

TIERRA DEL FUEGO, ANTÁRTIDA E ISLAS DEL ATLÁNTICO SUR
CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES
ESTUDIO DE LÍNEA DE BASE DE LAS COMUNIDADES BENTÓNICAS,
INTERMAREALES Y SUBMAREALES DE LAS ZONAS AFECTADAS POR LAS
DESCARGAS DE LAS PLANTAS DE TRATAMIENTO DE USHUAIA
INFORME FINAL
MAYO 2024

Autores: Llupart Facundo, Poljak Sebastián, Sánchez Julieta, Delpiani Matías, Alonso Cecilia,
Mariano Rodríguez, Hervias Antia, Pellegrino Melina.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE ANEXOS.....	13
RESUMEN.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS DEL INTERMAREAL.....	24
2.a. Justificación del uso de macroinvertebrados bentónicos para detectar impacto ambiental.....	24
2.b. Área de estudio y aspectos oceanográficos del Canal Beagle.....	25
2.c. Justificación del diseño de muestreo.....	32
2.d. Protocolo de muestreo de la CMB, emplazamiento de los puntos de toma de muestras y asignación taxonómica.....	42
2.e. Registro de parámetros ambientales.....	51
2.f. Tratamiento y análisis estadísticos de datos.....	51
2.g. Resultados de las comunidades macro-bentónicas.....	57
2.h. Discusión.....	89
3. ANÁLISIS DE ADN AMBIENTAL POR METABARCODING.....	95
3.a. Introducción.....	95
3.b. Colecta de muestras, obtención de ADNa y secuenciado.....	96
3.c. Resultados y Discusión.....	101
4. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE TOXICIDAD EN PECES.....	106
4.a. Introducción.....	106
4.b. Materiales y métodos.....	108
4.b.1. Recolección de peces y preparación de muestras.....	108
4.b.2. Biomarcadores de Estrés Oxidativo y Biotransformación.....	108
4.b.3. Biomarcadores de Genotoxicidad.....	109
4.b.4. Biomarcadores de neurotoxicidad.....	110
4.b.5. Cálculos y estadísticas.....	110
4.c. Resultados.....	111

4.c.1. Estrés Oxidativo y Biotransformación.....	111
4.c.1.1. Actividad de la enzima Catalasa en hígado.....	111
4.c.1.2. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa en hígado.....	112
4.c.2. Genotoxicidad.....	113
4.c.3. Biomarcador de neurotoxicidad.....	115
4.c.3.1. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en encéfalo.....	115
4.c.3.2. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en músculo.....	116
4.d. Discusión.....	117
5. TALLA Y BIOMASA DE MITÍLIDOS COMO INDICADORES DE IMPACTO.....	120
5.a. Introducción.....	120
5.b. Materiales y métodos.....	121
5.c. Resultados.....	126
5.d. Discusión.....	131
6. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA, NITRÓGENO Y FÓSFORO.....	136
6.a. Introducción.....	136
6.b. Materiales y métodos.....	137
6.c. Resultados y discusión.....	139
7. CONCLUSIONES FINALES.....	144
8.BIBLIOGRAFÍA.....	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Playas y microhábitats costeros del Canal Beagle.....	26
Figura 2. Batimetría del Canal Beagle. Tomado de Ballestrini et al. 1998.....	26
Figura 3. Modelo conceptual para explicar la evolución estacional y geográfica de la producción de toxinas por floraciones de <i>Alexandrium catenella</i> a lo largo de los tres sectores del Canal de Beagle (BC). SAAW: aguas subantárticas, presumiblemente proporcionadas por la corriente del Cabo de Hornos (CHC); MO:	

Materia orgánica; Sal: Salinidad; Rt: tiempo de residencia; PAR: Radiación fotosintéticamente activa; Si: concentración de silicato; DOM: Materia orgánica disuelta; Resusp: Procesos de resuspensión. Las flechas que apuntan hacia arriba y hacia abajo indican valores altos y bajos para el parámetro considerado. El signo "=" simboliza valores medios. Tomado de Schloss et al. 2023.27

Figura 4. Circulación residual promediada verticalmente y calculada para todo un año simulado (2016) en el área occidental (A) y Centro (B) del Canal Beagle. Tomado de Cucco et al. 2022.....29

Figura 5. Estimación de las velocidades de corriente, donde se indica la escala con que fueron graficados los vectores corrientes (en cm/seg de velocidad por centímetro de longitud). El Norte se encuentra orientado en todos los casos hacia la parte superior de las ilustraciones. Situación de cuatro horas antes de la pleamar para la superficie que abarca la mayoría de las Localidades muestreadas (A) y detalle de las incluidas en Bahía y Península Ushuaia (Emisor) y un sector adyacente del CB que incluye la desembocadura del Arroyo Grande y un sitio próximo a Playa Larga. Tomado de Ballestrini et al 1998.....30

Figura 6. Estimación de las velocidades de corriente, donde se indica la escala con que fueron graficados los vectores corrientes (en cm/seg de velocidad por centímetro de longitud). El Norte se encuentra orientado en todos los casos hacia la parte superior de las ilustraciones. Situación de pleamar para la superficie que abarca la totalidad de las Localidades muestreadas (a) y detalle de las incluidas en Bahía y Península Ushuaia (Emisor) y un sector adyacente del CB que incluye la desembocadura del Arroyo Grande y un sitio próximo a Playa Larga. Tomado de Ballestrini et al 1998.....31

Figura 7. Recorrida a la Bahía Ensenada, Parque Nacional Tierra del Fuego, para seleccionar los intermareales donde se realizaron los muestreos.....34

Figura 8. Localidades aptas para realizar el muestreo biológico en Canal Beagle (A y B). Las *Localidades* seleccionadas (A) y no seleccionadas (B) se muestran con color rojo y verde y amarillo respectivamente.35

Figura 9. Ubicación geográfica de las *Localidades*, *Sitios* y *Áreas* de muestreo en la costa norte del Canal Beagle. Se presenta una visión general (A) y recortes de

cada <i>Localidad</i> para visualizar la ubicación de la toma de muestras (B a F). Las <i>Localidades</i> consideradas impactadas se denotan con rojo, las de referencia con verde.....	36
Figura 10. Gráfica del diseño experimental en el que se muestran los factores a la izquierda en blanco, los niveles en rojo (impactado) y verde (Referencia) para los que se ejemplifica con sólo una Localidad (Dispensor y Referencia Este = RE), Sitio y Área en cada caso. En AG = Arroyo Grande, USH = Bahía Ushuaia y RO = Referencia Oeste se empleó el mismo esquema de muestreo. Las líneas blancas indican el patrón de anidamiento.....	40
Figura 11. Muestreo con cuadrantes según recomendaciones de MBON Pole to Pole.....	43
Figura 12. Muestreo piloto en Bahía Golondrina.....	44
Figura 13. Diseño final de planilla de muestreo biológico.....	45
Figura 14. Puesta a punto de protocolo de muestreo y entrenamiento de asignación taxonómica en laboratorio del ICPA.....	46
Figura 15. Protocolo de muestreo en campo.....	47
Figura 16. Cartillas de identificación taxonómica utilizadas en campo. Cada imagen rectangular tiene un tamaño de hoja A4.....	48
Figura 17. Muestreo biológico con cuadrantes en el intermareal.....	50
Figura 18. Fotografía en lupa y a campo de algunos de los ejemplares sobre los cuales se requirió determinación taxonómica (trabajo realizado por Julieta Sánchez).....	51
Figura 19. Relevamiento de parámetros ambientales en agua superficial costera con la sonda multiparamétrica Horiba.....	52
Figura 20. Curva de acumulación de especies (línea azul) y los intervalos de confianza al 95% ajustados por un modelo de Clench.....	60
Figura 21. Gráfico de barras del número de especies promedio con sus respectivos desvíos (líneas blancas) de localidades no impactadas (barra verde) e impactadas (barra roja).....	61

Figura 22. Gráfico de barras del número de especies promedio con sus respectivos desvíos (líneas blancas) de localidades no impactadas (barras verdes) e impactadas (barras rojas).....	62
Figura 23. Gráfico de cajas y bigotes del número de especies promedio con sus respectivos desvíos en las cinco localidades. El tamaño de la caja indica el rango de valores entre el primer y tercer cuartil, la línea media indica la mediana, la cruz el promedio y los bigotes los límites de valores mínimos y máximos.....	62
Figura 24. Gráfico de barras del número de especies promedio con sus respectivos desvíos (líneas blancas) de sitios no impactados (barras verdes) e impactadas (barras rojas).....	63
Figura 25. Gráfico de barras del número de especies promedio en áreas no impactadas (barras verdes) e impactadas (barras rojas).....	64
Figura 26. Diversidad específica por <i>Localidad</i> en barras verdes (NO_IMP = No impactado) y barras rojas (IMP = Impactado).....	65
Figura 27. Diversidad específica por <i>Localidad</i> en forma de mapa de calor.....	65
Figura 28. Gráfico de sombras donde se muestran las especies o grupos de especies en el eje Y, las <i>Localidades</i> en el Eje x (superior) entre líneas perpendiculares negras continuas. El recuadro punteado A denota el conjunto de especies dominantes del intermareal del Canal Beagle. El recuadro punteado B destaca un conjunto de especies con preferencia por ambientes no impactados. Y en el recuadro punteado C destaca dos especies con presencia en <i>Localidades</i> impactadas. Arriba a la izquierda se muestra el gradiente de abundancia transformada con raíz cuarta.....	66
Figura 29. Ordenamiento de muestras por <i>Área</i> por <i>Sitio</i> por <i>Localidad</i>	69
Figura 30. Ordenamiento de muestras por <i>Área</i> por <i>Sitio</i> por <i>Localidad</i> con superposición de burbujas, cuyo tamaño es proporcional al número promedio de especies registradas en cada <i>Área</i> dentro de cada <i>Localidad</i>	70
Figura 31. Ordenación de muestras por <i>Sitio</i> en cada <i>Localidad</i>	71
Figura 32. Ordenación de muestras por <i>Sitio</i> en cada <i>Condición</i> . Sitios No Impactados (NO_IMP) y Sitios Impactados (IMP).....	71
Figura 33. Ordenación de muestras por <i>Localidad</i>	72

Figura 34. Ordenación de muestras por <i>Localidad</i> en función de su <i>Condición</i> . <i>Localidades</i> No Impactadas (NO_IMP) y <i>Localidades</i> Impactadas (IMP).....	73
Figura 35. Ordenación de <i>Áreas</i> en <i>Localidades</i> No Impactadas (NO_IMP) y en <i>Localidades</i> Impactadas (IMP) y representación de una triada de especies indicadoras de buena salud ambiental.....	74
Figura 36. Ordenación de <i>Áreas</i> en <i>Localidades</i> No Impactadas (NO_IMP) y <i>Localidades</i> Impactadas (IMP) y representación de una triada de especies indicadoras de buena salud ambiental.....	74
Figura 37. Ordenación de <i>Áreas</i> en <i>Localidades</i> No Impactadas (NO_IMP) y <i>Localidades</i> Impactadas (IMP) y representación de una triada de especies o grupo de especies indicadoras de mala salud ambiental.....	75
Figura 38. Análisis de componentes principales por <i>Sitios</i> dentro de cada <i>Localidad</i> utilizando la matriz abiótica completa.....	78
Figura 39. Análisis de componentes principales por <i>Localidad</i> dentro de cada <i>Condición</i> utilizando la matriz abiótica completa.....	79
Figura 40. Análisis de componentes principales por <i>Sitios</i> dentro de cada <i>Localidad</i> utilizando la matriz abiótica que refleja impacto.....	80
Figura 41. Análisis de componentes principales por <i>Localidad</i> dentro de cada <i>Condición</i> utilizando la matriz abiótica que refleja impacto.....	80
Figura 42. Superposición de burbujas de Turbidez (Turb) por <i>Localidades</i> en función de su <i>Condición</i> (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de CMB del intermareal rocoso.....	81
Figura 43. Superposición de burbujas de Coliformes fecales (Col_Fec, $\text{sqr} = \text{raíz}$ cuadrada,) por <i>Localidades</i> en función de su <i>Condición</i> (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de CMB del intermareal rocoso.....	82
Figura 44. Superposición de burbujas de Materia Orgánica Total (Mot) por <i>Localidades</i> en función de su <i>Condición</i> (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de comunidades macro-bentónicas del intermareal rocoso.....	82

Figura 45. Superposición de burbujas de Fósforo total (P-PO4) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de comunidades macrobentónicas del intermareal rocoso.....83

Figura 46. Superposición de burbujas de Sólidos disueltos totales (SDT, $\text{sqr} = \text{raíz cuadrada,}$) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de comunidades macrobentónicas del intermareal rocoso.....84

Figura 47. Árbol divisorio de muestras de cada *Localidad* en función de su *Condición*. Las divisiones del árbol se justifican como sigue: A: R=0.69; B%=89; Col_Fec<2.9(>4), B: R=0.25; B%=38; Col_Fec<1.7(>2.9) C: R=0.00; B%=16; P-PO4_mg/l<0.0493(>0.114) D: R=0.93; B%=92; Col_Fec<1.2E+05(>3.5E+05) E: R=0.55; B%=49; P-PO4_mg/l<0.0617(>0.0697) F: R=0.67; B%=39; P-PO4_mg/l<0.189(>0.242) G: R=0.32; B%=23; P-PO4_mg/l<0.0697(>0.073) or Col_Fec<4(>7.8) H: R=0.33; B%=19; P-PO4_mg/l<0.0737(>0.091) I: R=0.00; B%=23; Col_Fec<7.8(>1.9E+04) or P-PO4_mg/l<0.091(>0.0932).....85

Figura 48. Árbol divisorio de muestras de cada *Sitio* en función de su *Condición*. Las divisiones del árbol se justifican como sigue: A: R=0.69; B%=89; Col_Fec<2.9(>4), B: R=0.25; B%=38; Col_Fec<1.7(>2.9) C: R=0.00; B%=16; P-PO4_mg/l<0.0493(>0.114) D: R=0.93; B%=92; Col_Fec<1.2E+05(>3.5E+05) E: R=0.55; B%=49; P-PO4_mg/l<0.0617(>0.0697) F: R=0.67; B%=39; P-PO4_mg/l<0.189(>0.242) G: R=0.32; B%=23; P-PO4_mg/l<0.0697(>0.073) or Col_Fec<4(>7.8) H: R=0.33; B%=19; P-PO4_mg/l<0.0737(>0.091) I: R=0.00; B%=23; Col_Fec<7.8(>1.9E+04) or P-PO4_mg/l<0.091(>0.0932).....85

Figura 49. Biplot de muestras biológicas por *Localidad* y todas las variables ambientales medidas.....86

Figura 50. Biplot de muestras biológicas por *Localidad* y las variables ambientales que reflejan impacto.....87

Figura 51. Biplot de muestras biológicas por *Condición* y las variables ambientales que reflejan impacto.....87

Figura 52. Biplot de muestras biológicas por *Condición* y la variable ambiental que mejor refleja el impacto super-impuesta como burbuja.....88

Figura 53. Biplot de muestras biológicas por *Condición* y la variable ambiental que en segundo lugar mejor refleja el impacto super-impuesta como burbuja.....89

Figura 54. Extracto de una sección del alineamiento generado en el programa MEGA v7 a partir de las secuencias de ADN del gen COI.....	96
Figura 55. Toma de muestra de agua para análisis de ADN.....	97
Figura 56. Filtrado de la muestra en laboratorio y filtros finales.....	97
Figura 57. ADN ambiental en suspensión de isopropanol.....	98
Figura 58. Gel de agarosa al 2% donde se observan los amplificadores positivos (calles 1 a 5), el marcador de peso molecular de referencia (calle 6) y los controles Negativo y Blanco (calles 7 y 8, respectivamente).....	98
Figura 59. Gel de agarosa al 2% utilizado para corroborar la unión de las etiquetas moleculares a los amplificadores de la PCR1. En la calle 1 se observa el producto de PCR1 y en la calle 2 la misma muestra luego de la PCR2, se corrobora mayor intensidad y tamaño.....	99
Figura 60. Gráfico de componentes principales. En distintos colores se representan las <i>Localidades</i>	102
Figura 61. Gráfico de sombras donde se muestran las especies o grupos de especies en el eje Y y las <i>Localidades</i> en el eje X (superior). Arriba a la izquierda se muestra el gradiente de abundancia transformada con raíz cuarta.....	103
Figura 62. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en hígado en las especies <i>Austrolycus depressiceps</i> , <i>Patagonotothen cornucola</i> y <i>Harpagifer bispinis</i> colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de la enzima catalasa en hígado en <i>Austrolycus depressiceps</i> (B), <i>Patagonotothen cornucola</i> (C) y <i>Harpagifer bispinis</i> (D) comparando entre los diferentes sitios muestreados (valor de $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles basales entre las diferentes especies.....	111
Figura 63. Actividad enzimática de glutatión S- transferasa (GST), en hígado de las especies <i>Austrolycus depressiceps</i> , <i>Patagonotothen cornucola</i> y <i>Harpagifer bispinis</i> colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de la enzima GST en hígado <i>Austrolycus depressiceps</i> (B), <i>Patagonotothen cornucola</i> (C) y <i>Harpagifer bispinis</i> (D) comparando entre los diferentes sitios muestreados (valor de $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles basales entre las diferentes especies. Diferentes letras minúsculas indican	

diferencias en los niveles enzimáticos entre la Bahía Ushuaia/ Arroyo Grande y la Referencia Este.....	113
Figura 64. Fotomicrografías de eritrocitos periféricos de <i>Patagonotothen cornucola</i> colectados en sitios cercanos a la ciudad de Ushuaia teñidos con colorante Giemsa 15 %. A: eritrocito normal; B,C: células con núcleo normal pero con presencia de un micronúcleo; D: célula binucleada; E: núcleo que presenta la anomalía nuclear de tipo muesca; F: núcleo que presenta la anomalía nuclear de tipo yema. Tamaño de la barra negra: 5 µm.....	114
Figura 65. Frecuencias de micronúcleos (MN), invaginaciones, evaginaciones y anomalías nucleares totales en eritrocitos de <i>Patagonotothen cornucola</i> en condición impactada y en condición no impactada. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre los niveles impactado y no impactado ($p < 0.05$)...	115
Figura 66. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en encéfalo en las especies <i>Austrolycus depressiceps</i> , <i>Patagonotothen cornucola</i> y <i>Harpagifer bispinis</i> colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de AChE en encéfalo en <i>Austrolycus depressiceps</i> (B), <i>Patagonotothen cornucola</i> (C) y <i>Harpagifer bispinis</i> (D) comparando entre las diferentes localidades muestreadas. El asterisco (*) indica una diferencia significativa con sus entre los valores encontrados en el Dispensor y la Referencia Oeste (valor de $p < 0,05$).....	116
Figura 67. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en músculo en las especies <i>Austrolycus depressiceps</i> , <i>Patagonotothen cornucola</i> y <i>Harpagifer bispinis</i> colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de AChE en músculo en <i>Austrolycus depressiceps</i> (B), <i>Patagonotothen cornucola</i> (C) y <i>Harpagifer bispinis</i> (D) comparando entre las diferentes localidades muestreadas. (Valor de $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles basales entre las diferentes especies.....	117
Figura 68. Colecta de mitílidos con <i>corer</i>	122
Figura 69. Longitudes registradas en cada uno de los ejemplares de mitílidos recolectados.....	123
Figura 70. Procesamiento de mitílidos en laboratorios del ICPA.....	123

Figura 71. Distribución de tallas porcentual de <i>Mytilus chilensis</i> en condiciones impactadas (barras rojas) y no impactadas (barras verdes) considerando la suma de los organismos colectados en los <i>corer</i>	127
Figura 72. Índice de condición de Walne (ICW) por <i>Localidad</i> indicando aquellas impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.....	128
Figura 73. Índice de condición de Fulton utilizando el peso seco (KnS) por <i>Localidad</i> indicando aquellas impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.....	129
Figura 74. Índice de condición de Fulton utilizando el peso húmedo (KnH) por <i>Localidad</i> indicando aquellas impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.....	129
Figura 75. Índice de condición de Walne por <i>Sitios</i> dentro de cada <i>Localidad</i> identificada como impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.....	130
Figura 76. Índice de condición de Fulton utilizando el peso seco (KnS) por <i>Sitios</i> dentro de cada <i>Localidad</i> identificada como impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.....	130
Figura 77. Índice de condición de Fulton utilizando el peso húmedo (KnH) por <i>Sitios</i> dentro de cada <i>Localidad</i> identificada como impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.....	131
Figura 78. Curvas de materia Orgánica (verde), N (negro) y P (fucsia) por <i>Áreas</i> de muestreo. Los valores están expresados en mg/l; la serie del eje izquierdo corresponde a N y P mientras que la del derecho a la materia orgánica.....	141
Figura 79. Cuencas servidas en Ushuaia. Fuente: tomado de DPOSS.....	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Denominación y coordenadas geográficas de *Localidades*, *Sitios* y *Áreas* seleccionadas en este trabajo. La categorización de las *Localidades* (Verde = No Impactadas y Rojo = Impactadas) siguen antecedentes previos realizados por

Diodato et al. (2018) y DPOSS (2021) y quienes emplearon criterios de categorización de los mismos puntos de muestreo para determinar la calidad ambiental en agua y sedimentos.....38

Tabla 2. Lista sistemática de especies presentes en Canal Beagle con un N = 300. Se distingue Especie, Familia, Clase, Phylum para la mayoría de los casos y en niveles taxonómicos superiores para algunos casos. CM = Comunidad macrobentónica refleja las especies o grupos de especies que fueron consideradas en los análisis estadísticos de comunidades.....59

