107-111.

Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C.P., Balshine, S. y Wood, C.M. 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 147: 441–449.

Förtsner U. y Wittmann, G. T. eds. 1983. Metal pollution in the aquatic environment. Springer- Verlag, Heidelberg 486 pp.

Giarratano, E. y Amín, O.A. 2010. Heavy metals monitoring in the southernmost mussel farm of the world (Beagle Channel, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1378–1384.

Gil, M.N., Torres, A., Harvey, M. y Esteves, J.L. 2006. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41(2): 167 – 176.

Giménez, L. y Anger, K. 2001. Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 260: 241–257.

Giordano R., Musmeci, L., Ciaralli, L., Vernillo, I., Chirico, M., Piccioni, A. y Constantini, S. 1992. Total contents and sequential extractions of mercury, cadmium and lead in coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 24(7): 350-357.

Gonzalo, C. y Camargo, J.A. 2012. Fluoride bioaccumulation in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) as suitable bioindicator of fluoride pollution in freshwater ecosystems. *Ecological Indicators* 20: 244–251.

Greenwood, J. G. y Fielder, D.R. 1983. Acute toxicity of zinc and cadmium to zoeae of the three species of Portunid crabs (CRUSTACEA: BRACHYURA). *Comp. Biochemistral Phisiology* 75 C (1): 141- 144.

Hakan Olsén, K. 2011. Effects of Pollutants on Olfactory Mediated Behaviors in Fish and Crustaceans. Chapter 26: 507-529. DOI: 10.1007/978-0-387-77101-4\_26.

Hatje V., Apte, S.C., Hales, L.T. y Birch, G.F. 2003. Dissolved trace metal distributions in Port Jackson estuary (Sydney Harbour), Australia. *Marine Bulletin*, 46: 719–730.

Hebel, D.K., Jones, M.B. y Depledge, M.H. 1997. Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44: 177–184.

Hines, A.H. 1982. Aliometric Constraints and Variables of Reproductive Effort in Brachyuran Crabs. *Marine Biology* 69: 309-320.

Iribarne, O. (editor) 2001. Reserva de Biosfera Mar Chiquita: Características físicas, biológicas y ecológicas. Editorial Martín, Argentina. 320pp.

Iribarne, O., Bortolus, A. y Botto, F. 1997. Between-habitat differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. Marine Ecology Progress Series 155: 137-145.

Isla F.I. y Gaido, E. S. 2001. Evolución geológica de la laguna Mar Chiquita. En: Iribarne, O. (ed.) Reserva de Biosfera Mar Chiquita. Características físicas, biológicas y ecológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata, Editorial Martín, Mar del Plata, pp. 19-30.

Ituarte R., Bas C., Luppi, T. y Spivak, E. 2006. “Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae)”. Scientia Marina 70: 709-718.

Ituarte, R., Spivak, E. y Luppi, T. 2004. Female reproductive cycle of the Southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varinudae). Scientia Marina 68 (1): 127-137.

Jackson, R., Baird D. y Els, S. 2005. “The effect of the heavy metals lead (Pb<sup>2+</sup>) and zinc (Zn<sup>2+</sup>) on the brood and larval development of the burrowing crustacean, *Callinassa kraussi*”. Water SA, (31) 1: 107-115.

Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T. y Sepčić, K. 2009. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. Environmental Science Pollution Research. DOI 10.1007/s11356-009-0112-x.

Jiann, K-T., Wen, L-S. y Santschi, P.H. 2005. Trace metal (Cd, Cu, Ni and Pb) partitioning, affinities and removal in the Danshuei River estuary, a macrotidal, temporally anoxic estuary in Taiwan. *Marine Chemistry*, 96: 293– 313.

Kjerfve, B. 1994. Coastal lagoons process. Elsevier Oceanography Series, 60. Elsevier Science Publishers.

