



Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería en Medioambiente
Ingeniería Ambiental

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LOS SEDIMENTOS DEL
HUMEDAL URBANO ESTUARIO LOS MOLLES: BASE PARA UN
PROGRAMA DE MONITOREO.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AMBIENTAL**

**AUTOR: YARITZA EVELYN ARAYA ALFARO
PROFESOR GUÍA: HERNÁN GAETE OLIVARES**

VALPARAÍSO, 2022

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia, por entregarme el apoyo incondicional en todo este proceso, por amarme y ser pilar fundamental de todo lo que soy y seré a futuro como persona y como profesional. A mi mami y mis tatas, por ser los mejores del mundo y por quienes agradezco a la vida poder tenerlos conmigo en esta etapa.

A mis amigas por siempre estar cuando las necesitaba y a mis amigos quienes me acompañaron, ayudaron y apoyaron durante todo el proceso universitario, por el lazo inquebrantable que hemos forjado durante estos últimos años y por estar, en las buenas en las malas y en las peores.

A todos los compañeros que hice en la etapa universitaria, con quienes trabajé, movilicé y luché por un país y una universidad más justa, equitativa y feminista.

A los profesores Hernán Gaete y Hugo Díaz, quienes me facilitaron sus laboratorios para desarrollar mi estudio durante el año y quienes aguantaron todas mis embarradas durante el desarrollo de los ensayos.

A la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Valparaíso, quienes me entregaron los insumos necesarios para la realización de mi ensayo y al laboratorio de Ecología Aplicada de Universidad de Valparaíso que me facilitaron su laboratorio para procesar mis muestras.

A la vida por todo lo que me ha dado y que espero me siga dando.

RESUMEN

Los humedales tipo estuarios son ecosistemas importantes para una variedad de especies a los que proveen hábitat, recursos, beneficios y servicios, sin embargo, el avance de la actividad antrópica amenaza con perturbar su balance natural y su calidad. Esta problemática afecta a cuerpos de agua en todo el mundo. En la región de Valparaíso, tenemos el caso del humedal urbano Estuario Los Molles, ecosistema que se encuentra fuertemente presionado por la actividad humana, fraccionando su polígono (debido a expansión urbana y el crecimiento de la población flotante en la localidad) e interviniendo sus aguas (al recibir descargas de aguas residuales de una planta de tratamiento y aguas servidas), lo que altera su calidad y la de sus sedimentos. Para evaluar la calidad de estos últimos, se realizaron pruebas de toxicidad estandarizadas al exponer los organismos, *Allium cepa* y *Artemia salina* L a elutriados de sedimento del estuario. Preliminarmente con sulfato de cobre (CuSO_4) como tóxico de referencia y posteriormente con los elutriados pertenecientes a cinco puntos de muestreo del humedal. La recolección de muestras se realizó en el mes de octubre de 2022. Los resultados de la experiencia previa en laboratorio presentaron datos poco concluyentes para *Allium cepa* debido a la baja concentración del tóxico en el medio de exposición, para el ensayo con *Artemia salina*, la concentración de inhibición media Cl_{50} fue de 1,99 mg/L de CuSO_4 . Los elutriados de los sedimentos del humedal presentaron niveles altos de toxicidad con respecto al control, en las estaciones E4 con un porcentaje de mortalidad 42 % y 50 % de nauplios de *Artemia salina* L. expuestos por 24 y 48 horas respectivamente, mientras que los valores de toxicidad más altos registrados en *Allium cepa* fueron aquellos expuestos a E1 y E3, quienes presentaron mayor ocurrencia de aberraciones cromosómicas y E5 siendo la zona que desarrolló menor número de células en mitosis en la zona meristemática de las raíces. Los protocolos estandarizados demuestran que los organismos seleccionados para la realización de los bioensayos detectan niveles de toxicidad en muestras compuestas como los elutriados, además, presentan ventajas debido a la sensibilidad de los organismos y la fácil reproducción de los ensayos, por lo que podrían ser utilizados para evaluar ambientalmente la calidad del humedal Estuario Los Molles, como base para desarrollar un programa de monitoreo que busque conservar y preservar este ecosistema.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco teórico	1
2.1 Definición de humedal	1
2.2 Importancia de los humedales	1
2.2.1 Ecosistemas acuáticos costeros	2
2.3 Características físicas, químicas y biológicas de los ecosistemas acuáticos costeros.	3
2.3.1 Factores geológicos	3
2.3.2 Recurso hídrico	4
2.3.3 Disponibilidad de oxígeno	5
2.3.4 Vegetación y organismos acuáticos	6
2.3.5 Sedimentos	6
2.4 Impactos de las actividades antrópicas sobre los ecosistemas acuáticos continentales	8
2.5 Legislación y normativas ambientales.	9
2.5.1 Normativas nacionales	10
2.5.1.1 Ley de humedales urbanos	10
2.5.1.2 Norma técnica NCh 1.333, modificada en 1987	11
2.5.1.3 Normas de calidad primarias para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades recreacionales con contacto directo	11
2.5.1.4 Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales del Lago Villarrica	12
2.5.1.5 Norma secundaria de la calidad para la protección de las aguas continentales de la cuenca del Río Maipo	13
2.5.1.6 Norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del Río Serrano	13

2.5.1.7 Norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas del Lago Llanquihue.....	13
2.5.2 Planes de monitoreo	14
2.6 Análisis de calidad de cuerpos de agua	14
2.7 Bioensayos como herramienta para determinar la toxicidad de un lugar	15
2.7.1 <i>Allium cepa</i>	17
2.7.2 <i>Artemia salina</i> L.	19
3. Problema	23
4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. Metodología	26
5.1 Zona de estudio.....	26
5.2 Puntos de muestreo	27
5.3 Muestreo y pretratamiento de las muestras de sedimentos.....	28
5.4 Caracterización Física y Química de las aguas y sedimentos.	28
5.5 Elección de organismos a utilizar.	31
5.6 Bioensayos.....	31
5.6.1 Preparación muestras de elutriados.....	32
5.6.2 Bioensayo con <i>Allium cepa</i>	33
5.6.2.1 Elongación radicular	34
5.6.2.2 Índice mitótico (IM)	35
5.6.3 Bioensayo con <i>Artemia salina</i> L.	37
5.6.3.1 Eclosión de quistes de <i>Artemia salina</i> L.	38
5.6.3.2 Prueba de toxicidad.....	40
5.6.3.3 Cálculos de porcentaje de mortalidad.....	41
5.7 Programa de monitoreo.....	42

5.7.1 Etapas del monitoreo	43
5.7.1.1 Etapa 1: recopilación bibliográfica y análisis.....	43
5.7.1.2 Etapa 2: definición de objetivos	43
5.7.1.3 Etapa 3: definir preguntas claves y escalas adecuadas.....	44
5.7.1.4 Etapa 4: Selección del diseño de monitoreo	44
5.7.1.5 Etapa 5: Determinación de parámetros a medir, número de sitios y duración del monitoreo.	44
5.7.1.6 Etapa 6: Protocolos de monitoreo.....	46
5.7.1.7 Etapa 7: implementación programa de monitoreo	50
5.7.1.8 Etapa 8: análisis de resultados	50
5.7.1.9 Etapa 9: Evaluación y manejo adaptativo.	50
6. Resultados.....	51
6.1 Implementación de ensayos estandarizados de toxicidad con un tóxico de referencia	51
6.1.1 Ensayo con bulbos de <i>Allium sp.</i>	51
6.1.2 Ensayo con <i>Artemia salina</i> L.....	53
6.2 Características físicas y químicas del humedal	55
6.2.1 Parámetros medidos en Terreno.....	56
6.2.2 Parámetros medidos en laboratorio	57
6.3 Determinación de la genotoxicidad y citotoxicidad de los sedimentos.	62
6.3.1 Bioensayo con <i>Allium cepa.</i>	62
6.3.2 Bioensayo con <i>Artemia salina</i> L.	73
6.4 Programa de monitoreo.....	75
7. Discusión	77
8. Conclusión.....	83
9. Bibliografía.....	84
10. Anexos.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1: Materiales bioensayo adaptado con <i>Allium sp.</i>	34
Tabla 5.2: Condiciones para las pruebas de toxicidad con <i>Allium cepa</i>	35
Tabla 5.3: Materiales para bioensayo con <i>Artemia salina L.</i>	38
Tabla 5.4: Condiciones para la eclosión de quistes de <i>Artemia salina L.</i>	40
Tabla 5.5: Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad con <i>Artemia salina L</i>	41
Tabla 5.6: Parámetros a medir en el monitoreo.	44
Tabla 5.7: Elementos de protección personal, equipamiento y materiales para el monitoreo de Avifauna (CEA, 2018).	47
Tabla 5.8: Elementos de protección personal, equipamiento y materiales para el monitoreo de Macrófitas (CEA, 2018).....	48
Tabla 5.9: Elementos de protección personal, equipamiento y materiales para el monitoreo de Macroinvertebrados (CEA, 2018).....	49
Tabla 6.1: Mortalidad de nauplios a 24 y 48 horas de exposición.	54
Tabla 6.2: Ubicación geográfica estaciones de muestreo.....	55
Tabla 6.3: Parámetros físicos, químicos e hidro morfológicos del humedal.	57
Tabla 6.4: Resultados análisis por colorimetría.	57
Tabla 6.5: Materia orgánica sedimentos.	58
Tabla 6.6: Crecimiento radicular <i>Allium cepa</i>	63
Tabla 6.7: Resumen medidas de tendencia central.	64
Tabla 6.8: Análisis de varianza.....	64
Tabla 6.9: Significancia de los datos.	65
Tabla 6.10: Conteo de células en mitosis.	65
Tabla 6.11: Índice mitótico (IM) e índice de fases (IF).	66
Tabla 6.12: Aberraciones en células de <i>Allium cepa</i>	70
Tabla 6.13: Mortalidad de nauplios a las 24 y 48 horas de exposición.	73
Tabla 6.14: Programa de monitoreo.	76
Tabla 10.1: Plantilla de datos crecimiento radicular <i>Allium sp.</i>	98
Tabla 10.2: Mortandad de nauplios a 24 y 48 horas de exposición.	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: <i>Ciclo hidrológico de humedal costero</i>	2
Figura 2.2: Esquema general de las partes de un estuario incluyendo sus relaciones con la parte fluvial.	4
Figura 2.3: Fisiología de la raíz	18
Figura 2.4: Ciclo de vida de <i>Artemia salina</i>	20
Figura 2.5: <i>Artemia salina</i> L. adulta.	21
Figura 5.1: Imagen satelital Los Molles en la región de Valparaíso.	26
Figura 5.2: Estaciones de muestreo.	28
Figura 5.3: Muestras de agua.	29
Figura 5.4: Agitador de tamiz.	30
Figura 5.5: Determinación de materia orgánica por método de ignición.	31
Figura 5.6: Muestras secas de sedimentos por punto de muestra.	32
Figura 5.7: Elutriados	33
Figura 5.8: Zona meristemática de la raíz, observación en lupa binocular.	36
Figura 5.9: Raíz en orceína acética.	36
Figura 5.10: Quistes de <i>Artemia salina</i> (eclosionando y por eclosionar).	38
Figura 5.11: Crecimiento de <i>Artemia salina</i> L.	39
Figura 5.12: <i>Artemia salina</i> expuestas a elutriados, control negativo y positivo.	40
Figura 5.13: Etapas y elementos fundamentales del monitoreo.	43
Figura 5.14: Cuadrante.	48
Figura 5.15: Red de pateo en forma de D	49
Figura 6.1: Bioensayo con <i>Allium fistulosum</i> expuestos a distintas concentraciones de CuSO ₄	51
Figura 6.2: Desviación estándar del crecimiento radicular.	52
Figura 6.3: Imagen microscópica 10X zona meristemática <i>Allium fistulosum</i>	52
Figura 6.4: Imagen microscópica 100X zona meristemática <i>Allium fistulosum</i>	53
Figura 6.5: Quistes de <i>Artemia salina</i> en microscopio 4X y nauplio de <i>Artemia salina</i> microscopía 10X.	53
Figura 6.6: Porcentaje de mortalidad según concentración.	54
Figura 6.7: Estaciones de muestreo. Fuente: Google Earth.	56

Figura 6.8: Curva granulométrica Estación 1.	59
Figura 6.9: Curva granulométrica Estación 2	60
Figura 6.10: Curva granulométrica Estación 3.....	60
Figura 6.11: Curva granulométrica Estación 4.....	61
- Figura 6.12: Curva granulométrica Estación 5.	61
Figura 6.13: Índice mitótico.	66
Figura 6.14: División celular control. A: profase temprana b: Metafase c: Anafase d: Telofase final.	67
Figura 6.15: División celular muestra E1. A: Profase inicial b: Metafase c: Anafase final d. Telofase inicial.....	67
Figura 6.16: Células en división celular expuestas a elutriado E2.....	68
Figura 6.17: Células en división celular a) Anafase temprana b) Telofase c) Metafase d) Profase temprana.	68
Figura 6.18: Mitosis raíces expuestas a elutriado E4. a: Metafase. b: Anafase final. c: Telofase. d: Profase inicial.....	69
Figura 6.19: Mitosis raíces expuesta a elutriado E5. a: Metafase b: Anafase temprana c: Telofase inicial d: Profase inicial.	69
Figura 6.20: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas elutriado E1. a: b: Micronúcleo c: Cromosoma rezagado.....	70
Figura 6.21: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E2. Presencia de micronúcleos.	71
Figura 6.22: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E3. Micronúcleo y Puente en Anafase.	71
Figura 6.23: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E3. Micronúcleo y anillo en Metafase.....	72
Figura 6.24: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E5. Micronúcleos.	72
Figura 6.25: Porcentaje mortalidad después de 24 horas de exposición.....	73
Figura 6.26: Porcentaje mortalidad después de 48 horas de exposición.....	74

ACRÓNIMOS

DGA: Dirección General de Aguas.

FIR: Ficha Informativa de Ramsar.

HU: Humedal Urbano.

MMA: Ministerio de Medio Ambiente.

SEGPRES: Secretaria General de la Presidencia.

OdeC: Objeto de Conservación.

PGA: Plan de Gestión Ambiental.

SEA: Sistema de Evaluación Ambiental.

SEIA: Servicio de Evaluación de Impacto Ambiental

SIG: Sistema de Información Geográfica.

SISS: Superintendencia de Servicios Sanitarios.

INN: Instituto Nacional de Normalización.

EPA: Environmental Protection Agency.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

CONAMA: Corporación nacional de medio ambiente.

OD: Oxígeno disuelto.

TDS: Solidos disueltos totales.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes acuáticos comprenden los ecosistemas marinos y de agua dulce. Los ambientes marinos cubren cerca de 71% de la Tierra y se compone por océanos, estuarios, arrecifes de coral y ecosistemas costeros, mientras los ecosistemas de agua dulce cubren menos del 1% de la superficie terrestre y están compuestos por ecosistemas lénticos, lóticos y de humedales. En conjunto producen el 50 % de la biomasa, incorporando el 50 % del CO₂ liberado antropogénicamente y siendo responsables por el 50% de la emisión de oxígeno en este planeta (Longhurst, 1995). Aproximadamente el 90 % del CO₂ liberado antropogénicamente es absorbido por los océanos (Reid, 2016) y ayudan a mitigar el cambio climático al canalizar el exceso de CO₂ de los sedimentos de aguas profundas, a través de la bomba biológica (Hain *et al.*, 2014). Sin embargo, las actividades humanas están causando un número creciente de impactos nocivos en ellos.

La contaminación de los ambientes acuáticos con metales pesados y otros contaminantes afecta la ecología microbiana con efectos posteriores en los ciclos biogeoquímicos y la renovación de nutrientes, además, los ecosistemas acuáticos, como sistemas abiertos, almacenan sedimentos, detritos orgánicos y de otros tipos desde el medio terrestre circundante y realizan intercambio de gases con la atmósfera, por lo que sus límites volumétricos le permiten una cierta capacidad de dilución y degradación de contaminantes. Una vez ese límite se sobrepasa, el ecosistema comenzará a deteriorarse debido a los efectos sinérgicos de varias alteraciones y en el peor de los casos decantará en un deterioro irreversible luego de un periodo de aparente resistencia.

Ante esto, las comunidades bentónicas residentes y vegetación aledaña a los cuerpos de agua están sujetas a una serie de factores estresantes químicos y no químicos, por lo que es importante realizar un análisis de múltiples factores para evaluar el deterioro del ecosistema mediante bioensayos toxicológicos para identificar aquellos factores más significativos.

En el presente trabajo se estudiará las características físicas y químicas del Humedal Estuario Los Molles, además, se realizará una evaluación ecotoxicológica de los sedimentos del cuerpo de agua, mediante el desarrollo de bioensayos con las especies *Allium cepa* y *Artemia salina* L., para determinar el nivel de toxicidad de las aguas y sedimentos del humedal y como estos afectan el desarrollo de los organismos antes mencionados, esto como base para un plan de monitoreo ambiental.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de humedal

En la Convención Ramsar (1971), realizada en Irán se definió el termino humedal como “aquellas extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros”.

Se les considera como ecotonos o sistemas intermedios entre zonas inundadas permanentemente y ambientes normalmente secos. Su biodiversidad está determinada según el origen del humedal, su ubicación geográfica, la hidrología de la cuenca, un suelo o sedimento característico de biotopos húmedos del suelo o sedimento y una vegetación emergente característica de los biotopos húmedos (usualmente con gran proporción de helófitas) (Hauenstein *et al.*, 1999; Mitch y Gosselink 1986).

En Chile, Decreto N° 771 de 1981 del Ministerio de Relaciones Exteriores, que promulgó en nuestro país la Convención de Ramsar, define humedal como “las zonas húmedas que dividen en áreas de ciénagas, pantanos, áreas de musgos o agua, sean estas naturales o artificiales, permanentes o temporales, de aguas estáticas o corrientes, frescas, con helechos o saladas, incluyendo zonas de agua de mar cuya profundidad no exceda de seis metros durante la marea baja”.

2.2 Importancia de los humedales

Los humedales cumplen un papel importante como reguladores del ciclo hídrico siendo reservorios de agua superficial y subterránea, además, son hábitat para una variedad de flora, fauna y funga. Se les considera como uno de los ecosistemas más productivos del mundo, proporcionando un conjunto de recursos naturales de gran valor científico, turístico y cultural (Hauenstein *et al.*, 1999). Además, los humedales tipos estuarios, son capaces

de amortiguar el efecto de las marejadas, almacenan aguas de las inundaciones, retener sedimentos y reducir la contaminación (Kusler *et al.*, 1994)

Se estima que los cuerpos de agua superficial (lagos, ríos, marismas, estuarios y acuíferos) sirven como reservorio natural para gran parte del agua dulce disponible en todo el mundo. Sin embargo, esto solo representa < 1% de la cantidad total de agua en la Tierra (Convención Ramsar, 2018).

Una forma de clasificar estos cuerpos de agua es considerando su ubicación geográfica y tipo de cuerpo de agua, extensión, entre otras características relevantes. Es así como podemos identificar ecosistemas acuáticos interiores, costeros y marinos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

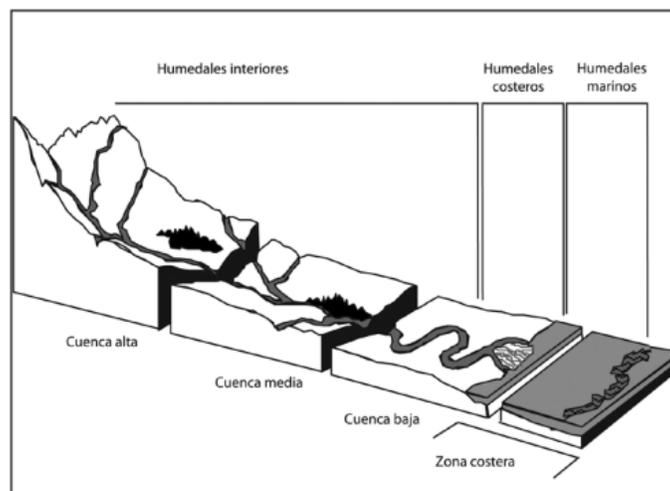


Figura 2.1: Ciclo hidrológico de humedal costero (Cervantes, 2018).

2.2.1 Ecosistemas acuáticos costeros

El Humedal Estuario Los Molles, como todo cuerpo de agua en áreas costeras, mantienen una conexión permanente o temporal mar-continente en un amplio rango de escalas espaciotemporales, que pueden o no estar conectados a sistemas de agua dulce. Esto significa que los tipos de salinidad presentes en las aguas de estos sistemas van desde salobres hasta típicamente marina (Burke, 1988).

En estos ecosistemas, los procesos dinámicos son significativos lo que impone un stress permanente o temporal en su morfología y en los organismos que lo habitan.

2.3 Características físicas, químicas y biológicas de los ecosistemas acuáticos costeros.

La estructura de un ecosistema tiene en cuenta los factores bióticos y las condiciones físicas y químicas, las cuales son determinantes en el establecimiento de los organismos que habitan un ecosistema acuático; su distribución espacial está influida por el caudal y la velocidad de la corriente estos pueden causar cambios en las condiciones ecosistémicas, las concentraciones de oxígeno disuelto, dióxido de carbono y medidas de conductividad, pH y temperatura, entre otros parámetros, asociándolos con la contaminación del agua, sobre todo de origen antrópico (Giller y Malmqvist, 1998; Dickinson y Murphy, 2004).

2.3.1 Factores geológicos

Los márgenes de un estuario están dados principalmente por factores como el relieve continental y las características morfológicas de la plataforma continental, los cuales juegan un rol importante en el comportamiento de los procesos que actúan en la costa, determinan la forma del cuerpo de agua y el nivel de resistencia o vulnerabilidad ante procesos físicos (Marcovecchio *et al.*, 2013).

A su vez, el relieve costero está asociado a la procedencia de los sedimentos, que mayoritariamente proviene del aporte fluvial pero también de la erosión en las costas asociadas en la desembocadura. Estos determinan el rango de marea y las interacciones de este con el humedal (**Figura 2.2**). El caso de Los Molles, las planicies aluviales presentan bajo relieve, lo que propicia un rango de marea grande y por ende la formación del estuario, por tanto, la resiliencia de estos ambientes depende no solo de su capacidad de entrapar sedimentos sino también del aporte que reciben (Marcovecchio *et al.*, 2013).

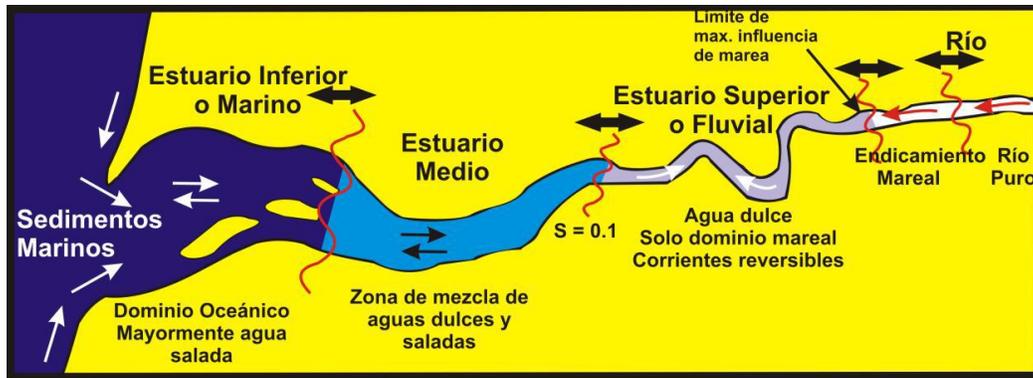


Figura 2.2: Esquema general de las partes de un estuario incluyendo sus relaciones con la parte fluvial (Perillo y Cuadrado, 2013).

2.3.2 Recurso hídrico

El grado de fluctuación vertical del nivel freático y la tasa de flujo lateral del agua subterránea (hidrodinámica) describe gran parte de la variación funcional en los humedales. Para ser clasificado como un humedal, la presencia de agua debe contribuir a la formación de suelos hídricos que se forman bajo condiciones de inundación o saturación durante un tiempo suficiente para crear condiciones anaeróbicas durante la temporada de crecimiento (anóxico químicamente reducido) (Mitch y Gosselink 1986). Las condiciones del agua de los humedales pueden variar ampliamente en términos del momento y la duración de la inundación de agua superficial.

La incorporación del recurso hídrico a los estuarios se da por dos interacciones, la descarga de la cuenca en la parte alta del humedal y las mareas en la desembocadura, las cuales definen el patrón de circulación básica del estuario y el grado de estratificación vertical y longitudinal.

Las mareas introducen y distribuyen componentes tales como sal, sedimentos, nutrientes y otras sustancias del mar a aguas continentales y de igual manera son responsables de la exportación definitiva de los materiales continentales y estuarinos hacia el mar, desde inundaciones permanentes en humedales submareales hasta inundaciones menos frecuentes en otros humedales, como es el caso de Los Molles, donde este fenómeno se presenta mayoritariamente en la temporada de invierno gatillada fenómenos

meteorológicos (precipitaciones, temperatura, vientos, interacción gravitatoria de la luna en las marejadas, etc.), con cambios diarios o de medio día en los niveles del agua.