Tabla 3. Listado de especies o rango taxonómico mayor que explican las similitudes entre la condición no impactada e impactada en orden decreciente. Se destacan en **negrita** aquellas especies que aportan únicamente en cada grupo y con subrayado aquellas especies que si bien aparecen en ambos grupos sus abundancias son contrastantes. Prom_ Abund= promedio abundancia, Prom_Simil= promedio similitud, Dis/DS= disimilitud sobre desvío estándar, Contrib%= contribución porcentual, Cum.% = contribución porcentual acumulada. Taxones subrayados son los que se comparten entre condiciones y por lo tanto el aporte se debe a diferencias de abundancia; en **negrita** taxones particulares para cada condición.....67

Tabla 4. Listado de especies o rango taxonómico mayor que explican las disimilitudes entre la condición no impactada (columna verde) e impactada (columna roja) en orden decreciente. Prom_ abund= promedio abundancia, Prom_Dis= promedio de disimilitud, Dis/DS= disimilitud sobre desvío estándar, Contrib%= contribución porcentual,. Cum% = contribución porcentual acumulada.....68

Tabla 5. Análisis PERMANOVA en el que se detalla los factores incluidos en el modelo (Fuentes de Variación), los grados de libertad (g.l), la suma de cuadrados (SM), los cuadrados medios (CM), el estadístico Pseudo F, el valor de probabilidad (P) por permutaciones (perm), el número de permutaciones (Perms) y la probabilidad estimada por Monte Carlo (MC). Los valores de probabilidad significativa están en **negrita**.....76

Tabla 6. Componentes de variación para cada factor estimado como el porcentaje de aporte al total.....	77
Tabla 7. Dispersión promedio y error estándar (ES) para cada Localidad en base a los 60 cuadrantes (N).....	77
Tabla 8. Test de <i>t</i> para la comparación pareada de dispersión multivariada entre localidades. El test no contempla corrección por comparaciones múltiples.....	77
Tabla 9. Eigenvalores, porcentaje de variación individual por eje y acumulada para los dos primeros ejes en el análisis de componentes principales realizados con la matriz completa (totales) de variables ambientales y con la matriz de variables que reflejan impacto (impacto).....	81
Tabla 10. Resumen de los parámetros obtenidos por medio de la secuenciación Illumina Mi-Seq.....	100
Tabla 11. Composición porcentual de las especies en cada una de las bahías relevadas.....	127
Tabla 12. Coeficiente de correlación entre los valores medios de condición entre el Índice de condición de Walne, Índice de condición de Fulton utilizando el peso seco (KnS) e Índice de condición de Fulton utilizando el peso húmedo (KnH)...	131
Tabla 13. Lecturas de CONP, N y P de las muestras de agua tomadas en cada Área por Sitio por bahía expresadas en miligramos por litro (mg/l). En negrita: valores elevados en relación al valor medio del parámetro en el área de estudio.....	140
Tabla 14. Caracterización de los efluentes por Cuenca. Fuente: tomado de DPOSS.....	146

ÍNDICE DE ANEXOS

Versión animada del patrón de riqueza específica por Área

https://drive.google.com/file/d/1zIphh9vUJOUrT3vEdZZuJo0fquI7Ldmb/view?usp=share_link...62

Versión animada de la Figura con los valores de coliformes fecales como burbujas

https://drive.google.com/file/d/1rEco79vfDk2yTmBzBk8WPvRTmaOT3YCH/view?usp=share_link...87

RESUMEN

El informe final contiene los resultados y conclusiones de las tareas realizadas entre 01/10/2023 y hasta el 01/05/2024 en el proyecto de referencia. El presente trabajo representa la primera línea de base ambiental realizada sobre distintas fracciones de la biota que habita el intermareal rocoso del sector central de la porción Argentina del Canal Beagle. Con el objeto de detectar impacto debido al vertido de efluentes cloacales y pluvio-cloacales con distintos niveles de tratamiento en el Canal Beagle, un equipo técnico del Instituto de Ciencias Polares, Ambiente y Recursos Naturales perteneciente a la Universidad Nacional de Tierra del Fuego empleó diversos abordajes científico-técnicos para la detección de impacto ambiental. Con la intención de realizar un diagnóstico lo más acabado se realizaron estudios a nivel ecológico de comunidades macro-bentónicas (1) y con la metodología de ADN ambiental (2) jerarquizando la variación a escala espacial. Además, a nivel de especies y poblaciones se trabajó con tres especies de peces y se utilizaron muestras de distintos órganos para evaluar biomarcadores de genotoxicidad y actividad enzimática (3). También se determinó la condición media del bivalvo mitílido *Mytilus chilensis* (4). Además, se incluyó una medición de parámetros ambientales con la finalidad de relacionar los hallazgos obtenidos en organismos vivos con el gradiente de impacto ambiental (5 y 6). El informe introduce el área de estudio, la temática de impacto biótico, vierte justificaciones técnicas sobre las decisiones tomadas y ofrece una descripción de cada una de las tareas por cada línea de investigación. La línea de investigación (1) se considera la prioritaria en este informe por cuanto reviste el mayor esfuerzo y logística de muestreo. Los resultados obtenidos demuestran que la comunidad macro-bentónica del intermareal rocoso de zonas impactadas por los efluentes es diferente a la de zonas no impactadas. En las primeras la comunidad está simplificada en composición y estructura producto de la desaparición de especies o grupos de especies sensibles como resultado de los efluentes pre-tratados vertidos por el dispersor, por los crudos volcados al Arroyo Grande y por otras descargas pluvio-

cloacales en Bahía Ushuaia. El resultado general de la línea de investigación (2) no fue útil para detectar impacto ambiental dado lo localizado del efecto que generan los efluentes cloacales sobre la comunidad del bentos. Algunas especies de peces analizados en la línea (3) mostraron alteraciones nucleares y actividad enzimática que aportan evidencias de impacto. La línea de investigación (4) detectó diferencias en la condición de *M. chilensis* de zonas impactadas versus no impactadas. El análisis de las variables ambientales en agua y en sedimento (5) y los las mediciones de materia orgánica total, nitrógeno y fósforo (6) demostraron un patrón de gradiente ambiental que refleja impacto y explica satisfactoriamente el patrón biótico. Con base en los resultados de este trabajo se verifica la existencia de impacto biótico como respuesta a los vertidos. La zona de influencia directa del impacto biótico se limita a pocos kilómetros de los principales puntos de vertido, por cuanto se detectaron comunidades, poblaciones y organismos en buen estado ecológico en las Referencias Oeste (Bahía Ensenada) y Este (Estancia Túnel). Se discute la necesidad de: (a) extender en el espacio y el tiempo el monitoreo de comunidades macro-bentónicas con similar base metodológica; (b) conocer mejor la magnitud y dirección de las plumas de contaminación; (c) se refuerza la necesidad de poner en funcionamiento la planta de tratamiento en Arroyo Grande; (d) la conveniencia de acordar entre partes el futuro emplazamiento del emisario submarino. En vistas del constante crecimiento poblacional y del ejido urbano en la ciudad de Ushuaia y el consiguiente e inevitable aumento de vertidos al Canal Beagle, el éxito de implementación de los puntos (a-d) podrá sostener la calificación de impacto localizado detectado en este trabajo o podrá extenderse en el espacio con consecuencias socio-ambientales no conocidas.

1. INTRODUCCIÓN

Las costas marinas alrededor del mundo han sido y son frecuentemente utilizadas para descargar efluentes pluviales y cloacales, en muchos casos volcados en áreas costeras intermareales y sub-mareales. Esta idea de que las zonas costeras marítimas pueden recibir efluentes tanto domésticos como industriales de forma ilimitada fue cambiando con el tiempo. Los ambientes costeros confinados y semi-confinados en particular, rápidamente muestran señales de degradación ambiental al recibir dichos tipos de vertidos. Actualmente, la principal vía de entrada en el medio marino de la contaminación por materia orgánica y todas las sustancias que esto acarrea continúa siendo el aporte de aguas negras o servidas de los emisarios cloacales costeros. A esto debe sumarse el alto grado de deterioro ambiental que pueden causar muchos de los efluentes producto de la actividad industrial (Muniz et al. 2013). La influencia negativa del aumento de la materia orgánica en el ambiente marino producido por efluentes cloacales ha sido documentada en un amplio rango de comunidades bentónicas a lo largo del mundo. Por mencionar algunos ejemplos, Roberts (1996), encontró que la comunidad macrobentónica (es decir los organismos asociados al fondo marino de más de 0,5 mm) de las costas de North Head, Australia, se vio empobrecida en el número de especies al ser sometida a los efluentes cloacales; en las costas italianas de la Región de Apulia, sobre el Mar Jónico, Terlizzi et al. (2005) detectaron diferencias significativas entre aquellos ensambles empobrecidos por su exposición a aguas residuales respecto de aquellos de lugares de referencia, considerados poco o no impactados, encontrando particularmente una disminución de abundancia de esponjas incrustantes y briozoos.

En Argentina, los estudios de la relación entre el macrobentos y la contaminación por dispersores cloacales están concentrados geográficamente en la Provincia de Buenos Aires. En la zona de Bahía Blanca (39° S), en un entorno mixohalino (es decir marino mezclado con agua dulce) la estructura de una comunidad dominada por anélidos poliquetos fue relacionada al enriquecimiento

orgánico (Elías 1992, Elías & Bremec 1995, Bravo et al. 2021). La población del bivalvo *Brachidontes rodriguezii* afectada por un efluente cloacal tuvo menores densidades, mayores tallas, pero menor biomasa que la hallada en la población control. Estos datos evidenciaron la respuesta de los individuos de dichas especies al estrés al que se encuentran sometidos, que limita el desarrollo natural de la población. En la zona de Quequén la población de *B. rodriguezii* estuvo ausente en las cercanías del efluente cloacal y alcanzó valores normales sólo a los 150 metros del mismo (López Gappa et al. 1990). Otros estudios, realizados en áreas intermareales (Elías et al. 2001a) y someras (Elías et al. 2001b) afectadas por el efluente cloacal de Mar del Plata permitieron determinar no sólo nuevas especies de poliquetos infaunales (Elías & Bremec 1997, Elías et al. 2000), sino también su asociación con el contenido orgánico del sedimento. Además, se hicieron evidentes los cambios a largo plazo en las comunidades macrobentónicas debido a impactos antrópicos (Vallarino 2002, Vallarino & Elías 2000, Vallarino et al. 2002) y se demostró que la descarga del efluente intermareal cloacal de la ciudad de Mar del Plata (38°) que opero entre 1989 y 2014 afectó la composición y estructura de la comunidad macrobentónica intermareal cerca de la desembocadura (Jaubet et al. 2011, Jaubet et al. 2013, Elías et al. 2015, Llanos 2018). Estudios más recientes, realizados luego del funcionamiento del emisario submarino (en diciembre de 2014), demuestran que la estructura de la comunidad bentónica intermareal está cambiando nuevamente (Jaubet et al. 2024), adquiriendo características de comunidades no afectadas o de comunidades con impacto intermedio (Cuello et al. 2019).

La Provincia de Tierra del Fuego Antártida e Islas del Atlántico Sur (TDF A.I.A.S) es la más austral de nuestro país y fue habitada desde hace aproximadamente 10.000 años por los grupos aborígenes Selknam u Onas, Manneken, Yámanas y Alacalufes. A partir de la llegada de los marinos españoles en 1520, la historia de ocupación de la isla, del archipiélago y la región cambiaría drásticamente, incluyendo la ocupación británica de las Islas Malvinas en 1833 y la matanza de los pueblos originarios desde 1880 hasta bien entrada la década de 1920, con consecuencias evidentes en el entorno natural. La ocupación humana ha

crecido continuamente hasta la actualidad y, en el presente, cuenta con unos 190.641 habitantes. La ciudad de Ushuaia, con 82.615 habitantes se posiciona en el puesto número 14 a nivel nacional entre los distritos con más crecimiento poblacional: Censo 2001: 45.785 habitantes; Censo 2010: 56.956 habitantes; Censo 2022: 82.615 habitantes, lo que representa un 45% de incremento entre los últimos dos censos. Además, recibe unos 400.000 turistas al año.

Ushuaia es una ciudad emplazada en la costa norte del Canal Beagle (CB en adelante) y consta de un núcleo urbano y fabril que produce descargas de efluentes cloacales, pluviales, pluvio-cloacales e industriales. Como resulta obvio, el ambiente marino está experimentando un incremento del impacto que genera la actividad antrópica en general y debida a dichos vertidos en particular, especialmente en Bahía Ushuaia, Bahía Encerrada y Bahía Golondrina. Además, la pesca comercial, el transporte marítimo, los dragados, la ocupación de terrenos costeros para urbanismo, la actividad turística, etc, son factores adicionales que aumentan el deterioro ambiental. Estas presiones están generando impactos en los ecosistemas, evidenciados, entre otras cosas, por signos de contaminación (Diodato et al. 2021), sobreexplotación de recursos (Lovrich & Tapella 2014, 2016), introducción de especies exóticas (Valenzuela et al. 2014), pérdida de hábitats (Henn et al. 2016), entre otros.

Para gestionar estas presiones y minimizar o eliminar los impactos, existen diversas formas en que la sociedad puede intervenir, con la intención de proteger, conservar y restaurar los ecosistemas. Una de ellas son las normativas nacionales, provinciales y municipales, los controles para velar por su cumplimiento y los instrumentos legales en los casos de incumplimiento. Precisamente, esto sucedió en la ciudad de Ushuaia en 2012, cuando la Asociación Civil “Participación Ciudadana” presentó una denuncia de protección de los intereses colectivos por la falta de tratamiento por parte de la Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios (DPOSS en adelante), de los efluentes cloacales vertidos en el mar. Es así que en 2014, el Juzgado de Primera Instancia en lo Civil y Comercial, se expidió a favor de los denunciantes, obligando al gobierno provincial y municipal a realizar obras, acciones paliativas y de remediación, con el objetivo de mejorar la calidad

ambiental. Por ello, la DPOSS desarrolló un Plan de Remediación de Ushuaia (PRAU), cuyo fin último es la intervención sobre el ecosistema urbano y natural de la ciudad de Ushuaia con el propósito de minimizar el impacto ambiental hasta alcanzar niveles objetivos de remediación establecidos por la normativa ambiental (DPOSS 2017a, 2017b, 2022). Cabe mencionar también, el fortalecimiento institucional logrado por el laboratorio de la DPOSS a partir de la adquisición de instrumentos y equipamientos de medición, como también el ingreso de profesionales especializados (DPOSS 2021).

Como parte del PRAU se realizaron varios monitoreos ambientales en agua y en sedimentos en el CB (DPOSS 2017a, 2017b, 2022) y un proyecto titulado “Propuestas de acciones y estrategias para la implementación del Plan Integral de Remediación Ambiental de la cuenca hídrica de la ciudad de Ushuaia – sector Este”, realizado por personal docente y no docente del Instituto de Ciencias Polares, Ambiente y Recursos Naturales de la Universidad Nacional de Tierra del Fuego, Ushuaia, entre junio 2017 y septiembre 2018 (Diodato et al. 2018). El objetivo principal de este proyecto fue evaluar mediante un diagnóstico ambiental la calidad del agua y de los sedimentos de la zona costera del sector este de Bahía Ushuaia, del Arroyo Grande y Río Olivia, generando una línea de base ambiental que sirva como herramienta para proponer estrategias de remediación de los sitios afectados por los vertidos de efluentes cloacales sin tratamiento sobre el CB. La conclusión general del diagnóstico ambiental indica que no existen parámetros con valores preocupantes o impactos significativos tanto en agua como en sedimentos, ni existen valores críticos en cuanto a metales pesados e hidrocarburos. Sin embargo, algunos sitios (B° Canal Beagle, Estación de Bombeo 16, B° Bahía, desembocadura del Arroyo Grande y zona baja del Arroyo Grande) presentaron altos valores de materia orgánica, amonio, fosfatos, turbidez, clorofila a y bacterias coliformes, indicadores de impacto urbano. Los sitios de referencia (Playa Larga, Parque Nacional y las zonas altas de las cuencas) presentaron los valores más bajos del estudio en cuanto a los parámetros considerados como indicadores de aportes urbanos (Diodato et al. 2018).

Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado en el marco del PRAU estudios tendientes a relevar el potencial impacto de las descargas sobre el componente biótico que habita el CB. Estudios previos realizados por investigadores del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET), han puntualizado efectos de polución en especies particulares, pero no se han realizado evaluaciones a nivel de comunidad. Por ejemplo, se estudió la concentración de metales pesados e hidrocarburos clorados en *Mytilus edulis* (Amin et al. 1996, 2011; Conti et al. 2011). Sobre la misma especie se realizaron estudios sobre biomarcadores de estrés oxidativo (Duarte et al. 2011, Giarratano & Amin 2010, Giarratino et al. 2010, 2011) y contaminación orgánica (Sericano et al. 1995), que luego se extendió a lapas (Conti et al. 2019). Sin embargo, estudios que contemplan comunidades de invertebrados en el lado argentino del CB se han enfocado en evaluaciones de diversidad en los bosques de "cachiyuyo" *Macrosystis pyrifera* (Bravo et al. 2023, Cruz-Jiménez 2019, Adami & Gordillo 1999), pero son llamativamente escasos los aportes sobre comunidades de invertebrados en el intermareal. En este ambiente puede mencionarse un estudio pionero que describe la fauna de sustratos rocosos en 11 sitios del CB (Zaixso et al. 1978) y los aportes realizados por Curelovich et al. (2013, 2014, 2016) en Ensenada Zaratiegui, quienes muestran que los invertebrados marinos herbívoros, la disponibilidad de sustrato y las algas coralinas tienen una importancia significativa pero diferencial en el reclutamiento de las distintas especies sésiles de las comunidades rocosas del intermareal en el CB, como los bivalvos mitílidos y los percebes. A pesar de la escasa información existente sobre la comunidad macrobentónica en el ambiente intermareal fueguino, se ha reconocido que es de sumo interés generar conocimiento de base sobre la estructura de la comunidad y los mecanismos que afectan su dinámica, para el desarrollo de planes de manejo orientados a la conservación de la biodiversidad o que permitan predecir su evolución frente a los disturbios (Curelovich et al. 2014). Sobre la costa chilena del CB sí se han realizado contribuciones a la comprensión de los procesos que modelan la estructura y composición de la comunidad de invertebrados bentónicos (Ojeda et al. 2014, 2017,

Rodríguez et al. 2021), aunque sin vinculación con la detección de impacto ambiental.

Con el objetivo de llevar adelante un estudio idóneo que permita tener una visión amplia del efecto de los vertidos cloacales, pluviocloacales, pluviales e incluso industriales sobre el medioambiente marino costero) el equipo técnico de este proyecto incluyó diversas líneas de trabajo como fuentes independientes de información en la detección de impacto. La más relevante es el estudio de las comunidades macrobentónicas intermareales (CMB de aquí en adelante), agregando además: muestreos de agua para la determinación de especies a través de la novedosa técnica de *metabarcoding* de ADN ambiental; estudios de estrés oxidativo y daño genético de las diferentes especies de peces que habitan el intermareal; muestreos del ensamble de bivalvos mitílidos como especies centinela del estado del ambiente; muestreos de agua y sedimentos para medir niveles de contaminación por materia orgánica. Estos muestreos fueron realizados para alcanzar los objetivos específicos planteados, con excepción de las mediciones de materia orgánica que se agregaron posteriormente, así como los muestreos de agua para medición de sólidos disueltos totales, coliformes totales y coliformes fecales, turbidez, materia orgánica total, entre otros. Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

- Comparar la diversidad y abundancia de especies intermareales bentónicas, su densidad, en bahías potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales con zonas potencialmente no impactadas (i.e. zonas referencia) por las descargas.
- Estimar diversidad y abundancia específica a través de ADN ambiental en bahías potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales con zonas potencialmente no impactadas por las descargas.
- Analizar el estrés oxidativo en peces del intermareal que habitan bahías potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales con zonas potencialmente no impactadas por las descargas

- Contrastar las variaciones en talla y biomasa en organismos clave que puedan ser útiles como indicadores (mejillones) en bahías potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales con zonas potencialmente no impactadas por las descargas.

2. MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS DEL INTERMAREAL

2.a. Justificación del uso de macroinvertebrados bentónicos para detectar impacto ambiental.

El macrobentos, que comprende en términos generales y con algunas excepciones a los organismos mayores de 500 micras o que se pueden ver a simple vista, es un componente importante de las redes tróficas de los ecosistemas marinos dado su rol en la transferencia de energía entre los productores primarios y los consumidores de niveles tróficos superiores (Wilber & Clarke 1998). Además de mantener el flujo de energía, estas especies bentónicas brindan servicios ecosistémicos vitales del tipo denominado “de regulación”, dado que incluyen aportes al funcionamiento del ciclo de nutrientes y la aireación de los sedimentos (Covich et al. 1999). Las comunidades bentónicas además aportan sustancialmente a la biodiversidad en muchas regiones y son ampliamente utilizadas como indicadores de salud ambiental marina debido a que brindan, expresan o integran información sobre su hábitat (Muniz et al. 2013, Elías et al. 2021).

Los organismos bentónicos se han utilizado durante mucho tiempo para monitorear los efectos del aumento de materia orgánica en el ambiente porque: (1) presentan escasa movilidad y por lo tanto son más sensibles a perturbaciones físicas y químicas locales; (2) las asociaciones bentónicas incluyen diversas especies que exhiben distintos grados de tolerancia al estrés; (3) responden a las perturbaciones aún considerando niveles taxonómicos supra-específicos, como géneros, familias y hasta clases y (4) integran la historia reciente de disturbios, que puede no ser detectada en otros compartimientos biológicos, tales como las comunidades pelágicas (Warwick 1993, Salas et al. 2006, Patrício et al. 2009, Borja et al. 2008, Dauvin et al. 2010).