Kogan, M., López Greco, L.S., Romano, L.A. y Rodríguez, E.M. 2000. Effects of Cadmium on somatic and gonadal growth of juvenile females of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura: Grapsidae). *Zoological Studies* 39 (4): 344-350.

Koirtyohann, S,R. y Wen, J.N. 1973. Critical study of the AEDC-MIBK extraction system for the absorption. *Analytical chemistry*, 45 (12): 1986-1989.

Kopprio, G. A., Biancalana, F., Fricke, A., Garzón Cardona, J.E., Martínez, A., y Lara, R.J. 2014. Global change effects on biogeochemical processes of Argentinian estuaries: An overview of vulnerabilities and ecohydrological adaptive outlooks. *Marine Pollution Bulletin*. Article in Press.

Kråg, A.S. y Ekerholm, M. 2006. Copper reduce mating behaviour in male shore crabs (*Carcinus maenas* (L.)). *Aquatic Toxicology* 80: 60–69.

Kremling, K. 1999. Determination of trace metals. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K. (eds). *Methods of seawater analysis*, Verlag-Chemie, Heidelberg, Germany, 10: 183-191.

Lardies, M.A. y Castilla, J.C. 2001. Latitudinal variation in the reproductive biology of the comensal crab *Pinnaxodes chilensis* (Decapoda: Pinnotheridae) along the Chilean coast. *Marine Biology* 139: 1125-1133.

Lauer, M. M., Bento de Oliveira, C., Lie Inocencio Yano, L. y Bianchini, A. 2012. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 156: 140–147.

Lavolpe, M., López Greco, L., Kesselman, D. y Rodríguez E. 2004. Differential toxicity of copper, zinc, and lead during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (3): 131- 138.

Lavradas, R.T., Hauser-Davis, R.A., Cavalcanti Lavandier, R., Chávez Rocha, R.C., Saint' Pierre, T.D., Seixas, T., Kehrig, H.A. y Moreira, I. 2014. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes sp.*) specimens from southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107: 55–60.

Le Pabic, C., Caplata, C., Lehodeya, J.P., Milinkovitch, T., Kouetaa, N., Cossone, R.P. y Bustamanted, P. 2015. Trace metal concentrations in post-hatching cuttlefish *Sepia officinalis* and consequences of dissolved zinc exposure. *Aquatic Toxicology* 159: 23–35.

Levent Bat. 2005. “A Review of Sediment Toxicity Bioassays Using the Amphipods and Polychaetes”. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 5: 119-139. Review.

Lewis, C. y Ford, A.T. 2012. Infertility in male aquatic invertebrates: A review. *Aquatic Toxicology* 120– 121: 79– 89.

Li, X., Jia, L., Zhao, Y., Wang, Q. y Cheng, Y. 2009. “Seasonal bioconcentration of heavy metals in *Onchidium struma* (Gastropoda: Pulmonata) from

Chongming Island, the Yangtze Estuary, China”. *Journal of Environmental Sciences* 21: 255-262.

Liu, J., Wu, H., Feng, J., Li, Z. y Lin, G. 2014. Heavy metal contamination and ecological risk assessments in the sediments and zoobenthos of selected mangrove ecosystems, South China. *Catena* 119: 136–142.

López Greco, L.S. y Rodríguez, E. 1998. Somatic growth in juveniles of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Brachyura, Grapsidae), under laboratory conditions. *Investigaciones Marinas, Valparaiso*, 26: 127-135.

López Greco, L.S., Stella, V. y Rodríguez, E. 1997. Size at onset of sexual maturity in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Nauplius, Rio Grande*, 5(2): 65-75.

López Greco, L.S., Sánchez, M.V., Nicoloso, G.L., Medesani, D.A. y Rodríguez, E.M. 2001. Toxicity of Cadmium and Copper on Larval and Juvenile Stages of the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 333–338.