2.3.3 Disponibilidad de oxígeno

El agua también absorbe el oxígeno liberado por las plantas acuáticas en la fotosíntesis. Una cantidad suficiente de oxígeno disuelto es esencial para el crecimiento y reproducción de organismos aerobios. La fauna acuática obtiene oxígeno moviendo activamente el agua a través de sus estructuras respiratorias o permitiendo pasivamente que las corrientes les suministren oxígeno.

Por otra parte, la inundación de los suelos de los humedales puede conducir a la formación de condiciones anaeróbicas, ya que el oxígeno se consume más rápido de lo que puede ser reemplazado por difusión. Las tasas de pérdida de oxígeno en suelos inundados pueden variar con otras condiciones del suelo, como la cantidad de materia orgánica y las tasas de respiración microbiana. En la mayoría de los humedales, pequeñas capas de óxido del suelo pueden persistir en la superficie o alrededor de las raíces de las plantas vasculares, pero generalmente están dominadas por condiciones anaeróbicas o reductoras.

Si las condiciones anaeróbicas en un humedal prevalecen, este puede generar un gran impacto en su biogeoquímica, con implicaciones importantes para la transformación de carbono, nitrógeno, fósforo, etc. Dependiendo de la entrada, la salida y la circulación interna, los humedales pueden actuar como fuentes, sumideros o transformadores de estos materiales.

Los efectos biológicos asociados al agotamiento de oxígeno en un cuerpo de agua pueden inducir a muertes de vida acuática, sobre todo de aquellos organismos con requerimiento de oxígeno más altos (Meyer y Barclay, 1990).

Uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes en los humedales es el ciclo del nitrógeno, ya que las condiciones anaerobias generan transformaciones como la desnitrificación, donde el nitrato se pierde en la atmósfera por conversión bacteriana en nitrógeno u óxido nitroso.

En el caso de los estuarios, la estratificación se ve ligada a la salinidad del cuerpo de agua, esto debido a que el agua salada contiene menos oxígeno disuelto que el agua dulce, lo que puede afectar la distribución de los organismos acuáticos. Esta estratificación puede ser horizontal, con niveles de OD que caen desde el interior hasta el océano abierto, o vertical, con el agua fresca y oxigenada del río flotando sobre el agua de mar con bajo OD (Webster, Ford y Tillman, 2005; Ajani et al., 2013).

2.3.4 Vegetación y organismos acuáticos

Debido al predominio de agua y las condiciones anaerobias en los humedales, los organismos que habitan humedales, especialmente las plantas con raíces desarrollan adaptaciones para mantenerse en el ecosistema de manera resiliente, lo que les permite seguir siendo productivas ante condiciones de estrés, lo que convierte a los humedales en uno de los ecosistemas más productivos del mundo (Whittaker y Likens, 1973).

Estas altas tasas de producción primaria, sustenta a su vez la producción secundaria, no solo de las comunidades microbianas (a través de la entrada masiva de detritos en los suelos), sino también para dar vida a parte importante de la avifauna.

Los animales detríticos, como los insectos terrestres y crustáceos, consumen material vegetal muerto como su principal fuente de energía, mientras que otros (como los bivalvos) ayudan a procesar la materia orgánica para usarla como parte de otros organismos. Los invertebrados y los peces pequeños se alimentan de algas, y algunos invertebrados, aves y mamíferos se alimentan de biomasa vegetal, que es una importante fuente de energía para muchos consumidores primarios en el humedal.

2.3.5 Sedimentos

Un sedimento es un material sólido, transportado por factores como el viento, el agua o el hielo, que se deposita en capas de forma no consolidada (Boggs, 2009). Se originan comúnmente del transporte de material rocoso meteorizado y pueden consistir en clastos (fragmentos de roca o granos de minerales meteorizados), minerales precipitados química

o biogénicamente, o ambos y pueden estar formados por partículas sólidas y fragmentadas (limos, arenas y gravas), que son depositadas por procesos físicos como el agua, el viento y el hielo (Dalezios, 2018).

Los efectos sobre la dinámica de los sedimentos juegan un papel importante en la determinación de la calidad del agua, debido al transporte de nutrientes y contaminantes. Los sedimentos de los lechos absorben los contaminantes debido a su estructura, lo que los convierte en un geo absorbente natural donde se acumulan los contaminantes introducidos en el medio acuático (Förstner y Salomons 2010; Ekere *et al.*, 2017; Birch 2017). Además, su alta capacidad para absorber y liberar sustancias disueltas hace que los sedimentos del fondo sean un factor clave en el reciclaje de nutrientes (Fafandel *et al.* 2015). Los oligoelementos son contaminantes específicos que no sufren biodegradación, lo que tiene un efecto peligroso sobre el equilibrio ecológico en los ecosistemas acuáticos. El exceso de nutrientes por periodos prolongados de tiempo puede conducir a la eutrofización (Jung, 2017). Los procesos de eutrofización pueden causar varios efectos adversos, como el desarrollo masivo y la proliferación de algas, la producción de cianotóxicas, la acumulación de materia orgánica, el agotamiento del oxígeno en verano y la disminución del pH en el agua de desbordamiento (Jung 2017; Baran *et al.* 2019).

En el medio acuático, hay evidencia de que la eutrofización podría influir en el contenido de oligoelementos en los sedimentos del fondo. Los cambios en el pH y las condiciones redox en el sistema agua-sedimento conducen a la liberación de metales unidos a carbonato intercambiable y fases fácilmente reducibles en el sedimento (Rybicka y Wilson 2000; Kumar, Rani, Gupta y Gupta 2014; Wang, 2017). Además, el alto contenido de materia orgánica y nitrógeno se consideran agentes importantes para la evaluación de la tasa de eutrofización. El ciclo de la materia orgánica (consumo de organismos sedimentarios y mineralización) proporciona una fuente de contaminación a largo plazo que afecta la cadena alimentaria (Fafandel, 2015). Además, varios estudios han informado que la eutrofización y la contaminación por metales pesados son dos problemas ambientales acuáticos clave (Pabón *et al.*, 2020; Pernía *et al.*, 2018).

El aumento de la actividad humana ha resultado en una mayor liberación de metales pesados y contaminantes a la hidrosfera. (Hutton y Symon, 1986) Este es el caso de las aguas superficiales, las cuales se convierten en sumideros de metales pesados. Varios estudios han determinado que grandes cantidades de metales pesados se liberan en los ecosistemas de agua dulce debido a los efectos de la urbanización y la industrialización

(Martín, De Arana, Ramos y Gil, 2015). Algunos ríos y lagos se enfrentan a diversos grados de riesgo ecológico debido a la contaminación por metales pesados, esto debido a que algunos organismos expuestos a altas concentraciones de metales pueden absorber directamente metales biodisponibles (como cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb) y mercurio (Hg) (de nieto y Vilma, 2019) y concentraciones de metales convencionales que se bioacumulan hasta cierto punto en sus tejidos.

Gran parte de los estudios sobre la calidad de los sedimentos en cuerpos de agua se centran en que el alto contenido de metales traza puede ser responsable de la ecotoxicidad de los sedimentos y tener un impacto en los organismos bénticos (Baran y Tarnawski 2015). Sin embargo, con un bajo contenido de contaminación, otros factores como la materia orgánica, los nutrientes y la concentración de amoníaco pueden ser responsables de una toxicidad de baja a moderada (Czerniawska-Kusza, 2006; Fafandel, 2015) donde los nutrientes como los elementos traza liberados de los sedimentos del fondo al agua suprayacente pueden tener impactos tóxicos en los ecosistemas acuáticos.

2.4 Impactos de las actividades antrópicas sobre los ecosistemas acuáticos continentales.

Los ecosistemas acuáticos, tienen propiedades de resistencia al cambio y un cierto grado de resiliencia, tendiendo a volver a su estado original después de experimentar cambios moderados. Pero una vez que los cambios superan los límites que estas dos propiedades pueden soportar, estos ecosistemas pueden no necesariamente volver a su estado inicial, especialmente porque la estabilidad temporal de estos puede depender de un balance específico entre factores físicos, químicos y biológicos.

Son entidades dinámicas determinadas por los efectos de perturbaciones naturales o antrópicas que se presentan de manera periódica o circunstancial, muchas veces estos cambios pueden llegar a ser drásticos luego de periodos relativamente largos de resistencia a alteraciones.

La fragilidad de estos ecosistemas tiene que ver con una teoría en desarrollo que involucra la posibilidad de estados sucesivos de estabilidad, la cual, en caso de deterioro de variables importantes, puede generar una “caída” del ecosistema hacia algún otro estado, relativa y

temporalmente estable pero quizá con poca en riqueza de especies y de funciones ecosistémicas (Hobbs y Norton, 1996).

Si el deterioro progresivo continúa, la resistencia y resiliencia de los organismos disminuye gradualmente, haciendo que la calidad ambiental se vea más comprometida. Si esto ocurre será cada vez más difícil retornar el sistema hacia estados estables similares a los previos con mayor riqueza biótica y de funcionamiento ecosistémico.

El cambio climático y las actividades antropogénicas están afectando gravemente a los ecosistemas acuáticos por factores como la extracción excesiva de agua, el vertimiento de aguas residuales y desechos, la introducción de especies exóticas, las cuales representan un alto riesgo para los organismos locales, pudiendo resultar depredadas, desplazadas por competencia ecológica o contagiadas con enfermedades que no existían originalmente en el lugar. Además, la contaminación de los cuerpos de agua por escorrentías agrícolas, industriales y urbanas ponen en peligro el suministro de agua potable limpia y tienen impactos negativos en los organismos marinos y de agua dulce (Verhougstraete, 2015; Beiras, 2018).

La vulnerabilidad de los ecosistemas acuáticos también tiene implicaciones en la fragilidad social, ya que las comunidades rurales sufrirán problemas de salud y económicos si el acceso al agua se reduce en términos de calidad, cantidad y disponibilidad futura, convertirse en foco de inestabilidad social.

Se estima que entre 1970 y 2015 el 35% de los humedales han desaparecido a nivel mundial, de ellos, la región con mayor pérdida de superficie es Latinoamérica y el Caribe con un declive de 59% (Darrah *et al.*, 2019)

En este ambiente, abordar la pérdida de humedales por la contaminación es una preocupación clave para los formuladores de políticas, ya que los servicios ecosistémicos de los humedales sustentan los medios de subsistencia de las comunidades en todo el mundo y la productividad de los humedales depende totalmente de la integridad ecológica de estos ecosistemas.

2.5 Legislación y normativas ambientales.

Para conservación de los ecosistemas acuáticos, se requiere de una legislación ambiental que genere políticas y normas para la protección, conservación del recurso y los

organismos que lo habitan, particularmente para la contaminación a niveles industriales, así como soluciones para mitigar los efectos de los contaminantes antropogénicos y restaurar los importantes servicios proporcionados por los ecosistemas acuáticos para las generaciones futuras.

2.5.1 Normativas nacionales.

2.5.1.1 Ley de humedales urbanos

En 2020 se promulgó la Ley N°21.202 que modifica diversos cuerpos legales con el objetivo de proteger los humedales urbanos en Chile. Esta ley tiene por objeto regular de manera específica los ecosistemas de humedales dentro de áreas urbanas e introduce en la legislación nacional el concepto de humedales urbanos, por la gran relevancia ecosistémica que estos aportan para las ciudades, como áreas verdes, espacios para la recreación, control de inundaciones, mitigación al cambio climático, entre otros. Además de dar cuenta de las fuertes amenazas bajo las cuales se encuentran.

Según los datos del “Inventario de humedales urbanos y actualización del Catastro Nacional de Humedales” (Ministerio del Medio Ambiente, 2011), Chile cuenta con 1.473 humedales emplazados en áreas urbanas, cuya superficie total alcanza 732.791 hectáreas.

Esta nueva normativa busca asegurar la protección de los humedales que se encuentren total o parcialmente dentro del radio urbano, para que un humedal sea declarado humedal urbano, los municipios deben realizar una solicitud de reconocimiento al SEREMI de medio ambiente, quien mediante un análisis de admisibilidad acoge el trámite de solicitud, analiza los antecedentes entregados por el municipio y una vez cumplido lo requerido por ley, es el Ministerio de Medio Ambiente quien declara una zona como “humedal urbano”. De tal forma, la Ley entrega a los municipios herramientas concretas que permitirá proteger los humedales urbanos, a través de la elaboración de Ordenanzas Generales para la protección de humedales urbanos y la postergación de permisos de subdivisión predial, loteo, urbanización y de construcciones.

Además, esta ley establece que los humedales urbanos declarados por el Ministerio del Medio Ambiente deben ser incluidos en los Instrumentos de Planificación Territorial a toda escala como “área de protección de valor natural”.

2.5.1.2 Norma técnica NCh 1.333, modificada en 1987.

Es una norma técnica oficial desarrollada por el Instituto Nacional de Normalización (INN) que fija un criterio de calidad del agua según requerimientos científicos referidos a aspectos físicos, químicos y biológicos, según el uso determinado para proteger y preservar la calidad de las aguas que se destinen para: a) consumo humano, b) para la bebida de animales, c) riego, d) recreación y estética y e) para la vida acuática. Estos últimos son aplicables a la zona de estudio del presente trabajo.

Establece los requisitos de calidad para el vertimiento de residuos contaminantes a cursos de agua los cuales deberán ajustarse a los requerimientos especificados en la norma, teniendo en cuenta la capacidad de auto purificación y dilución del cuerpo receptor, de acuerdo con estudios que efectúe la Autoridad Competente en cada caso particular.

2.5.1.3 Normas de calidad primarias para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades recreacionales con contacto directo.

La Norma 144, promulgada por la SEGPRES en 2008, establece normas de calidad para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades de recreacionales con contacto directo.

Tiene por objetivo general proteger la calidad de las aguas marinas y estuarinas de manera de salvaguardar la salud de las personas.

Instaura los niveles de calidad ambiental que deben tener las aguas marinas y estuarinas en Chile, en parámetros como pH, color, coliformes fecales, Arsénico, entre otros.

Además, define en su artículo 2°, los siguientes conceptos de interés para el desarrollo de este trabajo.

- *“Calidad natural: Es la unidad o concentración de un compuesto o elemento en el cuerpo de agua marino o estuarino, que corresponde a la situación original del agua sin intervención antrópica más las situaciones permanentes e irreversibles o inmodificables de origen antrópico y será determinada por la Dirección General del Territorio Marítimo y Marina Mercante, con la información disponible.”*
- *“Programa de Vigilancia: Programa de monitoreo sistemático o conjunto de ellos, destinado a caracterizar, medir y controlar la variación de la calidad de las aguas marinas y estuarinas en un periodo de tiempo.”*
- *“Situación de emergencia ambiental o emergencia: Episodio de contaminación durante el cual los niveles de calidad ambiental presentes en un periodo determinado de tiempo producen riesgo inminente de efectos agudos en la salud de las personas.”*

2.5.1.4 Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales del Lago Villarrica

Promulgado en 2013 por el MMA, el Decreto 19 establece normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales del Lago Villarrica y tiene como objetivo proteger la calidad de las aguas del lago para prevenir un aumento acelerado de su estado trófico, provocado por la actividad antrópica.

Fija los niveles de calidad de las aguas en sus distintas estaciones de monitores parámetros como transparencia, fósforo disuelto, nitrógeno disuelto, clorofila a, entre otros.

Por otro lado, define entre otros:

- *“Bioindicador: Individuos de una especie, población o comunidad biológica del cual se conoce previamente su grado de tolerancia a cambios en el ambiente, respondiendo de manera evidente frente a impactos ambientales o perturbaciones que ocurren dentro de su hábitat, modificando la estructura de su población en composición, abundancia, presencia o ausencia.”*
- *“Estado Trófico: Es la categoría de calidad de un cuerpo de agua, representada por el nivel de productividad biológica determinada por la concentración de nutrientes y los factores físicos y químicos que éste presente.”*

2.5.1.5 Norma secundaria de la calidad para la protección de las aguas continentales de la cuenca del Río Maipo

El Decreto 53, 2013 del MMA establece las normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del río Maipo.

Su objetivo es conservar o preservar los ecosistemas hídricos y sus servicios ecosistémicos a través de la mantención o mejoramiento de la calidad de las aguas de la cuenca.

Instaura los límites de calidad ambiental por área de vigilancia para los parámetros: OD, conductividad eléctrica, pH, sulfato, DBO, nitratos, entre otros.

2.5.1.6 Norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del Río Serrano.

El Decreto 75 promulgado en 2009 por la SEGPRES, establece normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del Río Serrano.

El objetivo general es proteger y mantener cuerpos de agua de calidad excepcional en la Cuenca para asegurar sus cualidades como sitio de valor ambiental, escénico y turístico, de manera de salvaguardar el aprovechamiento del recurso hídrico, las comunidades acuáticas y los ecosistemas, maximizando los beneficios ambientales, sociales y económicos.

Fija valores de calidad ambiental para los parámetros: pH, OD, conductividad eléctrica, coliformes fecales, entre otros.

2.5.1.7 Norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas del Lago Llanquihue

El Decreto 122 promulgado por la SEGPRES en 2009, establece normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas del Lago Llanquihue.

Su objetivo es mantener la calidad de las aguas del lago y prevenir la eutrofización antrópica, proporcionando instrumentos de gestión para mantener su actual condición oligotrófica estableciendo niveles de calidad para parámetros como conductividad eléctrica, pH, OD, DQO, entre otros.

Además, define estado trófico como *“la categoría de calidad que representa el nivel de la productividad biológica determinada por la cantidad de nutrientes y los factores físicos y químicos de un curso o cuerpo”*.

2.5.2 Planes de monitoreo

El diseño de un Programa de monitoreo y seguimiento ambiental responde a la necesidad de conocer la condición ambiental y ecológica de los humedales. La existencia de un programa de monitoreo es un requisito previo para determinar si un humedal ha sufrido o no, cambios en sus características ecosistémicas.

Para ello, el MMA ha desarrollado diversas herramientas técnicas para verificar cambios en el estado del ecosistema. En conjunto con CONAF crearon en 2016 el “Manual para el establecimiento de programas de monitoreo en humedales” y en 2022 con ONU medio ambiente, desarrollaron la “Guía de monitoreo de humedales”, estos son relevantes para el uso sustentable, la planificación, manejo y conservación de los humedales en Chile, a escala nacional, regional y local.

2.6 Análisis de calidad de cuerpos de agua

En las últimas décadas, el análisis químico se ha utilizado ampliamente para la evaluación de la calidad del agua y la detección de nuevos elementos potencialmente tóxicos. Sin embargo, el análisis químico extenso todavía tiene muchas limitaciones y solo puede cubrir un pequeño subconjunto de contaminantes que pueden estar presentes en los cuerpos de agua, principalmente relacionados con las actividades humanas (industria, agricultura y

urbanización). Además, no se proporciona información sobre los posibles efectos tóxicos de las mezclas de productos químicos naturales y artificiales. En este sentido, los enfoques basados en el impacto que producen estos contaminantes pueden ayudar a revelar actividades biológicas que pueden estar asociadas con efectos adversos en la vida acuática, especialmente en los humedales. Por lo tanto, el uso de métodos bioanalíticos para evaluar la calidad del agua es un buen mecanismo para determinar el estado real del medio ambiente.

Como herramienta complementaria al análisis químico, las metodologías basadas en efectos pueden, por lo tanto, detectar la toxicidad planteada por compuestos o mezclas químicas no objetivo. Varios estudios han utilizado bioensayos para evaluar las actividades tóxicas en cuerpos de agua superficiales (Dieterich & Gaete, 2021; Garmendia, Menchaca, Belzunce y Revill, 2009)

Para ello, la ecotoxicología es el campo de la toxicología que se encarga del estudio del impacto de los distintos tóxicos sobre los ecosistemas (Truhaut, 1977). Esta disciplina científica estudia los efectos tóxicos de sustancias químicas, físicas o mezclas, ya sean naturales o xenobióticos, sobre la diversidad de organismos, poblaciones y comunidades en los ecosistemas e integra los efectos ecológicos y toxicológicos de químicos sobre los ecosistemas considerando el transporte, la transformación y la descomposición de estos en el medio ambiente (Forbes, 1994).

Se puede definir como el estudio de los efectos de agentes tóxicos en los ecosistemas, con la finalidad de comprender su importancia para la estructura y función de estos mismos. Se pueden hallar diferentes definiciones sobre la ecotoxicología, sin embargo, más allá de las diferencias, todas tienen en común dos factores: los agentes tóxicos y el ecosistema (Ferrari, 2006).

2.7 Bioensayos como herramienta para determinar la toxicidad de un lugar

Un bioensayo se define como el uso de un organismo vivo como agente de prueba para detectar la presencia o concentración de un compuesto químico o un efecto ambiental. Son métodos de detección relativamente simple y se pueden emplear para el monitoreo de causas y sus efectos de tipo ambiental y en farmacología. En un organismo, la respuesta

biológica (efecto) se puede generar a concentraciones menores a los límites de detección de los principales métodos analíticos y aunque, un método analítico sea lo suficientemente exacto para evaluar un nivel o concentración de compuesto o causa de daño, sus datos no indican efectos biológicos en el ecosistema o al organismo de prueba, los cuales se pueden observar en los organismos aun cuando la exposición a los compuestos o causas ha finalizado. La detección de estos efectos sobre un organismo se puede utilizar para el monitoreo, lo que resulta útil para examinar o controlar los compuestos antes y después de un evento o dosis, controlar la eficacia de un proceso de remediación o biorremediación y para asegurar el cumplimiento de parámetros establecidos por las normas de calidad ambiental.

Los bioensayos son herramientas que ayudan a la evaluación de riesgo ambiental puesto que revelan datos de calidad del medio para proteger organismos de presentes o futuras afectaciones, además otorgan datos que ayudan en la toma de decisiones corporativas o normativas para establecer si un cuerpo de agua se encuentra intervenido antrópicamente y si esto afecta a los organismos que lo habitan.

En los últimos años, los bioensayos han cobrado interés en el campo de la investigación para evaluar los potenciales efectos fitotóxicos, citotóxicos y genotóxicos de diferentes compuestos.

Para proteger los cuerpos de agua, se necesitan métodos de prueba ecotoxicológicos simples y confiables para determinar los efectos potenciales de las sustancias xenobióticas (Torokne, Vasdinnyei, 2007). Además, la implementación correcta de medidas regulatorias, tanto en el ámbito nacional como internacional, requiere que los métodos toxicológicos usados sean estandarizados, confiables y reproducibles (Vanhaecke 1984; Loschau, Kratke 2005).

En términos generales, es complejo determinar la ecotoxicidad de un humedal basada únicamente en parámetros químicos por lo que los bioensayos pueden indicar las respuestas biológicas a los diferentes estreses químicos (Baran y Tarnawski 2015; Gao *et al.*, 2018). Además, las ventajas de los bioensayos sobre la evaluación de la calidad química son que las pruebas biológicas integran los efectos de todas las sustancias químicas presentes en su biodisponibilidad actual y detectan posibles efectos combinados, sinérgicos o antagónicos (Tarnawski y Baran 2018). Por lo tanto, para una evaluación integral de la

calidad de los sedimentos del fondo, el contenido de contaminación, el estado nutricional y los análisis ecotoxicológicos deben integrarse.

2.7.1 *Allium cepa*

Comúnmente conocida como cebolla, *Allium cepa* L. es una planta herbácea familia de las *Liliaceae*, originaria de Asia central, es una de las hortalizas de consumo más antigua (primeras referencias remontan hacia 3.200 a.C., egipcios, griegos y romanos), en la actualidad su consumo tiene una amplia distribución. Se estima que cerca de 170 países la cultivan (FAOSTAT, 2020).

La cebolla es una especie bianual cultivada como anual. Las raíces no superan los 30 cm de profundidad y su tallo tiene una forma de disco subcónico situado en la base del bulbo. Con ciertas condiciones ambientales y de desarrollo, su yema apical y a veces las laterales generan cada una un tallo floral o escapo, que es hueco. Las hojas son de tipo hueco y están dispuesta en forma opuesta. La morfología de su raíz esta compuesta por cuatro zonas: Zona de ramificación, zona de diferenciación, zona de elongación (donde ocurre la división celular) y la cofia (**Figura 2.3**).

La cebolla, como planta bienal cambia durante su crecimiento y desarrollo. En el primer año de cultivo, se tiene lugar a la formación del bulbo, resultante de un aumento del fotoperiodo diurno y el ascenso de la temperatura en días largos. En el segundo año, se produce la fase reproductiva sexual (Rothman y Dondo, 2008).