Entre los organismos macro-bentónicos, los poliquetos son colonizadores de sustratos afectados por aumentos de materia orgánica y muchas veces son las mismas especies tolerantes y oportunistas las que se registran en todas partes del mundo. Por ejemplo, algunos poliquetos de la familia Capitellidae (y en particular

Capitella capitata) fueron históricamente utilizados para el reconocimiento de dichos disturbios (Reish 1957, 1963). *C. capitata* es una de las especies predominantes en las zonas más cercanas a los puntos de descargas cloacales (Pearson & Rosemberg 1978) y probablemente sea la única especie hasta el presente que se ajuste más firmemente a la actual definición de especie indicadora de contaminación por materia orgánica.

2.b. Área de estudio y aspectos oceanográficos del Canal Beagle.

El archipiélago fueguino forma parte del ambiente subantártico, oceanográficamente comprendido entre la Convergencia Antártica y la Convergencia Subtropical. El CB es considerado un complejo sistema semi-estuarial que conecta los dos mayores océanos del mundo: el Pacífico y el Atlántico (Acha et al. 2004). La dinámica del agua marina está controlada principalmente por aguas subantárticas que ingresan al CB desde el oeste y suroeste y por una gran entrada estacional de agua dulce especialmente importante durante el verano debido a la presencia de glaciares y numerosos ríos que drenan en él, como ocurre por ejemplo la Bahía Lapataia, Bahía Ushuaia, Bahía Cambaceres, etc. Por esta razón, las aguas del CB a lo largo de su recorrido presentan valores de salinidad superficiales que no superan las 32 ups.

El CB exhibe una topografía moldeada por la dinámica glaciaria ocurrida durante el cuaternario (Bujalesky 2011), que generó una extensa y heterogénea área costera que se tradujo en microhábitats sujetos a factores físicos extremos propios de latitudes altas. A menor escala espacial, el litoral del CB presenta numerosos accidentes geográficos costeros que forman bahías y ensenadas expuestas en mayor o menor medida a la corriente principal, pequeñas penínsulas e islas de distinta superficie y variaciones en la profundidad de las aguas (LLoris & Rucabado 1991) (Figura 1).

El margen costero presenta playas arenosas y/o rocosas con diferentes pendientes, en proporciones variables a nivel local, sujetas a un régimen de mareas semi-diurno (dos bajamares y dos pleamares cada 24 horas) de una amplitud media de 1,1 metros en Ushuaia. La profundidad en Bahía Ushuaia varía de 6 a 30 m en

algunos sectores occidentales, llegando hasta 100-170 m al este, cerca ya del canal propiamente dicho (Figura 2). Bahía Golondrina es menos profunda, alcanzando los 20 m en zonas exteriores. La temperatura del agua superficial varía a lo largo del año, hallándose los valores extremos en el mes de enero, con 9.35°C, y en el mes de agosto, con 4.38°C (Ballestrini et al. 1998).



Figura 1. Playas y microhábitats costeros del Canal Beagle.

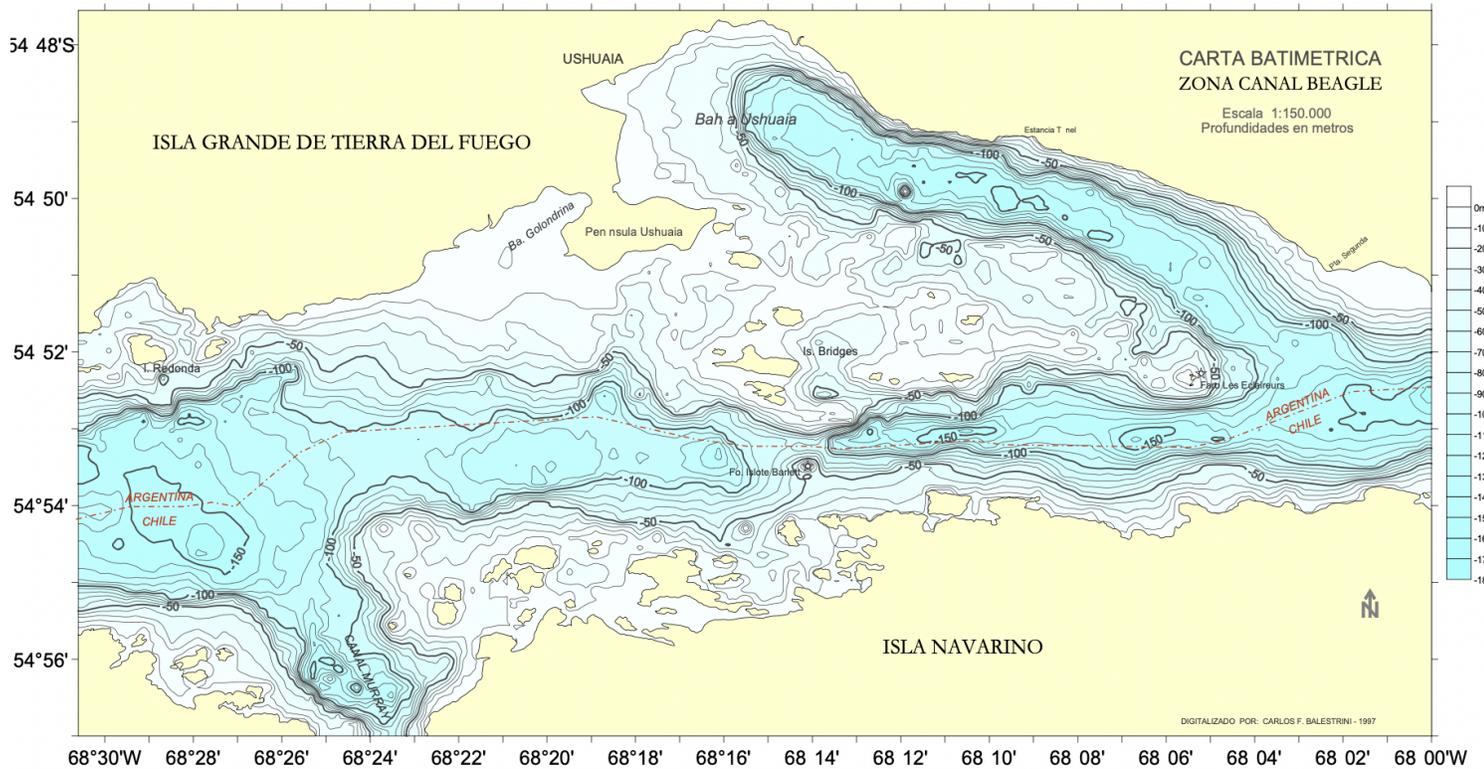


Figura 2. Batimetría del Canal Beagle. Tomado de Ballestrini et al. 1998.

El patrón de circulación general de la corriente en el CB, a lo largo de sus 240 km y 5 km promedio de ancho, es en sentido Oeste-Este (Giesecke et al. 2021), es decir desde el Pacífico hacia el Atlántico. El CB puede dividirse en tres regiones principales de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas de las masas de agua (Schloss et al. 2022). De estas regiones, la zona Occidental y Central son las de interés para el presente trabajo, dado que en ellas se sitúan las localidades donde se tomaron las muestras biológicas (Figura 3).

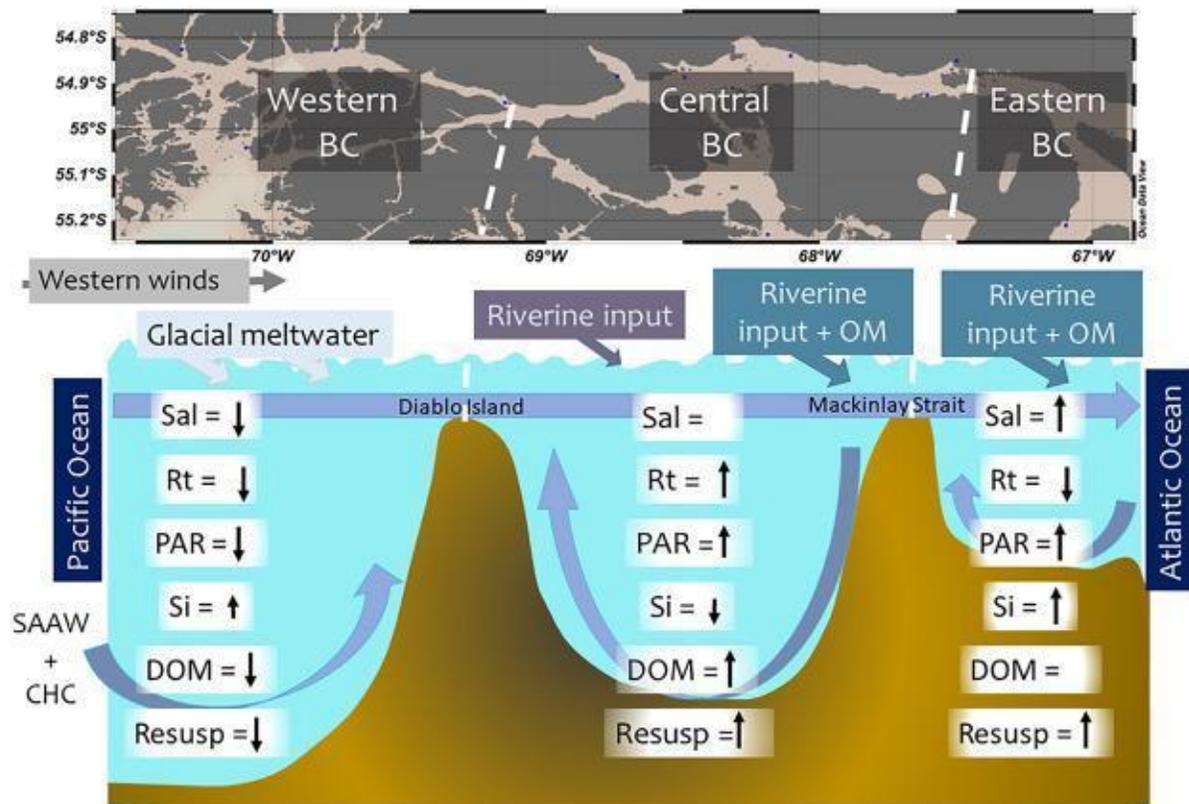


Figura 3. Modelo conceptual para explicar la evolución estacional y geográfica de la producción de toxinas por floraciones de *Alexandrium catenella* a lo largo de los tres sectores del Canal de Beagle (BC). SAAW: aguas subantárticas, presumiblemente proporcionadas por la corriente del Cabo de Hornos (CHC); MO: Materia orgánica; Sal: Salinidad; Rt: tiempo de residencia; PAR: Radiación fotosintéticamente activa; Si: concentración de silicato; DOM: Materia orgánica disuelta; Resusp: Procesos de resuspensión. Las flechas que apuntan hacia arriba y hacia abajo indican valores altos y bajos para el parámetro considerado. El signo "=" simboliza valores medios. Tomado de Schloss et al. 2023.

Como se mencionó, el agua en el CB fluye fundamentalmente en sentido oeste-este (Figura 4A). Sin embargo, sobre la costa norte se generan células de circulación residuales en sentido anti-horario en correspondencia con cambios batimétricos abruptos (Cucco et al. 2022). En el sector central del CB que se extiende entre el aeropuerto de Ushuaia en la costa noroeste y Puerto Williams (Chile) en la costa suroeste, la circulación residual se caracteriza por un patrón complejo debido a la presencia de rasgos geomorfológicos particulares como la Bahía de Ushuaia y varias islas (Figura 4B). El flujo principal hacia el este, con intensificaciones a lo largo del lado norte del canal, lleva aguas hacia la Bahía de Ushuaia a través de una densa red de pasajes de poca profundidad que atraviesan el archipiélago al sur de la bahía. La circulación dentro de la Bahía Ushuaia está caracterizada por un giro en sentido anti-horario de la corriente, que se da a lo largo del lado occidental y por una zona de aguas tranquilas en su parte central. Este escenario produce fenómenos de atrapamiento de agua que generalmente conducen a una baja ventilación y al agotamiento del oxígeno disuelto (Cucco et al. 2022).

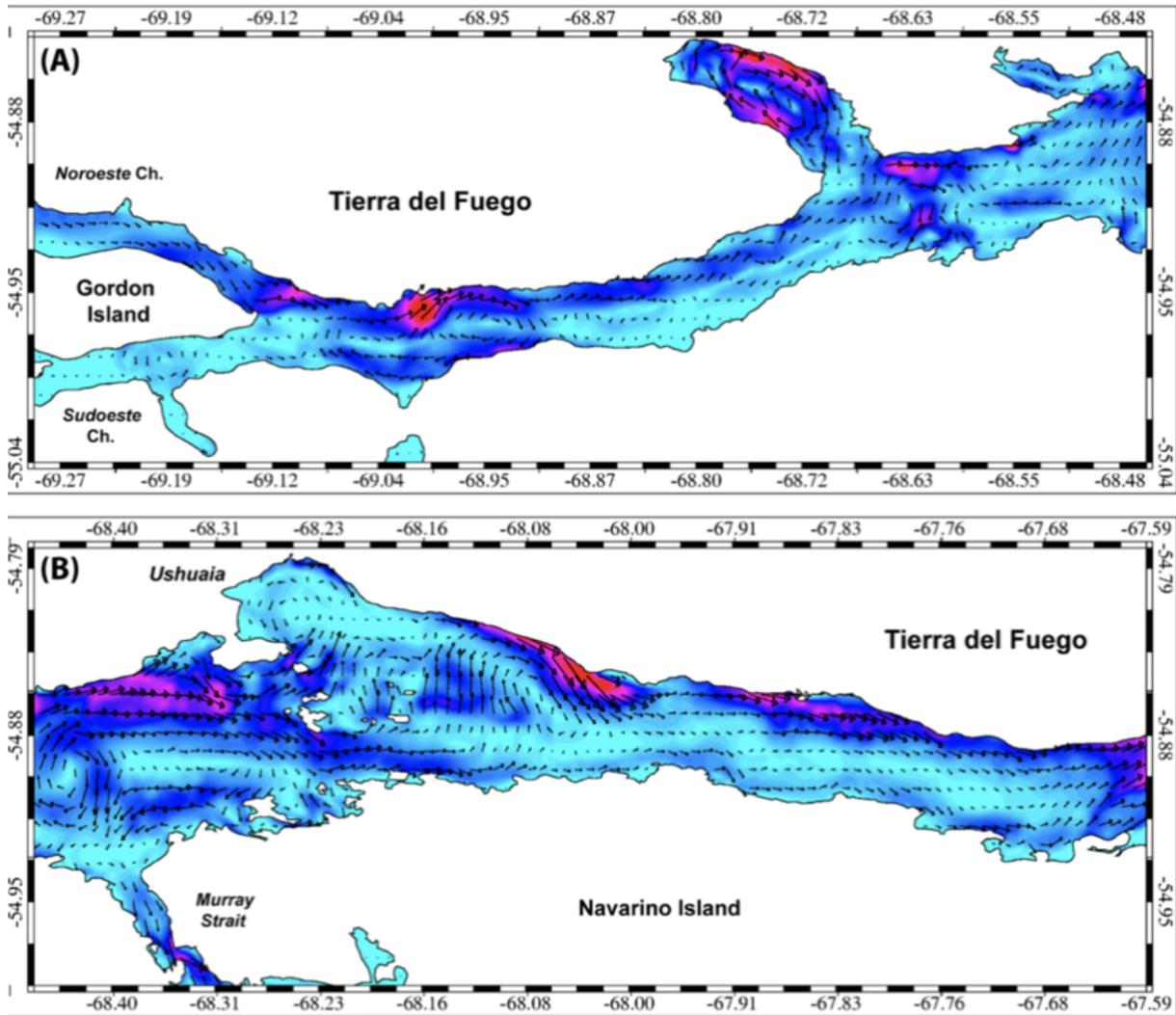


Figura 4. Circulación residual promediada verticalmente y calculada para todo un año simulado (2016) en el área occidental (A) y Centro (B) del Canal Beagle. Tomado de Cucco et al. 2022.

El patrón general de circulación en el área de estudio varía también según el momento de marea y el tipo de viento, incluso hasta el punto de que el giro anti-horario en Bahía Ushuaia se interrumpe entre dos y tres horas antes y después de la pleamar (Ballestrini et al. 1998). Según las estimaciones proporcionada por estos autores, y aún sin contar con modelos específicos de deriva de la pluma de descarga del emisario de los efluentes cloacales en Bahía Golondrina y en Bahía Ushuaia, se puede intuir que la dirección de la pluma podría variar en algún grado dependiendo del momento de descarga respecto de la marea y de los vientos predominantes. Pevio a la pleamar (Figura 5) es razonable prever un transporte de

las descargas cloacales (actualmente pre-tratadas) desde el dispersor submarino situado al final de la margen este de la Bahía Golondrina (Localidad Dispersor) hacia el este, afectando las costas de la Península Ushuaia e Isla dos Lomos y por otro lado, una ingesión de aguas pre-tratadas al sector este de Bahía Ushuaia (Localidad Ushuaia). En esta situación se observa poco refluo hacia Bahía Golondrina, cuyos vectores de movimiento de aguas, al igual que en Bahía Ensenada (Localidad Referencia Oeste), se advierten de poca magnitud (Figura 5A y 5B). Sin embargo, en el momento de la pleamar, el desplazamiento de dichas aguas pre-tratadas del emisario podría alcanzar la zona interna de la Bahía Golondrina (Figura 6A y 6B), más aún en condiciones de viento particulares. En ambos casos el impacto tendrá una intensidad inversamente proporcional a la distancia al punto de descarga por efectos de dilución y directamente proporcional a la cantidad de descarga.

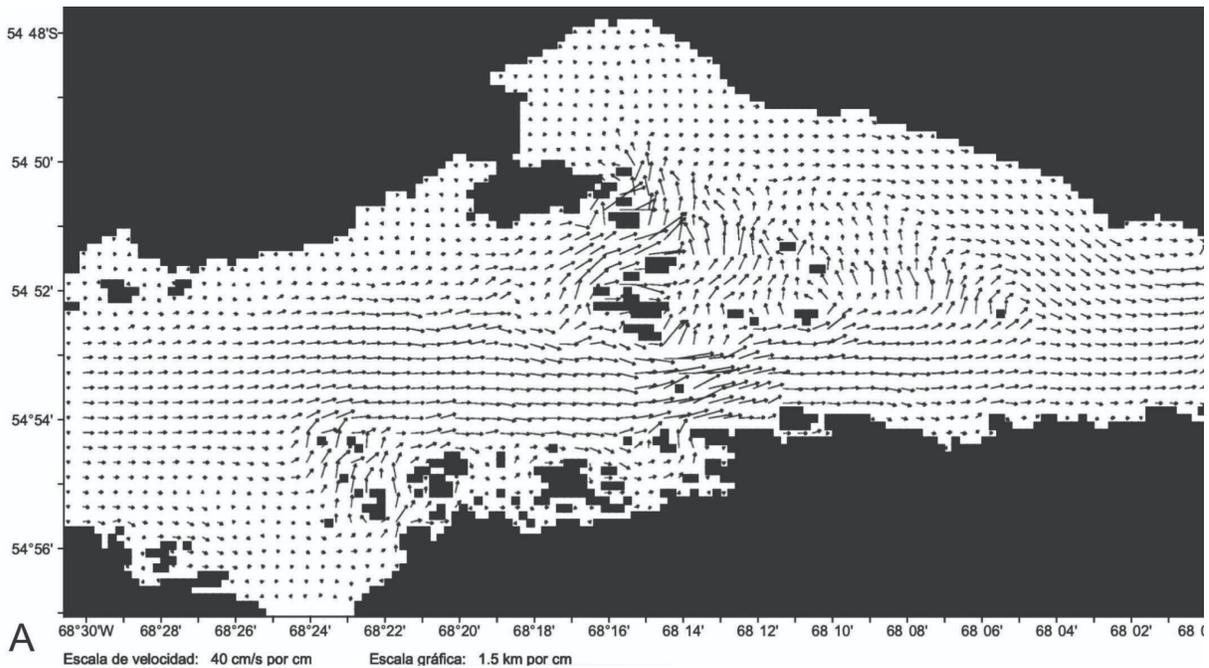
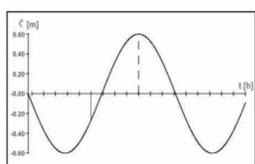


Figura 5 (A y B) . Corrientes de marea, 4 horas antes de la Pleamar en el puerto de Ushuaia.