Luppi T., Spivak, E. y Anger, K. (2002). “Postsettlement growth of two estuarine crab species, *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae): laboratory and field investigations”. *Helgoland Marine Research* 55: 293–305

Luppi, T., Spivak, E., Bas, C. y Anger, K. 2004. Molt and growth of an estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae), in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 333–344.

Lye, C.M., Bentley, M.G., Clare, A.S. y Sefton, E.M. 2005. Endocrine disruption in the shore crab *Carcinus maenas*—a biomarker for benthic marine invertebrates? *Marine Ecology Progress Series* 288: 221-232.

Ma, D., Hou, Y., Du, L., Li, N., Xuan, R., Wang, F., Jing, W. y Wang, L. 2013. Oxidative damages and ultrastructural changes in the sperm of freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98: 244–249.

MacFarlane G.R., Booth, D.J. y Brown, K.R. 2000. The Semaphore crab, *Heloeccius cordiformis*: bio-indication potential for heavy metals in estuarine systems. *Aquatic Toxicology* 50: 153–166.

Maharajan, A., Narayanasamy, Y., Ganapiriya, E. y Shanmugavel, K. 2015. Histological alterations of a combination of Chlorpyrifos and Cypermethrin (Nurocombi) insecticide in the fresh water crab, *Paratelphusa jacquemontii* (Rathbun). *The Journal of Basic and Applied Zoology* 72: 104–112.

Maharajan, A., Rajalakshmi, S., Vijayakumaran, M. y Kumarasamy, P. 2012. Sublethal effect of copper toxicity against histopathological changes in the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Biological Trace Element Research* 145: 201–210.

Manosathiyadevan, M. y Selvisabhanayakam, V.D. 2012. Morphological alterations and biochemical contents of the testis of adult male freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 2 (4): 104–113.

Mao, H-h., Lee, S-E., S, J., Hwang, J.M., Bae, Y.J. y Cho, K. 2013. Exposure of mayfly *Ephemera orientalis* (Ephemeroptera) eggs to heavy metals and discovery of biomarkers. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36: 1167–1175.

Marcovecchio, J.E., Andrade, S., Ferrer, L., Asteasuain, R., De Marco, S.G., Gavio, M.A., Scarlato, N., Freije, R. y Pucci, A. 2001. "Mercury distribution in estuarine environments from Argentina: the detoxification and recovery of salt-marshes after 15 years", *Wetland Environmental Management* 9: 317-322.

Marcovecchio, J.E., Botté, S., Severini, M. y Deluchi, F. 2010. Geochemical Control of Heavy Metal Concentrations and Distribution Within Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Aquatic Geochemistry* 16: 251-266.

Marcovecchio, J.E., De Marco, S.G., Pozzobon, M.V., Gavio, M.A., Asteasuain, R., Rusansky, C., Ferrer, L., Andrade, S. y Freije, H. 1997. The role of estuaries buffer zones to the litoral marine environmental: the case of Mar Chiquita coastal lagoon, in Argentina. *Proceedings VII Congreso Latinoamericano sobre Ciencias do Mar*. A. Martins Paiva y R. Weber (ed). USP, Vol II: 128-130. ISB N° 3-540-42540-3.

Marcovecchio, J.E. y Ferrer, L. 2005. Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Journal of Coastal Research*, 21 (4): 826-834.

Marcovecchio, J.E., Ferrer, L., De Marco, S., Gavio, A. y Pucci A. 2004. "Trace Metals Occurrence and Geochemical Distribution in Sediments from Mar Chiquita Coastal Lagoon, Argentina". In: *Facets of Environmental Geochemistry in Tropical and Subtropical Environments*, L.D.Lacerda, R.E.Santelli, E.K.Duursma & J.J.Abrão (eds), Springer-Verlag, Berlin (Germany), Ch.24, 384 pp. (ISBN 3-540-42540-3).

Marcovecchio, J., Freije, R., De Marco, S., Gavio, .A., Beltrame, O. y Asteasuain, R. 2006. "Seasonality of hydrographic variables in a coastal lagoon: Mar Chiquita, Argentina". *Aquatic Conservation: Marine & Freshwater Ecosystems* 16: 335-347.