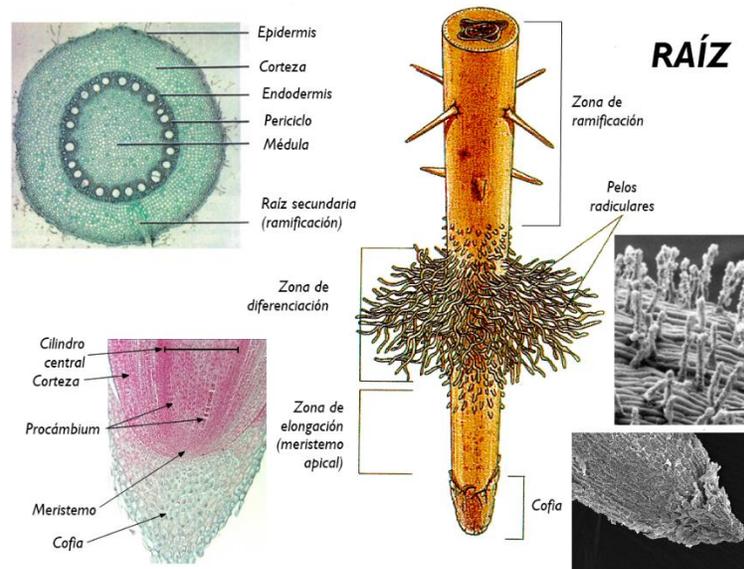


Figura 2.3: Fisiología de la raíz (“Reproducción de plantas con flores”, s/f).

Se han identificado plantas terrestres como bioindicadoras de la presencia de tóxicos tanto en aguas como en suelos y se han constituido como centinelas de contaminantes en estos medios. La OECD desarrolló directrices para realizar ensayos de químicos, “Guidelines for the Testing of Chemicals” (OECD, 2003), donde establece las especies bioindicadoras para el desarrollo de pruebas de toxicidad en los diferentes protocolos de aplicación en ecotoxicología. Dentro de estas especies se encuentran la lechuga (*Lactuca sativa*) y la cebolla (*Allium cepa*).

Allium cepa es reconocida como excelente bioindicador de genotoxicidad y efectos mutagénicos (Grant, 1999), por ser un ensayo rápido y sensible. Uno de los usos más difundidos de este modelo ha sido la determinación a corto plazo de contaminación ambiental (Fiskesjö, 1988; 1993) y puede usarse para evaluar la calidad del agua y los sedimentos en los cuerpos de agua (Lema & Marin-Morales, 2009) (da Costa, de Brito, Rocha, 2012).

Su aplicación en el análisis genotóxico de compuestos químicos y mezclas complejas es ampliamente utilizada desde su implementación desarrollada por Levan en 1938. Numerosos trabajos han sido incluidos en la base de datos del Centro de Información sobre Mutágenos Ambientales, registros obtenidos con distintas técnicas en *Allium cepa* demostraron una confiabilidad de un 80% en un estudio en el que se compararon los

resultados del test de *Allium cepa* con otros sistemas de prueba en la evaluación de varios compuestos (Grant, 1982).

Así mismo, los resultados de esta prueba pueden ayudar a mostrar los verdaderos peligros para la salud de las toxinas, ya que la fijación defectuosa durante la división celular y la toxicidad causada por estos daños pueden interferir con el desarrollo de los organismos, afectando organismos completos e incluso biomas locales (Blagojević, Stamenko, Vujošević, 2009; Caritá & Maron-Morales, 2008).

Además de las ventajas en cuanto a costos, disponibilidad y sensibilidad, esta especie cuenta con características cromosomales que favorecen la evaluación de aberraciones cromosómicas, la formación de micronúcleos y permite evaluar el mecanismo de acción de los contaminantes en el ADN de los organismos expuestos y como estos afectan en el desarrollo de este, lo cual puede ser útil en una interpretación de los posibles mecanismos implicados en la genotoxicidad (Fiskesjö, 1985; Rank, 2002).

Aunque *Allium cepa* no es una especie representativa de un humedal, ni tampoco es una especie nativa o naturalizada en el ecosistema, la información entregada por este bioensayo de toxicidad proporciona datos sobre el posible efecto de los contaminantes sobre las comunidades vegetales cercanas a los de cuerpos de agua posiblemente contaminados. Por otra parte, esta especie es de fácil y rápida germinación y crecimiento por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días, a bajo costo y no requiere de equipamiento costoso o sofisticado, por lo que la evaluación ecotoxicológica es de simple ejecución.

Los análisis realizados en este estudio con cebolla incluirán: crecimiento relativo de la raíz, alteraciones de anafases-telofases y aberraciones cromosómicas.

2.7.2 Artemia salina I.

Artemia salina L. es un artrópodo que pertenece al grupo de los crustáceos braquiópodos, son organismos minúsculos de cuerpo blando, color carmelita y transparentes a la luz. Se conocen comúnmente por el nombre de artemia, también llamados “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés (Schmidt, 1985). El género *Artemia* sp. está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cinco especies bisexuales (*A. salina*

L., *A. persimilis P.*, *A. franciscana K.*) y varias poblaciones partenogenéticas (*A. bowen* y *A. sterling*), entre otras (Serrano, Ortega y Villar, 1996), (Varó, Serrano, Navarro, López y Amat, 1998).

Se encuentra distribuido alrededor del mundo en ambientes estuarinos hasta ultra salinos pudiendo crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y forman parte importante del zooplancton, por lo que son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos son pequeñas partículas de color marrón que miden cerca de 0,2 mm de diámetro y pueden permanecer en estado de reposo o inactividad (cistos inactivos o quistes) por un año o más. Mientras se mantengan deshidratados, estos huevos pueden soportar condiciones extremas, mantenerse viables y ser almacenados por largos períodos de tiempo (Wah, 1993). Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño aproximado de 7 a 10mm (**Figura 2.5**).

Después de la rehidratación en solución salina, estos organismos completan la embriogénesis de 16 a 36 horas después de la inmersión, el embrión emerge del cascarón cubierto por una membrana y desarrolla apéndices con los que rompen la membrana para convertirse en larvas de nauplios nadadoras. Los animales alcanzan la madurez sexual de 20 a 35 días después de la eclosión (Wah, 1993). El ciclo de crecimiento de estos organismos se detalla en la **Figura 2.4**.

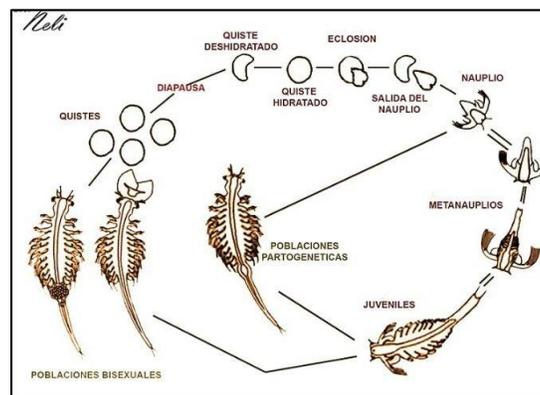


Figura 2.4: Ciclo de vida de *Artemia salina*. Fuente: Heli.

Artemia es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, debido a que se utiliza en acuicultura como alimento vivo para el crecimiento (en incubadoras) una variedad de peces y mariscos, por lo que su cultivo es una actividad muy frecuente, ya que es rápido, barato, sencillo y no requiere de herramientas o equipos muy sofisticados. Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (Pino, Jorge, E., y Khambay, 2007).



Figura 2.5: *Artemia salina L.* adulta.

Esta especie se ha utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos (Vanhaecke, 1984), se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para determinar la bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Meyer, Ferrigni, 1982; McLaughlin, 1991; Lhullier, Horta, 2006; Stefanello, Salvador, 2006; Silva, Nascimento, 2007). La resiliencia de estos animales los hace ideales para probar muestras en los experimentos. Además, el ensayo permite la evaluación rápida de las relaciones estructura-actividad y son fácilmente observables las interacciones entre compuestos (Pino, Jorge, 2007).

En relación con su uso en pruebas ecotoxicológicas en ambientes marinos y estuarios, P. Vanhaecke del Centro de Referencia de *Artemia* en Bélgica (Vanhaecke, 1984), realizó un estudio exhaustivo de literatura científica respecto al uso de esta especie en investigaciones sobre contaminación ambiental, desarrollando un ensayo estándar de toxicidad aguda (a corto plazo), conocido como ARC-TEST o ensayo del Centro de Referencia de *Artemia*. Este ensayo está basado en la determinación de la CL_{50} a las 24 horas de las larvas (instares II-III) de una cepa específica de *Artemia sp.*

El procedimiento fue sometido a un estudio colaborativo entre 70 centros de investigación europeos y americanos para determinar el grado de estandarización del protocolo experimental propuesto. Al comparar los resultados de este estudio con los obtenidos utilizando los organismos diana de uso común en pruebas toxicológicas, se determinó que la repetibilidad y reproducibilidad son al menos iguales que las de una prueba a corto plazo usando *Daphnia spp.* y en algunos casos aproximadas en algunos casos a los valores obtenidos utilizando *Brachydanio spp.* Los autores concluyeron que este bioensayo es un valioso instrumento como prueba en una primera evaluación para categorizar la toxicidad de productos químicos y como prueba de referencia para el ambiente marino, además, reconocieron que esta requiere poca experiencia.

3. PROBLEMA

Los ríos transportan sedimentos en suspensión o arrastrados en el fondo del lecho, dependiendo del tamaño de las partículas y la presión que la corriente puede ejercer en él. En el transporte de fondo, partículas de arenas o material de diámetros mayor se mueven aguas abajo en el lecho, deslizándose, saltando, o rodando. Por otra parte, partículas de limo y de diámetro inferior, son transportadas en suspensión, es decir en la columna de agua, por efecto de la turbulencia del flujo (Dalezios, 2018).

Los sedimentos son considerados reservorios de agentes contaminantes como metales y compuestos orgánicos entre otros, (Förstner y Salomons 2010; Ekere *et al.*, 2017; Birch 2017, López, 1998) Los sedimentos son considerados matrices importantes para el monitoreo ambiental, ya que reflejan el impacto antrópico en los ecosistemas acuáticos (Harikumar y Nasir 2010; Wang *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2018). Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la EPA (agencia de protección ambiental de US) la contaminación en sedimentos constituye una de las principales fuentes de contaminación física y química de las aguas naturales en ríos, quebradas, arroyos, lagos, etc. (FAO, 2015).

El humedal Estuario Los Molles, ubicado en la comuna de La Ligua, es el humedal más al norte de la Región de Valparaíso y en 2021 fue declarado Humedal Urbano bajo la Ley 21.202 cuyo objetivo es proteger estos cuerpos de agua.

Este humedal se ha visto afectado por múltiples intervenciones antrópicas, ya que pues recibe directamente los efluentes de una planta de tratamiento de aguas y aguas residuales no tratadas de la población aledaña. A pesar de la importancia de este ecosistema acuático, se desconoce la calidad ambiental de este ecosistema, en particular de los sedimentos. En este trabajo se postula que los sedimentos contienen agentes químicos en una mezcla compleja que pueden representar un riesgo para los organismos asociados a este compartimento ambiental. Contar con esta información es fundamental para el diseño y aplicación de herramientas de gestión ambiental para la protección de la biodiversidad acuática.

De acuerdo con lo anterior, en esta investigación se realizó un estudio tendiente a determinar la calidad ambiental de las aguas y sedimentos del Humedal Estuario Los Molles, mediante el análisis parámetros físicos y químicos y la realización de bioensayos ecotoxicológicos estandarizados para determinar su calidad ambiental.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los sedimentos del humedal Estuario Los Molles sobre organismos acuáticos, base para un programa de monitoreo ambiental.

4.2 Objetivos específicos

- Implementar ensayos estandarizados de toxicidad con un tóxico de referencia.
- Realizar una caracterización física y química de las aguas y sedimentos de la zona de estudio.
- Determinar la genotoxicidad y citotoxicidad de los sedimentos.
- Diseñar un programa de monitoreo ambiental en el humedal.

5. METODOLOGÍA

5.1 Zona de estudio

El Humedal Estuario de Los Molles, se encuentra ubicado en la localidad de Los Molles, comuna de La Ligua, Provincia de Petorca. Es la desembocadura del estero Los Coiles, el cual nace en la cordillera de la costa y recorre cerca de 1 km hasta llegar al Océano Pacífico formando un estuario que da origen al Humedal Estuario Los Molles (**Figura 5.1**).

La zona de estudio tiene un área de 9,2 ha., las cuales fueron declaradas Humedal urbano en 2017 bajo la Ley 21.202 que modifica cuerpos legales para proteger los humedales urbanos.

El área de conservación y protección correspondiente al Humedal urbano de Los Molles naturalmente se encuentra asociado a un sistema dunar, siendo parte fundamental del corredor biológico que unifica los sistemas terrestre-costero y el sistema estuarino, a través de la Quebrada Los Coiles, presentando una actual condición de fragilidad y amenaza ambiental, debido a factores relacionados principalmente con el cambio climático, la morfodinámica costera, la presión inmobiliaria y prácticas antrópicas que se desarrollan en la zona.

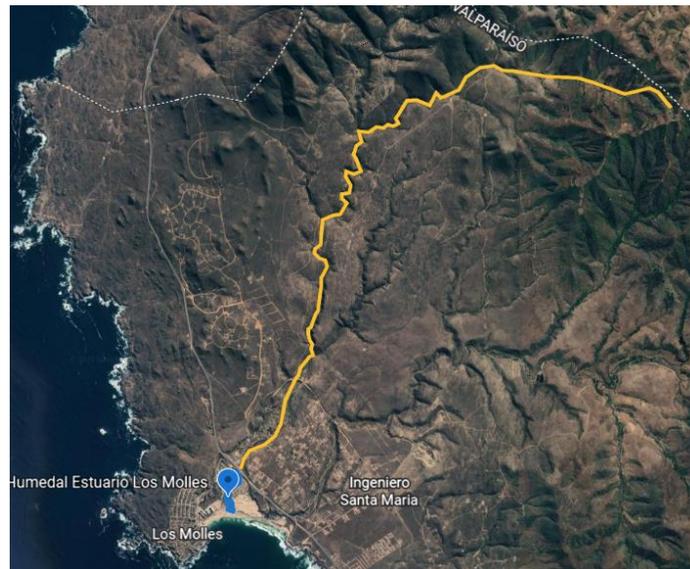


Figura 5.1: Imagen satelital Los Molles en la región de Valparaíso. Google Earth.

5.2 Puntos de muestreo

Utilizando imágenes satelitales y reconocimiento en terreno se definieron 5 puntos de muestreo en la sección del humedal que se encuentra con agua todo el año (Figura 5.2), los puntos fueron georreferenciados con un equipo Garmin eTrex 20x. La toma de muestras se realizó en la primavera de 2022.

La selección se realizó en base a las características geográficas del humedal, la accesibilidad y la cercanía a las actividades antrópicas.



Figura 5.1: Polígono del Humedal urbano estuario Los Molles. A: Área de estudio de libre acceso.
B: Área con acceso restringido (MMA, 2021).



Figura 5.2: Estaciones de muestreo. (Google Earth.)

5.3 Muestreo y pretratamiento de las muestras de sedimentos.

Las muestras de sedimentos fueron recolectadas según Andreu & Camacho (2002). Las muestras se obtuvieron por triplicado con una pala, tomando muestras de sedimentos poco profundos (5cm – 10 cm de profundidad) para luego ser colocadas en recipientes plásticos herméticos, correctamente etiquetados y se preservaron en un contenedor a 4 °C para su transporte (EPA, 2001), posteriormente fueron almacenados a -4° °C en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad de Valparaíso para ser tratadas y analizadas.

5.4 Caracterización Física y Química de las aguas y sedimentos.

La evaluación de sustancias bioactivas o de condiciones ecotóxicas requiere de la medición de una multiplicidad de parámetros que se deben de tomar de manera y en cantidad

suficiente para que permitan extraer conclusiones a través de un análisis estadístico correcto.

Para la caracterización física y química, se recolectaron muestras de agua superficial y sedimentos. En terreno se midieron parámetros tales como temperatura, pH, conductividad eléctrica con un equipo Hanna HI 98130; el oxígeno disuelto se midió con un oxímetro Hanna HI 98193, adicionalmente se describieron las propiedades organolépticas las cuales fueron anotadas en una planilla (Anexo 1). Además, se recolectaron muestras de agua las cuales fueron analizadas en el laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad de Valparaíso (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), midiendo la concentración de fosfatos, nitritos, nitratos y cobre por colorimetría con un espectrofotómetro multiparamétrico Hanna 83203. Por otra parte, debido a que las muestras tienen un alto contenido de arenas, para determinar la materia organica de los sedimentos se utilizó el método de ignición o calcinación a una temperatura de 500°C por 6 horas (Steubing, Godoy, & Alberdi, 2001)



Figura 5.3: Muestras de agua.

Para determinar el tamaño de partícula de los sedimentos secos, se utilizó un agitador magnético Ro-Tap E modelo RX-29-E con seis tamices (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) con diámetros de apertura de 4750 μm (N°. 4), 2000 μm (N°. 10) para arena mediana gruesa, 425 μm (N°. 40) para arena mediana, 250 μm (N° 60) para arena fina, 106 μm (N° 140) para arena media-fina y 75 μm (N° 200) para limo, el análisis de datos se utilizó la herramienta Microsoft Excel.

La clasificación de estos se realizó según el Sistema Unificado de Clasificación de Suelos (SUCS, 1985), donde las partículas mayores a 4,75 mm y menores a 75 mm se consideran gravas, las partículas cuyas dimensiones fluctúan entre 0,075 mm (malla N° 200) y 4,75 (malla N° 4) se consideran arenas y las partículas menores a 0,075 pertenecen a suelos finos y dependiendo de su plasticidad, son consideradas limos o arcillas.



Figura 5.4: Agitador de tamiz.

La materia orgánica de los sedimentos se determinó al calcinar las muestras a altas temperaturas. Para ello se pesaron las muestras de sedimento y su crisol respectivo, para ser calcinadas a 500°C por 4 horas en una mufla, esto produce la destrucción climatizada de toda la materia orgánica del sedimento. Las muestras se dejaron secar en un desecador, para luego obtener el nuevo peso (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Se utilizó una balanza analítica de 4 dígitos para pesar todas las muestras. El porcentaje de materia orgánica (MO) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% MO = \frac{(P1 - P2)}{(P2 - C)} * 100$$

Donde:

P1= Peso del sedimento antes de la calcinación

P2= Peso del sedimento después de la calcinación

C= Peso crisol



Figura 5.5: Determinación de materia orgánica por método de ignición.

5.5 Elección de organismos a utilizar.

La elección de un organismo de prueba adecuado para un bioensayo depende del efecto que se desea evaluar y de las características del organismo. Para ello, el organismo debe ser representativo de un grupo ecológico. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de una población expuesta a cierto agente tóxico se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto de la sensibilidad de los organismos como de fallas operacionales en la aplicación del método.

Los organismos de prueba pueden ser criados en laboratorio, colectados en terreno o adquiridos en el mercado regular. En general, es preferible utilizar organismos criados en el laboratorio en vez de los recolectados en terreno porque los exámenes estandarizados requieren de un abastecimiento siempre disponible de organismos en buena salud provenientes de cultivos de condiciones conocidas y constantes.

5.6 Bioensayos.

Los organismos que se utilizaron para el desarrollo de bioensayos con elutriados corresponden a *Allium cepa* o cebolla, reconocida como excelente bioindicador de genotoxicidad y efectos mutagénicos (Grant, 1999) y el segundo organismo utilizado corresponde a *Artemia sp.* la cual ha sido ampliamente utilizada en estudios ambientales

como organismo de prueba ideal para realizar este tipo de ensayos de letalidad. Con estos bioensayos es posible evaluar la toxicidad general y bioactividad de sustancias de origen natural de una manera preliminar, sencilla, rápida, bastante utilizada y aceptada en el mundo (Wah, 1993).

5.6.1 Preparación muestras de elutriados.

Los elutriados de sedimentos se obtuvieron según metodología de Ramírez y Mendoza (2008). Las muestras se secaron a 60 °C eliminando toda la humedad (**Figura 5.6**); luego el material seco fue tamizado en tamiz N°10 (2000 micras) para luego ser trasvasado en tubos de centrifuga; posteriormente se agregó agua de mar filtrada (para el ensayo con *Artemia sp.*) y agua destilada (para los ensayos con *Allium cepa*), en una relación 1:3 v/v. Los tubos se agitaron en un “shaker” modelo LSI-3016A / LSI-3016R durante 1 hora para generar una mezcla homogénea, las muestras fueron refrigeradas a 4 °C para su sedimentación y almacenamiento (**Figura 5.7**). Antes de realizar las pruebas de toxicidad, los tubos fueron centrifugados durante 15 min a 3000 rpm para luego extraer la parte acuosa (elutriado) dejando el sedimento sin resuspender.

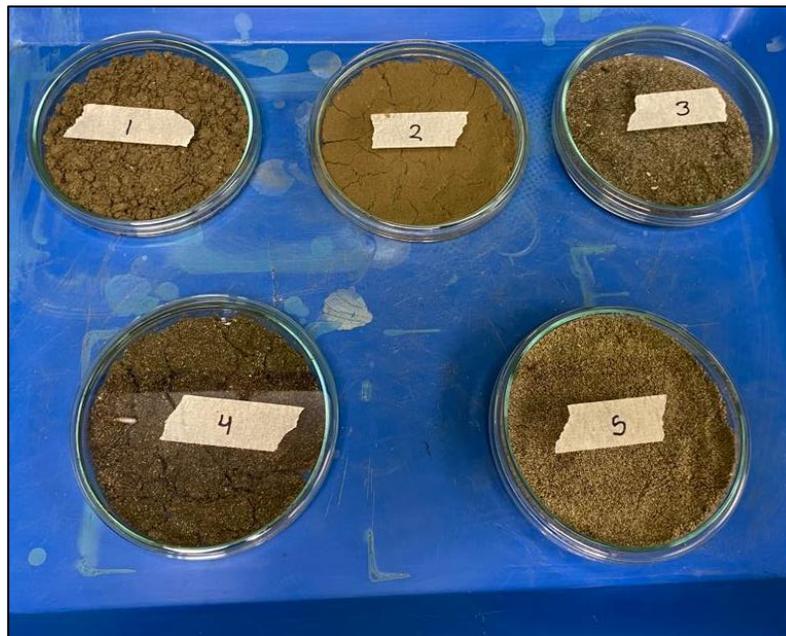


Figura 5.6: Muestras secas de sedimentos por punto de muestra.

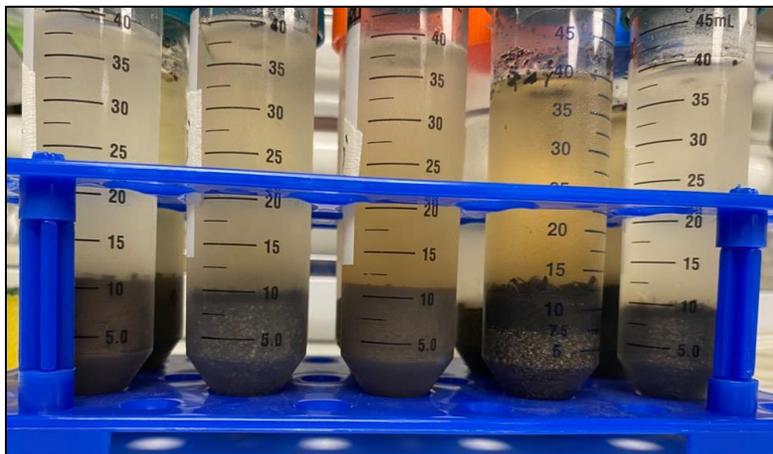


Figura 5.7: Muestras de elutriados.

5.6.2 Bioensayo con *Allium cepa*

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium sp*) se rehidrata, estimula el crecimiento celular, lo que alarga las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación ocurre en presencia de sustancias tóxicas, la división celular en el meristema de la raíz puede inhibirse al ralentizar el proceso mitótico o destruir las células. Este tipo de alteraciones tienden a impedir el crecimiento normal de las raíces, impidiendo así su elongación (Fiskesjö, 1985, 1993, 1997).

A. cepa es una excelente herramienta para el control biológico de los efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales debido a sus raíces adventicias de rápido crecimiento (Çavuşoğlu, D., Macar, O., Kalefetoğlu Macar, T., Çavuşoğlu, K., & Yalçın, E. (2022).

El efecto se cuantificará determinando el porcentaje de inhibición del crecimiento de raíces expuestas al elutriado en relación con la longitud media de las raíces de control (expuestas a agua destilada). además, el rápido crecimiento también implica una rápida división celular, lo que brinda una excelente oportunidad para detectar posibles disfunciones en la mitosis en el meristema de las raíces de *Allium sp*. (Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., Acar, A., & Yapar, K., 2020).