B

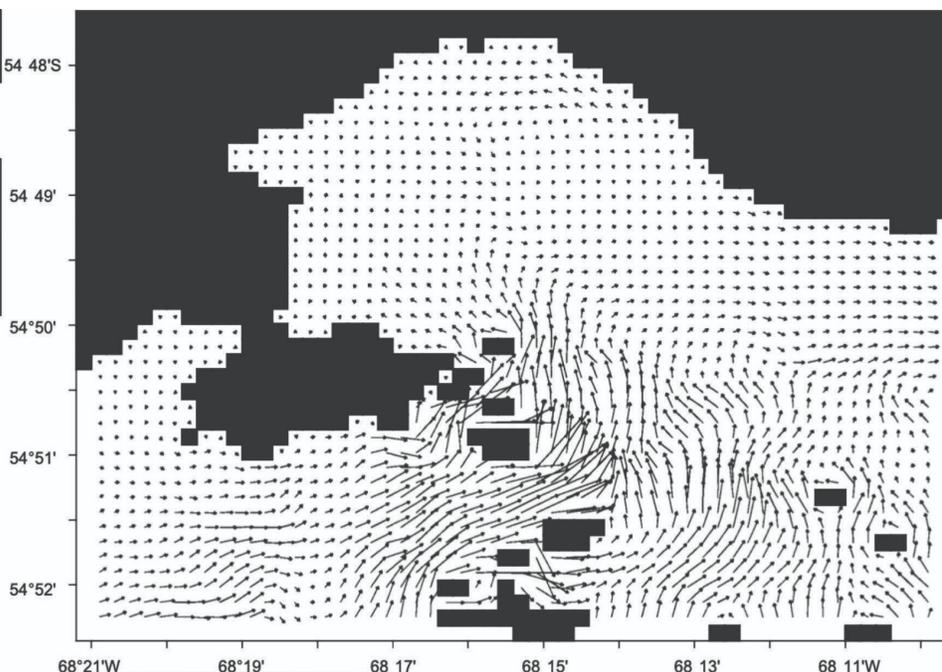
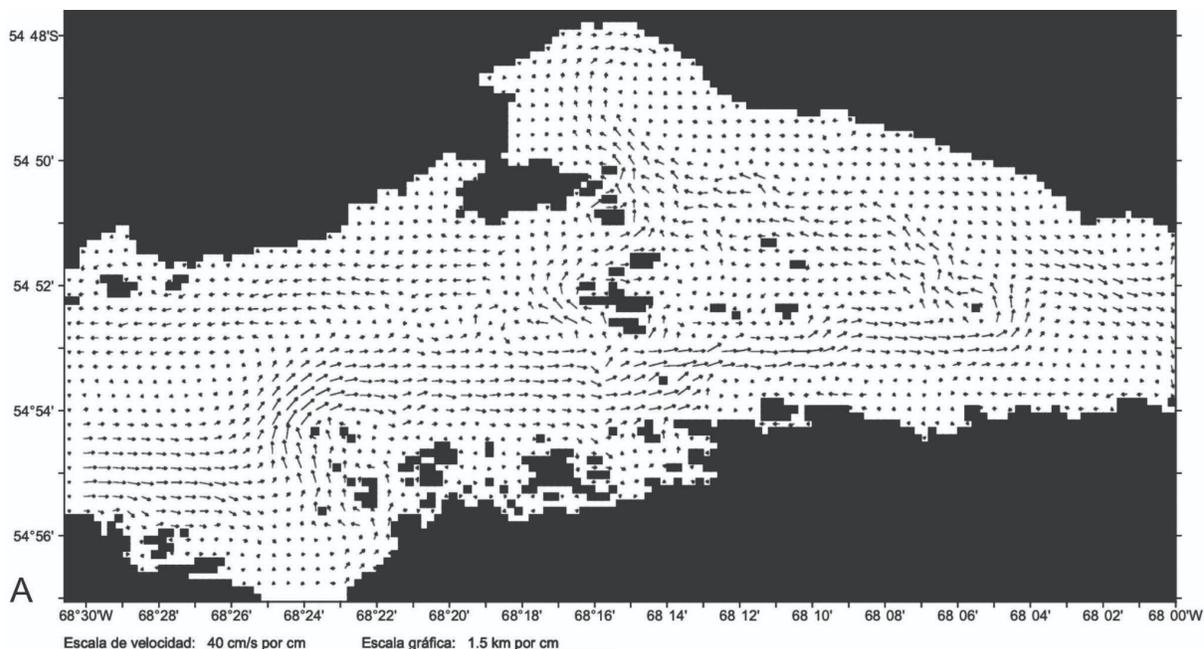


Figura 5. Estimación de las velocidades de corriente, donde se indica la escala con que fueron graficados los vectores corrientes (en cm/seg de velocidad por centímetro de longitud). El Norte se encuentra orientado en todos los casos hacia la parte superior de las ilustraciones. Situación de cuatro horas antes de la pleamar para la superficie que abarca la mayoría de las Localidades muestreadas (A) y detalle de las incluidas en Bahía y Península Ushuaia (Emisor) y un sector adyacente del CB que incluye la desembocadura del Arroyo Grande y un sitio próximo a Playa Larga. Tomado de Ballestrini et al. 1998.



A

Figura 6 (A y B) .Corrientes de marea, en el instante de la Pleamar en el puerto de Ushuaia.

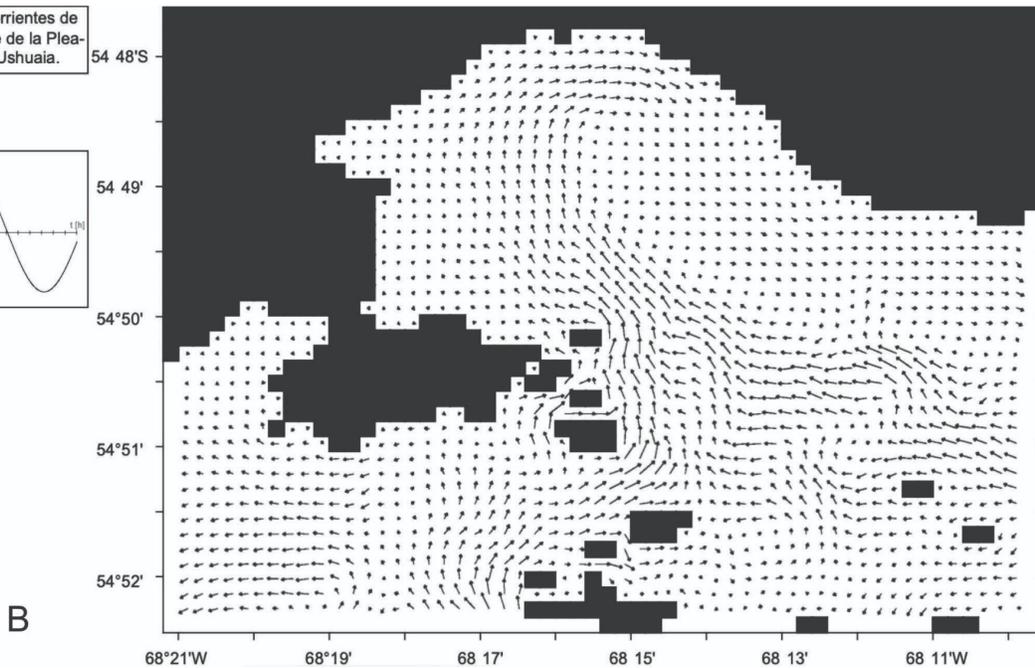
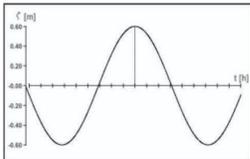


Figura 6. Estimación de las velocidades de corriente, donde se indica la escala con que fueron graficados los vectores corrientes (en cm/seg de velocidad por centímetro de longitud). El Norte se encuentra orientado en todos los casos hacia la parte superior de las ilustraciones. Situación de pleamar para la superficie que abarca la totalidad de las Localidades muestreadas (A) y detalle de las incluidas en Bahía y Península Ushuaia (Emisor) y un sector adyacente del CB que incluye la desembocadura del Arroyo Grande y un sitio próximo a Playa Larga. Tomado de Ballestrini et al. 1998.

Desde un punto de vista biótico, el CB es un corredor sub-polar que conecta dos grandes océanos y debido a que su desembocadura es próxima a la corriente circumpolar, en él confluyen faunas de tres orígenes distintos: Antártico, Pacífico y Atlántico. Esta situación biogeográfica única confiere un gran valor agregado a estudios de estructura y gradiente de composición de las comunidades marinas.

2.c. Justificación del diseño de muestreo

En términos generales, los lineamientos esenciales del diseño de muestreo propuesto para detectar impacto ambiental fueron realizados siguiendo a Underwood (1997), Quinn & Keough (2002) y Anderson et al. (2008). Dichos diseños

han sido aplicados con éxito en diversos trabajos científicos a lo largo del mundo. En particular, los fundamentos de muestreo planteados por estos autores en diversos trabajos fueron revisados con claridad y recomendados en un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos que enfatiza en la utilización de organismos bentónicos para detectar impacto (Muniz et al. 2013). A continuación, se discuten los principales lineamientos seguidos en este trabajo para justificar con argumentos sólidos y con sentido ecológico las decisiones tomadas. Además, es útil para clarificar los criterios adoptados y así facilitar la replicación del diseño de muestreo en futuros monitoreos. También se pueden advertir potenciales falencias y limitaciones.

El conocimiento previo del área y la realización de un muestreo piloto son aspectos fundamentales para definir el área de muestreo más eficiente y el número de réplicas que se deberán obtener en cada escala espacial (Muniz et al. 2013). La costa del CB fue visualizada previamente mediante Google Earth y fueron preseleccionados lugares adecuados para el muestreo comparativo respecto a las 2 *Localidades* asumidas como impactadas por los vertidos cloacales y pluviocloacales. Se realizaron múltiples salidas de campo a pie por la costa norte del CB entre Bahía Ensenada (Límite Oeste) y Estancia Túnel (Límite Este) para verificar los sectores de playa potencialmente idóneos para el muestreo (ver Figura 7).



Figura 7. Recorrida a la Bahía Ensenada, Parque Nacional Tierra del Fuego, para seleccionar los intermareales donde se realizaron los muestreos.

Así se definieron todas las playas con intermareal rocoso aptas para el muestreo biológico, es decir con disponibilidad de hábitat que permitiese la toma de muestras de macroinvertebrados bentónicos (Figura 8). Para considerarlo apto, el intermareal además debió cumplir una serie de requisitos generales tales como: accesibilidad, tipo de sustrato, pendiente, oleaje, largo del intermareal, proximidad a otro intermareal adecuado, presencia de arroyos de agua dulce, etc. De esta forma sería posible realizar comparaciones ecológicas fiables de los resultados entre localidades. Para completar esta tarea, previamente se tramitaron permisos especiales para ingresar en distintas jurisdicciones: Parques Nacionales, Policía de Seguridad Aeroportuaria mediante gestión de DPOSS y Reserva natural Playa Larga. Las autorizaciones de colecta de organismos y agua marina fueron tramitadas ante la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Medio Ambiente (Resolución S.A. N° 43/24) y la Administración de Parques Nacionales. Las salidas preliminares permitieron re-definir algunos sitios potenciales de muestreo sin alterar la lógica del diseño del mismo ni el número total de muestras (ver más adelante), pero sí mejorar la obtención de información de sitios potencialmente afectados por

presión continua y acumulada de efluentes cloacales en contraposición con sitios potencialmente no impactados por las descargas.

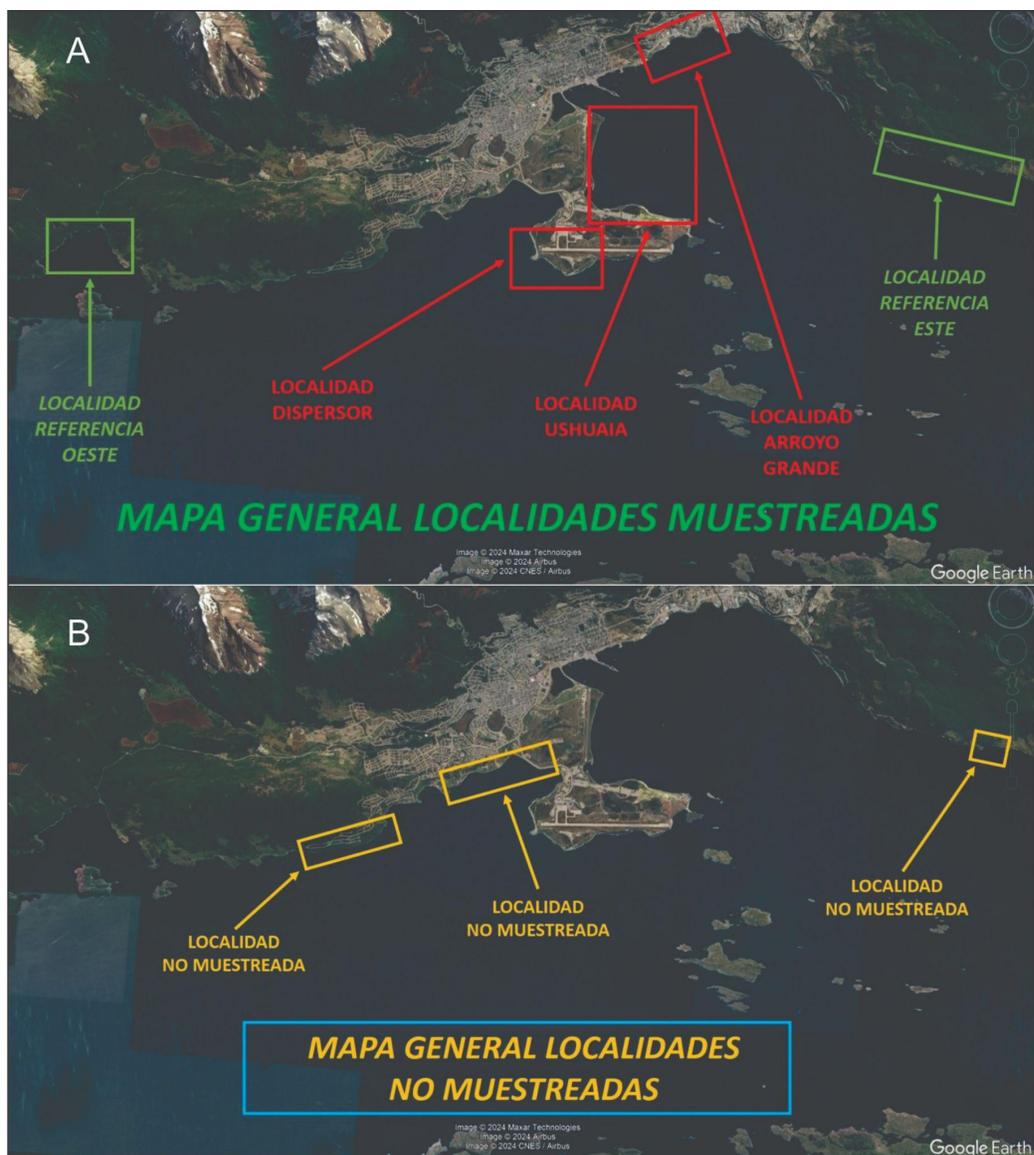


Figura 8. Localidades aptas para realizar el muestreo biológico en Canal Beagle (A y B). Las *Localidades* seleccionadas (A) y no seleccionadas (B) se muestran con color rojo y verde y amarillo respectivamente.

Finalmente se seleccionaron las localidades para el muestreo, dado que cumplían con los requisitos mencionados anteriormente establecidos por el cuerpo técnico del proyecto en un total de cinco (5). Entre ellas dos localidades se

seleccionaron por requerimiento de DPOSS (por recibir efluentes cloacales y pluviocloacales) y se corresponden con la condición de impacto establecida en reportes ambientales previos. Estas fueron las denominadas Dispensor y Arroyo Grande. De las restantes 6 localidades pre-seleccionadas como aptas y comparables, se tomaron tres al azar (Figura 9).

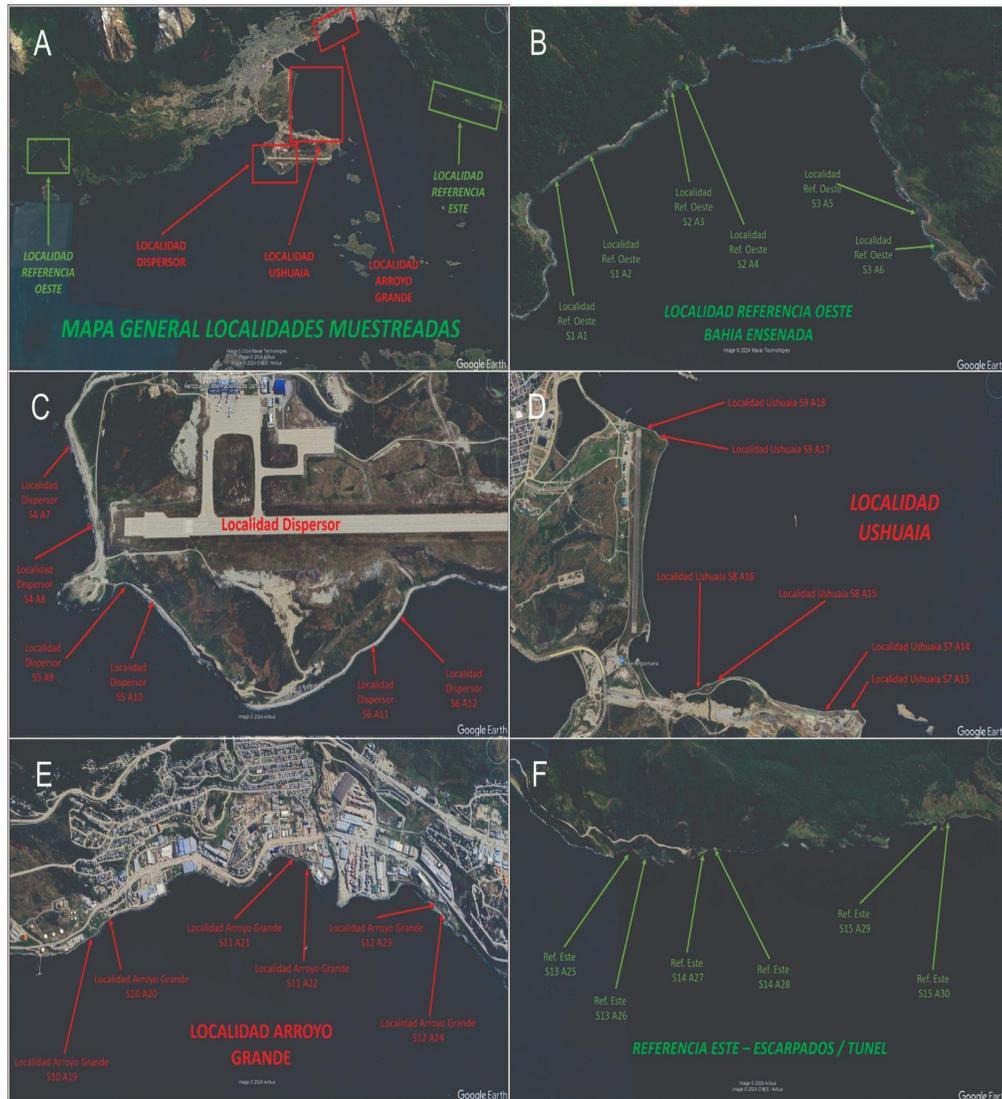


Figura 9. Ubicación geográfica de las *Localidades*, *Sitios* y *Áreas* de muestreo en la costa norte del Canal Beagle. Se presenta una visión general (A) y recortes de cada *Localidad* para visualizar la ubicación de la toma de muestras (B a F). Las *Localidades* consideradas impactadas se denotan con rojo, las de referencia con verde.

Las cinco Localidades utilizadas para el estudio fueron denominadas de Oeste a Este como sigue:

1) Referencia Oeste (Bahía Ensenada): esta localidad es considerada referencia/control o no impactada. Esta condición se justifica por estar expuesta a aguas que llegan desde el oeste, kilómetros antes del dispersor, y que siguen su curso en esa dirección, por su ubicación dentro de un Parque Nacional, y porque está de acuerdo con la asignación de localidad no impactada empleada por DPOSS (2021) y por Diodato et al. (2018).

2) Dispersor Submarino (Aeropuerto): esta localidad se encuentra en la península que separa la Bahía Golondrina de la Bahía Ushuaia y contiene el Aeropuerto Internacional de Ushuaia. Aquí es donde se produce el vertido sub-superficial del dispersor cloacal de la ciudad de Ushuaia, previo pre-tratamiento que se realiza en la planta de Bahía Golondrina. Por ello, esta localidad es considerada impactada de acuerdo con la asignación empleada por la DPOSS (2021) y por Diodato et al. (2018).

3) Bahía Ushuaia (Ushuaia): esta localidad se ubica en el sector Oeste de la Bahía Ushuaia. Se halla próxima al asentamiento urbano de la ciudad de Ushuaia y al dispersor submarino por lo que se considera a priori como localidad impactada. Esta condición está de acuerdo con la asignación empleada por la DPOSS (2021) y por Diodato et al. (2018).

4) Arroyo Grande: esta localidad también se encuentra dentro de la Bahía Ushuaia, aunque con una ubicación más hacia al este y al fondo de la bahía y se halla próxima al ejido urbano de Ushuaia. El margen costero recibe aportes de agua dulce del Arroyo Grande, que a su vez recibe vertidos cloacales sin tratamiento y pluviales. Además, esta localidad recibe vertidos pluvio-cloacales sin tratamiento. Por todo ello se la considera *a priori* como una localidad impactada. Esta condición está de acuerdo con la asignación empleada por DPOSS (2021) y por Diodato et al. (2018).

5) Referencia Este (Playa Larga/Estancia Túnel): esta localidad se halla alejada de la ciudad de Ushuaia y en parte incluye las proximidades de la reserva Provincial Playa Larga y Estancia Túnel. Por ello, esta localidad fue considerada como no impactada. Esta condición también está de acuerdo con la asignación empleada por

DPOSS (2021) y por Diodato et al. (2018). El detalle de las coordenadas geográficas de la toma de muestras en cada Localidad se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Denominación y coordenadas geográficas de Localidades, Sitios y Áreas seleccionadas en este trabajo. La categorización de las Localidades (Verde = No Impactadas y Rojo = Impactadas) siguen antecedentes previos realizados por Diodato et al. (2018) y DPOSS (2021) y quienes emplearon criterios de categorización de los mismos puntos de muestreo para determinar la calidad ambiental en agua y sedimentos.