Maria, V.L., Santos, M.A. y Bebianno, M.J. 2009. Contaminant effects in shore crabs (*Carcinus maenas*) from Ria Formosa Lagoon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150: 196–208.

Market, B. 2008. From Biomonitoring to integrated observation of the environment. The multi-markered bioindication concept. *Ecological Chemistry and Engineerings* 15 (3): 315-333.

Martin, J.M., Huang, W.W. y Yoon, Y.Y. 1994. Levels and fate of trace metals in the lagoon of Venice (Italy). *Marine Chemistry* 46: 371-386.

Martin-Diaz, M., Riba, I., Casado Martínez, M. y Del Valls, A. 2006. "Bioavailability of metals in sediments of the Spanish estuaries using *Carcinus maenas*". *Ciencias Marinas* 32: 412-420.

Martos, P. y Reta, R. 1997. Aspectos hidrográficos de la región estuarial de la Laguna de Mar Chiquita, provincia de Buenos Aires. II Congreso Argentino de Limnología - I Reunión de Sistemas Costeros Mixohalinos, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires (Argentina).

Marsh, H. y Rodríguez-Reinoso, F. (eds). 2006. Applicability of activated carbon. In: *Activated Carbon*, Elsevier Ed., Chapter 8: 383-453.

Medesani, D., López Greco, L. y Rodríguez, E. 2004. “Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*”. *Aquatic Toxicology* 69: 165–174.

Méndez Casariego, A., Alberti, J., Luppi, T., Daleo, P. e Iribarne, O. 2011. Habitat shifts and spatial distribution of the intertidal crab *Neohelice* (*Chasmagnathus*) *granulata* Dana. *Journal of Sea Research* 66: 87–94.

Mendez Casariego, A., Luppi, T. Iribarne, O. y Daleo, P. 2011. Increase of organic matter transport between marshes and tidal flats by the burrowing crab *Neohelice* (*Chasmagnathus*) *granulata* Dana in SW Atlantic salt marshes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 401: 110–117.

Mendoza-Rodríguez, R. 2007. Acute toxicity of copper (Cu<sup>2+</sup>) on postlarvae of river prawn *Cryphiops caementarius* (Natantia, Palaemonidae). *Revista peruana de biología* 14 (1): 053- 054. NOTA CIENTIFICA.

Menone, M., Miglioranza, K.S.B., Botto, F., Iribarne, O., Aizpún de Moreno, J. E. y Moreno, V. J. 2006. Field accumulative behavior of organochlorine pesticides. The role of crabs and sediment characteristics in coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* 52: 1717–1724.

Morgan, S.G., Spilseth, S.A., Page, H.M., Brooks, A.J. y Grosholz, E.D. 2006. Spatial and temporal movement of the lined shore crab (*Pachygrapsus crassipes*) in salt marshes and its utility as an indicator of habitat condition. *Marine Ecology Progress Series* 314: 271-281.

Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C. y Rainbow, P.S. 2001. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in

crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 129: 193-209.

Mouneyrac, C., Mastain, O., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Beaunier, P., Jeantet, A.Y., Smith, B.D. y Rainbow, P.S. 2003. Trace-metal detoxification and tolerance of the estuarine worm *Hediste diversicolor* chronically exposed in their environment. *Marine Biology* 143: 731–744,

Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S. y Wood, C.M. 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149: 340–348.

Nascimento, I., Sousa, E. y Nipper, M. (eds.) 2002. *Métodos em Ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil*. Sao Paulo Editora, 262 pp.

Páez-Osuna, F. 1995. “Trace metal concentrations and their distribution in the lobster *Panulirus inflatus* (Bouvier, 1895) from the Mexican Pacific Coast”. *Environmental Pollution* 90: 163-170.