Este efecto se puede determinar indirectamente al comparar el crecimiento de las raíces expuestas a la solución con las que no se exponen a la solución de elutriación después de

72 horas de prueba. Los materiales requeridos para la realización del ensayo se detallan en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1: Materiales bioensayo adaptado con *Allium sp.*

Material biológico	Materiales y equipos	Reactivos
Bulbos de <i>Allium sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Vasos plásticos • Pipeta graduada 10 ml • Matraz Erlenmeyer 125 ml • Propipeta • Vidrio reloj • Gotario • Material quirúrgico • Microscopio óptico • Lupa binocular • Balanza analítica • Contador manual 	<ul style="list-style-type: none"> • Elutriado • Orceína acética 1% • Agua destilada

5.6.2.1 Elongación radicular

Bulbos de *A. cepa* sanos y de tamaño similar (2-4 cm de diámetro) fueron obtenidos comercialmente en la comuna de Catemu, región de Valparaíso. Se utilizaron 36 cebollas, se les retiraron las catalifas exteriores y se limpió de raicillas sin destruir los primordios cuidadosamente con un bisturí. Los bulbos de cebollas se germinaron en vasos plásticos con agua destilada durante 48 horas en la oscuridad. El presente estudio se desarrolló de acuerdo con protocolos modificados de Krüger (Krüger, 2009), y Aiub y Felzenswalb (Aiub y Felzenswalb, 2011) y utilizando los elutriados de sedimentos como medio de exposición.

Pasadas las 48 horas y de manera aleatoria, se distribuyeron los bulbos en vasos plásticos y fueron expuestos a agua destilada como control y al elutriado de los 5 puntos de muestreo (70 ml aproximadamente). Para cada medio de exposición se utilizaron 6 bulbos de cebolla. Estas se mantuvieron en la oscuridad para evitar la luz solar directa. Después de 24 horas de exposición, se midió en cm el crecimiento longitudinal de las raíces de los bulbos de cebolla seleccionados al azar.

Para obtener el porcentaje de efecto de inhibición se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición crecimiento} = \frac{(\text{Longitud media control} - \text{Longitud media muestra})}{\text{Longitud media control}} \times 100$$

Las condiciones se mantuvieron constantes durante todo el ensayo, los bulbos se almacenaron a temperatura ambiente, en una zona protegidos de la luz y de las corrientes del aire (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2: Condiciones para las pruebas de toxicidad con *Allium cepa*

Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con <i>Allium cepa</i>	
Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20 ± 2°C
Iluminación	Oscuridad
Volumen de solución de prueba	70 ml
Número de muestras	6
Numero de replicas	6
Duración de la prueba	72 horas
Tamaño de los bulbos	2-4 cm diámetro
Efecto medido	Elongación radicular
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% control positivo y negativo

5.6.2.2 Índice mitótico (IM)

Para el análisis de citotoxicidad, se colocaron las raíces medidas en el análisis macroscópico, en un vidrio reloj, cortándoles el meristema de la raíz, identificada por manchas decoloradas (Imagen 5.8), ya que esta es la zona de la raíz con actividad celular. La tinción de las muestras se realizó según metodología descritas en el libro “Técnicas de histología y citología”. Las raíces se tiñeron con orceína acética clorhídrica y se calentaron en un mechero tres veces (sin dejar ebulir) para fijar y romper las paredes celulares. Posteriormente se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de tinte y se depositaron en un portaobjetos donde se procedió a cortar los primeros milímetros terminales (cofia). Se agregó una gota de colorante y se cubrió con un cubreobjeto para luego cuidadosamente disgregar las células con un lápiz de grafito y posteriormente aplicar la técnica del “squash” con el dedo pulgar. Se sellaron los bordes de las muestras con barniz de uñas transparente para evitar la deshidratación celular y tener una muestra

semipermanente para su posterior análisis. El procedimiento se realizó con las 6 muestras (elutriados de las 5 estaciones de muestreo y un control con agua destilada).



Figura 5.8: Zona meristemática de la raíz, observación en lupa binocular.

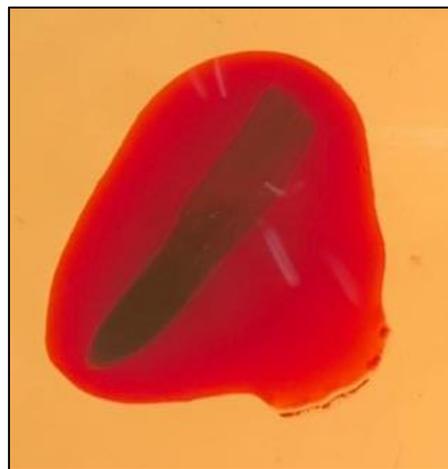


Figura 5.9: Raíz en orceína acética.

Los portaobjetos preparados para cada medio de exposición se observaron bajo un microscopio óptico con un aumento de 100x para evaluar las etapas mitóticas, la aparición de micronúcleos y anomalías nucleares en las células en interfase y en aumento 40x para realizar el conteo. Se analizaron un total de 2.000 células por muestra y se observarán los siguientes parámetros: índice mitótico (MI), el índice de fases (IF), la frecuencia de aberraciones cromosómicas (CA) en anafase y telofase, y la frecuencia de micronúcleos (MN) según Fiskesjö (Fiskesjö 1985 y 1988).

Se calcularán el índice mitótico (IM) y el índice de fases (IF) a partir de las siguientes fórmulas:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ de células en mitosis } (P + M + A + T)}{N^{\circ} \text{ Total de células}} \times 100$$

$$IF = \frac{N^{\circ} \text{ de células en cada fase}}{\text{Total de células en mitosis}} \times 100$$

$$\text{Aberraciones cromosomales (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de aberraciones cromosómicas}}{N^{\circ} \text{ de células}} \times 100$$

Donde:

P: Profase

M: Metafase

A: Anafase

T: Telofase

5.6.3 Bioensayo con *Artemia salina* L.

Este ensayo está basado en la determinación de la concentración letal media CL₅₀ a las 24 y 48 horas de exposición de las larvas de *Artemia sp.* El estadio de prueba fue el primer instar larval de metanauplio, el cual aparece con la primera muda (Sorgeloos, *et al.*, 1986), La prueba se realizó mediante la metodología estandarizada desarrollada por el Centro de Referencia de Artemia (Vanhaecke, *et al.*, 1981). Los materiales necesarios para desarrollar el ensayo se muestran en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3: Materiales para bioensayo con *Artemia salina* L.

MATERIALES		
Material Biológico	Materiales y equipo	Reactivos
Huevecillos liofilizados de <i>Artemia salina</i> L.	<ul style="list-style-type: none"> • Matraz Erlenmeyer 500ml y 250 ml. • Vasos precipitados 50 ml y 100 ml. • Placas de Petri. • Foco de 18W • Pipetas graduadas 10 ml • Pipetas Pasteur • Aireador con manguera • Micropipeta • Puntas para micropipeta • Contador manual 	<ul style="list-style-type: none"> • Agua de mar filtrada • Elutriado

5.6.3.1 Eclosión de quistes de *Artemia salina* L.

Los quistes de artemia fueron adquiridos comercialmente en el mercado acuícola, buscando aquellos proveedores que garantizan una tasa de eclosión alta para garantizar el stock de organismos para realizar el ensayo.

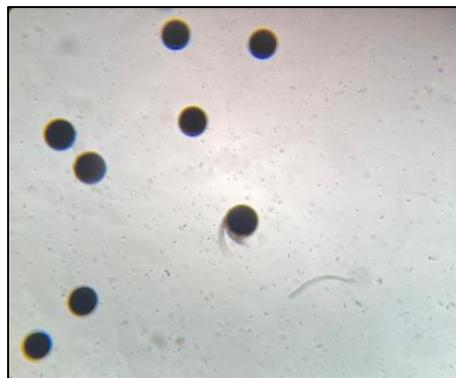


Figura 5.10: Quistes de *Artemia salina* (eclosionando y por eclosionar).

Para eclosionar los huevos (**Figura 5.10**), se colocaron 500 ml de agua de mar filtrada y 5 gr de quistes de *A. salina* con espirulina en un matraz Erlenmeyer. Se mantuvo una aireación suave y constante desde el fondo del matraz para mantener los quistes en

suspensión, con iluminación continua y una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Una vez que los quistes eclosionaron (etapa instar I), se detuvo el burbujeo de aire. Después de cinco minutos los quistes no eclosionados sedimentan y los nauplios forman una nube que flota cerca del fondo del recipiente.



Figura 5.11: Crecimiento de *Artemia salina* L. (Heli, s/f).

Una vez sedimentados los quistes, se recolectaron los organismos con una pipeta Pasteur, evitando tomar los quistes no eclosionados para transferir los nauplios a placas Petri de 5 cm de diámetro. Para la distribución de las larvas se tuvo en cuenta que las artemias son animales a los que les atrae la luz, por lo tanto, se apagó el foco y se iluminó con linterna una zona específica del matraz donde se concentraron los nauplios en una zona de la alícuota para facilitar la recolección, posteriormente se trasladaron los organismos con micropipetas al medio de exposición (10 ml de volumen por replica). Las condiciones para el desarrollo del bioensayo se encuentran especificadas en la **Tabla 5.4**.

Tabla 5.4: Condiciones para la eclosión de quistes de *Artemia salina* L

Resumen de las condiciones recomendadas para la eclosión de quistes de <i>Artemia salina</i> L.	
Medio de eclosión	Agua de mar filtrada
Temperatura	25 - 30°C
Fotoperiodo	24 horas, 2000 lux
Oxígeno	>20 mg/L
pH	7-8
Salinidad	35 mg/L
Organismos por replica	1 gr quistes x 250 ml agua de mar filtrada
Tiempo	16-18 horas

5.6.3.2 Prueba de toxicidad

Se desarrollaron las pruebas sometiendo las *A. salina* a concentraciones del 100% del elutriado de cada punto de muestreo y un control negativo sin elutriado (solo agua de mar filtrada).

Los elutriados de cada punto de muestreo se ensayaron utilizando 10 nauplios de *A. salina* en etapa Instar II-III por replica, un control negativo con agua de mar filtrada y un control positivo con dicromato de potasio $H_2Cr_2O_7$.

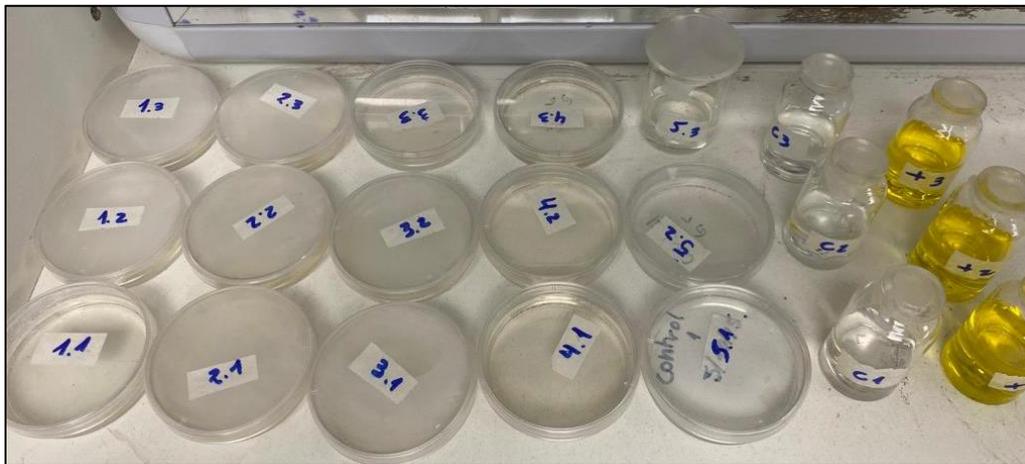


Figura 5.12: *Artemia salina* expuestas a elutriados, control negativo y positivo.

Las observaciones del grado de toxicidad en los nauplios se realizaron después de 24 y 48 horas de exposición en una lupa binocular para contar el número de individuos muertos o su carecía de movilidad a los 15 segundos de observación (Iannacone, 2007), considerando vivos aquellos nauplios que presenten movimiento y muertos aquellos que no, con estos datos se puede determinar la concentración letal media CL_{50}

La aceptabilidad de los resultados fue medida según el criterio en cuanto a la mortalidad del control negativo no debe exceder el 10 % y la concentración de oxígeno disuelto debe ser mayor que 2 mg/l para bioensayos de toxicidad en organismos acuáticos (Vanhaecke, *et al.*, 1981).

Las condiciones para el desarrollo de este ensayo se presentan en la **Tabla 5.5**.

Tabla 5.5: Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad con *Artemia salina* L

Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con <i>Artemia salina</i> L.	
Tipo de ensayo	Estático.
Temperatura	25 ± 2°C.
Fotoperiodo	24 horas.
Volumen de solución de prueba	10 ml.
Número de organismos por replica	10 nauplios instar II-III
Numero de replicas	3.
Duración de la prueba	72 horas.
Agua de dilución	Agua de mar filtrada.
Efecto medido	Inhibición de movimiento
Resultado final	CL_{50} ; % de mortalidad o inhibición de movimiento.
Aceptabilidad de los resultados	Control negativo < 10%

5.6.3.3 Cálculos de porcentaje de mortalidad

Para calcular el porcentaje de mortalidad entre medios de exposición, se utilizó la fórmula sumando el número de nauplios muertos en las tres réplicas de una misma muestra, sobre la sumatoria del número total de nauplios de una misma muestra. Dividir el número de

nauplios muertos entre el número total de nauplios. El resultado de la división multiplicado por cien es el porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* para esa concentración de la muestra.

Fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad de } Artemia \text{ salina} = \frac{\Sigma \text{ nauplios muertos}}{\Sigma \text{ total de nauplios}} \times 100$$

Para el análisis estadístico de los resultados, se realizó la prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos para corroborar si existen diferencias relevantes a nivel estadístico entre los 7 medios de exposición y determinar si las medianas de estos son diferentes, con la fórmula:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \left(\frac{(\Sigma R1)^2}{n1} + \frac{(\Sigma R2)^2}{n2} + \dots + \frac{(\Sigma Rk)^2}{nk} \right) - 3(N+1)$$

Donde:

K: Numero de población.

$\Sigma R1, \Sigma R2, \dots \Sigma Rk$: Suma de rangos de las muestras.

$N1, n2, \dots nk$: tamaño de muestras.

N: Numero combinado de observaciones para todas las muestras.

5.7 Programa de monitoreo

Se define monitoreo como “las observaciones sistemáticas de parámetros relacionados con un problema específico, diseñadas de tal manera que provean información sobre las características del problema a tratar y sus cambios a lo largo del tiempo” (Spellerberg, 1991).

El diseño de un programa de monitoreo y seguimiento ambiental responde a la necesidad de conocer la condición ecológica y ambiental de los humedales. La existencia de un

programa de monitoreo es un requisito previo para determinar si un humedal ha sufrido o no, cambios en sus características ecológicas.



Figura 5.13: Etapas y elementos fundamentales del monitoreo. (MMA- ONU Medio Ambiente, 2022.)

El programa de monitoreo propuesto se realizó en base a la “Guía de monitoreo de humedales (MMA, 2022) y el Manual para el establecimiento de programas de monitoreo en humedales (CONAF, 2016) estableciendo 9 etapas para definir el programa de monitoreo en base al diagrama presentado en la **Figura 5.13**. La modalidad de monitoreo será del tipo vigilancia, con el fin de determinar el estado actual del humedal y su tendencia en el tiempo, teniendo en consideración los potenciales factores de estrés o amenazas del ecosistema.

5.7.1 Etapas del monitoreo

5.7.1.1 Etapa 1: recopilación bibliográfica y análisis.

Preliminarmente, se debe realizar la recopilación de antecedentes de la zona de estudio, con el fin de obtener información relevante que pudiesen describir las características físicas, químicas y biológicas (Caracterización de flora y fauna, meteorología, geomorfología, etc.) y con ello comprender el estado ambiental previo a la realización del monitoreo.

5.7.1.2 Etapa 2: definición de objetivos

Con esto se busca plantear la meta o propósito del monitoreo, estableciendo un objetivo general, la cual se sustenta con objetivos específicos que definan tareas o metas concretas a corto plazo, las que ayudan a completar el objetivo general. Los objetivos deben ser alcanzables, medibles, concretos y claros.

5.7.1.3 Etapa 3: definir preguntas claves y escalas adecuadas

Para conocer el estado general del ecosistema, se deben establecer los límites espaciales de la zona de estudio, en este caso, el programa de monitoreo se limitará al polígono establecido en la declaratoria de humedal urbano, de 9,2 ha.

5.7.1.4 Etapa 4: Selección del diseño de monitoreo

Según las características descritas en la Guía de Monitoreo de Humedales (MMA-ONU Medio Ambiente, 2022), se propone un monitoreo del estado o condición, el cual busca caracterizar atributos físicos o biológicos en la zona de estudio.

5.7.1.5 Etapa 5: Determinación de parámetros a medir, número de sitios y duración del monitoreo.

En base a los puntos anteriores, se definieron los parámetros a evaluar en el monitoreo. Teniendo en consideración la visita en terreno, se proponen las 5 estaciones de muestreo que fueron analizadas para este estudio.

Las variables físicas, químicas y biológicas a monitorear se describen en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6: Parámetros a medir en el monitoreo.

Físicos y Químicos del agua.	Biológicos.
<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura. • pH. • Conductividad eléctrica. • Oxígeno disuelto. • Transparencia y turbiedad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Riqueza y abundancia: <ul style="list-style-type: none"> - Macroinvertebrados. - Vegetación acuática o macrófitos. - Avifauna.

-
- Sólidos suspendidos totales.
 - Color del agua.
-

La riqueza específica (S) se determinará al cuantificar el número de especies presentes en un cuadrante determinado, mientras que la abundancia corresponderá al número de

Para medir la riqueza y abundancia de las especies más representativas tanto de macroinvertebrados, macrófitos como de avifauna, se realizará el análisis de datos con el software BioDiversity Pro, para obtener una base de datos y poder realizar comparaciones en diferentes temporadas y conocer cómo se comportan las especies en el tiempo.

Índices de diversidad.

- Índice de Shannon-Wiener

El cálculo de diversidad de especies se realizará mediante el índice de Shannon-Wiener, el cual refleja la heterogeneidad de una comunidad en fase a dos factores: el número de especies y su abundancia relativa. Los valores de este índice van desde 0 hasta 5, considerando valores <2 como bajos en diversidad y valores > 3 lugares con alta diversidad de especies. El cálculo se realiza en base a la fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde:

S: Número de especies (Riqueza de especies).

p_i : Proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (n_i/N).

n_i : Número de individuos de la especie.

N: Número de todos los individuos de todas las especies.

- Índice de Simpson

También conocido como índice de dominancia de las especies, muestra la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie. Su valor oscila entre 0 y 1, teniendo mayor diversidad de un hábitat cuando el valor se acerca a 0, mientras que un valor cercano a 1 significa una mayor probabilidad de que la muestra esté dominada por una sola especie.

La fórmula es la siguiente:

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Donde:

S = Número de especies (Riqueza de especies).

n_i = Número de individuos de la especie i .

N = Número de todos los individuos de todas las especies.

- Índice de Margalef.

Este índice de diversidad específica calcula la riqueza de especies basada en la distribución de los individuos de las distintas especies en función del número de individuos existentes en la muestra. Su fórmula es la siguiente.

$$I = \frac{s - 1}{\ln N}$$

Donde:

S = Número de especies (Riqueza de especies).

N = Número de todos los individuos de todas las especies.

5.7.1.6 Etapa 6: Protocolos de monitoreo.

Para determinar el protocolo de monitoreo, se debe tener en cuenta el uso de equipos de medición de los distintos parámetros y los elementos de protección personal (EPP) de la persona a cargo de realizar el muestreo.

Los protocolos para el monitoreo dependerán de la disponibilidad de equipos que midan los parámetros antes establecidos y del nivel de exactitud que se requiera para su análisis.

Parámetros físicos y químicos.

Las metodologías para medir los parámetros físicos y químicos se encuentran descritas en el apartado 5.4.

Parámetros biológicos.

- Monitoreo de Avifauna

El monitoreo de avifauna contempla un muestreo directo definido en transectos, registrando las aves presentes en el área utilizando la técnica de conteo de puntos fijos de observación, donde el censador registra las especies de manera visual y vocal al observar un sector específico (De la Maza y Bonacic, 2013). El tiempo de observación y registro será de 30 minutos por cada punto de muestreo, con un radio de observación de 50 metros dentro del humedal y 10 metros en suelo (Hutto *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1994). El censo se realizará bajo condiciones meteorológicas favorables y sin lluvia para disminuir errores atribuibles a factores externos.

Los elementos y equipos para el monitoreo se presentan en la **Tabla 5.7**.

Tabla 5.7: Elementos de protección personal, equipamiento y materiales para el monitoreo de Avifauna (CEA, 2018).

Elementos de protección personal.	Equipamiento y materiales.
<ul style="list-style-type: none"> Ropa adecuada para el clima del área de estudio. Protector solar y bálsamo labial con filtro UVA/UVB. Lentes de seguridad con filtro UVA/UVB. Gorro legionario. 	<ul style="list-style-type: none"> Contador manual. Binoculares 10x42. Guía de identificación de Aves. Libreta y lápiz. Cámara fotográfica.

- Monitoreo de macrófitas.

EL monitoreo de macrófitos se propone en base a la “Guía metodológica y protocolos de muestreo de flora y fauna acuática en aguas continentales de Chile”, Gobierno de Chile (CEA, 2018). Teniendo en cuenta que el humedal tiene sectores no vadeables (profundidad máxima > 2 metros), se propone establecer 10 transectos para el monitoreo de macrófitas (2 en cada estación de muestreo) de un área aproximada de 20 m² perpendiculares a la orilla. Para las zonas menos profundas, los transectos serán rectángulos de 2 metros de ancho y 10 metros de largo, por otro lado, para zonas con profundidades >2 metros la longitud, cada transecto llegará hasta donde se alcancen los 2 metros de profundidad y su ancho será tal que abarque el área propuesta anteriormente.

La determinación de especies y su cobertura (superficie de proyección sobre el sustrato) en cada transecto se realizará de forma visual, al ubicar un cuadrante de 1 m x 1 m sobre las plantas acuáticas, calculando de forma aproximada el porcentaje de cobertura de cada especie y la cobertura del total de ellas. Las especies no identificadas serán recolectadas para su posterior análisis.



Figura 5.14: Cuadrante para monitoreo de macrófitas (CEA, 2018).

Los elementos necesarios para la realización del monitoreo se detallan en la **Tabla 5.8**.

Tabla 5.8: Elementos de protección personal, equipamiento y materiales para el monitoreo de Macrófitas (CEA, 2018).

Elementos de protección personal	Equipamiento y materiales
<ul style="list-style-type: none"> • Ropa adecuada para el clima del área de estudio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rastrillo con mango extensible.
<ul style="list-style-type: none"> • Botas o bateadores de pescador de caucho, nylon-PVC o neopreno. 	<ul style="list-style-type: none"> • Draga del tipo Van Veen.
<ul style="list-style-type: none"> • Protector solar y bálsamo labial con filtro UVA/UVB. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cinta métrica lavable con plomos para marcar transectos.
<ul style="list-style-type: none"> • Guantes de látex o neopreno. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lupa 10X aumento, espátula y pinzas.
<ul style="list-style-type: none"> • Lentes de seguridad con filtro UVA/UVB. 	<ul style="list-style-type: none"> • Guía de identificación de macrófitos.
<ul style="list-style-type: none"> • Gorro legionario. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bandejas de plástico. • Cámara fotográfica.

- Monitoreo de Macroinvertebrados.

El protocolo de muestreo se realizará en base a lo dispuesto en la “Guía metodológica y protocolos de muestreo de flora y fauna acuática en aguas continentales de Chile” del Gobierno de Chile (CEA, 2018), para ecosistemas humedales (estuarios y marismas) mediante redes de pateo para muestreo cualitativo.



Figura 5.15: Red de pateo en forma de D (WildCo, s/f).

Las redes “kick net” pueden ser usadas para una variedad de ecosistemas, con ellas se barre la superficie del fondo para obtener la composición de especies en multi hábitats. Para el muestreo, se remueve el sustrato con los pies y se recolectan las muestras con la red.

Tabla 5.9: Elementos de protección personal, equipamiento y materiales para el monitoreo de Macroinvertebrados (CEA, 2018).

Elementos de protección personal (EPP)	Equipamiento y materiales
<ul style="list-style-type: none"> • Ropa adecuada para el clima del área de estudio. • Botas o bateadores de pescador de caucho, nylon-PVC o neopreno. • Protector solar y bálsamo labial con filtro UVA/UVB. • Guantes de látex o neopreno. • Lentes de seguridad con filtro UVA/UVB. • Gorro legionario. 	<ul style="list-style-type: none"> • Red cualitativa o cuantitativa • Frascos o bolsas plásticas para colecta. • Rotuladores. • Piseta y bandejas plásticas. • Lupa 10X aumento. • Cámara fotográfica.

5.7.1.7 Etapa 7: implementación programa de monitoreo

Una vez establecidas todas las variables (objetivos, número de sitios de muestreo, duración y parámetros a monitorear) detalladas en las etapas anteriores, se procede a implementar el programa de monitoreo, el cual debe contar con recursos humanos, técnicos y financieros.

5.7.1.8 Etapa 8: análisis de resultados

Para realizar un efectivo análisis de los datos, se requiere de una base de datos sólida que recopile la información del monitoreo (en base a anotaciones y planillas) para luego comparar con datos bibliográficos y monitoreos previos.