LOCALIDAD	NOMBRE COMUN	SITIO	AREA	LATITUD	LONGITUD
REFERENCIA OESTE	ENSENADA	1	1	54°51'13.06"S	68°30'4.76"O
REFERENCIA OESTE	ENSENADA	1	2	54°51'9.97"S	68°29'58.91"O
REFERENCIA OESTE	ENSENADA	2	3	54°51'0.24"S	68°29'40.06"O
REFERENCIA OESTE	ENSENADA	2	4	54°50'58.35"S	68°29'36.82"O
REFERENCIA OESTE	ENSENADA	3	5	54°51'8.46"S	68°28'27.69"O
REFERENCIA OESTE	ENSENADA	3	6	54°51'11.80"S	68°28'22.89"O
DISPERSOR	AEROPUERTO PENINSULA USHUAIA	4	7	54°50'30.76"S	68°19'23.96"O
DISPERSOR	AEROPUERTO PENINSULA USHUAIA	4	8	54°50'38.49"S	68°19'16.61"O
DISPERSOR	AEROPUERTO PENINSULA USHUAIA	5	9	54°50'45.25"S	68°19'5.65"O
DISPERSOR	AEROPUERTO PENINSULA USHUAIA	5	10	54°50'47.18"S	68°18'58.99"O
DISPERSOR	AEROPUERTO PENINSULA USHUAIA	6	11	54°50'49.93"S	68°18'5.38"O
DISPERSOR	AEROPUERTO PENINSULA USHUAIA	6	12	54°50'45.93"S	68°17'57.18"O
USHUAIA	ZONA MILITAR	7	13	54°50'7.75"S	68°15'58.91"O
USHUAIA	ZONA MILITAR	7	14	54°50'8.28"S	68°16'15.53"O
USHUAIA	ZONA MILITAR	8	15	54°50'1.39"S	68°17'22.84"O
USHUAIA	ZONA MILITAR	8	16	54°50'3.75"S	68°17'34.95"O
USHUAIA	AFASYN	9	17	54°48'56.80"S	68°18'1.41"O
USHUAIA	AFASYN	9	18	54°48'54.20"S	68°18'12.33"O
ARROYO GRANDE	ARROYO GRANDE	10	19	54°48'10.21"S	68°17'3.57"O
ARROYO GRANDE	ARROYO GRANDE	10	20	54°48'5.33"S	68°16'56.67"O
ARROYO GRANDE	ARROYO GRANDE	11	21	54°47'42.87"S	68°15'48.08"O
ARROYO GRANDE	ARROYO GRANDE	11	22	54°47'42.57"S	68°15'44.34"O
ARROYO GRANDE	ARROYO GRANDE	12	23	54°47'43.00"S	68°14'46.31"O
ARROYO GRANDE	ARROYO GRANDE	12	24	54°47'43.56"S	68°14'40.81"O
REFERENCIA ESTE	PLAYA LARGA	13	25	54°49'1.26"S	68°11'41.65"O
REFERENCIA ESTE	PLAYA LARGA	13	26	54°49'3.56"S	68°11'36.70"O
REFERENCIA ESTE	ESTANCIA TUNEL	14	27	54°49'6.48"S	68°11'6.65"O
REFERENCIA ESTE	ESTANCIA TUNEL	14	28	54°49'6.07"S	68°11'2.98"O
REFERENCIA ESTE	ESTANCIA TUNEL	15	29	54°49'15.20"S	68°8'58.61"O
REFERENCIA ESTE	ESTANCIA TUNEL	15	30	54°49'14.47"S	68°8'56.26"O

El interés más relevante del diseño de muestreo propuesto para la detección de impacto ambiental fue poder identificar cambios en los ensambles de especies debidos al efecto de interés (i.e. efluentes cloacales y pluviales) y no debidos a cualquier otra razón, incluyendo fundamentalmente la variabilidad natural inherente a la disposición de microhábitats aprovechables por los organismos macrobentónicos a lo largo del espacio en los intermareales y el tiempo (i.e. variación no contemplada aquí). Según Underwood (1992, 1994), los diseños de muestreo

jerárquicos son los que permiten detectar diferencias a varias escalas espaciales y determinar cuál es la más relevante para analizar un impacto ambiental. Además, permiten cuantificar la variabilidad entre y dentro de las áreas de referencia e impactadas y determinar así la magnitud y dirección del potencial impacto, considerando esa variabilidad. A pesar de la extensa literatura disponible sobre el tema (Green 1979, Hurlbert 1984, Underwood 1997, 2000, Underwood & Chapman 2005, Anderson et al. 2008, entre otros), aún hoy persisten estudios de evaluación de perturbaciones ambientales que comparan una única área impactada con una única área control o de referencia en un único momento (Underwood 2000). Los experimentos diseñados de esta forma no permiten realizar interpretaciones válidas de los resultados por acarrear problemas de solapamiento (Quinn & Keough 2002). En este estudio, la condición aleatoria de elección de cinco localidades (3 referencias vs 2 impactadas) permiten interpretaciones válidas de los resultados ya que no se acarrear problemas de pseudo-replicación (Hurlbert 1984). En este sentido, el factor *Localidad* fue considerado aleatorio (con $a = 5$ niveles) y anidado en el factor *Condición*, el cual fue considerado fijo con dos niveles (control vs. impacto). El factor *Localidad* pone a prueba la hipótesis nula de no variabilidad en la estructura y composición de la CMB a la mayor escala espacial del presente trabajo (escala de kilómetros). El factor *Condición* pone a prueba la hipótesis nula de no impacto debido a la descarga de efluentes cloacales y pluviales.

En cada localidad se muestreó en tres sitios definidos aleatoriamente e identificados con números correlativos a lo largo de todas las localidades (sitio 1, 2 y 3 en localidad 1; 4, 5 y 6 en la localidad 2, etc.), siguiendo un sentido oeste-este en la costa como si esta fuera una línea recta extendida. Así, S1 (Referencia Oeste) representa el sitio de referencia más al oeste muestreado Bahía Ensenada, mientras que S15 en Playa Larga-Estancia Túnel (Referencia Este) representa el sitio de referencia más al este muestreado en la costa de Playa Larga y la Estancia Túnel. El factor *Sitio* fue considerado aleatorio con tres niveles ($b = 3$) y anidado en *Localidad*. El factor *Sitio* pone a prueba la hipótesis nula de no variabilidad en la estructura y composición de la CMB a una escala espacial de cientos de metros. La misma secuencia lógica fue establecida para el factor aleatorio *Área* con $c = 2$

niveles y anidado en el factor *Sitio* y por lo tanto en *Localidad*. Por ejemplo, Referencia Oeste_ S1_A2 representa el sitio referencia más al oeste con su *Área* más este en la localidad ubicada en Bahía Ensenada. El factor *Área* pone a prueba la hipótesis nula de no variabilidad en la estructura y composición de la CMB a una escala espacial de decenas de metros.

En cada *Área* se tomaron un total de $n = 10$ muestras, para un total de $a \times b \times c \times n = N = 300$ muestras (60 por *Localidad*). La variación entre réplicas dimensiona la variabilidad a la menor escala espacial (pocos metros). El diseño de muestreo se resume y ejemplifica en la Figura 10.

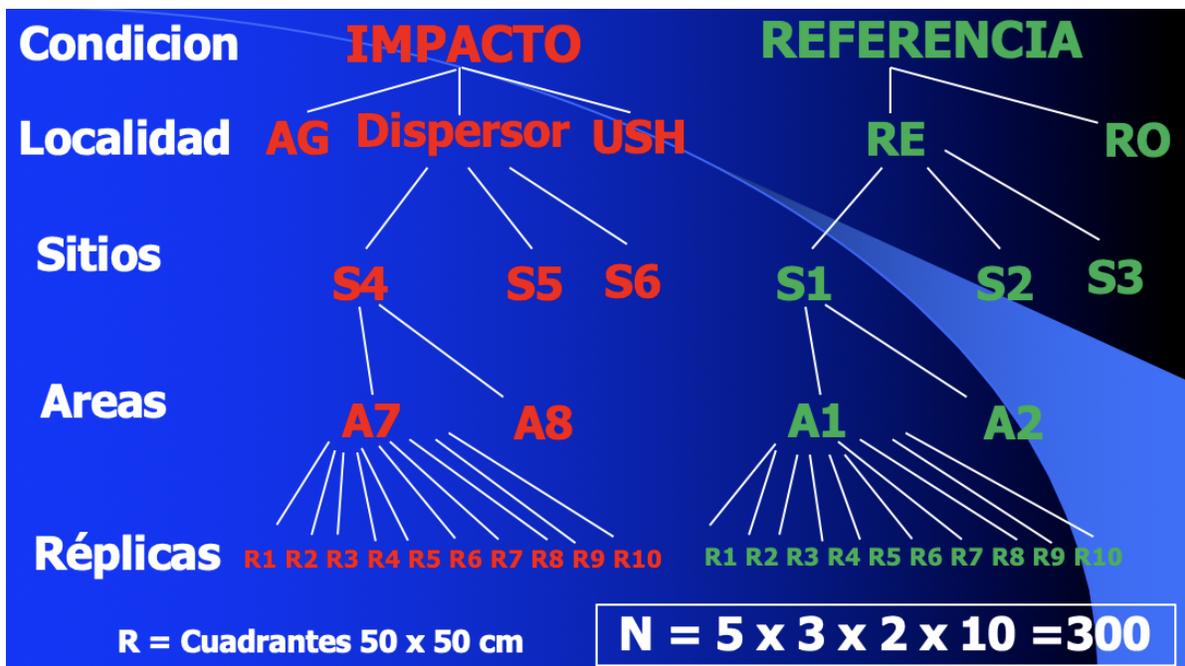


Figura 10. Gráfica del diseño experimental en el que se muestran los factores a la izquierda en blanco, los niveles en rojo (impactado) y verde (Referencia) para los que se ejemplifica con sólo una Localidad (Dispensor y Referencia Este = RE), Sitio y Área en cada caso. En AG = Arroyo Grande, USH = Bahía Ushuaia y RO = Referencia Oeste se empleó el mismo esquema de muestreo. Las líneas blancas indican el patrón de anidamiento.

Un diseño de muestreo del tipo multifactorial mixto, jerárquico, balanceado y asimétrico con réplicas a distintas escalas espaciales como este se consideró esencial para comparar la estructura (relaciones de abundancia) y composición

(presencia-ausencia) de la CMB en lugares expuestos a vertidos cloacales y pluviales respecto de lugares de referencia. En el caso del presente trabajo, dado que no se disponía de datos biológicos previos al impacto, se utilizó un diseño de After-Control-Impact (ACI) (Chapman et al. 1995, Roberts 1996a, Glasby 1997). Estos diseños 'ACI', son más limitados que los Beyond-BACI (Before-After-Control-Impact; Underwood 1991) a la hora de establecer relaciones causa-efecto entre las intervenciones humanas y las respuestas de las comunidades, aunque han sido ampliamente utilizados en estudios de impacto ambiental (Chapman et al. 1995, Roberts 1996, Lardicci et al. 1999, Guidetti et al. 2002). Más específicamente, en ausencia de datos "antes", puede ser posible detectar diferencias consistentes entre uno o más lugares de impacto y varios lugares de control o referencia. Glasby (1997) menciona las limitaciones asociadas con la detección de impactos cuando sólo se dispone de datos posteriores al mismo.

El diseño espacial jerárquico propuesto no contempla mediciones repetidas en el tiempo para acotarlo dentro del presupuesto y tiempo de duración del proyecto. Por ello, no se cuenta con replicación temporal tanto para la estación primavera como para las otras tres estaciones a lo largo del año, aún cuando la estacionalidad es otro factor fundamental para entender la dinámica de las comunidades marinas en latitudes altas. El fotoperíodo y la intensidad de la radiación solar presentan marcados cambios estacionales que determinan cambios en variables abióticas (Iachetti et al. 2021) cuyo efecto se refleja en las comunidades planctónicas (Bruno et al. 2018), bentónicas (Ojeda et al. 2014) y en el necton (Vanella et al. 2007, Cruz-Jiménez 2019).

En este contexto optamos por anteponer el estudio de fuentes de variabilidad espacial sobre variaciones en las tendencias temporales, ya que existe un compromiso en términos de costo-beneficio entre una y otra estrategia.

Lo anteriormente expuesto justifica tanto el "N" muestral como la cobertura espacial escogida en términos del principal objetivo del presente trabajo en un contexto judicial. Este esquema de muestreo cumple con creces las recomendaciones planteadas por un grupo de expertos con vasta experiencia en estudios de impacto

ambiental para el caso especial del bentos de sustratos duros de áreas intermareales en el Atlántico Sudoccidental (Muniz et al. 2013).

2.d. Protocolo de muestreo de la CMB, emplazamiento de los puntos de toma de muestras y asignación taxonómica.

La fauna bentónica intermareal presenta una distribución diferencial a lo largo del espacio entre las líneas de las mareas máxima y mínima. Por ello, el diseño de muestreo fue estratificado aleatorio (y no uno completamente aleatorio), porque ello permite una mayor precisión para la estimación de la variabilidad de la estructura y composición de la CMB y poblaciones de otros organismos bentónicos (Cochran 1963, Quinn & Keough 2002). Por ello, en este trabajo se optó por diferenciar tres estratos espaciales en cada uno de los intermareales de cada *Localidad/Sitio/Área* y tomar muestras aleatorias en solo una de las tres zonas del intermareal, ampliamente reconocidas en la bibliografía especializada (Lewis 1964, Mathieson & Nienhuis 1991, Stephenson & Stephenson 1972). Siguiendo a Sessa (2013) los estratos considerados fueron:

1) Supralitoral ó Parte Alta: Zona más expuesta a la desecación, cercana a la línea de pleamar, es la zona más crítica en condiciones de humedad, salinidad y fuerza del oleaje. Queda cubierto solo durante la marea alta de sicigia.

2) Mesolitoral ó Parte Media: Zona comprendida entre las líneas de alta y baja marea de cuadratura. Pasa menos tiempo descubierta que el Supralitoral, suele tener algunas grietas o pozones que retienen agua (llamados pozas de marea).

3) Infralitoral ó Parte Baja: Zona cercana a la línea de bajamar, casi siempre húmeda que queda comprendida entre la línea de marea baja de cuadratura y la baja de sicigia.

Este último estrato (3) fue el escogido para realizar el muestreo de comunidades debido a que muestreos pilotos realizados con antelación demostraron que aquí se registra la mayor diversidad de macroinvertebrados bentónicos tanto epifaunales como infaunales. Por ello, en el intermareal bajo se estableció, para cada área de muestreo, una transecta paralela a la línea de costa

de $n = 10$ cuadrantes de 50 cm x 50 cm donde se realizó un muestreo exhaustivo de macroinvertebrados bentónicos (Figura 11). Para la toma de muestras en campo seguimos un protocolo internacional para estandarizar muestreos en intermareales rocosos denominado “MBON Pole to Pole”: <https://repository.oceanbestpractices.org/handle/11329/1143>.



Figura 11. Muestreo con cuadrantes según recomendaciones de MBON Pole to Pole.



Figura 12. Muestreo piloto en Bahía Golondrina.

Previo a los muestreos de la CMB, se realizó un muestreo piloto (cuya información no se contabiliza para futuros análisis) con la finalidad de poner a punto la metodología de trabajo en campo (ver debajo protocolo de muestreo) y para acordar entre los participantes la asignación sistemática de organismos de difícil reconocimiento en campo (Figura 12). Asimismo, se convinieron distintos criterios de cuantificación para aquellos organismos no numerables (i.e. organismos coloniales) o aquellos extremadamente numerosos y móviles (por. ej. anfípodos e isópodos). En cada caso se escogió establecer porcentajes de cobertura, rangos o solo presencia/ausencia y finalmente se elaboró una planilla de muestreo (Figura 13).

Diversidad Intermareal - Proyecto DPOSS 2023		
B:	Fecha:	
S:	Equipo:	
A:	Foto:	
C:		
Taxa	Cobertura %	Comentarios
Algas pardas/rojas		
Algas verdes		
Mitilidos		
Cirripedios		
Piedras		
	N° de Individuos	
Moluscos		
Almeja blanca (<i>Eurhomoia exalbida</i>)		
Cholga (<i>Aulacomys atra</i>) [estriado, umbo afinado]		
Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>) [liso]		
Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>) [liso]		
<i>Chiton magallanicus</i> [escamas]		
<i>Tonicia</i> sp [cintura lisa]		
<i>Plaxiphora aurata</i> [pelos]		
Lapa (<i>Nacella magellanica</i>) [con estrías, + alta]		
Lapa (<i>Nacella deaurata</i>) [con estrías, + baja]		
Lapa (<i>Nacella flammea</i>) [lisa, + baja que deaurata]		
Lapa (<i>Nacella mytilina</i>) [lisa]		
Lapa sp juveniles		
Caracol plomizo (<i>Paratritia plumbea</i>)		
Caracol colmillo (<i>Acontina monodonta</i>)		
<i>Margarita violacea</i> [rosada, violeta]		
<i>Trochus versianus</i>		
<i>Trochus pictus</i> [lamelas]		
<i>Xymeris m. viciformis</i> [cuadrulado]		
<i>Nodditaria araucana</i> [micromolusco, <5mm]		
<i>Fisurella picta</i> [gris-verde, + alta, tentáculos negros]		
<i>Fisurella oriens</i> [rosada, + baja, tentáculos amarillos]		
<i>Siphonaria lessonae</i> [con pulmón, sombrerito chino]		
Crustáceos [1 = <5D; 2 = 5D-10D; 3 = 10D-20D; 4 = >20D]		
Amphipoda		1 2 3 4
Isópoda		1 2 3 4
Cangrejo común (<i>Halicarcinus planatus</i>)		
Cangrejo Ermitaño (<i>Pagurus captus</i>)		
Cangrejo tractor (<i>Peltarion spinulosum</i>)		
Langostilla (<i>Grimothoe gregaria</i>)		
Cirripedios (<i>Balanus laevis</i>) [+bajo, amarronado]		
Cirripedios (<i>Nobolanus fasciatus</i>) [+alto, blanco, estriado]		
Cnidarios		
Anémón gris (<i>Parantheopsis cruenta</i>) [tentáculos rayados]		
Anémón gris/verde (<i>Isoparastis fionae</i>) [boca rosa, tentáculos lisos verde]		
Anémón roja (<i>Bunodactis octonaria</i>) [boca amarilla]		
Anémón lobulada (<i>Anthothoe octotes</i>) [marrón, grande]		
Equinodermos		
Estrella de mar (<i>Anasteria antarctica</i>) [dorso gris/verde]		
Estrella de mar (<i>Asterina fimbriata</i>) [anaranjada]		
Erizo Rojo (<i>Loxechinus albus</i>) [grande, rojo]		
Erizo Verde (<i>Arbacia dufresnii</i>) [grande, verde]		
Erizo rosado (<i>Pseudoechinus magellanicus</i>) [pequeño]		
Ophiura (<i>Ophiactis asperula</i>) [rosa, naranja]		
Ophiura (<i>Ophiophragmus chilensis</i>) [verdosa, puntos oscuros]		
Pepino de mar (<i>Chiridota psanii</i>) [rojo translúcido]		
Pepino de mar (<i>Psolus patagonicus</i>) [vientre aplanado, con plaquitas rosadas duras dorso]		
Pepino de mar (<i>Pentactella leonina</i>) [blanco]		
Anélidos		
Poliquetos errantes (<i>Hermadion</i> sp) [escamas en dorso, quetas largas cobrizas]		
Poliquetos errantes (Nereididae) [ojos negros, parapodos de sanrollados por igual, mandíbulas negras]		
Poliquetos Serpulidae [pequeño, anaranjado]		
Eulalia sp. [borde amarillo/verde, centro negro/azul]		
Poliquetos tubícola (Terebellidae) [tubo de piedras]		
Poliqueto arenícola (Arenicolidae)		
Poliqueto Cabello de ángel (<i>Cirratulus cirratus</i>) [cirros largos a lo largo de todo el cuerpo]		
Hirudinea		
Poríferos		
Porífero (<i>Halidona porcelana</i>) [violeta, rosada]		
Porífero NN [blanquecino]		
Nemertinos y Sipunculidos (gusanos no segmentados)		
Nemertino (<i>Parbolasia corrugatus</i>) [marrón, largos]		
Sipunculido (<i>Golfingia margaritacea</i>) [amarillo, beige, sin anillos, 3-5 cm]		
Peces		
<i>Austrolycus depressiceps</i> [anguiliforme, negro]		
<i>Crossostomus chilensis</i> [anguiliforme, negro, labio bordeado]		
<i>Dadyanos insignis</i> [alargado, marrón, manchas negras]		
<i>Harpagifer bispinis</i> [pequeño, cabeza prominente]		
<i>Patagonothoten cornucula</i> [pequeño, dos manchas mejillas]		
<i>Patagonothoten tesellata</i>		
Indeterminados		
Indet 1		
Indet 2		
Indet 3		
Indet 4		
Indet 5		

Figura 13. Diseño final de planilla de muestreo biológico.

Además, previo a los muestreos de campo, el equipo técnico realizó un encuentro en laboratorios del ICPA donde se desplegaron todas las muestras de organismos marinos previamente colectadas con fines académicos en las asignaturas Diversidad Animal I y Diversidad Animal II para detectar y corregir deficiencias de asignación sistemática de especies (Figura 14).



Figura 14. Puesta a punto de protocolo de muestreo y entrenamiento de asignación taxonómica en laboratorio del ICPA.

La finalidad de este entrenamiento fue lograr un consenso a la hora de registrar la biodiversidad a campo, homogeneizando los criterios entre los distintos integrantes. Además, se puso a prueba el protocolo de muestreo y se implementaron mejoras (Figura 15).

Protocolo de muestreo proyecto DPOSS

Pasos a seguir:

Por Cuadrante

1. Reconocer área y colocar cuadrante próximo a la marea (no más 50% en una sola roca)
2. Completar tarjeta con datos de Bahía, Sitio, Área y Cuadrante.
3. Tomar una foto del cuadrante con sus datos de GPS o "gepesear".
4. Estimar cobertura de piedras, algas, mitilidos, cirripedios en intersecciones.
5. Identificar las especies de cobertura como especies y colocar asterisco (*).
6. Identificar por especie y realizar el conteo.
7. Tomar una foto y/o guardar los ejemplares que no pudieran identificarse (rotular).
8. Al finalizar tomar una foto de la planilla y guardar la planilla en folio.