Pandya, P.J. 2011. *Benthic Community Structure of Mahi River Estuary with Special Reference to Animal-sediment Relationship* (Ph.D. thesis). The Maharaja Sayajirao University of Baroda, Vadodara, Gujarat, India 23–104.

Papoulias. D.M., Schwars, M.S., Mena, L. y Diana, M. 2013. Gonadal abnormalities in frogs (*Lithobates spp.*) collected from managed wetlands in an agricultural region of Nebraska, USA. *Environmental Pollution* 172: 1-8.

Park, J., Soyoun, K., Jisu, Y., Jae-Seong, L., June-Woo, P. y Jinho, J. 2014. Effect of salinity on acute copper and zinc toxicity to *Tigriopus japonicus*: The difference between metal ions and nanoparticles. *Marine Pollution Bulletin* 85: 526–531.

Paruruckumani, P.S., Maharajan, A., Ganapiriya, V. Narayanaswamy, Y. y Raja Jeyasekar, R. 2015. Surface ultrastructural changes in the gill and liver tissue of asian sea bass *Lates calcarifer* (Bloch) exposed to copper. *Biological Trace Element Research* <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-015-0370-z>.

Perillo, G.M.E. 1995. Definitions and Geomorphologic classifications of estuaries. In: *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries, Developments in Sedimentology* 53. Chapter 2: 17-47.

Piccolo, M.C. y Perillo, G.M.E. 1999. The Argentina Estuaries: A review. In: Perillo, G.M.E., M.C. Piccolo & M. Pino Quivira (eds.), *Estuaries of South America: their geomorphology and dynamics*, Environmental Science Series, Springer-Verlag, Berlin 6: 101-132.

Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Yunes, J.S., Luquet, C.M., Bianchini, A. y Monserrat, J.M. 2000. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 459–468.

Pinto Rodrigues, A., Oliva-Teles, T., Mesquita, S.R., Delerue- Matos, C. y Guimarães, L. 2014. Integrated biomarker responses of an estuarine invertebrate to high abiotic stress and decreased metal contamination. *Marine Environmental Research* 101: 101-114.

Ponce-Vélez, G. y Botello, A. V. 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiológica*, 1(2): 1-10.

Pourang, N., Dennis, J.H. y Ghourchian, H. 2005. Distribution of heavy metals in *Panaeus semisulcatus* from Persian Gulf and possible role of metallothionein in their redistribution during storage. *Environmental Monitoring and Assessment* 100: 71–88.

Prato, E., Parlapiano, I. y Biandolino, F. 2013. Assessment of individual and combined toxicities of three heavy metals (Cu, Cd and Hg) by using *Tigriopus fulvus*. *Chemistry and Ecology* 29 (7): 635–642.

Prohaska, F. 1976. The climate of Argentina, Paraguay and Uruguay. In: Schwedtfeger, W. (ed), *Climates of Central and South America, World Survey of Climatology*, vol 12. Elsevier, New York, pp. 13-112.

Qunfang, Z., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. y Jiang, G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606: 135-150.

Reish, D. y Oshida, P. 1987. Short-term static bioassays. Part 10. FAO, Doc. *Téc. Pesca* 247.

Reta, R., Martos, P., Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C. y Ferrante, A. 2001. Características hidrográficas del estuario de la laguna Mar Chiquita. En: Iribarne O. (ed.). *Reserva de Biosfera Mar Chiquita. Características físicas, biológicas y ecológicas*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Editorial Martín, Mar del Plata, pp. 31-52.

Revathi, P., Vasanthi, L.A. y Munuswamy, N.2011. Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 623–629.

Rodríguez Grau J. y Esclapés, M. 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Gerencia general de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP, PDVSA. 109 pp.

Rodríguez, E., Medesani, D. y Fingerman, M. 2007. “Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review”. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 146: 661-671.

Rodríguez, E.T. y Pardal, M.A. 2014. Review: The crab *Carcinus maenas* as a suitable experimental model in ecotoxicology. *Environment International* 70: 158–182.