Para el programa de monitoreo propuesto busca analizar las fluctuaciones de los parámetros físicos y químicos en un periodo de tiempo determinado (entre campañas de muestreo) y analizar la diversidad, riqueza específica, abundancia, índice de Shannon e índice de Jaccard para macroinvertebrados, avifauna y macrófitas.

5.7.1.9 Etapa 9: Evaluación y manejo adaptativo.

El manejo adaptativo nace desde la evaluación del proceso y los resultados obtenidos en el monitoreo, por tanto, en base a estos, se evalúa las variables que pueden condicionar el muestreo o que no obtuvieron resultados esperados, ante esto, se debe plantear una nueva propuesta de monitoreo, adaptando las metodologías a los requerimientos necesarios con la finalidad de obtener muestras más representativas y de mejor calidad.

6. RESULTADOS

6.1 Implementación de ensayos estandarizados de toxicidad con un tóxico de referencia

6.1.1 Ensayo con bulbos de *Allium sp.*

De manera preliminar, se realizaron los ensayos estandarizados de *Allium cepa* con bulbos de *Allium fistulosum* o cebollín, esta especie al pertenecer al mismo género tiene características similares en su crecimiento y desarrollo, esto debido a la temporada del desarrollo del ensayo. Los cebollines fueron expuestos a distintas concentraciones de CuSO_4 como químico de referencia.

Los valores obtenidos para los parámetros analizados en las raíces de *Allium cepa* expuestas a distintas concentraciones de CuSO_4 se muestran en la Tabla 6.2.



Figura 6.1: Bioensayo con *Allium fistulosum* expuestos a distintas concentraciones de CuSO_4 .

Los bulbos expuestos a agua destilada registraron un crecimiento promedio de 0,95 cm. La única concentración que presentó un crecimiento mayor fueron las expuestas a 2mg/L con 1,19 cm, a su vez fueron los datos más dispersos respecto a la media. Las raíces con un desarrollo más homogéneo fueron aquellas expuestas a 1,5 mg/L de CuSO_4 .

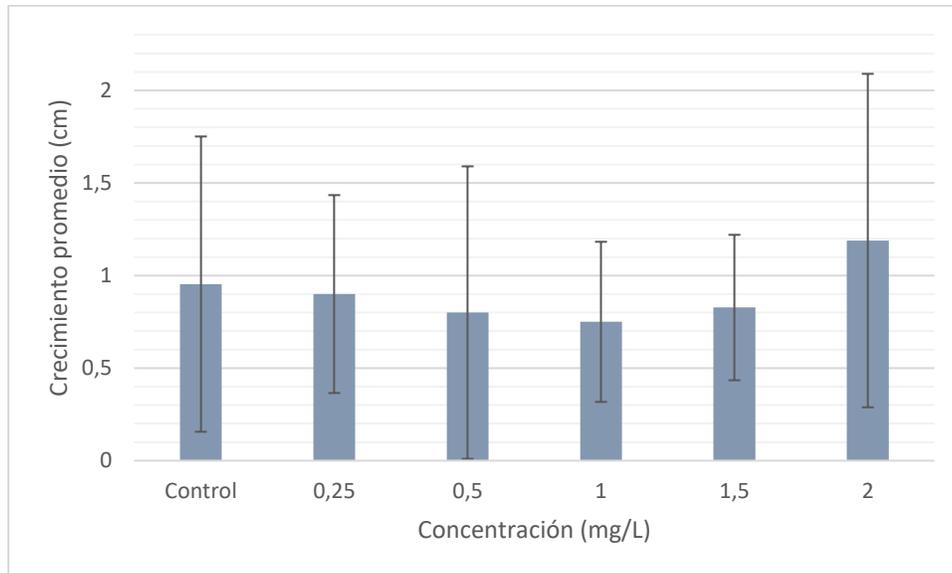


Figura 6.2: Desviación estándar del crecimiento radicular.

Por razones de tiempo y de disponibilidad de reactivos, la observación de mitosis de células de *Allium cepa* no se pudo llevar a cabo, sin embargo, se observaron los meristemas expuestos a la concentración más alta, en el microscopio óptico con azul de toluidina, colorante que se usa para tinciones rápidas en histología vegetal.

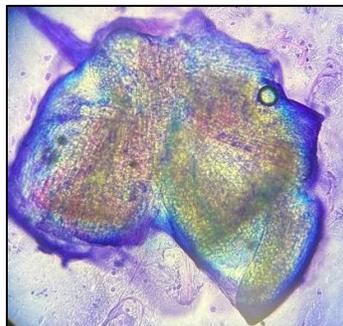


Figura 6.3: Imagen microscópica 10X zona meristemática *Allium fistulosum*.



Figura 6.4: Imagen microscópica 100X zona meristemática *Allium fistulosum*.

6.1.2 Ensayo con *Artemia salina* L.

Se realizó la eclosión de huevos de *Artemia* según lo establecido por el distribuidor, luego de 18 horas, los huevos eclosionaron y se expusieron los nauplios a las distintas concentraciones de CuSO_4 (la dilución se realizó con agua de mar filtrada).



Figura 6.5: Quistes de *Artemia salina* en microscopio 4X y nauplio de *Artemia salina* microscopía 10X.

Los valores de mortalidad o inhibición de crecimiento analizados en *Artemia salina* L. expuestas a distintas concentraciones de CuSO_4 se muestran en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1: Mortalidad de nauplios a 24 y 48 horas de exposición.

Concentraciones	N° total de nauplios	Total nauplios muertos	
		24 horas	48 horas
Control 1	10	0	3
Control 2	10	0	2
Control 3	10	1	1
C 1.1	7	0	1
C 1.2	10	1	3
C 1.3	10	0	2
C 2.1	10	2	2
C 2.2	9	4	4
C 2.3	9	3	5
C 3.1	11	6	6
C 3.2	10	3	4
C 3.3	8	6	8
C 4.1	10	6	6
C 4.2	10	3	3
C 4.3	9	5	5
C 5.1	10	5	6
C 5.2	11	0	0
C 5.3	8	4	5

Con C1: 0,25 mg/L; C2: 0,5 mg/L; C3: 1 mg/L; C4: 1,5 mg/L y C5: 2 mg/L de CuSO₄.

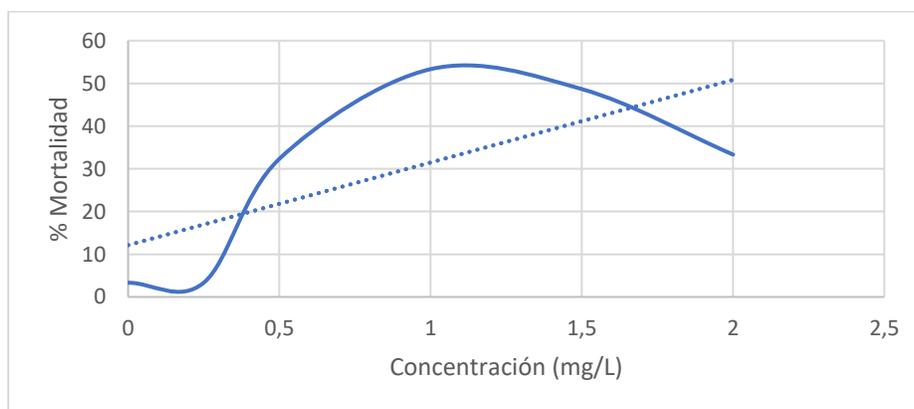


Figura 6.6: Porcentaje de mortalidad según concentración.

A partir de la ecuación $y=19,354x+12,12$ se calcula el CL50 de la siguiente manera:

$$Cl_{50} = \frac{50 - 12,12}{19,354}$$

$$Cl_{50} = 1,99 \text{ mg/L}$$

Por lo que la concentración letal donde el 50% de los organismos muere es a los 1,99 mg/L de CuSO₄.

6.2 Características físicas y químicas del humedal

Para obtener una visión general de la zona de estudio, se realizó una visita preliminar en el mes de agosto de 2022 para identificar los potenciales puntos de muestreo, determinando aquellos más representativos para realizar su análisis, a su vez, se tuvo en cuenta las características geográficas del humedal, la accesibilidad y la cercanía a las actividades antrópicas.

Se determinaron las estaciones de muestreo en el terreno realizado en octubre de 2022, donde se extrajeron muestras de agua y sedimentos que se utilizaron para realizar análisis experimentales. Las estaciones de muestreo y sus coordenadas se presentan en la **Tabla 6.2** y **Figura 6.7** respectivamente.

Tabla 6.2: Ubicación geográfica estaciones de muestreo

ESTACIÓN	UBICACIÓN GEOGRÁFICA		ALTURA msnm	NOMBRE	Profundidad promedio (cm)
	E (19H)	S (UTM)			
E1	263824	6432260	7	Entrada	20
E2	263747	6430963	5	Población Chagres	70
E3	263629	6430829	3	Polluelos	76
E4	263680	6430700	1	Estacionamiento	86
E5	263695	6430603	-1	Desembocadura	65



Figura 6.7: Estaciones de muestreo. Fuente: Google Earth.

6.2.1 Parámetros medidos en Terreno

Los resultados del análisis in situ de las aguas y sedimentos de los puntos de muestreos se presentan en la **Tabla 6.3**.

Los parámetros sólidos disueltos y conductividad eléctrica presentaron valores de 10 mg/L y 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en todas las estaciones de muestreo (capacidad máxima de lectura del equipo), por lo que se debió realizar una dilución de las muestras con agua desmineralizada y leer con multiparámetro. Respecto al pH, E1 presenta un pH más bien neutro, por otro lado, E2, E3, E4 y E5 tiene un pH más alcalino.

En términos generales, las muestras fueron en su mayoría arenosas a primera vista.

Tabla 6.3: Parámetros físicos, químicos e hidro morfológicos del humedal.

Variable	E1	E2	E3	E4	E5	
Hora	9:33	10:15	11:56	12:40	13:17	
T° (°C)	16,10	17,90	20	19	18,60	
pH	7,41	8,25	8,51	8,44	8,32	
SST (ppm)	24,8	28,8	24	25	24,20	
Cond. Elec. (mS/cm)	49,60	57,50	48	50	48,40	
Salinidad (g/L)	32,60	38,28	31,46	32,88	31,74	
Profundidad promedio (cm)	20	70	76	86	65	
Ancho (m)	1	12	21	37	35	
Tipo de sedimento de fondo	Arenoso	Fangoso	Fangoso	Arenoso	Arenoso	
Propiedades Organolépticas	Color	Rojizo	Café verdoso	Negro	Grisáceo	Grisáceo
	Olor	Putrefacto	Putrefacto	Putrefacto	Mar	Mar

6.2.2 Parámetros medidos en laboratorio

Los resultados de los análisis realizados en laboratorio con un espectrofotómetro se pueden observar en la **Tabla 6.4**.

La estación con mayor presencia de cobre fue E3 (6,0 mg/L) y el menor en E1 (0,15 mg/L). Las muestras de E3 presentaban mayor cantidad de nitratos (6,0 mg/L), mientras que E5 solo contenía 1,5 mg/L. En cuanto a los nitritos, su mayor presencia se encontraba en E1 y menor en E4 (0,10 mg/L). Por otro lado, la estación con más fosfato fue E1 (4,2) y E5 quien contuvo menos (0,19 mg/L).

Tabla 6.4: Resultados análisis por colorimetría.

Parámetro	Estación 1	Estación 2	Estación 3	Estación 4	Estación 5
Cobre (mg/L)	0,15	0,81	1,13	0,99	0,76
Nitrato (mg/L)	3,7	3,4	6,0	3,4	1,5
Nitrito (mg/L)	0,61	0,12	0,12	0,10	0,13
Fosfato (mg/L)	4,2	1,7	1,9	2,0	0,19

- Materia Orgánica.

El porcentaje de materia orgánica de las muestras es mayor en E2 con un 40,6%, mientras que las estaciones 4 y 5 fueron aquellas con un porcentaje significativamente menor, con un 3,6% y 2,6% respectivamente.

El contenido de materia orgánica de las muestras se presenta en la **Tabla 6.5**

Tabla 6.5: Materia orgánica sedimentos.

Muestra	Materia Orgánica (%)
E1	17
E2	40,6
E3	27
E4	3,6
E5	2,6

- Granulometría

Las muestras fueron analizadas por triplicado para obtener los porcentajes granulométricos más representativos de cada zona, una vez establecidos los puntos de muestreo, se procedió a realizar la extracción de las muestras con una distancia de 1-2 metros entre ellas. Los datos fueron introducidos a una tabla Excel para realizar las siguientes gráficas **6.9, 6.10, 6.11, 6.12 y 6.13.**

Para clasificar partículas que queden por encima del tamiz N° se catalogan como gravas, aquellas que se encuentran entre los tamices N° 4 y °200 se clasifican como arenas y se consideran limos o arcillas aquellos que pasan el tamiz N° 200.

- Estación 1

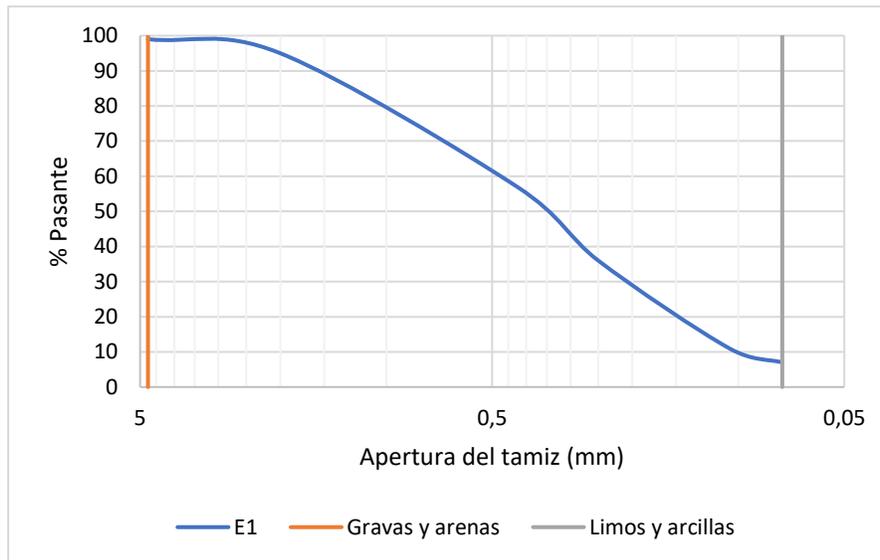


Figura 6.8: Curva granulométrica Estación 1.

Al ser una curva más bien extendida, significa que hay una distribución las partículas tienen una mejor distribución del material y que las partículas no son de tamaños similares.

De la gráfica podemos decir que el tipo de sedimento de la estación N° 1 contienen un 1% de gravas, un 7% de limos o arcillas y un predominante 92% de arenas.

- Estación 2

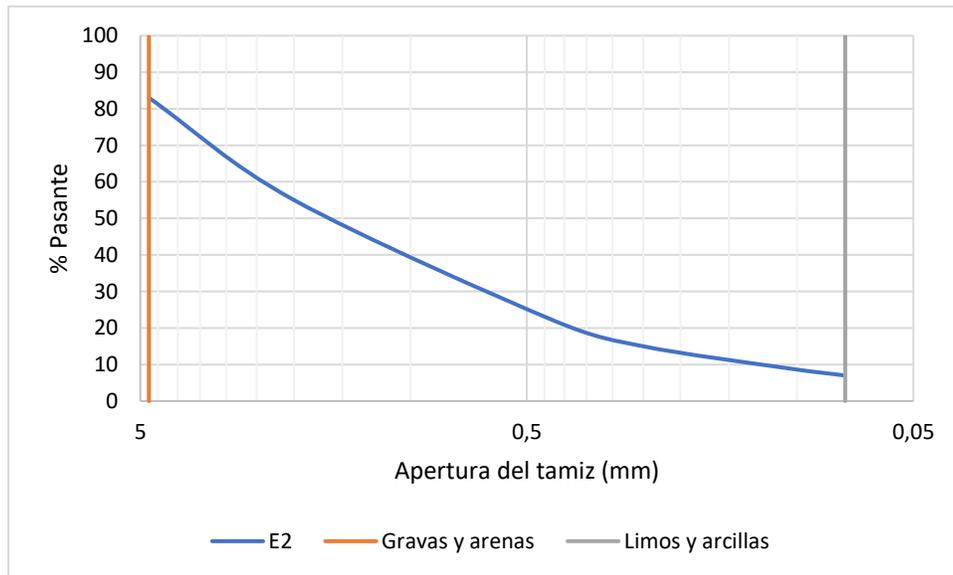


Figura 6.9: Curva granulométrica Estación 2

Se determinó que el tipo de sedimento de la estación N° 2 contienen un 17% de gravas, un 76% de arenas y un 7% de limos o gravas.

- Estación 3

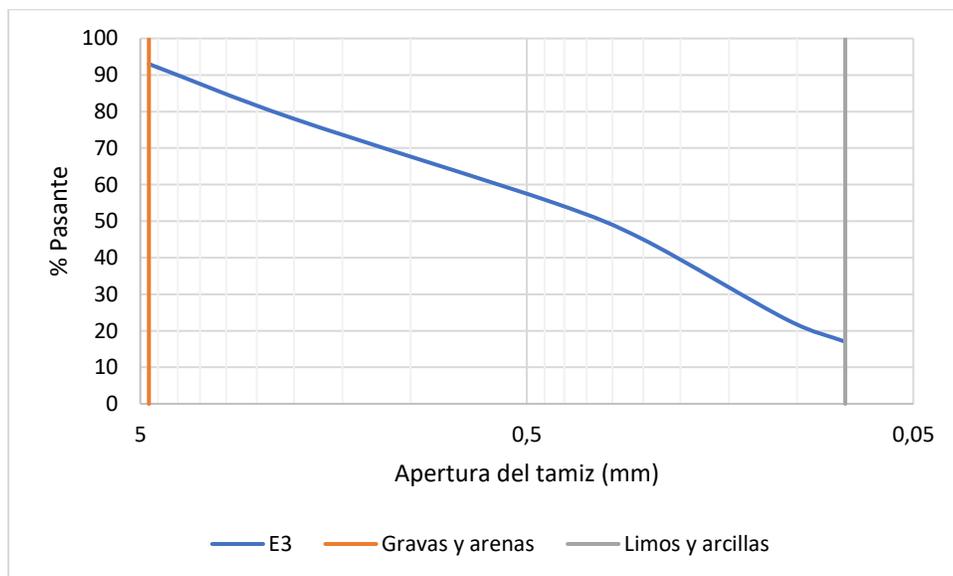


Figura 6.10: Curva granulométrica Estación 3.

La estación N° 3 contiene un 7% de gravas, un 76% de arenas y un 17% de gravas o limos.

- Estación 4

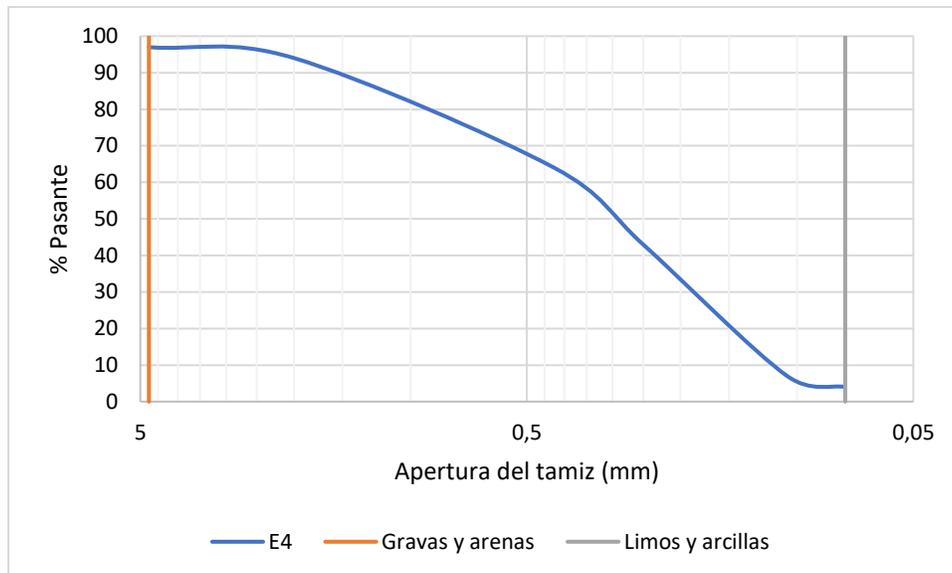


Figura 6.11: Curva granulométrica Estación 4.

De la gráfica podemos decir que el tipo de sedimento de la estación N° 4 contienen un 3% de gravas, un 4% de limos o arcillas y un predominante 93% de arenas

- Estación 5

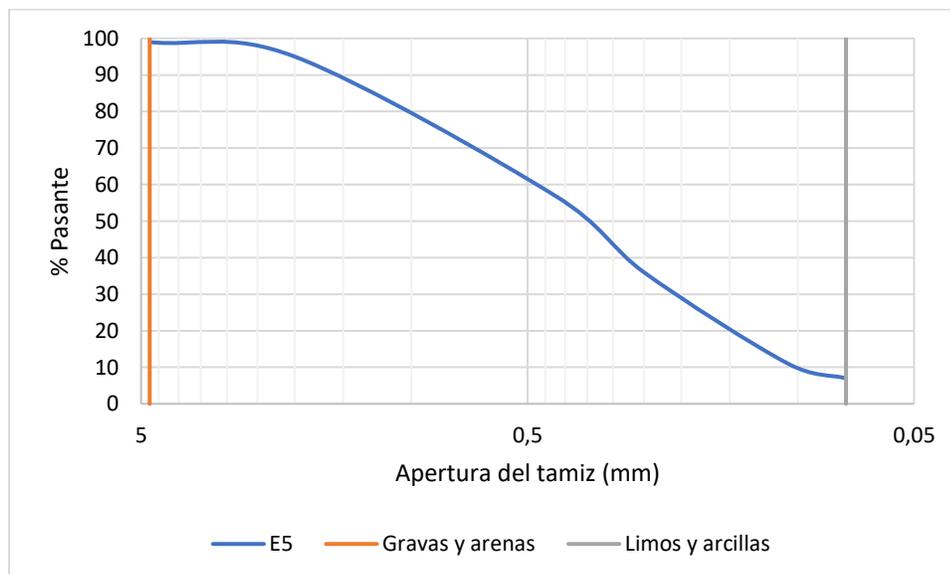


Figura 6.12: Curva granulométrica Estación 5.

Se pudo determinar que el tipo de sedimento de la estación N° 5 contienen un 100 % de arenas.

De manera general, se puede decir que el sedimento del Humedal Estuario Los Molles son predominantemente arenas con bajos porcentajes de sedimentos finos (limos y arcillas).

6.3 Determinación de la genotoxicidad y citotoxicidad de los sedimentos.

6.3.1 Bioensayo con *Allium cepa*.

- Crecimiento de la raíz.

Luego de 48 horas de exposición en agua destilada para estimular el crecimiento de la raíz y 24 horas de exposición al elutriado, los bulbos de cebolla presentaron el siguiente crecimiento radicular (**Tabla 6.6**).

Del total de muestras por estación, los bulbos expuestos a elutriados crecieron 20 raíces en E1, 15 raíces en E2, 23 raíces en E3, 27 raíces en E4, 21 raíces en E5 y 26 raíces expuestas al control (agua destilada).

Las muestras pertenecientes a la estación N°2 fueron las que menor cantidad de raíces desarrollaron (15 raíces en total), por lo que el conteo del total de raíces y el análisis de varianza se realizó en base al mínimo de 15 raíces por estación. Los datos de las demás raíces fueron elegidos al azar para garantizar que los datos fueran representativos.

La longitud media de las raíces expuestas al control (agua destilada) fue de 1,3 cm, al calcular el porcentaje de inhibición de las demás muestras con respecto al control, las estaciones E1 y E4 fue presentan una diferencia de 9 y 15 puntos porcentuales por debajo del valor promedio, por otro lado, las estaciones E2, E3 y E5 presentaron un incremento de 39%, 45% y 19% respectivamente en comparación al control.