Por Área

9. Tomar los datos ambientales con el Horiba.
10. Colecta de peces en un tacho con agua.
11. Colectar muestras de mejillones con coring-espátula y guardar en bolsa rotulada.
12. Tomar muestra de 30 gramos de sedimento para estimar la materia orgánica total.
13. Tomar muestra de agua para estimar la materia orgánica.
14. Tomar una muestra de agua para realizar análisis de ADN ambiental.

EQUIPAMIENTO e INSUMOS de CAMPO

- 4 Cuadrantes de 0,5 x 0,5 m con 36 intersecciones
- 6 rótulos para foto de cuadrantes
- 4 Cámara de fotos (GPS)
- 8 Pinzas entomológicas.
- 4 Cartillas de identificación
- 4 Planilleros completos (Planilleros, planillas, banda elástica, Lápiz, sacapuntas, goma, folio, papel vegetal, fibra indeleble, fibrón pizarra)
- 1 Medidor de variables ambientales Horiba
- 30 Recipientes plásticos con tapa para la colecta de ejemplares indeterminados
- 30 Recipientes plásticos con tapa para la colecta de 30 gramos de sedimento
- Bidónes para toma de agua para ADN
- Botellas para toma de muestras de agua para materia orgánica.
- 4 Coring para mejillón
- 4 espátulas para mejillón
- Bolsas para mejillones.
- 2 tachos para colecta de peces y aireadores.

Figura 15. Protocolo de muestreo en campo.

de otras especies y en oquedades y se consideró la fauna enterrada en primeros tres centímetros de sedimento. Las especies u otro rango taxonómico extremadamente numerosos para contabilizar en campo (*Balanus laevis*, *Notobalanus flosculus*, isópodos, anfípodos y poliquetos serpúlidos) fueron cuantificados en rangos, siendo I entre 0 y 50 individuos, II entre 51 y 100 individuos, III entre 101 y 200 individuos y IV entre 200 y 400 individuos. Los rangos fueron convertidos a conteo para el estudio de comunidades. En otros casos se optó por registrar solo su presencia-ausencia (*Mytilus chilensis*, *Brachidontes purpuratus* y *Aulacomya atra*) y por lo tanto se utilizaron solo para análisis de riqueza específica (diversidad alfa). Debido a que los sub-hábitats como pozas de mareas son comunes solo en algunas costas rocosas y tienen comunidades marcadamente distintas, no fueron contempladas en el presente trabajo.

Todos los muestreos fueron realizados durante la primavera austral, entre el 1/10/2023 y el 21/11/2023. Se restringieron arbitrariamente y sin excepción para aquellos días en que la mínima altura de la bajamar fuera igual o menor a 0,4 metros según lo reportado en la Sección de Mareas del Departamento Oceanografía que pertenece al Sistema de Hidrografía Naval tomando como referencia el Puerto Patrón de Bahía Ushuaia (http://www.hidro.gov.ar/oceanografia/tmareas/form_tmareas.asp). Este criterio se estableció a los fines de homogeneizar la localización de los muestreos en el intermareal más bajo y así mejorar el aspecto comparativo entre intermareales muestreados en diferentes días/meses. Del conjunto total de días que superaron los criterios establecidos, se aleatorizaron los n = 15 días de muestreo necesarios para completar el diseño de muestreo. Durante la bajamar, los ocho integrantes del equipo técnico se subdividieron en cuatro equipos de dos personas para completar cada uno de ellos un total de 5 a 6 cuadrantes por día (Figura 17).



Figura 17. Muestreo biológico con cuadrantes en el intermareal.

Con el objetivo de minimizar el impacto ambiental que supone la colecta de organismos bentónicos durante el muestreo, se realizó *in situ* la asignación taxonómica y la cuantificación. Sin embargo, debido a la diversidad de Phyla registrados y el número de especies similares en apariencia externa, se optó por coleccionar organismos de referencia solo para aquellos taxa no discernibles en campo, para su posterior inspección bajo lupa en laboratorio. La tarea de asignación taxonómica de aquellos organismos no identificados en campo fue realizada por la Dra. Julieta Sánchez utilizando una lupa binocular Olympus C011 y claves para la identificación taxonómica de cada grupo particular (Figura 18). Cabe destacar que la labor de la Dra. Sánchez abarcó, no sólo la determinación de aproximadamente 100 ejemplares (trabajo que requirió acondicionamiento de los ejemplares en el laboratorio y horas de observación y asignación de los organismo bajo material óptico), sino además el trabajo de relevamiento de datos y asesoramiento en el campo, y la confección de las cartillas de identificación (junto a Mariano Rodriguez). Por otro lado, los datos de asignación específica fueron de suma importancia para seleccionar los ejemplares sobre los que se obtuvieron los códigos de barras genéticos (ver inciso 3).



Figura 18. Fotografía en lupa y a campo de algunos de los ejemplares sobre los cuales se requirió determinación taxonómica (trabajo realizado por Julieta Sánchez).

2.e. Registro de parámetros ambientales

En cada Área, el equipo técnico obtuvo la temperatura superficial del mar, la salinidad, el Ph, el potencial de óxido-reducción y la conductividad mediante una sonda multiparamétrica Horiba propiedad del ICPA-UNTDF (Figura 19).

Para medir los niveles de materia orgánica en sedimento se tomaron muestras aleatorias (30 gramos de sedimento superficial) en cada área de muestreo. El porcentaje de materia orgánica total (MOT) fue determinado por el método de calcinación (Heiri et al. 2001).



Figura 19. Relevamiento de parámetros ambientales en agua superficial costera con la sonda multiparamétrica Horiba.

Además, se tomaron muestras de agua de mar para determinar los siguientes parámetros: turbiedad, sólidos disueltos totales, demanda química de oxígeno, coliformes fecales y totales. Los parámetros fueron medidos por DPOSS y por el Laboratorio IACA de Bahía Blanca (Buenos Aires). Sin embargo, las muestras enviadas desde la ciudad de Ushuaia a Buenos Aires pasaron demasiado tiempo antes de ser analizadas y por ello las lecturas no resultaron confiables.

Esta información fue tabulada y utilizada para caracterizar ambientalmente cada zona de muestreo. Se utilizó la matriz de parámetros físico-químicos del agua, los datos de nutrientes (carbono y nitrógeno/fósforo; ver detalles en el capítulo 6) y los datos de laboratorio a nivel de *Sitio* (quince, tres por *Localidad*) para vincularlos estadísticamente con la variación espacial en la comunidad biótica y así inferir el grado y la dirección de los cambios asociados al impacto. Cabe mencionar que el alcance espacial de los efectos producidos por efluentes vertidos a la costa por el dispersor estará condicionado no solo por la magnitud y tipo de descarga, sino también por la tasa de difusión y dilución, que a su vez dependen de condiciones oceanográficas (mareas, corrientes, etc.) climatológicas (vientos, etc.) que son

variables a lo largo del año en el área estudio. Por ello, determinar a qué escala espacial es posible detectar un potencial impacto es de sumo interés en fase de evaluación y para el futuro monitoreo ambiental.

2.f. Tratamiento y análisis estadísticos de datos

Es generalmente aceptado que la comunidad completa es más sensible a cambios ambientales respecto de especies individuales, aún cuando se trata con especies indicadoras o con índices univariados que resumen características de una comunidad (por ejemplo la riqueza específica). Sin embargo, estudios sobre efectos de la contaminación de las aguas residuales en comunidades marinas se han realizado utilizando métodos univariados (Otway et al. 1996, Roberts 1996b, Underwood & Chapman 1996) o multivariados (Clarke 1993, Smith & Simpson 1993). Pocos estudios se beneficiaron de una combinación de ellos (Chapman et al. 1995, Roberts et al. 1998). Underwood y Peterson (1988) y Warwick (1993) enfatizaron la necesidad de utilizar ambas técnicas de análisis como un enfoque integrado. En el presente trabajo, se asumió que el uso de diferentes análisis a distintos niveles de organización biológica aumenta la capacidad de detección de impacto.

La representatividad del muestreo experimental se evaluó mediante el procedimiento propuesto por Jiménez-Valverde y Hortal (2003) utilizando el programa EstimateS (Colwell 2009). Se calculó la curva de acumulación esperada de especies según las fórmulas propuestas por Colwell et al. (2004). A la gráfica de acumulación de riqueza especies (eje Y) por unidades de muestra (eje X) se ajustó el Modelo de Regresión de Clench mediante el algoritmo de Quasi-Newton basado en las derivadas primera y segunda de la *loss function* (función que describe el error en el ajuste del modelo a los datos observados) (StatSoft 2001). De esta manera se evalúa si el inventario es suficientemente completo y altamente confiable. De todas maneras, debe tenerse presente que un inventario real no llega a completarse nunca (Gotelli & Colwell 2001) y claramente la estimación final del número de especies depende de la resolución espacial (y temporal) del muestreo; siendo

fundamental que las estimaciones de riqueza especifiquen el área de recolección de muestras y el método de colecta (Adler & Lauenroth 2003).

Los datos de CMB fueron sometidos a distintas transformaciones con la finalidad de reducir la influencia de las especies muy abundantes. Se utilizaron gráficos de sombra (Clarke et al. 2014) para determinar que la intensidad más adecuada de transformación es la raíz cuarta. La dis-similitud entre los cuadrantes de cada intermareal por cada *Localidad/Sitio/Área* fue calculada con el índice de Bray-Curtis. Los datos de especies fueron estandarizados por el total y la dis-similitud entre cada una de ellas fue cuantificada con el índice de asociación de Whittaker (1972). Con esta matriz se realizó un análisis de *clusters* para reconocer los patrones de co-ocurrencia de las especies. Se utilizó un gráfico de sombras ordenados en el eje de Y por la co-ocurrencia y en el eje X por las *Localidades* ordenadas según sean potencialmente “impactada” o “referencia” para tener una primera impresión sobre el estado (riqueza y abundancia) de la CMB en el intermareal del área central del CB. Este gráfico permite identificar especies indicadoras de *Localidades* según su *Condición*. Como es de interés cuantificar que especies causan las agrupaciones dentro y las diferencias entre cada condición se empleó el análisis SIMPER (similarity percentages) (Clarke 1993). De esta manera se puede discriminar qué especies contribuyen más a tipificar o discriminar las *Localidades* en función de su *Condición*. Este análisis se realizó utilizando la matriz biótica transformada y el coeficiente de similaridad de Bray Curtis como medida de dis-similaridad (Bray & Curtis 1954).

La variación total de la matriz de dis-similitud entre *Localidades/Sitios/Áreas* se descompuso con un modelo lineal multifactorial utilizando Análisis de Varianza Multivariado por Permutaciones (PERMANOVA, Anderson 2001, 2007). Las hipótesis nulas se generaron utilizando 9.999 permutaciones de los residuos bajo el modelo reducido (Anderson & Ter Braak 2003). El método utilizado fue la permutación sin restricciones de datos brutos con sumas de cuadrados de Tipo III, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ considerado significativo. La importancia relativa de cada escala espacial se identificó como la raíz cuadrada relativizada del componente de variación de *Localidades, Sitios, Áreas y Cuadrantes* en el modelo

final. La hipótesis nula de igual dispersión dentro de cada *Localidad* (homogeneidad de varianza multivariada) se realizó mediante la prueba PERMIDISP (Anderson 2006). PERMANOVA es considerado robusto frente a la falta de homogeneidad de la varianza, particularmente cuando el diseño de muestreo es balanceado y cuando se cuenta con un buen número de muestras como en el caso de este estudio. Cuando el contraste de algún factor no alcanzó suficientes unidades permutables para obtener una prueba de permutación razonable, se optó por obtener un valor p utilizando una muestra aleatoria de Monte Carlo sobre la distribución de permutación asintótica (Anderson & Robinson 2003).

Luego, para visualizar el patrón de similitud entre *Localidades/Sitios/Áreas*, se estimaron los centroides y se proyectaron mediante Análisis de Coordenadas Principales (Gower 1966) en gráficas de dos dimensiones. Los centroides en el espacio multivariado definido por Bray Curtis no son necesariamente métricos (Anderson 2001). Por ello, se optó por calcular las coordenadas principales (Gower 1966) sobre la matriz de dis-similitud de todos los pares de muestras preservando las medidas de Bray Curtis, pero proyectarlas en un espacio euclidiano. El diseño de muestreo utilizado en este trabajo, permite cuantificar los efectos en una variedad de escalas espaciales (desde kilómetros a pocos centímetros) pero no a escala temporal. A escala espacial, la expectativa asumiendo que las descargas de efluentes perturban la estructura y composición del macrobentos, es encontrar un gradiente de impacto biótico que debería disminuir conforme aumenta la distancia desde la salida del efluente. Si este gradiente ambiental y biótico se cumple, debería hallarse un patrón de agrupamiento de muestras de CMB que no reflejan un patrón longitudinal de cercanía en distancias geográficas (i.e. en el sentido Este-Oeste o viceversa), sino que reflejan un gradiente de calidad ambiental donde las muestras de comunidades bióticas de condiciones impactadas deberían parecerse más entre sí que respecto de muestras bióticas tomadas en zonas no impactadas. Podría esperarse, además, que distintas fuentes de contaminación perturben la CMB de manera diferencial y por lo tanto hallar agrupamientos de *localidades* dentro de la condición impactada.

La matriz abiótica consistió de 8 (ocho) variables: Temperatura °C, PH, Salinidad, Sólidos Disueltos Totales (SDT), Turbidez, Materia Orgánica Total (Mot), Coliformes Totales (Col_Tot) y Fósforos Totales (P-PO4). La variable Coliformes Totales mostró una alta correlación ($>0,9$) con los valores de Coliformes fecales y por lo tanto no fue considerada en los análisis de relación con la matriz biótica. Misma aclaración es válida para Carbono Total y NPOC (materia orgánica disuelta, no particulada) respecto de Fósforos totales. DBO no mostró variación entre las *Localidades* y por ello fue excluida del análisis.

Debido a las diferencias de magnitud entre las diferentes variables y las unidades de medida en que se registran cada una de ellas, se optó por transformar con raíz cuadrada a SDT y Col_Tot. La matriz completa fue normalizada (escalamiento a valores entre 0 y 1) previo a los análisis estadísticos. En primera instancia (1), con esta matriz ambiental completa se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para ordenar los sitios dentro de cada localidad. En segunda instancia (2), se aisló de la matriz abiótica el sub-conjunto de variables que *a priori* tienen una relación más directa con la condición de impacto. Según Diodato et al. (2018) sitios más impactados son aquellos que presentan valores típicos de sistemas eutrofizados por actividades humanas (altos valores de nitrógeno, fósforo, materia orgánica, sólidos en suspensión, y baja concentración de oxígeno disuelto), registrando además altos valores de bacterias coliformes fecales lo que indica una clara contaminación por materia fecal. Es decir, en esta segunda instancia de análisis no se contemplaron las variables tomadas con Horiba que fueron registradas para caracterizar el ambiente (Temperatura, PH, Salinidad) donde se tomaron las muestras con intención de particularizar la interpretación sobre el efecto de los efluentes sobre el medio ambiente y sobre la comunidad macro-bentónica. Para ello se realizó primeramente una exploración visual, incorporando las variables al ordenamiento (PCO) resultante de la matriz biótica.

Para inferir el grado de variación en matriz biótica que es explicado por variaciones de la matriz abiótica, se corrió primeramente el procedimiento BEST (Bio-Env) para distinguir las variables más informativas. Este procedimiento computa un coeficiente de correlación escogido, el no paramétrico de Spearman en

este caso, para el ranking de similaridad de la matriz biótica y abiótica con la ventaja de que añade un test de permutaciones para averiguar si la correlación entre ambas matrices puede deberse al azar. Las variables asociadas al impacto fueron utilizadas para correr un LINKTREE (Clarke et al. 2008). Este análisis permite ver en un gráfico arborescente como las variables abióticas dividen las muestras biológicas, trazando límites de las variables seleccionadas. Las divisiones son binarias y están basadas en la optimización del estadístico R que se utiliza en ANOSIM y, por lo tanto, la técnica está basada en rangos

Finalmente se construyó un modelo lineal basado en distancias (DistLM) fue utilizado en combinación con el análisis de ordenación de redundancia basado en distancias (dbRDA) para explorar la hipótesis de cuanta variación de la comunidad macrobentónica del Canal Beagle puede ser explicada a través de variables ambientales (Legendre & Anderson 1999, McArdle & Anderson 2001). El análisis DISTLM modela la relación entre variables ambientales y los datos de composición y abundancias de macroinvertebrados a través de un modelo de regresiones múltiples. Los resultados de DISTLM son visualizados en un espacio multidimensional a través de la ordenación realizada con la rutina el dbRDA. El procedimiento dbRDA permite operar con matrices basadas en distancias no Euclidianas para datos biológicos (distancia de Bray-Curtis), para posteriormente entregar un set de coordenadas que representan los resultados en un espacio Euclidiano (Anderson et al. 2008). dbRDA representa el mejor modelo basado en una, dos, o más variables, de acuerdo con el criterio seleccionado; en este caso el BIC (Clarke & Gorley 2015).

2.g. Resultados de las comunidades macro-bentónicas.

Los relevamientos con los cuadrantes resultaron en la determinación de 106 taxas en la CMB, pudiendo ser más especies dado que en algunos casos la determinación taxonómica alcanzada para algunos grupos de individuos fue de la categoría *familia* o superior. Los taxas, en orden de mayor a menor diversidad pertenecieron a los siguientes Phyla: Moluscos (35 sp.), Anélidos (25 sp.),

Equinodermos (12 sp.), Cnidarios (9 sp.), Artrópodos (8 sp.), Cordados (7 sp.), Poríferos (6 sp.), Platelminfos (1 sp.), Nemátodos (1 sp), Briozoos (1 sp) y Nemertinos (1 sp.) (Tabla 2).

Tabla 2. Lista sistemática de especies determinadas con un N muestral = 300 cuadrantes. Se distinguió en lo posible Especie, Familia, Clase y Phylum. CM = Comunidad macro-bentónica. Las "x" indican las especies que fueron consideradas en los análisis estadísticos de comunidades.