Sal Moyano, M.P., Gavio, M.A. y Luppi, T.A. 2012. Mating system of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Brachyura: Varunidae) in two contrasting environments: effect of burrow architecture. *Marine Biology*. 159: 1403-1416.

Sal Moyano, M.P., Gavio, M.A., Mc Lay, C. y Luppi, T.A. 2014. Habitat-related differences in the pre-copulatory guarding and copulation behavior of *Neohelice granulata* (Brachyura, Grapsoidea, Varunidae). *Journal of Sea Research*.

doi 10.1016/j.seares.2013.12.004.

Sal Moyano, M.P., Luppi, T.A., Gavio, M.A., Vallina, M. y Mc Lay, C. 2012. “Receptivity of female *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae): different strategies to maximize their reproductive success in contrasting habitats”. *Helgoland Marine Research* 66: 661–674. DOI 10.1007/s10152-012-0299-y.

Sal Moyano, M.P., Silva, P., Luppi, T.A. y Gavio, M.A. 2014. Female mate choice by chemical signals in a semi-terrestrial crab. *Journal of Sea Research*.85: 300–307.

Sampaio Sant ´Anna, B., Moscardi dos Santos, D., Corsino Sandrond, D., Cardoso de Souzad, S., Rodrigues de Marchi, M.R., Zara, F.J. y Turra, A. 2012. Hermit crabs as bioindicators of recent tributyltin (TBT) contamination. *Ecological Indicators* 14: 184–188.

Sánchez, M.V., Cahansky, A.V., López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M. 2005. Toxicity of mercury during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). *Environmental Research* 99: 72–78.

Saravana Bhavan, P. y Geraldine, P. 2009. Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Journal of Environmental Biology* 30 (4): 533–538.

Schvezov, N. y Amín, O. 2011. Biochemical response of amphipods (*Gammarid: Paramorea*) in a sediment laboratory exposure from Ushuaia Bay, Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 394–402.

Shi Ling Chan, G., Ying Yu Tan, L., y Pi Lee Goh, B. 2013. Development of a Toxicity Bioassay Using Fertilisation in the Green Mussel, *Perna viridis*, from Exposure to Copper and Cadmium. *Asian Youth Journal of Biology* 1: 1-12.

Shimshock, N., Sennefelder, G., Dueker, M., Thurberg y Yarish, F. 1992. Patterns of metal accumulation in *Laminaria longicuris* from Long Island Sound (Connecticut). *Archives of Environmental of Contamination and Toxicology* 22: 305-312.

Siddon, C.E. y Witman, J.D. 2004. Behavioral indirect interactions multiple predator effects and prey switching in the rocky subtidal. *Ecology* 85: 2938–2945.

Silva P., Luppi T.A. y Spivak, E. 2007. “Epibiosis on eggs and brooding care in the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae): comparison between mudflats and SALT marshes”. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87: 893-901.

Silva, P., Luppi, T.A., Spivak, E. y Anger, K. 2009. Reproductive traits of an estuarine crab, *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae), in two contrasting hábitats. *Scientia Marina* 73 (1): 117-127.

Simeó, C.G., Ribes, E. y Rotllant, G. 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell* 41: 345–361.

Simonetti, P., Botté, S.E., Fiori, S.M. y Marcovecchio, J.E. 2012. Heavy-Metal Concentrations in Soft Tissues of the Burrowing Crab *Neohelice granulata* in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62 (2): 243-253.

Spivak, E., Anger, K., Bas, C., Luppi, T. e Ismael, D. (1996). “Size structure, sex ratio, and breeding season in two intertidal grapsid crab species from Mar Chiquita Lagoon, Argentina”. *Nerítica* 10:7–26.

Spivak E., Anger, K., Luppi, T., Bas, C. e Ismael, D. (1994). “Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina)”. *Helgolän Meeresun* 48:59–78.