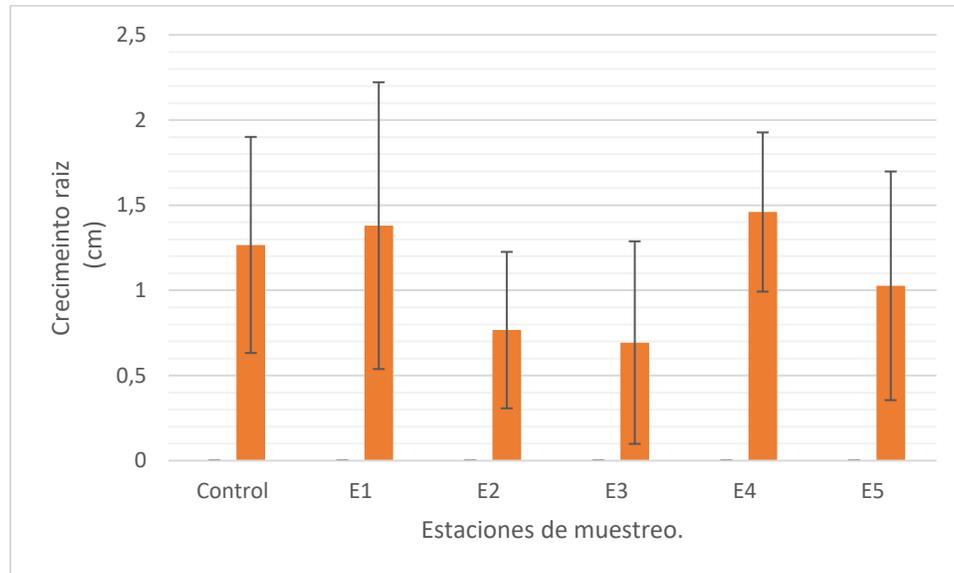


Tabla 6.6: Crecimiento radicular *Allium cepa*.

- Análisis ANOVA.

El análisis ANOVA de un solo factor se realizó en relación el crecimiento de la raíz. Las variantes corresponden a los 6 medios de exposición y con ello se determinó si existen diferencias significativas en el crecimiento radicular entre las 6 muestras.

Hipótesis nula (H_0): $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ (Las medias de los grupos son iguales)

Hipótesis alterna (H_1): No todas las μ_j son iguales.

Las raíces con mayor crecimiento promedio fueron aquellas expuestas al elutriado E4 (1,4 cm) mientras que aquellas que en promedio crecieron menos fueron las expuestas a E3 (0,7 cm), la desviación estándar de los datos fue mayor en E1 (0,8), mientras los datos más agrupados respecto a media se presentaron en E4 (0,5). Las muestras que presentaron mayor varianza en su crecimiento fueron las expuestas a E1 (0,7 cm) y aquellas con un crecimiento homogéneo entre raíces se presentaron en E4 (0,2 cm).

El resumen de estos datos se encuentra en la **Tabla 6.7**.

Tabla 6.7: Resumen medidas de tendencia central.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio (cm)	Varianza	Desviación estándar	Coefficiente de variación
E1	15	20,7	1,3800	0,7089	0,8419	0,6101
E2	15	11,5	0,7667	0,2110	0,4593	0,5991
E3	15	10,4	0,6933	0,3535	0,5946	0,8576
E4	15	21,9	1,4600	0,2183	0,4672	0,3200
E5	15	15,4	1,0267	0,4507	0,6713	0,6539
Control	15	19	1,2667	0,4024	0,6343	0,5008

Tabla 6.8: Análisis de varianza

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,7646	5	1,5529	3,9739	0,0028	2,3231
Dentro de los grupos	32,8253	84	0,3908			
Total	40,5899	89				

Con un valor F de 3,97 mayor al valor crítico de 2,32, se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, existen diferencias significativas en el crecimiento de raíz entre las muestras.

- Prueba de Tukey

Para calcular cuales muestras tienen una diferencia significativa entre sí, se calculó el T_α resultado con un valor de 0,7409. Una diferencia muestral mayor a T_α demuestra una diferencia significativa. El resultado de significancia se presenta en la tabla 6.9, donde podemos apreciar que las únicas muestras con diferencias significativas se dan en E3 y E4.

Tabla 6.9: Representatividad de los datos.

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Decisión
E1 - E2	0,6133	No significativa
E1 - E3	0,6867	No significativa
E1 - E4	0,0800	No significativa
E1 - E5	0,3533	No significativa
E1 - C	0,1133	No significativa
E2 - E3	0,0733	No significativa
E2 - E4	0,6933	No significativa
E2 - E5	0,2600	No significativa
E2 - C	0,5000	No significativa
E3 - E4	0,7667	Significativa
E3 - E5	0,3333	No significativa
E3 - EC	0,5733	No significativa
E4 - E5	0,4333	No significativa
E4 - C	0,1933	No significativa

- Índice Mitótico (IM).

Del total de raíces, se realizaron cerca de 50 muestras en portaobjetos, se seleccionaron las mejores muestras de cada medio de exposición para su análisis. Las muestras seleccionadas fueron recorridas en el microscopio para encontrar la zona meristemática de la raíz y se procedió a fotografiar aquellas más claras. Con las fotografías, se realizó el conteo de cerca 10.000 células en total (**Tabla 6.10**).

Tabla 6.10: Conteo de células en mitosis.

Muestras	Total células en profase	Total células en metafase	Total células en anafase	Total células en telofase	Total células en mitosis	Total células contadas
1	107	15	11	24	157	1794
2	94	13	9	26	142	2033
3	83	18	9	18	128	2014
4	71	27	19	23	140	2319
5	60	22	15	24	121	2212
Control	181	29	15	28	253	2230

Los resultados del índice mitótico, índice entre fases y la ocurrencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos de la raíz de *Allium cepa* sometidas a los distintos medios de exposición se presentan en la **Tabla 6.11**.

En este estudio, se pudo apreciar que el tratamiento control presentó una mayor actividad mitótica con un 11%, asimismo, las muestras expuestas a los elutriados tienen tasas mitóticas más bajas con E1:8,7 %; E2: 7%; E3: 6,3; E4 6% y E5: 5,5%.

El índice de células en profase fue mayor en el control con 71,5%, las muestras con mayor número de células en metafase se presentaron en E4 con 19% y con menor en E2 con 9,1%. El índice en anafase fue mayor en E4 con 13,6% mientras el menor en las raíces expuestas al control. Por otro lado, se observaron una cantidad mayor de células en telofase en las muestras de E5 con 19,8%, mientras que el control solo presentó un 11%.

Tabla 6.11: Índice mitótico (IM) e índice de fases (IF).

Muestras	IM	IF Profase	IF Metafase	IF Anafase	IF Telofase
1	8,7514	68,1529	9,5541	7,0064	15,2866
2	6,9848	66,1972	9,1549	6,3380	18,3099
3	6,3555	64,8438	14,0625	7,0313	14,0625
4	6,0371	50,7143	19,2857	13,5714	16,4286
5	5,4702	49,5868	18,1818	12,3967	19,8347
Control	11,3453	71,5415	11,4625	5,9289	11,0672

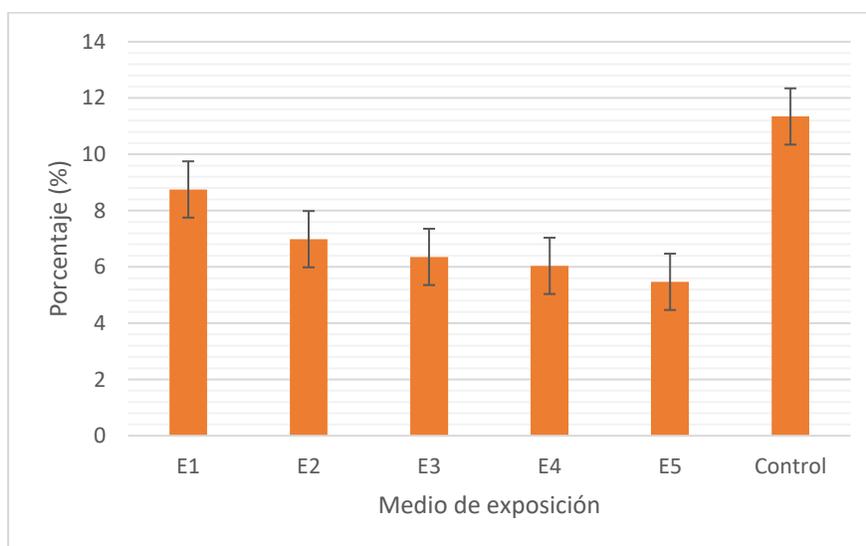


Figura 6.13: Índice mitótico.

- División celular en raíces de *Allium cepa* expuestas a control

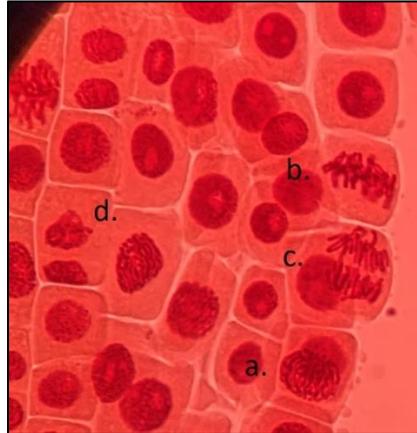


Figura 6.14: División celular control. A: profase temprana b: Metafase c: Anafase d: Telofase final.

- División celular en raíces de *Allium cepa* elutriado de E1



Figura 6.15: División celular muestra E1. A: Profase inicial b: Metafase c: Anafase final d. Telofase inicial

- División celular en raíces de *Allium cepa* expuestas a elutriado de E2

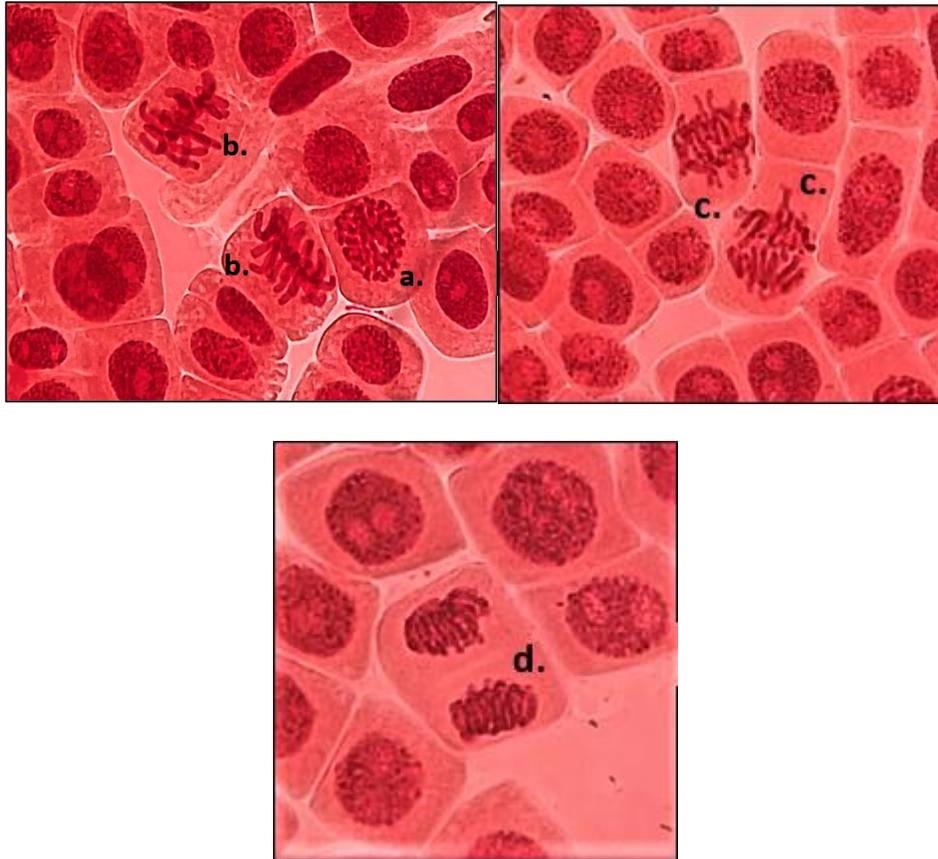


Figura 6.16: Células en división celular expuestas a elutriado E2

a) Profase temprana b) Metafase c) Anafase inicial d) Telofase inicial.

- División celular en raíces de *Allium cepa* expuestas a elutriado de E3

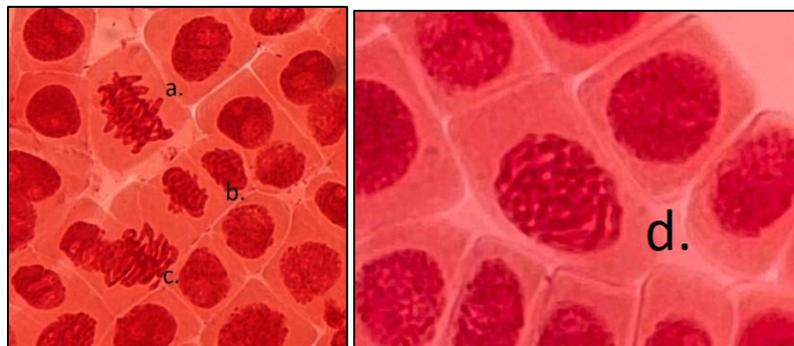


Figura 6.17: Células en división celular a) Anafase temprana b) Telofase c) Metafase d) Profase temprana.

- División celular en raíces de *Allium cepa* expuestas a elutriado de E4

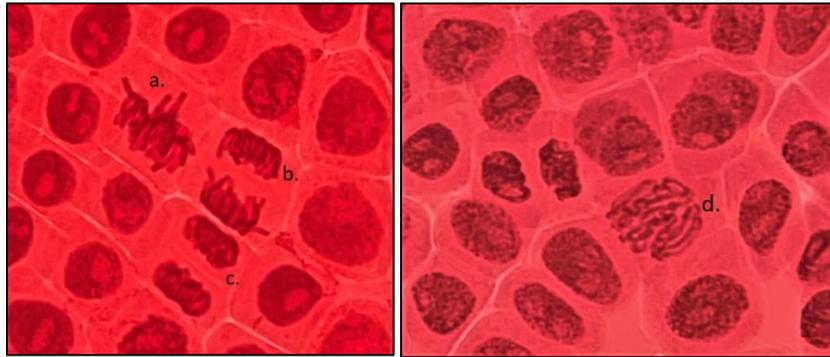


Figura 6.18: Mitosis raíces expuestas a elutriado E4. a: Metafase. b: Anafase final. c: Telofase. d: Profase inicial

- División celular en raíces de *Allium cepa* expuestas a elutriado de E5

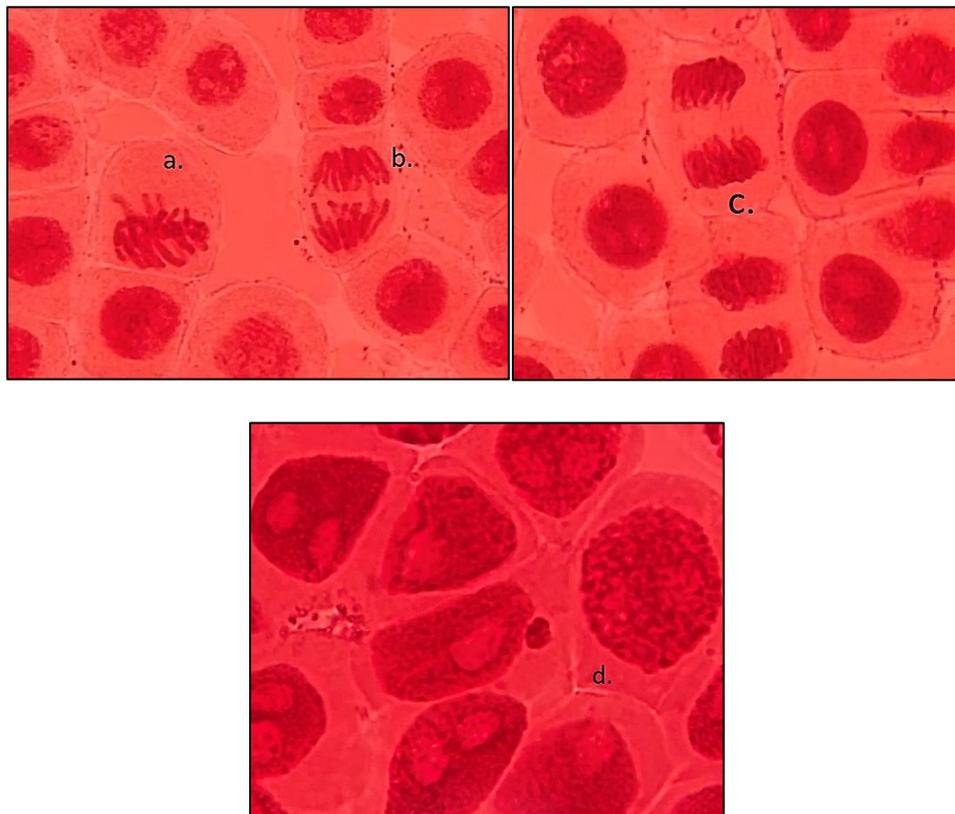


Figura 6.19: Mitosis raíces expuesta a elutriado E5. a: Metafase b: Anafase temprana c: Telofase inicial d: Profase inicial.

- Aberraciones cromosómicas.

Las frecuencias de aberraciones cromosomales tales como, micronúcleos (Mn), rotura cromosómica (RC), puente en anafase (PA), agrupamiento cromosómico en metafase, ausencia de núcleo (AN), anafase irregular (AI) y muesca nuclear (MN) se presentan en la **Tabla 6.12.** y en las figuras **Figura 6.20, Figura 6.20, Figura 6.20, Figura 6.20 y Figura 6.20.**

Tabla 6.12: Aberraciones en células de *Allium cepa*.

Muestras	N° Total células	N° Aberraciones cromosómicas	% Aberraciones cromosómicas.
Control	1794	0	0
E1	2033	4	0,19675357
E2	2014	2	0,09930487
E3	2319	4	0,17248814
E4	2212	1	0,04520796
E5	2230	2	0,0896861

Las muestras expuestas al control no presentaron aberraciones cromosómicas visibles.

- Aberraciones cromosómicas muestras expuestas a E1.



Figura 6.20: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas elutriado E1. a: b: Micronúcleo c: Cromosoma rezagado.

- Aberraciones expuestas a elutriado E2

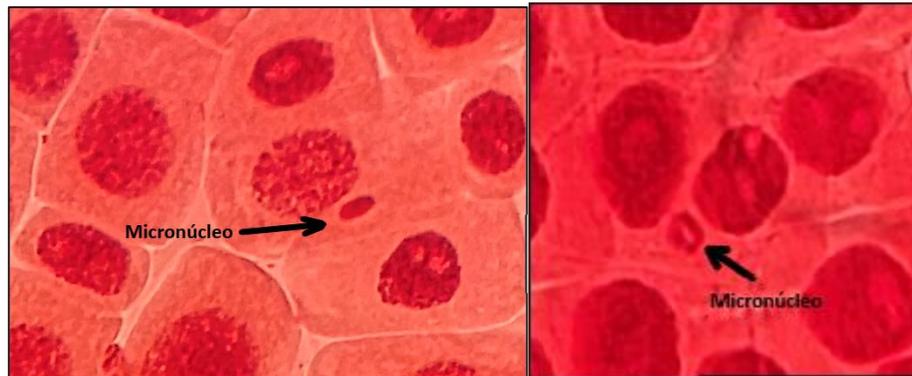


Figura 6.21: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E2. Presencia de micronúcleos.

- Aberraciones expuestas al elutriado de E3



Figura 6.22: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E3. Micronúcleo y Puente en Anafase.

- Aberraciones expuestas al elutriado de E4

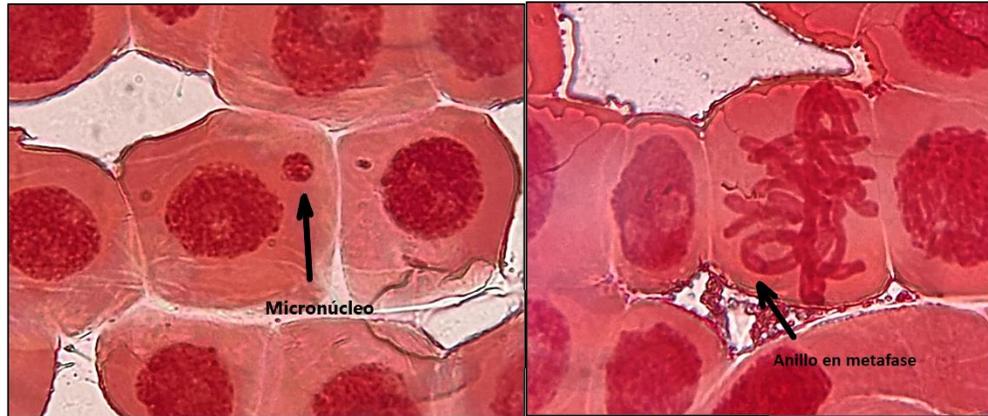


Figura 6.23: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E3. Micronúcleo y anillo en Metafase.

- Aberraciones expuestas al elutriado de E5



Figura 6.24: Aberraciones cromosómicas raíces expuestas a elutriado E5. Micronúcleos.

6.3.2 Bioensayo con *Artemia salina* L.

El porcentaje de mortalidad de los nauplios de los distintos medios de exposición se presenta en la **Tabla 6.13**. Donde el control presentó un 2% de mortalidad a las 24 y 48 horas, el control positivo presentó los valores más altos con un 82% las primeras 24 horas y la totalidad de los organismos a las 48 horas. De los nauplios expuestos a elutriados, la mayor mortalidad, tanto a las 24 como a las 48 horas se observaron en E1, con un 42 y 50% respectivamente.

Tabla 6.13: Mortalidad de nauplios a las 24 y 48 horas de exposición.

Muestras	24 horas	48 horas
Control negativo	2	2
Control positivo	82	100
E1	42	50
E2	2	16
E3	16	20
E4	12	32
E5	10	28

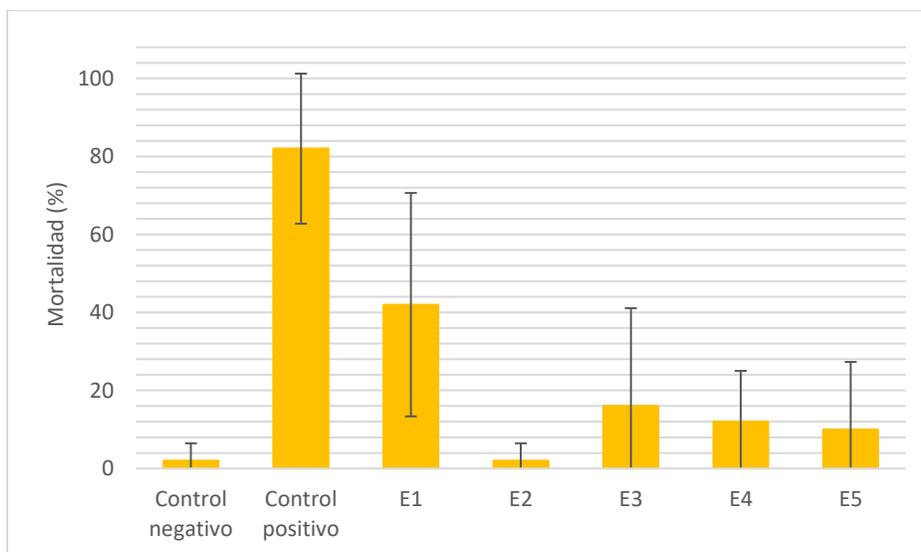


Figura 6.25: Porcentaje mortalidad después de 24 horas de exposición.

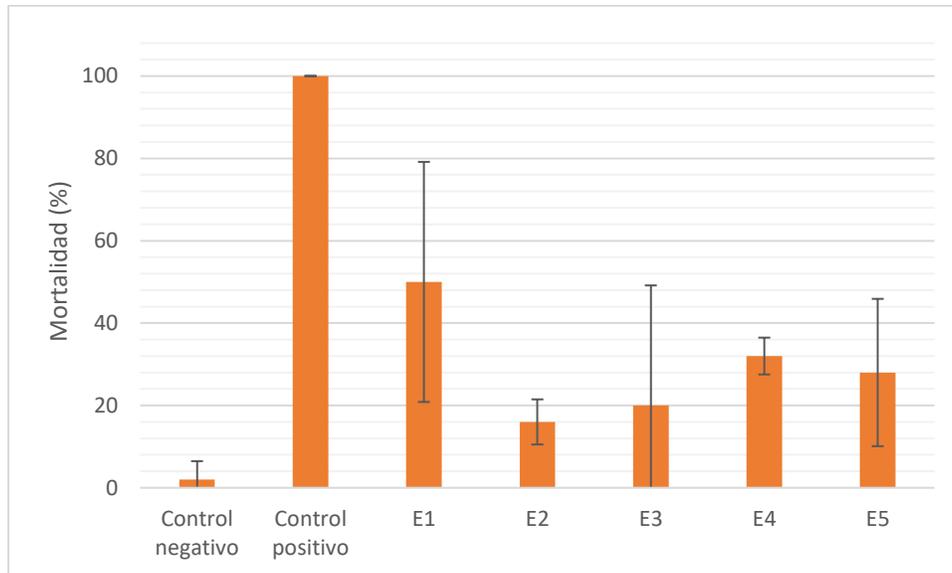


Figura 6.26: Porcentaje mortalidad después de 48 horas de exposición.

Con estos resultados y teniendo en cuenta que son datos no paramétricos, se realiza una prueba de Kruskal-Wallis, con la siguiente hipótesis.