Espece	Familia	Clase	Phylum	CM	Espece	Familia	Clase	Phylum	CM
<i>Eurhomalea exalbida</i>	Veneridae	Bivalvia	Mollusca	x	<i>Asterina fimbriata</i>	Asterinidae	Asterozoa	Echinodermata	x
<i>Tegula atra</i>	Tegulidae	Bivalvia	Mollusca		<i>Loxechinus albus</i>	Patellogastropoda	Echinozoa	Echinodermata	x
<i>Tawera elliptica</i>	Veneridae	Bivalvia	Mollusca	x	<i>Arbacia dufrenoyi</i>	Arbaciidae	Echinozoa	Echinodermata	
<i>Venus antiqua</i>	Veneridae	Bivalvia	Mollusca		<i>Pseudechinus</i>	Temnopleuridae	Echinozoa	Echinodermata	x
<i>Hiatella solida</i>	Hiatellidae	Bivalvia	Mollusca	x	<i>Ophiactis asperula</i>	Ophiactidae	Ophiurozoa	Echinodermata	x
<i>Aulacomya atra</i>	Mitilidae	Bivalvia	Mollusca		<i>Ophiopragmus chilensis</i>	Amphiuridae	Ophiurozoa	Echinodermata	x
<i>Brachidontes purpuratus</i>	Mitilidae	Bivalvia	Mollusca		<i>Chiridota pisanii</i>	Chiridotidae	Holothurozoa	Echinodermata	x
<i>Mytilus edulis</i>	Mitilidae	Bivalvia	Mollusca		<i>Psolus patagonicus</i>	Psolidae	Holothurozoa	Echinodermata	x
<i>Limatula pygmaea</i>	Limidae	Bivalvia	Mollusca		<i>Pentactella leonina</i>	Cucumariidae	Holothurozoa	Echinodermata	x
<i>Chiton magnificus</i>	Chitonidae	Polyplacophora	Mollusca		<i>Holothuria sp 1</i>	Physalidae	Holothurozoa	Echinodermata	
<i>Tonica lebruni</i>	Chitonidae	Polyplacophora	Mollusca	x	<i>Holothuria sp 2</i>	Physalidae	Holothurozoa	Echinodermata	
<i>Plaxiphora aurata</i>	Mopaliidae	Polyplacophora	Mollusca	x	<i>Hermadion rhizoicola</i>	Polynoidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Ischnochiton stramineus</i>	Ischnochitonidae	Polyplacophora	Mollusca	x	<i>Cirratulus cirratus</i>	Cirratulidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Nacella magellanica</i>	Nacellidae	Gastropoda	Mollusca	x	<i>Echiurus chilensis</i>	Echiuridae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Nacella deaurata</i>	Nacellidae	Gastropoda	Mollusca	x	<i>Capitella capitata</i>	Capitellidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Nacella flammea</i>	Nacellidae	Gastropoda	Mollusca	x	<i>Phragmatopoma sp.</i>	Sabellariidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Nacella mytilina</i>	Nacellidae	Gastropoda	Mollusca	x	<i>Eulalia sp.</i>	Phyllodoceidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Nacella sp juveniles</i>	Nacellidae	Gastropoda	Mollusca	x	Nereididae	Nereididae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Pareuthria plumbea</i>	Cominellidae	Gastropoda	Mollusca	x	Serpulidae	Serpulidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Pareuthria serialis</i>	Cominellidae	Gastropoda	Mollusca	x	Spionidae	Spionidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Acanthina monodon</i>	Muricidae	Gastropoda	Mollusca	x	Isopillidae	Isopillidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Margarella violacea</i>	Calliostomidae	Gastropoda	Mollusca	x	Owenidae	Owenidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Margarella expansa</i>	Calliostomidae	Gastropoda	Mollusca		Terebellidae	Terebellidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Trophon geversianus</i>	Muricidae	Gastropoda	Mollusca	x	Arenicolidae	Arenicolidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Trophon plicatus</i>	Muricidae	Gastropoda	Mollusca		Glyceridae	Glyceridae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Xymenopsis muriciformis</i>	Muricidae	Gastropoda	Mollusca	x	Pectinariidae	Pectinariidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Fissurella picta</i>	Fissurellidae	Gastropoda	Mollusca	x	Maldanidae	Maldanidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Fissurella oriens</i>	Fissurellidae	Gastropoda	Mollusca	x	Fauveliopsidae	Fauveliopsidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Fissurella patagonica</i>	Fissurellidae	Gastropoda	Mollusca		Sabellidae	Sabellidae	Polychaeta	Annelida	x
<i>Siphonaria lessoni</i>	Siphonariidae	Gastropoda	Mollusca	x	Capitellidae	Capitellidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Trochita pileus</i>	Calyptidae	Gastropoda	Mollusca		Polynoidae	Polynoidae	Polychaeta	Annelida	
<i>Savattia areolata</i>	Tudicidae	Gastropoda	Mollusca	x	Echiuridae	Echiuridae	Polychaeta	Annelida	
<i>Nodilittorina araucana</i>	Littorinidae	Gastropoda	Mollusca	x	<i>Oligoquetta sp</i>	Familia	Oligochaeta	Annelida	
<i>Calyptrea pileolus</i>	Calyptidae	Gastropoda	Mollusca		<i>Hirudineo sp</i>	Familia	Hirudinea	Annelida	
<i>Fusitriton magellanica</i>	Cymatiidae	Gastropoda	Mollusca		<i>Haliclona porcelana</i>	Chalinidae	Demospongiae	Porifera	x
Amphipoda	Amphipoda	Malacostraca	Arthropoda	x	<i>Clionaopsis platei</i>	Clionidae	Demospongiae	Porifera	x
Isopoda	Isopoda	Malacostraca	Arthropoda	x	<i>Crambe chilensis</i>	Crambeidae	Demospongiae	Porifera	x
<i>Halicarcinus planatus</i>	Hymenomatidae	Malacostraca	Arthropoda	x	<i>Crellomima sp</i>	Crellidae	Demospongiae	Porifera	
<i>Pagurus comptus</i>	Paguridae	Malacostraca	Arthropoda		Porifero sp 1	Familia	Demospongiae	Porifera	
<i>Peltarium spinosolum</i>	Trichopeltariidae	Malacostraca	Arthropoda		Porifero sp 2	Familia	Demospongiae	Porifera	
<i>Grimothoa gregaria</i>	Munididae	Malacostraca	Arthropoda		<i>Parbolasia corrugatus</i>	Lineidae	Pilidiophora	Nemertea	x
<i>Balanus laevis</i>	Balanidae	Thecosstraca	Arthropoda	x	<i>Golfingia margaritacea</i>	Golfingiidae	Sipuncula	Annelida	x
<i>Notobalanus flosculus</i>	Archaeobalanidae	Thecosstraca	Arthropoda	x	<i>Sipunculido sp1</i>	Sipunculidae	Sipuncula	Annelida	
<i>Parantheopsis cruentata</i>	Actiniidae	Anthozoa	Cnidaria	x	<i>Bryozoo sp</i>	Familia	Clase	Bryozoa	
<i>Isoparactis fionae</i>	Isanthidae	Anthozoa	Cnidaria	x	<i>Nematodo sp</i>	Familia	Clase	Nematoda	x
<i>Bunodactis octoradiata</i>	Actiniidae	Anthozoa	Cnidaria	x	<i>Policlado sp</i>	Familia	Turbellaria	Platyhelminthes	
<i>Antholoba aches</i>	Actinostolidae	Anthozoa	Cnidaria	x	<i>Hemicordado sp</i>	Familia	Clase	Hemichordata	
<i>Anémone sp 1</i>	Familia	Anthozoa	Cnidaria		Ascidia sp	Asciidae	Ascidiacea	Chordata	
<i>Anémone sp 2</i>	Familia	Anthozoa	Cnidaria		<i>Austrolycus depressiceps</i>	Zoarcidae	Teleostei	Chordata	x
<i>Anémone tubicola sp 1</i>	Zoanthidae?	Anthozoa	Cnidaria		<i>Dadyanos insigne</i>	Zoarcidae	Teleostei	Chordata	
<i>Anémone tubicola sp 2</i>	Zoanthidae?	Anthozoa	Cnidaria		<i>Harpagifer bispinis</i>	Harpagiferidae	Teleostei	Chordata	x
<i>Pennatulaceo sp</i>	Familia	Anthozoa	Cnidaria		<i>Patagonothoten comucula</i>	Nototheniidae	Teleostei	Chordata	x
<i>Anasterias antarctica</i>	Asteriidae	Asterozoa	Echinodermata	x	<i>Patagonothoten tesellata</i>	Nototheniidae	Teleostei	Chordata	

Para los análisis de comunidad, no se consideraron aquellos taxones cuya determinación fue posible sólo a altos niveles de la escala taxonómica y/o cuando la abundancia de la especie o grupo taxonómico de mayor nivel no superó el 1% del

total de individuos. La lista definitiva de taxones incluidos en los análisis de comunidades se denota con un "CM" en la Tabla 2.

El modelo de Clench para las 300 unidades muestrales sobre la base biótica depurada (i.e aquellas con CM = "x" en la Tabla 2) demostró un muy buen ajuste y una correcta representación (98,1% del total) de la diversidad macrobentónica del CB. Este modelo indicó que a partir de la muestra número 100 aproximadamente se alcanzó el máximo valor teórico de diversidad. La riqueza teórica es levemente superior (64,3) a la hallada en campo (63), pero hallar esa diferencia insumiría un esfuerzo de muestreo desproporcionadamente grande.

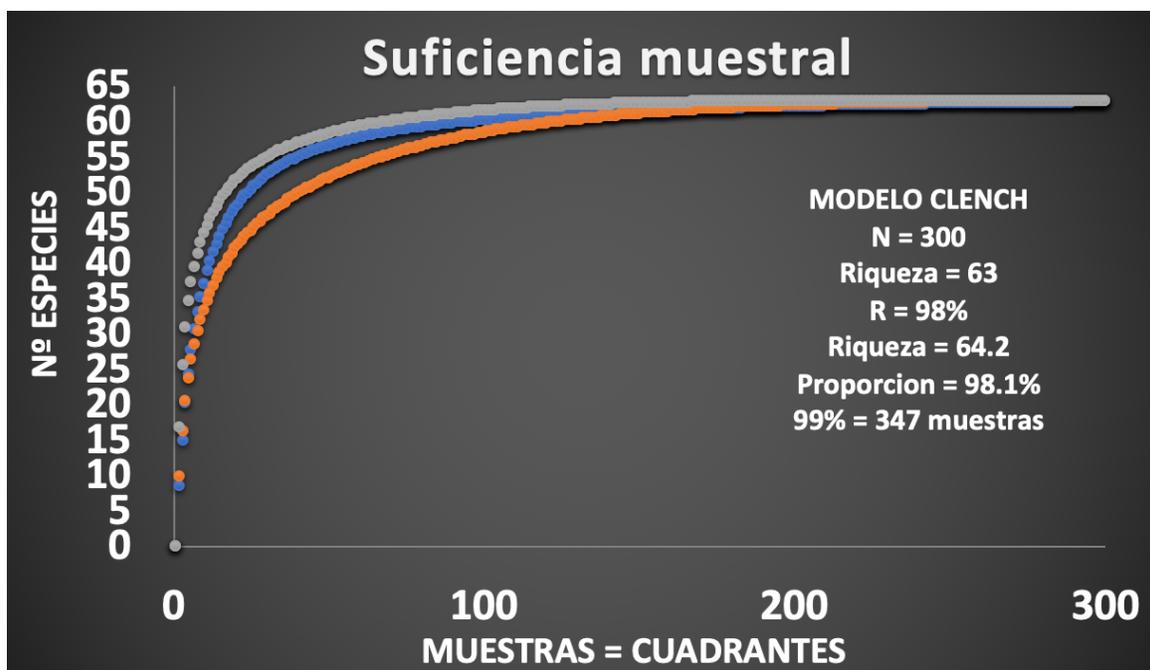


Figura 20. Curva de acumulación de especies (línea azul) y los intervalos de confianza al 95% ajustados por un modelo de Clench.

A partir de la base de datos depurada, se calculó el promedio de la riqueza específica (diversidad alfa) para las distintas *Localidades* dentro de cada *Condición* y se halló un patrón de defaunación consistente con la distancia desde los focos de contaminación ambiental. El promedio de riqueza en condiciones no impactadas fue de 34,7 sp., aun cuando se estimó a través de una superficie menor de muestreo, y fue mayor que el de condiciones impactadas (23,9 sp.) (Figura 21).

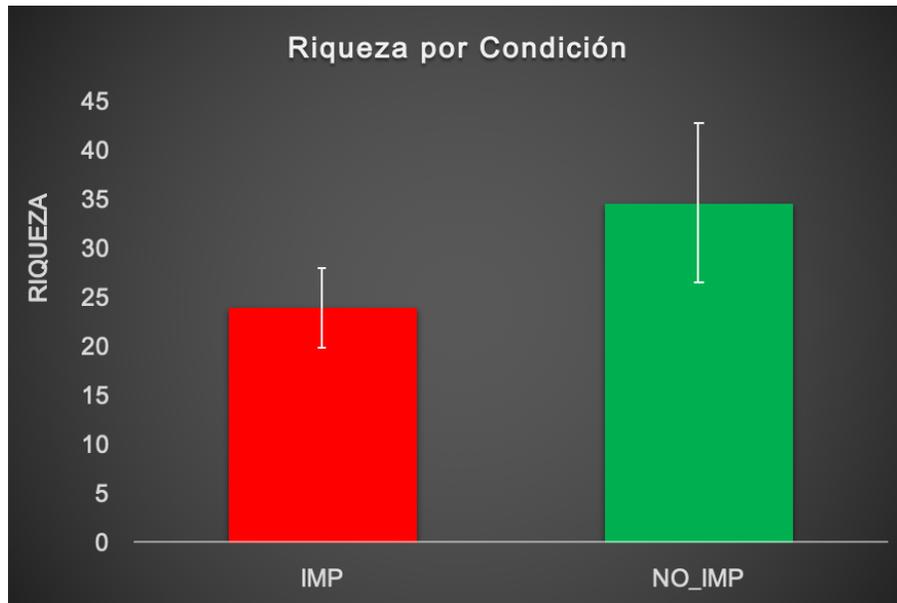


Figura 21. Gráfico de barras del número de especies promedio con sus respectivos desvíos (líneas blancas) de localidades no impactadas (barra verde) e impactadas (barra roja).

Aunque el patrón de empobrecimiento se mantiene, el número promedio de especies obtenido por *Sitio* mostró mayor variabilidad. Entre localidades no impactadas la riqueza específica promedio fue similar, aunque con mayor variación en la Referencia Este, pero en ambos casos superior a todas las localidades impactadas (Figura 22). Entre estas últimas, se verificó que las localidades afectadas por los efluentes que vierte el Arroyo Grande cuentan con la menor riqueza específica (Figura 23).

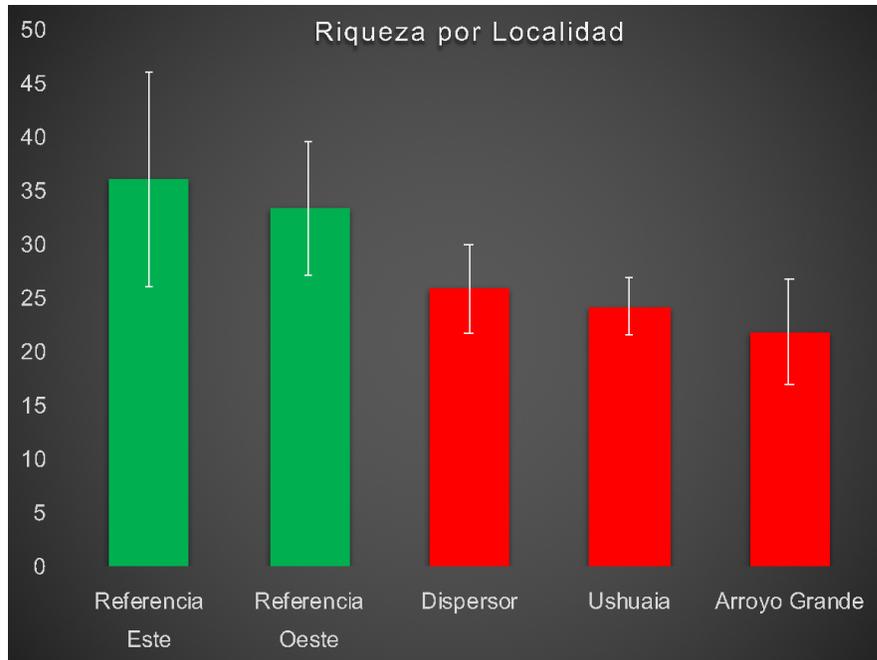


Figura 22. Gráfico de barras del número de especies promedio con sus respectivos desvíos (líneas blancas) de localidades no impactadas (barras verdes) e impactadas (barras rojas).

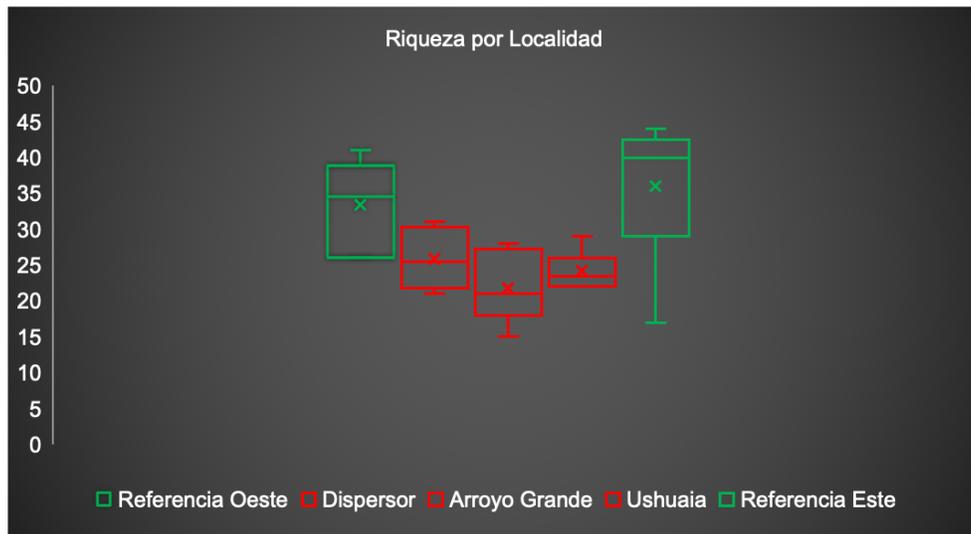


Figura 23. Gráfico de cajas y bigotes del número de especies promedio con sus respectivos desvíos en las cinco localidades. El tamaño de la caja indica el rango de valores entre el primer y tercer cuartil, la línea media indica la mediana, la cruz el promedio y los bigotes los límites de valores mínimos y máximos.

La riqueza por *Sitio* dentro de cada *Localidad* confirma el patrón (Figura 24), aunque se observó que un sitio dentro de la *Localidad* Ushuaia (impactada) tiene valores más próximos al promedio más bajo de riqueza de localidades no impactadas (como por ejemplo Ushuaia S11); y que un *sitio* de la *localidad* Referencia Este (no impactada) presentó valores promedio más próximos a *localidades* impactadas (como por ejemplo Referencia Este S13) (Figura 24 y 25).

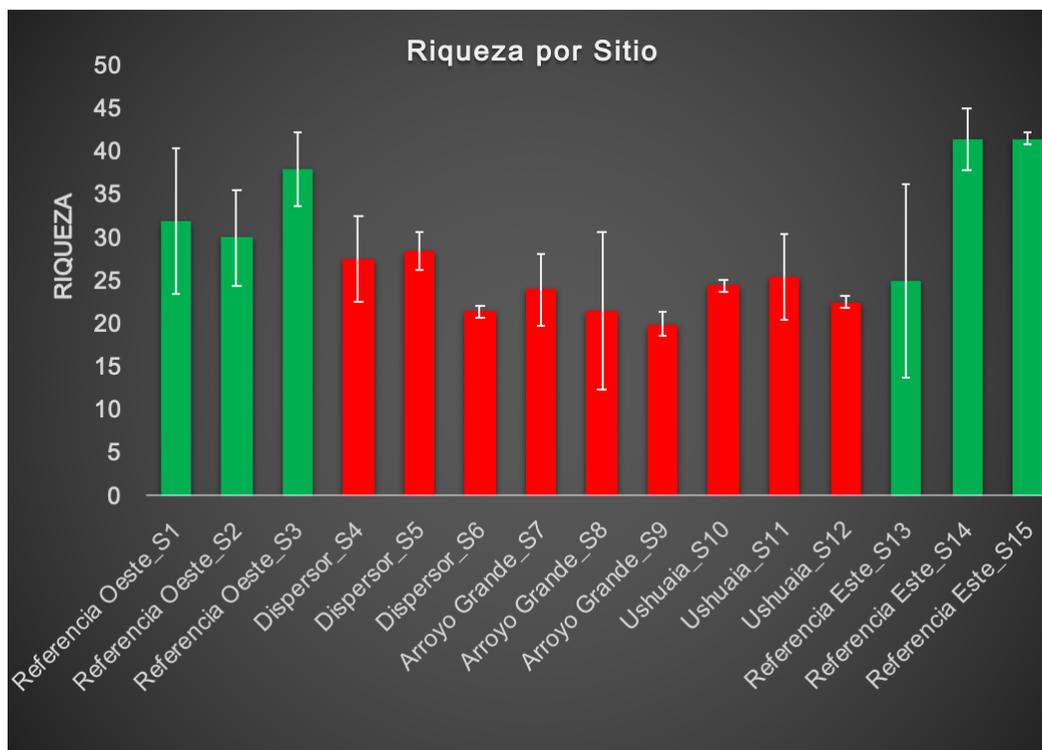


Figura 24. Gráfico de barras del número de especies promedio con sus respectivos desvíos (líneas blancas) de sitios no impactados (barras verdes) e impactadas (barras rojas).

Finalmente, el análisis a pequeñas escalas espaciales permitió identificar aquellos *sitios* donde las dos *áreas* muestreadas tienen una diversidad similar y donde dentro de cada *sitio* la riqueza específica fue disímil (Figura 25). Se demuestra que en al menos un *área* de la *localidad* Arroyo Grande, Ushuaia, Referencia Este y Oeste la riqueza estimada a través de 10 cuadrantes de 50 x 50 cm (2,5 metros cuadrados) varía considerablemente respecto del *área*

geográficamente más próxima. Estas áreas se muestran en tonalidades más claras en la figura 25.

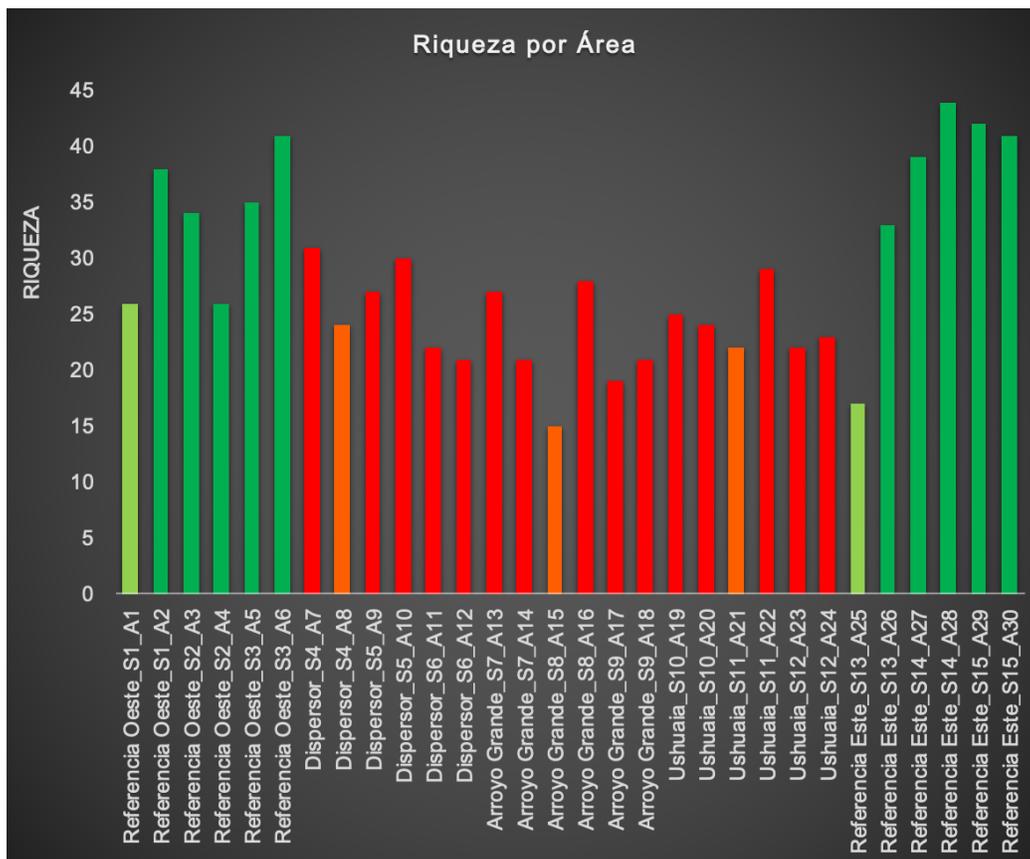


Figura 25. Gráfico de barras del número de especies promedio en áreas no impactadas (barras verdes) e impactadas (barras rojas).