Spivak, E. D. 2010. The crab *Neohelice* (=Chasmagnathus) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research* 64:149–154.

Stella, V.S., López, L.S. y Rodríguez, E.M. 1996. Fecundity and brood biomass investment in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Decapoda, Brachyura, Grapsidae). *Crustaceana* 69 (3): 306-312.

Strahler, A.N. 1981. *Geografía Física*, Ed. Omega S.A., Barcelona, 767 pp.

Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Costa, M.J. y Cabral, H.N. 2011. Connectivity between estuaries and marine environment: Integrating metrics to assess estuarine nursery function. *Ecological Indicators* 11: 1123–1133.

Vazquez, G.F., Diaz, R.A. y Salvador, L.G. 1998. Dissolved metals in Alvarado lagoon, México. *Environmental International*, 24 (7): 721-727

Vazquez, G.F., Sharma, V. K., Magallanes, V. R. y Marmolejo, A.J. 1999. Heavy Metals in a Coastal Lagoon of the Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 38 (6): 479-485.

Verriopoulos, G. y Hardouvelis, H. 1988. Effects of Sublethal Concentration of Zinc on Survival and Fertility in Four Successive Generations of *Tisbe*. *Marine Pollution Bulletin* 19 (4): 162-166.

Viaroli, P., Laserre, P. y Campostrini, P. 2007. Lagoons and coastal wetlands. *Hidrobiología*, 577: 1–3.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. y Koehler, A. 2007. “The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-

induced stress síndrome in sentinel organisms”. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 146: 281-300. Review.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P. y Rodriguez, E.M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 122: 121–129.

Wang, Z-L y Liu, C-K. 2003. Distribution and partition behavior of heavy metals between dissolved and acid-soluble fractions along a salinity gradient in the Changjiang Estuary, eastern China. *Chemical Geology*, 202: 383– 396

Ward, G.S. y Parrish, P.R. 1982. Manual of methods in aquatic environment research. Part 6. Toxicity. Test. FAO.Fisheries Technical Papers 185: 23 pp.

Weis, J.S., Cristini, A. y Rao, K.R. 1992. Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. *Am. Zool.* 32, 495-500.

Weis, J.S. 2014. Review: Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota. *Toxics* 2014, 2, 165-187; doi: 10.3390/toxics2020165.

Weng, N. y Wang, W-X. 2014. Variations of trace metals in two estuarine environments with contrasting pollution histories. *Science of the Total Environment* 485–486: 604–614.

Yamaguchi, S., Tuble Celino, F., Ito, A., Agusa, T., Tanabe, S., Tuyen, B.C., Miura, C. y Miura, T. 2008. “Effects of arsenic on gonadal development in freshwater crab, *Somanniathelphusa pax*, in Vietnam and *Geothelphusa dehaani* in Japan”. *Ecotoxicology* 17: 772-780.

Yang, G., Kille, P. y Ford, A. 2008. "Infertility in marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates?". *Aquatic Toxicology* 88: 81-87.

Yurchenko, O. y Vaschenko, M.A. 2010. "Morphology of spermatogenic and accessory cells in the mussel *Modiolus kurilensis* under environmental pollution". *Marine Environmental Research* 70: 171-180.

Yurchenko, O., Radasshevsky, V.I., Hsieh, H-L. y Reunov, A.A. 2009. "Ultrastructural comparison of the spermatozoa of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* inhabiting polluted and relatively clean areas in Taiwan". *Aquatic Ecology* 43: 513-519.

Zapata, V., López Greco, L.S. Medesani, D. y Rodríguez, E.M. 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. *Aquaculture* 224: 339–352.

Zar J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA, 435 pp.

Zheng, S., Wang, P., Wang, C., Hou, J. y Qian, J. 2013. Distribution of metals in water and suspended particulate matter during the resuspension processes in Taihu Lake sediment, China. *Quaternary International* 286: 94-102.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. y Jiangou, G. 2008. Review: Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606: 135–150.