Hipótesis nula (H_0): Mediana control = Mediana Positivo = Mediana E1 = Mediana E2 = Mediana E3 = Mediana E4 = Mediana E5

Hipótesis alterna (H_a): Existe por lo menos una mediana de la mortalidad de artemias (%) diferente.

Del análisis se tiene, $H = 19,54$, mientras el valor crítico = $12,59$.

Con $H > \text{Valor crítico}$, se rechaza la hipótesis nula, ya que existen evidencias estadísticas de que las medianas de la mortalidad de nauplios a las 24 de exposición son diferentes, con una significancia del 0,05.

6.4 Programa de monitoreo.

Todo programa de monitoreo debe tener un objetivo que lo justifique, para el programa de monitoreo propuesto se establecen los siguientes objetivos.

Objetivo General

- Determinar el estado ecológico del Humedal Estuario Los Molles, a partir del monitoreo periódico de componentes físicos, químicos y biológicos, como herramienta para la gestión sustentable del ecosistema.

Objetivos Específicos

- Levantar información ambiental de base que permita realizar seguimiento e identificar signos de alerta temprana frente a cambios en el estado de salud del humedal.
- Conocer la biodiversidad presente en el humedal con el fin de estimar la riqueza y abundancia en el ecosistema.
- Identificar las amenazas que afectan la biodiversidad del humedal.

Los límites espaciales del programa de monitoreo (área de estudio) contempla las 9,2 ha. declaradas humedal urbano en 2021 por el Ministerio de Medio Ambiente. Se tomarán las estaciones de muestreo ya establecidas en la **Figura 5.2** como base para el monitoreo, teniendo en consideración que estas cubren las gradientes ambientales de salinidad en estuarios dadas por efecto de las mareas (zona salina, dulceacuícola y mezcla).

A continuación, se presenta una tabla (Tabla 6.14) con los objetivos específicos del programa de monitoreo, sus metodologías, las actividades y resultados esperados relacionados al monitoreo del Humedal Estuario Los Molles, en base a lo establecido en la “Guía de monitoreo de humedales” (MMA, 2022).

Tabla 6.14: Programa de monitoreo.

Objetivo específico	Resultados	Actividades	Metodología	Frecuencia
Levantar información ambiental de base que permita realizar seguimiento e identificar signos de alerta temprana frente a cambios en el estado de salud del humedal.	Obtención de tendencias de características físicas y químicas, las cuales evidencian el estado ecológico del ecosistema del humedal.	Efectuar registros en terreno de las 5 estaciones de muestreo, midiendo temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad. Colectar muestras de agua para su análisis en laboratorio.	Los datos serán recolectados in-situ con equipo multiparamétrico Hanna modelo HI98130 y oxímetro Hanna HI98193. Ex-situ se analizarán muestras en laboratorio con espectrofotómetro multiparamétrico Hanna 83203.	Primavera y Otoño
Conocer la biodiversidad presente en el Humedal con el fin de estimar la riqueza y abundancia en el ecosistema.	Listado de especies presentes en el humedal urbano, para avifauna, macroinvertebrados y macrófitas. Índices de biodiversidad.	Realizar visita a terrenos para el monitoreo de macrófitas, macroinvertebrados y avifaunas presentes en el humedal.	Cálculo de índices de biodiversidad: índice de Shannon-Wiener, índice de Simpson e índice de Margalef.	Primavera y Otoño.
Identificar las amenazas que afectan la biodiversidad del humedal.	Listado de amenazas y puntos georreferenciados susceptibles a amenazas.	Trabajo en conjunto con la comunidad para identificar lugares o actividades antrópicas que generen una tensión en el humedal. Ejecutar acciones para mitigar o disminuir amenazas y sus efectos sobre el ecosistema.	Grupos de trabajo y realización de actividades vinculantes con la comunidad respecto al monitoreo del humedal.	Durante todo el año, según contingencias.

7. DISCUSIÓN

Los estudios realizados en el Humedal Estuario Los Molles pertenecen a la sección del humedal que se encuentra permanentemente saturada de agua, la sección que se encuentra separada como resultado de la actividad antrópica (vialidad y viviendas), no pudo ser estudiada debido a que no existe un acceso público y su perímetro se encuentra cercado, lo que imposibilitó la realización de un estudio integral del polígono declarado como humedal urbano.

Los análisis resultan concordantes a la temporada de toma de muestra (principios de primavera), teniendo en cuenta que hasta septiembre de 2022 se registraron precipitaciones de 306,5 mm/m², 10% más que el promedio entre 1991-2020 de 187 mm/m² (DGA, 2022), lo que se traduciría en un aumento en el caudal del Estero Los Coiles y por consiguiente y consiguiente un mayor ingreso de agua, nutrientes, sedimentos y posibles contaminantes. Lo mismo sucede con las marejadas, las cuales se desarrollan mayoritariamente en invierno.

En terreno, se pudieron observar dos puntos con evidente intervención por actividad antrópica, la primera en E1, donde el humedal recibe las descargas de aguas residuales de una planta de tratamiento de agua, en ese mismo lugar, el humedal se ve completamente fraccionado por la canalización de sus aguas debido a la presencia de un camino informal (que conecta la población Chagres con el pueblo de Los Molles) El segundo punto es E3, donde se observó la presunta descarga de aguas servidas proveniente de viviendas aledañas o la infiltración de aguas subterráneas pertenecientes a la sección del humedal a la que no se tuvo acceso.

Las variables físicas y químicas fueron características de ecosistemas costeros tipo estuario, el pH de las aguas del humedal fluctuó entre 7,4 y 8,5, valores que se encuentran dentro del rango donde se desarrollan la mayoría de los organismos estuarinos (entre 6,5 - 8,5). Los valores de pH tendieron a aumentar en las estaciones más cercanas a la desembocadura, ya que, en las zonas más altas, el pH tiende a ser más básico por el ingreso de agua dulce, mientras que las cercanas al océano, tienen un pH ligeramente alcalino debido a la amortiguación natural del carbonato y el bicarbonato disuelto en el agua de amar (EPA, 2006). A su vez, el humedal tiene una salinidad promedio concordante con

la salinidad de estuarios de 35 mg/L (US Department of Commerce & National Oceanic, 2019).

La estación E1 presentó un pH más bien básico posiblemente debido a la descarga de aguas residuales, a la actividad microbiana, a los componentes químicos en la escorrentía de la cuenca o debido a impactos por otras actividades antrópicas. A pesar de ser el punto más alejado del mar, tiene una salinidad cercana al promedio del estuario (33,4 mg/L), lo que denota homogeneidad en su concentración a lo largo del humedal.

Las aguas de la estación E2 presentaron los valores más altos de sólidos disueltos totales (TDS), conductividad eléctrica y salinidad. A su vez, sus sedimentos presentaron mayor porcentaje de materia orgánica, la cual se pudo corroborar en terreno siendo la estación con mayor dificultad para extraer las muestras, debido a una capa vegetal densa en el fondo. Esto se debe a la geografía del lugar, al ser un sector más elevado de la franja intermareal y presentar una forma de meandro con mayor presencia de vegetación en sus márgenes lo que propicia que la materia orgánica y los sedimentos se acumulen.

Los bajos porcentajes de materia orgánica de las estaciones 4 y 5 están relacionadas a la granulometría predominantemente arenosa de sus sedimentos, a la poca profundidad de sus aguas y al ingreso del mar en temporadas de lluvias y marejadas.

Los fondos blandos de grano grueso tienden a estar bien oxigenados (E3, E4 y E5), son pobres en materia orgánica y bacterias y ricos en organismos intersticiales, mientras que los fondos con mayor presencia de grano fino (E1 y E2) tienden a estar menos oxigenados, contener más materia orgánica y ser pobres en organismos intersticiales (Rocha, 2008).

En términos generales, la granulometría de las muestras es predominantemente arenosa (todas las estaciones > 75%), porcentaje que aumenta al acercarse a la desembocadura del humedal, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta que el estuario se encuentra asociado a un sistema costero con presencia de dunas. Los sedimentos arenosos son permeables, lo que permite que el agua fluya a través del espacio intersticial cuando hay gradientes de presión horizontal (Darcy, 1856) y flujos bidireccionales del agua por acción del viento y las marejadas (Sto EM., 2013). Por lo que los sedimentos arenosos (especialmente los presentes en E3, E4 y E5) son considerados como sitios de recambio acelerado de materia orgánica (Boudreau *et al.*, 2001, Huettel & Webster 2001)

Se debe tener en consideración que parámetros físicos y químicos como la salinidad, el pH y el potencial redox pueden cambiar significativamente durante el proceso de mezcla de aguas en el estuario. Además, el alto contenido de sólidos disueltos en suspensión puede provenir de la cuenca, del mar o de la agitación de material fino por mareas o corrientes, lo que vuelve a suspender el sedimento (Middelburg y Herman, 2007; Uncles y Stephens, 2010)

La realización de los bioensayos con CuSO_4 como tóxico de referencia tuvo la finalidad de implementar técnicas estandarizadas para análisis ecotoxicológicos en los organismos *Artemia salina* y *Allium fistulosum*, las cuales fueron aplicadas posteriormente con los elutriados del Humedal Estuario Los Molles.

Los resultados de los bioensayos realizados con sulfato de cobre tuvieron un alto grado de inexactitud debido a errores humanos cometidos durante el desarrollo de las metodologías, mayormente relacionadas a temas de tiempo y a la imposibilidad de repetir los ensayos.

La variabilidad en los resultados estuvo relacionada, en caso de las Artemias, al poco control en la eclosión de los organismos, la diferencia en el desarrollo de los nauplios pudo significar que los organismos más “maduros” fuesen más resistentes a las diferentes concentraciones del tóxico. En el caso de los cebollines, las concentraciones de CuSO_4 fueron demasiado pequeñas para generar efectos adversos significativos en el crecimiento de sus raíces.

A pesar de la inexactitud de los resultados, al exponer *Artemia salina* Leach y *Allium fistulosum* a CuSO_4 como tóxico de referencia, fue posible corroborar que la aplicación de ensayos ecotoxicológicos estandarizados son una buena herramienta para determinar los potenciales impactos que este y otros tóxicos pueden generar sobre organismos vegetales y animales. Con este estudio se pudo determinar que estos bioensayos pueden ser utilizados con otros medios de exposición como los elutriados, para analizar posibles elementos tóxicos en las aguas del Humedal Estuario Los Molles.

Este paso es importante para poder identificar la relación causa efecto con variables aisladas, además, esto ayudará a determinar y, si es necesario, a adaptar o combinar la metodología para encontrar la idónea o la que se adapte a las condiciones de laboratorio y mejorar las técnicas para luego ser aplicadas en el estudio final con elutriados.

Para determinar la genotoxicidad y citotoxicidad de los elutriados de los sedimentos, se perfeccionaron y adaptaron las metodologías de los bioensayos a las condiciones de laboratorio, controlando parámetros como salinidad y oxígeno disuelto para garantizar el correcto desarrollo de estos y por consiguiente la fiabilidad de los datos resultantes.

En cuanto al bioensayo realizado con *Allium cepa*, se observó una disminución del crecimiento radicular en aquellas raíces expuestas a los elutriados de las estaciones E2, E3 y E4, con respecto al control. Mientras que las expuestas a E1 y E4 presentaron los valores más altos en elongación promedio superando al control. Al analizar parámetros obtenidos en este estudio, no se pudo encontrar una correlación con estos resultados, pero ambas estaciones se encuentran cercanas a zonas de descargas de aguas residuales, por lo que se puede inferir que existe algún elemento no medido que favorezca el crecimiento vegetativo y, por ende, el crecimiento de la raíz al ser expuesto a su elutriado. Esto puede deberse al efecto de eventos independientes propician la elongación celular en vez de generar una diferenciación celular en la región proximal del ápice de la raíz o en la región mitóticamente activa del meristemo (Fusconi *et al.*, 2006).

El índice mitótico permite cuantificar la actividad mitótica de un organismo (Lessa y Cariello, 2017), la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular y estimar la citotoxicidad de una variedad de compuesto (Salazar-Mercado *et al.*, 2019). En este estudio se observó una inhibición en el proceso de mitosis de todas las raíces expuestas a elutriados, con respecto al control.

Con esto se demuestra que los elutriados de sedimento del humedal afectan el desarrollo mitótico y la estructura cromosómica de la raíz de *A. cepa*, con respecto al control, a pesar de eso, el IM de las muestras no fue significativamente menor, por lo que, no existe una alteración directa en el ADN de *A. cepa* (Atoyebi *et al.*, 2015). Además, al comparar los índices de cada fase se observó un mayor porcentaje de células mitóticas en profase, lo que demuestra que el ciclo celular se detiene allí al exponerse al elutriado esto debido a posibles sustancias citotóxicas presentes en el elutriado como Pb, Cd, As, Zn, Ni, entre otros elementos no evaluados (Chakraborty, R., Mukherjee, A.K. & Mukherjee, A., 2009)

Las frecuencias de células micro nucleadas y aberraciones cromosómicas en la prueba de *Allium cepa* fueron bajas, los porcentajes mayores se observaron en las muestras E1, E2 y E3, mientras que las estaciones E4 y E5 presentaron menor número de aberraciones, por lo que se puede decir que los elutriados de las estaciones más lejanas a la desembocadura

del humedal contienen elementos o compuestos que afectan la estructura cromosómica de la raíz.

Para el bioensayo con *Artemia salina* expuestos a los elutriados, el porcentaje más bajos de mortalidad de nauplios luego de 24 horas, se presentó en las estaciones E2 (2%), E3 (16%), E4 (12%) y E5 (10%), valores cercanos al control negativo (2%). Por otro lado, el porcentaje de mortalidad en E1 fue mientras que el control positivo con dicromato de potasio presento naturalmente un porcentaje mayor de 82% a las 24 horas de exposición.

Luego de 48 horas de exposición, la mortalidad aumentó en todas las muestras, esto debido al posible efecto tóxico de elementos o compuestos presentes en el sedimento, asimismo, al eliminar la aireación del medio, la respiración de los nauplios y la descomposición de estos mismos, reducen las concentraciones de oxígeno disuelto, lo que puede afectar el correcto desarrollo de los organismos acuáticos (Wetzel, R.G., 2001).

Con estos resultados podemos decir que los bioensayos estandarizados con los organismos *Allium cepa* y *Artemia salina* son ensayos económicos y de fácil manejo, los que permiten relacionar toxicidad y concentración (Amaro, 2009; Carballo, 2002)., no solo con tóxicos de referencia, sino también con mezclas compuestas, como los elutriados de sedimentos.

Para determinar la calidad de las aguas del humedal, se compararon los resultados de los parámetros físicos y químicos con la Norma chilena 1.333 (NCh 1.333, modificada en 1987) que fija criterios de calidad del agua dulce de acuerdo con requisitos científicos en aspectos físicos, químicos y biológicos, según su uso.

En Chile aún no existen normas técnicas para cuerpos de aguas salobres, por lo que se compararon parcialmente algunos parámetros con los establecidos en la norma para aguas destinadas a vida acuática. El pH del humedal se encuentra dentro del rango establecido por la norma de 6,0 a 9,0. El color de sus aguas no presento colorantes artificiales visibles ni solidos flotantes o espumas no naturales. Así mismo, no se detectó presencia de hidrocarburos en el cuerpo de agua ni sus alrededores. Por lo que, en términos generales, las aguas del estuario cumplen con lo normado.

Es relevante continuar con futuros estudios en el humedal que ayuden a comprender fenómenos físicos, químicos y biológicos a corto y mediano plazo en el ecosistema, como

la dinámica de concentración de materia orgánica al interactuar con factores como la temperatura, la vegetación y las tasas de acumulación de los distintos puntos del humedal.

este estudio servirá como precedente para el desarrollo de futuros estudios en la zona, ya que los únicos registros previos que caracterizaron de manera general algunos componentes del humedal fueron los realizados por la Ilustre Municipalidad de La Ligua en la solicitud para declarar el estuario en humedal urbano bajo la Ley 21.202. A pesar de esto, no hay información en la literatura de estudios científicos o monitoreos que caractericen de manera íntegra el humedal (características físicas, químicas, biológicas, geomorfológicas, etc.). En este ámbito es de gran importancia desarrollar un programa de monitoreo como el propuesto que busque proteger y preservar el ecosistema y que nos ayude a conocer el estado presente y futuro del ecosistema del humedal urbano estuario Los Molles.

8. CONCLUSIÓN

En el desarrollo de bioensayos, se demostró que la sensibilidad el crustáceo *Artemia salina* es mayor ante la exposición al tóxico de referencia CuSO_4 detectando valores de $\text{Cl}_{50} = 1,99$ mg/L. Por otra parte, el ensayo realizado con *Allium cepa* no arrojó resultados concluyentes como para determinar una concentración letal que inhiba el crecimiento radicular, debido a las bajas concentraciones de sulfato de cobre. A pesar de ello, se comprobó que el desarrollo de ensayos estandarizados con estos organismos son una excelente herramienta para evaluar la toxicidad de compuestos posiblemente tóxicos.

En base a lo anterior, al evaluar la ecotoxicidad de los elutriados de sedimentos provenientes del estuario, los bioensayos realizados con nauplios Instar II y III, presentaron porcentajes más altos de mortalidad al ser expuestos al elutriado de la estación E1 luego de 24 y 48 horas. Así mismo, los efectos producidos por el elutriado en *Allium cepa* fueron mayores en E 1 para el índice mitótico (IM), además, las muestras expuestas a E 1 y E3 presentaron mayor número de aberraciones en sus características celulares.

El desarrollo de los bioensayos se realizó bajo condiciones de laboratorio detalladas en la investigación.

Para mantener la calidad de las aguas del humedal, la implementación de un programa de monitoreo es una excelente herramienta para detectar tendencias en la composición química de las aguas del estuario, analizar el cambio físico del ecosistema y el comportamiento de los organismos que lo habitan, as u vez, es posible comprender la relación que existe entre los humedales y el cambio climático a escala local.

Este estudio logró evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los sedimentos del humedal urbano Estuario Los Molles, base para un programa de monitoreo que busque entender las dinámicas físicas, químicas y biológicas, con el fin de proteger y preservar este ecosistema y los organismos que lo habitan.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, T. (2011). *Petrology of sedimentary rocks* by Sam Boggs Jr. Cambridge University Press, Cambridge, 2009. No. of pages: x+600. ISBN 978-0-521-89716-9 (hardback). *Geological Journal*, 46(1), 107–107. doi:10.1002/gj.1241
2. Ajani, P., Brett, S., Krogh, M., Scanes, P., Webster, G., & Armand, L. (2013). The risk of harmful algal blooms (HABs) in the oyster-growing estuaries of New South Wales, Australia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(6), 5295–5316. doi:10.1007/s10661-012-2946-9
3. Amaro, M. I., Monasterios, M., Avendaño, M., & Charris, J. (2009). Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 29(1), 36–41. doi:10.1002/jat.1379
4. Amphibian net 1/4"oval net W/handle/fr knotless nylon. - wildco. (s/f). Recuperado el 19 de diciembre de 2022, de Sciencefirst.com website: <https://shop.sciencefirst.com/wildco/d-frame-dip-nets/7861-amphibian-net.html>
5. Andreu, E., & Camacho, A. (2002). *Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar*. España: Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Ministerio de Medio Ambiente.
6. ASTM International. (2014). *Classification of Soils for Engineering Purposes: Annual Book of ASTM Standards*. <https://www.studocu.com/row/document/ege-universitesi/electronics-ii/astm-d-2487-classification-of-soils-for-engineering-purposes-unified-soil-classification-system/8266235>.
7. Baran, A., Tarnawski, M., Koniarz, T., & Szara, M. (2019). Content of nutrients, trace elements, and ecotoxicity of sediment cores from Rożnów reservoir (Southern Poland). *Environmental Geochemistry and Health*, 41(6), 2929–2948. doi:10.1007/s10653-019-00363-x
8. Barreto, J. & P. P. G. (2009). *Determinación de la concentración letal media (CL50-96) de cobre (Cu) Y cinc (Zn) mediante pruebas toxicológicas (bioensayos), utilizando alevinos de *Oncorhynchus Mykiss* (Truchas Arcos Iris)*. Universidad de la Salle, Colombia.
9. Beiras, R. (2018). *Marine pollution: Sources, fate and effects of pollutants in coastal ecosystems*. Filadelfia, PA, Estados Unidos de América: Elsevier Science Publishing.
10. Birch, G. F. (2017). Determination of sediment metal background concentrations and enrichment in marine environments – A critical review. *The Science of the Total Environment*, 580, 813–831. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.12.028

11. Blagojević, J., Stamenković, G., & Vujosević, M. (2009). Potential genotoxic effects of melted snow from an urban area revealed by the *Allium cepa* test. *Chemosphere*, 76(10), 1344–1347. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.037
12. Boggs, S., Jr. (2009). *Petrology of sedimentary rocks*. Cambridge University Press.
13. Boudreau, B. P., Huettel, M., Forster, S., Jahnke, R. A., McLachlan, A., Middelburg, J. J., ... Sundby, B. (2001). Permeable marine sediments: Overturning an old paradigm. *Eos*, 82(11), 133–136. doi:10.1029/eo082i011p00133-01
14. Burke, D. G. (1988). & *American Planning Association*. American Planning Association.
15. Carballo, J. L., Hernández-Iñda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 17. doi:10.1186/1472-6750-2-17
16. Caritá, R., & Marin-Morales, M. A. (2008). Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72(5), 722–725. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.03.056
17. Çavuşoğlu, D., Macar, O., Kalefetoğlu Macar, T., Çavuşoğlu, K., & Yalçın, E. (2022). Mitigative effect of green tea extract against mercury(II) chloride toxicity in *Allium cepa* L. model. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(19), 27862–27874. doi:10.1007/s11356-021-17781-z
18. Centro de ecología aplicada. (2018). *Guía metodológica y protocolos de muestreo de flora y fauna acuática en aguas continentales en Chile*.
19. Cervantes, M. (2018). Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. *Conservacion Internacional, México*.
20. Chakraborty, R., Mukherjee, A. K., & Mukherjee, A. (2009). Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. *Environmental Monitoring and Assessment*, 153(1–4), 351–357. doi:10.1007/s10661-008-0361-z
21. Cisneros, R., & Vinatea, E. (2009). Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellogg 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología aplicada*, 8(1–2), 9. doi:10.21704/rea.v8i1-2.377
22. Comisión Nacional del Medio Ambiente. (1978). *Norma Chilena Oficial N° 1.333*.
23. CONAF. (2016). *Manual para el establecimiento de programas de monitoreo en humedales insertos en el Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado de Chile* (C. Zamorano, M. de la Maza, & M. y López, Eds.). Recuperado de https://biblioteca.digital.gob.cl/bitstream/handle/123456789/3378/16%20-%20MANUAL_monit_humedales_SNASPE_2016.pdf
24. Czerniawska-Kusza, I., Ciesielczuk, T., Kusza, G., & Cichoń, A. (2006). Comparison of the Phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments. *Environmental Toxicology*, 21(4), 367–372. doi:10.1002/tox.20189

25. da Costa, T. C., de Brito, K. C. T., Rocha, J. A. V., Leal, K. A., Rodrigues, M. L. K., Minella, J. P. G., ... Vargas, V. M. F. (2012). Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 63–72. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.08.007
26. Dalezios, N. R., Eslamian, S., Ostad-Ali-Askari, K., Rabbani, S., & Saeidi-Rizi, A. (2018). Sediments. En *Encyclopedia of Earth Sciences Series* (pp. 818–819). Cham: Springer International Publishing.
27. Darrah, S. E., Shennan-Farpón, Y., Loh, J., Davidson, N. C., Finlayson, C. M., Royal C. Gardner, & Walpole, M. J. (2019). Improvements to the Wetland Extent Trends (WET) index as a tool for monitoring natural and human-made wetlands. *Ecological Indicators*, 99, 294–298. doi:10.1016/j.ecolind.2018.12.032
28. De la Maza M., Bonacic C. (Eds.). (2013). Manual para el Monitoreo de Fauna Silvestre en Chile. Serie Fauna Australis, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile, 194pp.
29. de Nieto, G. F., & Vilma, B. (2019). *Contaminación del agua por metales pesados As, B, Cu, Pb, Cd y CN- en las cuencas de los Ríos Tambo, Quilca, Camaná y Ocoña de la región Arequipa*. Universidad nacional de San Agustín de Arequipa., Arequipa, Perú.
30. Dickinson, G., & Murphy, K. (2004). *Ecosystems*. Routledge.
31. Dieterich, A., & Gaete, H. (2021). Assessment of the genotoxicity of sediment elutriates from an aquatic ecosystem on *Allium cepa*: Limache stream in central Chile. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(5), 243. doi:10.1007/s10661-021-09029-7
32. Ekere, N., Yakubu, N., & Ihedioha, J. (2017). Ecological riskassessment of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of rivers Niger and Benue confluence, Lokoja, Central Nigeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 18966-18978.
33. EPA. (2006). *Volunteer Estuary Monitoring: A Methods Manual*. Recuperado de <https://www.epa.gov/nep/volunteer-estuary-monitoring-methods-manual>
34. Fafandel, M., Piljagic, J., Tankovic, M. S., Travizi, A., & Bihari, N. (2015). Nutrients vs toxicity in sediments, a case study of two semi-closed basin in Rijeka Bay, Croatia. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(5), 2888–2897.
35. *Field manual for the investigation of fish kills*. (1990). Dept. of Interior Fish & Wildlife Service.
36. Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99–112. doi:10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x
37. Fiskesjö, G. (1988). The *Allium* test--an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197(2), 243–260. doi:10.1016/0027-5107(88)90096-6
38. Fiskesjö, Geirid. (1993). The *allium* test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8(3), 291–298. doi:10.1002/tox.2530080306

39. Fusconi, R., Godinho, M. J. L., Hernández, I. L. C., & Bossolan, N. R. S. (2006). *Gordonia polyisoprenivorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Brazilian journal of microbiology*, 37(2). doi:10.1590/s1517-83822006000200014
40. Garmendia, J. M., Manchaca, I., Belzunce, M. J., & Revilla, M. (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Revista de Investigación Marina*, (1°), 11:25.
41. Giller, P. S., & Malmqvist, B. (1998). *The Biology of Streams and Rivers*. Oxford, Inglaterra: Oxford University Press.
42. *Global Wetland Outlook: State of the World's Wetlands and Their Services to People*. (2018). Gland, Suiza: Ramsar Convention on Wetlands.
43. Grant, W. F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research*, 426(2), 107–112. doi:10.1016/s0027-5107(99)00050-0
44. Hain, M. P., Sigman, D. M., & Haug, G. H. (2014). The biological pump in the past. En *Treatise on Geochemistry* (pp. 485–517). Elsevier.
45. Hartl, M., & Humpf, H. U. (2000). Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 38(12), 1097–1102. doi:10.1016/s0278-6915(00)00112-5
46. Hauenstein, E., González, M., Peña-Cortés, F., & Muñoz-Pedreras, A. (2002). Clasificación y caracterización DE la flora y vegetación DE Los humedales DE La Costa DE tolten (ix region, Chile). *Gayana. Botanica*, 59(2). doi:10.4067/s0717-66432002000200006
47. Huettel, M; Webster, IT. Porewater flow in permeable sediment. In: Boudreau, BP; Jorgensen, BB eds, editor/s. *The Benthic Boundary Layer: transport processes and biogeochemistry*. Oxford University Press; 2000. 144-179. <http://hdl.handle.net/102.100.100/208119?index=1>
48. Hutto, R. L., Pletschet, S. M., & Hendricks, P. (1986). A fixed-radius point count method for nonbreeding and breeding season use. *The Auk*, 103(3), 593–602. doi:10.1093/auk/103.3.593
49. Hutton, M., & Symon, C. (1986). The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the U.K. environment from human activities. *The Science of the Total Environment*, 57, 129–150. doi:10.1016/0048-9697(86)90018-5
50. Iannacone-Oliver, J. A., & Dale, W. E. (1999). Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Río Rímac, Lima,

- Perú. Revista Peruana De Entomología, 41 (1), 111–120. Recuperado a partir de <https://www.revperuentomol.com.pe/index.php/rev-peru-entomol/article/view/122>
51. Jung, H. (2017). Nutrients and heavy metals contamination in an urban estuary of northern New Jersey. *Geosciences*, 7(4), 108. doi:10.3390/geosciences7040108
52. Krüger, R. A. (2009). *Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa*. Centro Universitário Feevale, Nova Hamburgo, Brasil.
53. Kumar, R., Rani, M., Gupta, H., & Gupta, B. (2014). Trace metal fractionation in water and sediments of an urban river stretch. *Chemical speciation and bioavailability*, 26(4), 200–209. doi:10.3184/095422914x14142369069568
54. Kusler, J. A., Mitsch, W. J., & Larson, J. S. (1994). Wetlands. *Scientific American*, 270(1), 64–70. doi:10.1038/scientificamerican0194-64b
55. Laffoley, D., & Baxter, J. M. (Eds.). (2016). *Explaining Ocean Warming: Causes, scale, effects and consequences*. IUCN, International Union for Conservation of Nature.
56. Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*, 682(1), 71–81. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002
57. Lhullier, C., Horta, P. A., & Falkenberg, M. (2006). Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para Artemia salina. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 16(2), 158–163.
58. Livingston, K. (1986). Wetlands . William J. Mitsch and James G. Gosselink. Van Nostrand Reinhold, New York, 1986. xvi, 539 pp., illus. \$44.50. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4769), 1209–1209. doi:10.1126/science.233.4769.1209.b
59. Longhurst, A., Sathyendranath, S., Platt, T., & Caverhill, C. (1995). An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *Journal of plankton research*, 17(6), 1245–1271. doi:10.1093/plankt/17.6.1245
60. López, A., & Inda J, J. (2000). *Libro resumen XX Congreso de Ciencias del Mar*. Concepción, Chile: Universidad Católica de la Santísima Concepción.
61. López, Z., & Santos, M. (2018). *Influencia del proceso de urbanización en el humedal del centro poblado Pomacochas*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas, Perú.
62. Łukawska-Matuszewska, K., Burska, D., & Niemirycz, E. (2009). Toxicity assessment by microtox® in sediments, pore waters and sediment saline elutriates in the gulf of Gdansk (Baltic sea). *Clean: Soil, Air, Water*, 37(7), 592–598. doi:10.1002/clen.200900021
63. Marcovecchio, J. E., Pratolongo, P. D., Botello, A. V., Zapperi, G., Perillo, G. M. E., Gonzales trilla, G. L., ... Beltrame, M. O. (2013). *Procesos Químicos en Estuarios*. Tucumán, Argentina: Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional.

64. Mazon, A. F., Cerqueira, C. C. C., & Fernandes, M. N. (2002). Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research*, 88(1), 52–63. doi:10.1006/enrs.2001.4315
65. McLaughlin, J. L. (1991). Bench-top bioassays for the discovery of bioactive compounds in higher plants. *Brenesia*, 34, 1–14.
66. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31–34. doi:10.1055/s-2007-971236
67. Middelburg, J. J., & Herman, P. M. J. (2007). Organic matter processing in tidal estuaries. *Marine Chemistry*, 106(1–2), 127–147. doi:10.1016/j.marchem.2006.02.007
68. Ministerio de Medio Ambiente. (2013a). *Norma secundaria de calidad para la protección de las aguas continentales de la cuenca del Río Maipo*.
69. Ministerio de Medio Ambiente. (2013b). *Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales del Lago Villarrica*.
70. Ministerio de Medio Ambiente. (2020). *Ley N° 21.202 Modifica diversos cuerpos legales con el objetivo de proteger los humedales urbanos*.
71. Mitsch, W. J., & Gosselink, J. G. (1986). *Wetlands*. New York, E.E.U.U.: Van Nostrand Reinhold Co.
72. Mitsch, W. J., & Gosselink, J. G. (2007). *Wetlands*. Hoboken, E.E.U.U.: John Wiley & Sons.
73. OECD. (2003). *Guidelines for the Testing of Chemicals*.
74. Pabón, S. E., Benítez, R., Sarria, R. A., & Gallo, J. A. (2020). Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 14(27). doi:10.31908/19098367.0001
75. Perez, O. P., Lazo, F. J., Díaz, Ondina Leon, Khambay, Bhupinder P.S, & Branford-White, C. J. (2008). Cuban flora as a source of bioactive compounds. *International Journal of Cuban Studie*, 1(1), 1–9.
76. Perillo, G. M. E., & Cuadrado, G. D. (2013). Geomorfología y características de los sedimentos estuariales (Principales características de los estuarios): Procesos químicos en estuarios. *Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*, 14–47.
77. Pernía Santos, B. M., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez-Prado, N., Ramírez, L., Bravo, K., ... Zambrano, J. (2018). Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el Estero Salado, Ecuador. *Enfoque UTE*, 9(2), 89–105. doi:10.29019/enfoqueute.v9n2.246
78. Pino, P. O., Jorge, L. F., E., T. M. J., & Khambay, B. P. S. (2007). Aislamiento y caracterización de compuestos activos de *Mammea americana* L. *Revista Cubana de Química*, 19(1), 74–77.

79. Pociecha, A., & Wilk-Woźniak, E. (2003). Cyanoprokaryota-Cladocera relationships in a submontane dam reservoir modified by hydrological conditions. *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 109(1), 499–508. doi:10.1127/1864-1318/2003/0109-0499
80. Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología. Gobierno de México.
81. Ramsar Convention on Wetlands (2018) Global Wetland outlook: state of the world's Wetlands and their services to people. Ramsar Convention Secretariat, Gland, Switzerland
82. Rank, J., Lopez, L. C., Nielsen, M. H., & Moretton, J. (2002). Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*, 136(1), 13–18. doi:10.1034/j.1601-5223.2002.1360103.x
83. Repetto, G., & Repetto, M. (1995). Métodos alternativos: estudios toxicológicos in vitro. *Toxicología Avanzada*, 37–59.
84. Reproduccion de plantas con flores. (s/f). Recuperado el 17 de octubre de 2022, de Google.com website: <https://sites.google.com/site/biocienciasdesamuel/-reproduccion-de-plantas-con-flores>
85. Richard J. Hobbs, D. A. N. (1996). Towards a Conceptual Framework for Restoration Ecology. *Restoration Ecology*, 4(2), 93–110.
86. Rocha, C. (2008). Sandy sediments as active biogeochemical reactors: compound cycling in the fast lane. *Aquatic microbial ecology: international journal*, 53, 119–127. doi:10.3354/ame01221
87. Rousseaux, C., & Gregg, W. (2013). Interannual variation in phytoplankton primary production at A global scale. *Remote sensing*, 6(1), 1–19. doi:10.3390/rs6010001
88. Rybicka, E. H., & Wilson, M. J. (2000). Direct and indirect methods for chromium identification in industrial wastes. *Environmental Science and Pollution Research International*, 7(1), 7–13. doi:10.1065/espr199910.005
89. S, M. A., I, T. O., B, A. D., & A, A. B. (2015). Genotoxicity and anti-genotoxicity of aqueous extracts of herbal recipes containing *Luffa cylindrica* (L), *Nymphaea lotus* (L) and *Spondias mombin* (L) using the *Allium cepa* (L) assay. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 9(15), 492–499. doi:10.5897/ajpp2014.4219
90. Saleha Banu, B., Ishaq, M., Danadevi, K., Padmavathi, P., & Ahuja, Y. R. (2004). DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 42(12), 1931–1936. doi:10.1016/j.fct.2004.07.007

91. Salomons, W., & Förstner, U. (2010). Sediments and the “System”: from site-specific to regional-scale research: “A story of joy in researching dirt”. *Journal of Soils and Sediments*, 10(8), 1436–1439. doi:10.1007/s11368-010-0309-0
92. Schmidt, R. (1985). Optical motility test for the detection of trichothecenes using brine shrimps. *Mycotoxin Research*, 1(1), 25–29. doi:10.1007/BF03191951
93. Secretaría General de la Presidencia. (2008). *Normas de calidad primarias para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades recreacionales con contacto directo*.
94. Secretaria General de la Presidencia. (2009). *Norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas del Lago Llanquihue*.
95. Secretario General de la Presidencia. (2009). *Norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del Rio Serrano*.
96. Serrano, C., Ortega, T., & A., V. (1996). Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina Bioassays: A revision. Phytotherapy Res.*, 10, 118–120.
97. Silva, T. M. S., Nascimento, R. J. B., Batista, M. M., Agra, M. F., & Camara, C. A. (2007). Brine shrimp bioassay of some species of Solanum from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia: Orgao Oficial Da Sociedade Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 35–38. doi:10.1590/s0102-695x2007000100008
98. Sorgeloos, P., Ghent University, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & Faculty of Agricultural Sciences. (1986). *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*.
99. Spellerberg, I. F. (1991). *Monitoring ecological change*. Inglaterra: Cambridge University Press.
100. Stefanello, M.É., Salvador, M.J., Ito, I.Y., & Macari, P.A. (2006). Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Revista Brasileira De Farmacognosia-brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 525-530.
101. Steubing, L., Godoy, R., & Alberdi, M. (2001). *Métodos de ecología vegetal*. Chile: Universidad Austral de Chile.
102. Tarnawski, M., Baran, A., & Koniarz, T. (2015). The effect of bottom sediment supplement on changes of soil properties and on the chemical composition of plants. *Akademia Gorniczo-Hutnicza Im. Stanislaw Staszica. Geologia. Kwartalnik*, 41(3), 285. doi:10.7494/geol.2015.41.3.285
103. Törökne, A., Vasdinyei, R., & Asztalos, B. M. (2007). A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. *Environmental Toxicology*, 22(1), 64–68. doi:10.1002/tox.20235

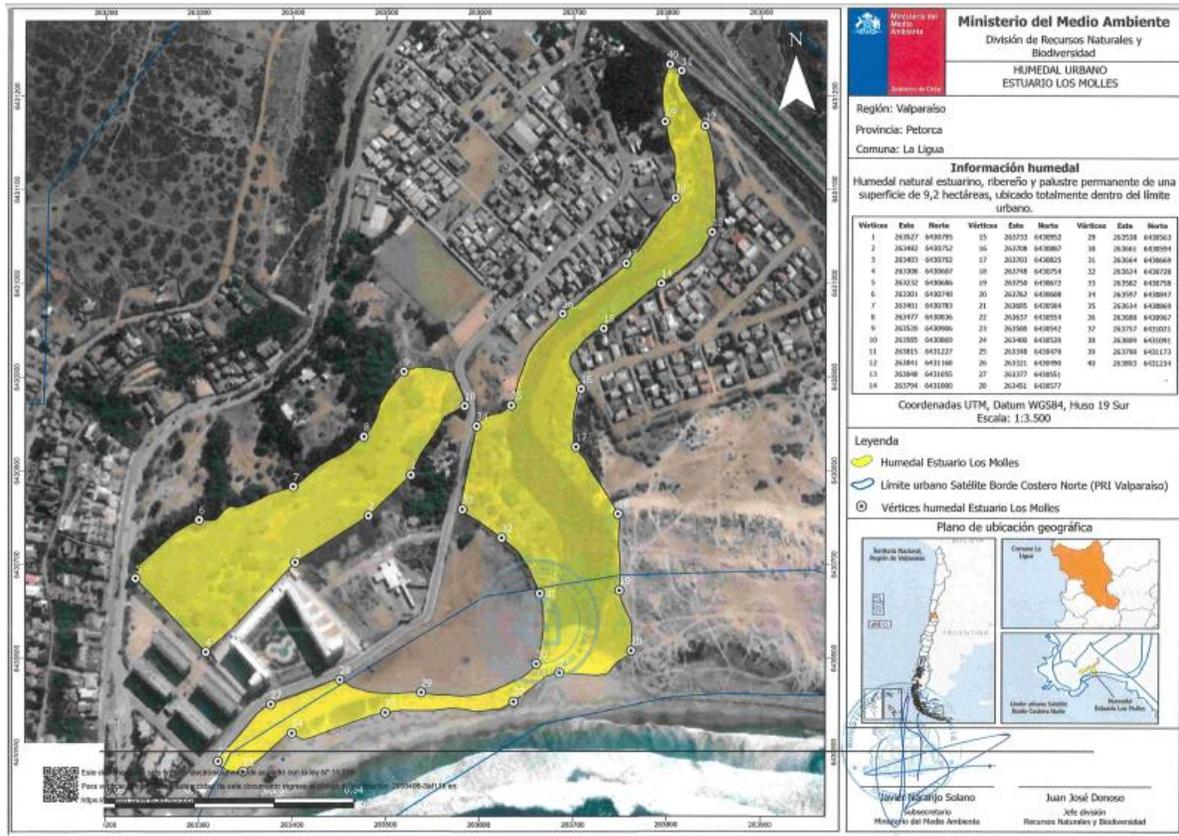
104. Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1(2), 151–173. doi:10.1016/0147-6513(77)90033-1
105. US Department of Commerce, & National Oceanic. (2019a). *Estuaries tutorial: NOAA's national ocean service education*. Recuperado de https://oceanservice.noaa.gov/education/tutorial_estuaries/est01_what.html
106. US Department of Commerce, & National Oceanic. (2019b). *What is eutrophication?* Recuperado de <https://oceanservice.noaa.gov/facts/eutrophication.html>
107. Vanhaecke, P. (1984). The ARC-TEST: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution*, 143–157.
108. Varó, I., Serrano, R., Navarro, J. C., López, F. J., & Amat, F. (1998). Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(6), 778–785. doi:10.1007/s001289900828
109. Verhougstraete, M. P., Martin, S. L., Kendall, A. D., Hyndman, D. W., & Rose, J. B. (2015). Linking fecal bacteria in rivers to landscape, geochemical, and hydrologic factors and sources at the basin scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10419–10424. doi:10.1073/pnas.1415836112
110. Wah, T. (1993). *Toxicity testing using the brine shrimp: Artemia salina* (S. Colegate & R. B. Molineux, Eds.). Boca Ratón, E.E.U.U.: Bioactive Natural Products: Detection, isolation and structural determination.
111. Wang, Y., Hu, J., Xiong, K., Huang, X., & Duan, S. (2012). Distribution of heavy metals in core sediments from baihua lake. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 51–58. doi:10.1016/j.proenv.2012.10.008
112. Webster, I., Atkinson, I., & Radke, L. (2013). Salinity. Recuperado el 9 de diciembre de 2022, de OzCoasts website: <https://ozcoasts.org.au/indicators/biophysical-indicators/salinity/>
113. Webster, I. T., Ford, P. W., & Tillman, P. (2005). Estimating nutrient budgets in tropical estuaries subject to episodic flows. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1–4), 165–173. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.10.027
114. Whittaker, R. H., & Likens, G. E. (1973). Primary production: The biosphere and man. *Human Ecology: An Interdisciplinary Journal*, 1(4), 357–369. doi:10.1007/bf01536732
115. Willson, M., De Santo, T., Sabag, C., & Armesto, J. (1994). Avian communities of fragmented South- Temperatte rainforests in Chile. *Conservation biology*, 8(2), 508–520.
116. Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., Acar, A., & Yapar, K. (2020). In vivo protective effects of *Ginkgo biloba* L. leaf extract against hydrogen peroxide toxicity: cytogenetic and biochemical

evaluation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(3), 3156–3164.
doi:10.1007/s11356-019-07156-w

117. Yildiz, M., Ciğerci, I. H., Konuk, M., Fidan, A. F., & Terzi, H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75(7), 934–938.
doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.023

10. ANEXOS

Anexo 1: Cartografía oficial declaratoria Humedal urbano.



Planilla Toma de Datos

CARACTERIZACIÓN Físico Y QUÍMICA HUMEDAL

ESTUARIO LOS MOLLES

ZONA DE ESTUDIO	Humedal Estuario Los Molles	FECHA	5 octubre 2022
------------------------	-----------------------------	--------------	----------------

MUESTREADOR	1 Yaritza Araya Alfaro
	2 María Jesús Bernal
	3 Daniela Paz Paz

Tabla 1. Coordenadas UTM WGS84.

ESTACIÓ N	UBICACIÓN GEOGRÁFICA (UTM)		ALTURA msnm	NOMBRE	Profundidad promedio (cm)
	E (19H)	S			
E 1	0263824	6432260	7	Entrada	20
E 2	0263747	6430963	5	Población Chagres	70
E 3	0263629	6430829	3	Polluelos	76
E 4	0263680	6430700	1	Estacionamiento	86
E 5	0263695	6430603	-1	Desembocadura	65

Tabla 3. Parámetros físicos, químicos e hidro morfológicos del humedal.

Variable		E1	E2	E3	E4	E5
Hora		9:33	10:15	11:56	12:40	13:17
T° (°C)		16,10	17,90	20	19	18,60
pH		7,41	8,25	8,51	8,44	8,32
SST (mg/L)		10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Cond. Elec (μS/cm)		20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
O.D (mg/L)		10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
DBO (mg/L)		20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Prof. Promedio (cm)		20	70	76	86	65
Ancho (m)		1	12	21	37	35
Tipo de sedimento de fondo			Fangoso		Arenoso	Arenoso
Propiedades Organolépticas	Color	Rojizo	Café verdoso	Negro		
	Olor	Putrefacto	Putrefacto	Putrefacto	Mar	Mar

Tabla 4. Observaciones

ESTACIÓN	OBSERVACIONES
E1	<p>Mucho musgo, Zona Eutrofizada con basura en el humedal y sus alrededores Suelo superficial arenoso rojizo Se observaron las siguientes aves: 3 Huairavos, 2 Huairavillos, 2 Cormoranes, 2 Garzas Chicas, 1 Dormilona tontita, 2 Golondrinas, 2 Picaflor Grande, 1 Chincol.</p>
E2	<p>Difícil acceso, zona más profunda del humedal, con fondo vegetal. Difícil extracción de las muestras de sedimentos debido a que el fondo tiene mucha alga y es muy densa la capa. Se logró observar las siguientes aves: 2 Huairavos, 1 Chercán, Tórtola, 4 Golondrina, 3 Jotes cabeza negra, 3 Patos Yeco, 1 Chincol. Lugar lleno de zancudos, se vio 1 libélula.</p>
E3	<p>Se observó a una madre Coscoroba con 7 Polluelos (En la visita preliminar, se observó a una pareja de Cisnes Coscoroba anidando entre los puntos de muestreo E1 y E2), 3 Cormoranes, varias Taguas comunes. Presencia de abundante dedal de otro, flores amarillas y moradas grandes, otras como ramillete blanco y morado. Se observaron conchitas y caracoles en el sedimento.</p>
E4	<p>Fácil extracción del sedimento, no se observa capa vegetal. Sedimento arenoso mayor tamaño del grano Padre Cisne Coscoroba enojado, marcando territorio y golondrinas, cormoranes y taguas comunes. Se observaron arañas Se vieron carpas saltando</p>
E5	<p>Fácil extracción de sedimento, sedimento mayoritariamente arenoso, con una capa vegetal flotando y en superficie Se observaron 10 cormoranes, 4 Patos Colorados, Taguas, muchos Zarapitos, 2 Perritos, Cisne Coscoroba, Jergones, Golondrinas, Chincol, Queltehue.</p>

Anexo

Tabla 10.1: Plantilla de datos crecimiento radicular *Allium sp.*

Medio de exposición	Replica	N° bulbos con crecimiento radicular	Promedio longitud radícula (cm)	Observaciones (síntomas morfológicos)
Control	1	0,3	-	
	2	0,2 0,2 0,3	0,2	
	3	1,8 2,5 1,4	3,2	
	4	0,3 0,4 1,8	0,8	
	5	0,4 1,7 1,1	1,1	Corte en bulbo
Concentración 1 0,25 mg/L	1	0,8 1,1 0,8	0,9	
	2	0,5 0,4 0,2	0,4	
	3	1,7 1,1 2,1	1,3	
	4	0,6 0,5 1,6	0,9	
	5	0,8 0,8 0,5	0,7	
Concentración 2 0,5 mg/L	1	-	-	Pudrición de capa externa
	2	0,5 0,7 0,6	0,6	
	3	1 1,2 3	1,6	
	4	0,5 0,4 0,5	0,5	
	5	0,2 0,2	0,2	
Concentración 3 1 mg/L	1	-	-	Pudrición de capa externa, agua turbia
	2	-	-	
	3	0,8 0,7	0,8	
	4	0,8 0,2 0,5	0,5	Pudrición de raíces
	5	1,5	1,5	
Concentración 4 1,5 mg/L	1	0,8 1,4 0,6	0,9	
	2	0,8 0,6	0,8	
	3	1,3 0,8 0,8	1	Buen estado
	4	0,3 1,4 0,3	0,6	
	5	-	-	
Concentración 5 2 mg/L	1	-	-	
	2	0,6 0,2 0,3	0,4	
	3	0,6 2,5 2,4	1,8	
	4	-	-	
	5	0,7 1,5 1,9	1,4	

Tabla 10.2: Mortandad de nauplios a 24 y 48 horas de exposición.

Medio de exposición	N° total de nauplios	Total nauplios muertos	
		24 horas	48 horas
Control 1	10	0	0
Control 2	10	0	2
Control 3	10	1	1
Control 4	10	0	0
Control 5	10	0	0
E 1.1	10	8	9
E 1.2	10	1	2
E 1.3	10	2	3
E 1.4	10	4	4
E1.5	10	6	7
E 2.1	10	0	2
E 2.2	10	0	2
E 2.3	10	0	1
E 2.4	10	0	1
E 2.5	10	1	2
E 3.1	10	1	2
E 3.2	10	0	0
E 3.3	10	1	1
E 3.4	10	0	0
E 3.5	10	6	7
E 4.1	10	1	3
E 4.2	10	2	3
E 4.3	10	0	3
E 4.4	10	0	4
E 4.5	10	3	3
E 5.1	10	0	4
E 5.2	10	0	3
E 5.3	10	0	1
E 5.4	10	1	1
E 5.5	10	4	5
Positivo 1	10	9	10
Positivo 2	10	5	10
Positivo 3	10	9	10
Positivo 4	10	10	10
Positivo 5	10	8	10