Para visualizar mejor el patrón de riqueza por área, se mapeó la misma en forma de barras y en calor (Figura 26 y 27). La versión animada de la misma puede verse [https://drive.google.com/file/d/1zlpqh9vUJOURT3vEdZZuJo0fgul7Ldmb/view?usp=share link](https://drive.google.com/file/d/1zlpqh9vUJOURT3vEdZZuJo0fgul7Ldmb/view?usp=share_link)).

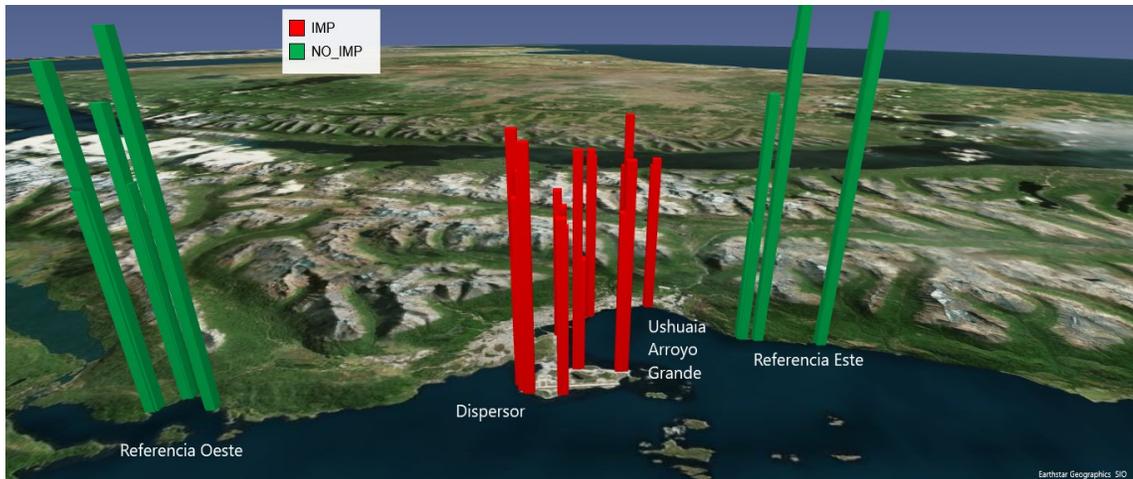


Figura 26. Diversidad específica por *Localidad* en barras verdes (NO_IMP = No impactado) y barras rojas (IMP = Impactado).

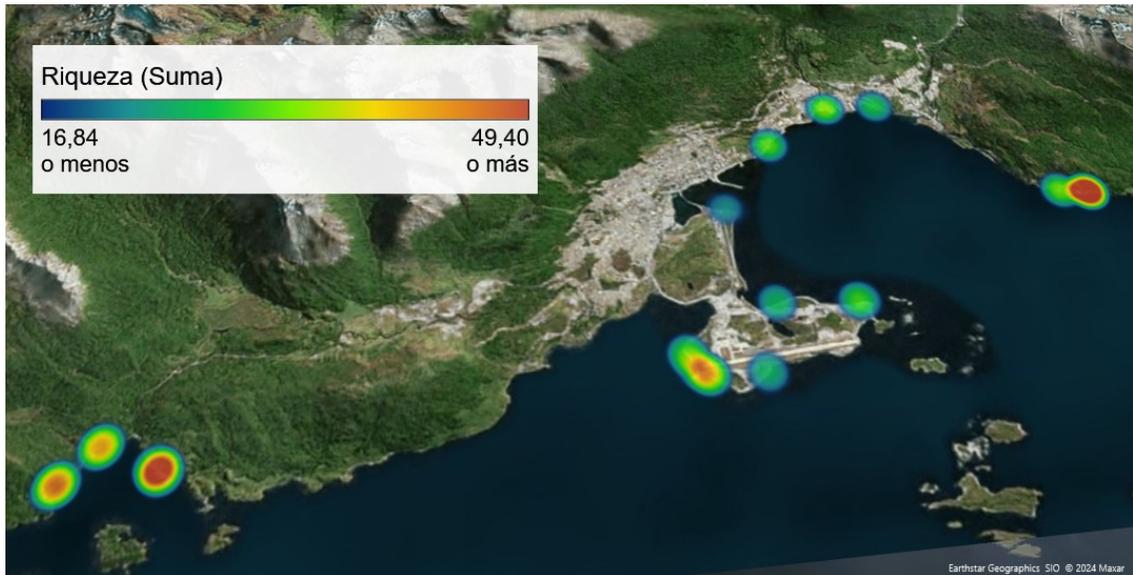


Figura 27. Diversidad específica por *Localidad* en forma de mapa de calor.

El gráfico de sombras ordenado muestra que existe un conjunto de especies que conforman la porción dominante de la CMB, es decir aquellas especies que están presentes y con alto número de individuos en la mayoría o todas las *localidades* independientemente de su *condición* (Figura 28). Éstas son *Nacella magellanica*, *N. deurata*, *N. flammea*, *N. juveniles*, *Pareuthria plumbea*, *Siphonaria lessoni*, Amphipoda, *Balanus laevi*, *Notobalanus flosculus*, *Parbolasia corrugatus* y

las familias Nereididae y Glyceridae dentro de los Poliquetos (Grupo A en la figura 28). Además, puede apreciarse que los *Sitios* no impactados presentan un mayor número de especies; que muchas especies se presentan en abundancias bajas; y que hay conjuntos de especies que tienden a co-ocurrir en *localidades* impactadas o no impactadas, pero no en ambos y entonces pueden ser identificadas como especies indicadoras de impacto vs. no impacto (Figura 28). Por ejemplo, *Halicarcinus planatus*, *Anasterias antarctica*, *Margarella violacea*, *Pseudoechinus magellanicus*, *Ophiactis asperula*, *Hermadion rhizoicola*, *Hiatella solida*, *Tonicia* sp., *Plaxiphora aurata*, *Ischnochiton stramineus* y la Familia Serpulidae dentro de los poliquetos, son mucho mas abundantes en ambas localidades anidadas dentro de la condición no impactada (Grupo B en la Figura 28). Sin embargo, *Capitella capitata*, *Eulalia* sp. y Nematoda fueron hallados en las localidades anidadas en la condición impactada (Grupo C en la Figura 28).

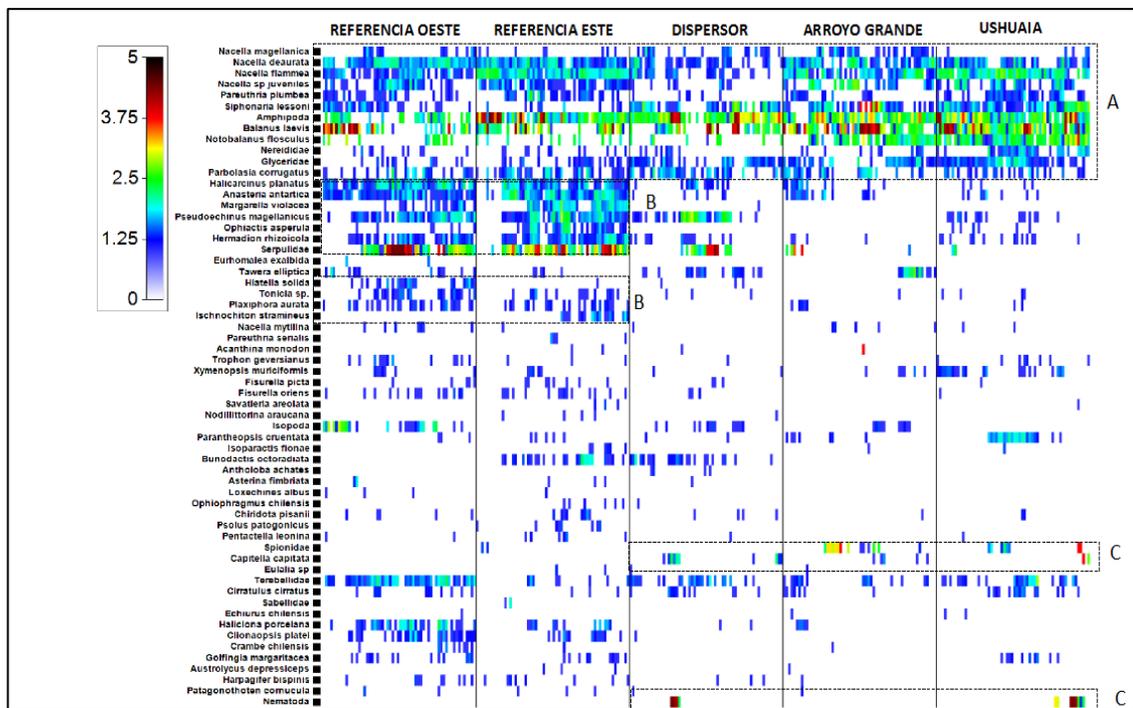


Figura 28. Gráfico de sombras donde se muestran las especies o grupos de especies en el eje Y, las *Localidades* en el Eje x (superior) entre líneas perpendiculares negras continuas. El recuadro punteado A denota el conjunto de especies dominantes del intermareal del Canal Beagle. El recuadro punteado B destaca un conjunto de especies con preferencia por ambientes no impactados. Y en el recuadro punteado C destaca dos especies con presencia en *Localidades*

impactadas. Arriba a la izquierda se muestra el gradiente de abundancia transformada con raíz cuarta.

El análisis de SIMPER identificó el conjunto de especies que explican las similitudes intra-grupo según el factor condición y las diferencias entre la condición impactada y no impactada considerando el promedio de su abundancia transformada (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Listado de especies o rango taxonómico mayor que explican las similitudes entre la condición no impactada e impactada en orden decreciente. Se destacan en negrita aquellas especies que aportan únicamente en cada grupo y con subrayado aquellas especies que si bien aparecen en ambos grupos sus abundancias son contrastantes. Prom_ Abund= promedio abundancia, Prom_Simil= promedio similitud, Dis/DS= disimilitud sobre desvío estándar, Contrib%= contribución porcentual, Cum.% = contribución porcentual acumulada. Taxones subrayados son los que se comparten entre condiciones y por lo tanto el aporte se debe a diferencias de abundancia; en negrita taxones particulares para cada condición.

	Condición sin impacto Similaridad: 47.51				
Especies	Prom_ Abund	Prom_Simil	Dis/DS	Contrib%	Cum.%
<u>Nacella deaurata</u>	1.56	5.63	2.22	11.85	11.85
<u>Nacella flammea</u>	1.48	4.75	1.5	9.99	21.85
Serpulidae	2.08	4.74	0.97	9.97	31.82
<u>Amphipoda</u>	1.71	4.33	0.84	9.11	40.93
Anasteria antartica	1.35	4.21	1.78	8.85	49.78
Halicarcinus planatus	1.3	3.81	1.41	8.02	57.8
Pseudoechinus magellanicus	1.18	2.94	1.11	6.19	64
<u>Balanus laevis</u>	1.49	2.89	0.58	6.09	70.08
	Condición impacto Similaridad: 44.95				
Especies	Prom_ Abund	Prom_Simil	Dis/DS	Contrib%	Cum.%
<u>Amphipoda</u>	2.37	11.32	1.77	25.19	25.19
<u>Balanus laevis</u>	2.03	6.76	0.99	15.03	40.22
Siphonaria lessoni	1.26	4.46	0.98	9.92	50.14
<u>Nacella flammea</u>	1.29	4.35	1	9.68	59.82
Notobalanus flosculus	1.28	3.65	0.67	8.12	67.94
<u>Nacella deaurata</u>	1.04	3.49	0.9	7.76	75.69

Tabla 4. Listado de especies o rango taxonómico mayor que explican las disimilitudes entre la condición no impactada (columna verde) e impactada (columna roja) en orden decreciente. Prom_abund= promedio abundancia, Prom_Dis= promedio de disimilitud, Dis/DS= disimilitud sobre desvío estándar, Contrib%= contribución porcentual, Cum% = contribución porcentual acumulada.

Condición	NO_IMP	IMP				
Species	Prom_Abund	Prom_Abund	Prom_Dis	Dis/DS	Contrib%	Cum%
Serpulidae	2.08	0.35	4.75	1.37	7.24	7.24
Balanus laevis	1.49	2.03	4.38	1.29	6.68	13.92
Amphipoda	1.71	2.37	3.61	1.21	5.5	19.42
Notobalanus flosculus	0.43	1.28	3.15	1.09	4.81	24.22
Anasteria antarctica	1.35	0.21	2.98	1.82	4.54	28.76
Halicarcinus planatus	1.3	0.22	2.89	1.65	4.41	33.17
Siphonaria lessoni	0.44	1.26	2.73	1.23	4.16	37.33
Pseudoechinus magellanicus	1.18	0.41	2.62	1.4	3.99	41.32
Nacella flammea	1.48	1.29	2.35	1.15	3.59	44.91
Nacella sp juveniles	0.89	0.62	2.24	1.19	3.41	48.32
Glyceridae	0.33	0.97	2.19	1.22	3.34	51.65
Nacella deaurata	1.56	1.04	2.14	1.13	3.26	54.91
Hermadion rhizoicola	0.95	0.19	2.08	1.31	3.18	58.09
Terebellidae	0.73	0.47	1.95	1.05	2.97	64.05
Pareuthria plumbea	0.6	0.39	1.61	1.02	2.45	66.5
Margarella violacea	0.67	0.01	1.57	0.83	2.39	68.89
Nacella magellanica	0.21	0.39	1.25	0.76	1.91	70.8

Los gráficos de coordenadas principales, calculados para los centroides del factor combinado de *Localidad x Sitio x Área*, permiten observar métricamente la relación de similitud de las muestras (n = 30) respecto de la composición y abundancia de la CMB. Se verificó que la CMB refleja un patrón acorde al gradiente ambiental del CB. En el sector izquierdo e inferior del gráfico se agruparon la gran mayoría de las muestras provenientes de la Referencia Oeste y Este, indicando que las comunidades en las *localidades* no afectadas por los efluentes son más similares entre sí, independientemente de que se encuentren en los extremos geográficos Oeste-Este del CB (Figura 29). Sin embargo, el *Área 1* del *Sitio 1* en la *Localidad* Referencia Oeste y el *Área 25* del *Sitio 13* en la *Localidad* Referencia Este se agruparon más próximas a *Localidades* impactadas Ushuaia y Arroyo Grande. Esto indica que existe variabilidad espacial en la CMB a escala de *Área* dentro de las dos

localidades no impactadas. Se evidenció una separación en el eje Y de la *Localidad* Dispensor con una mayor dispersión entre sus *Sitios-Áreas*, pero la separación se observó tanto respecto del resto de las *Localidades* de referencia como de las impactadas Ushuaia y Arroyo Grande.

Las *Localidades* Arroyo Grande y Ushuaia muestran superposición entre sí en el gráfico de ordenamiento, aunque están alejadas tanto de los *SitiosxÁreas* de las *Localidades* Referencia como así también de las del Dispensor (Figura 29).

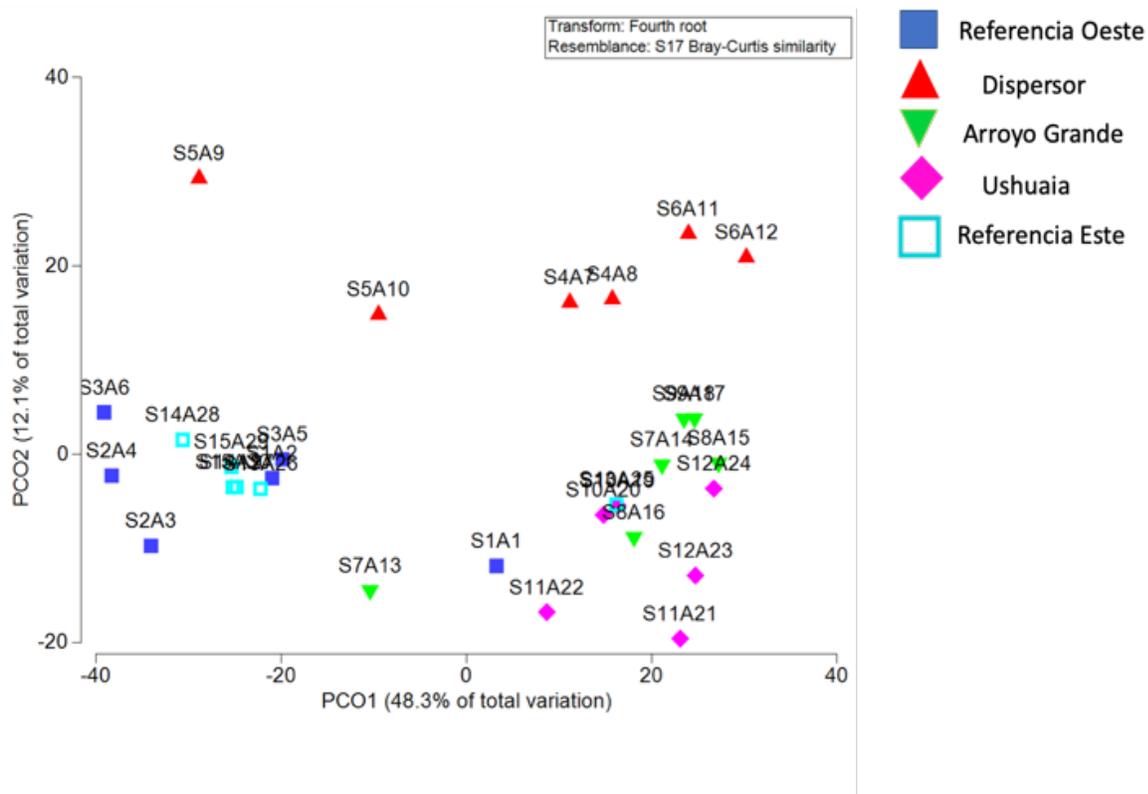


Figura 29. Ordenamiento de muestras por Área en cada Sitio por cada Localidad.

El mismo ordenamiento, pero superponiendo la riqueza de especies en cada Área demuestra que, al menos en parte, este patrón puede explicarse por la menor riqueza hallada en las áreas impactadas en contraposición con las no impactadas. Sin embargo, como se demostró en la figura 29 y 30, el Área 1 del Sitio 1 en la Localidad Referencia Oeste y el Área 25 del Sitio 13 en la Localidad Referencia Este poseen menor diversidad (Figura 30).

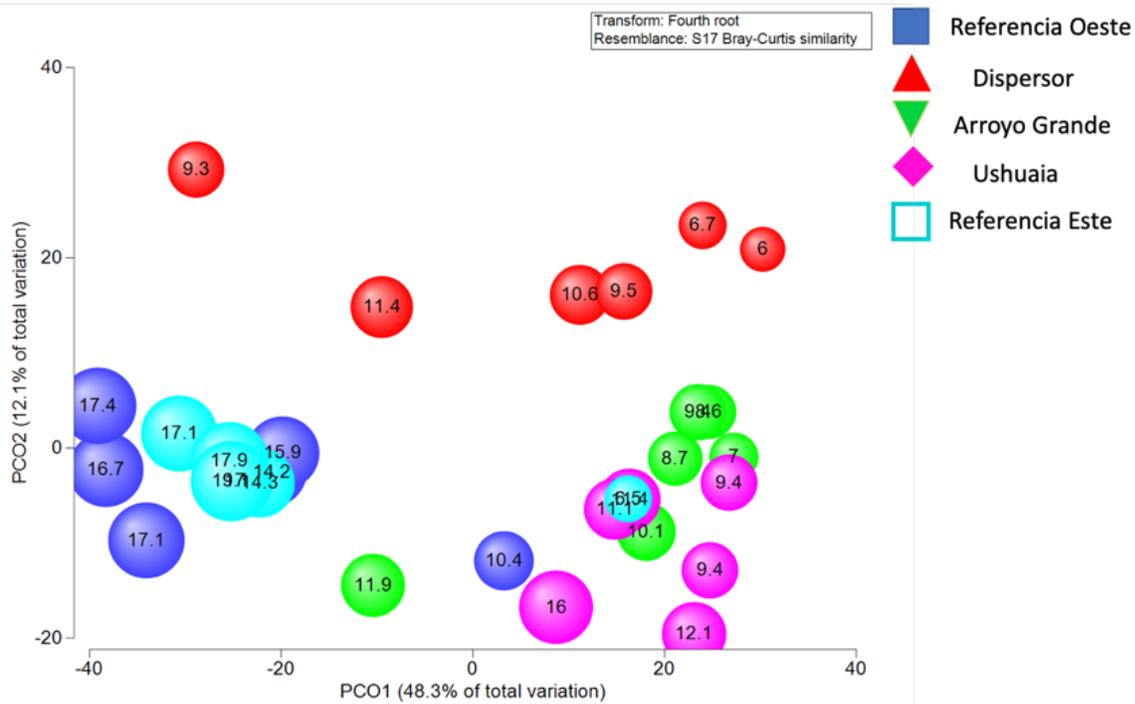


Figura 30. Ordenamiento de muestras por *Área* por *Sitio* por *Localidad* con superposición de burbujas, cuyo tamaño es proporcional al número promedio de especies registradas en cada *Área* dentro de cada *Localidad*.

Como es de esperar, el ordenamiento cuando se consideran los centroides del factor combinado *Localidad x Sitio* mejora el patrón y la cantidad de variación explicada en cada eje (Figura 31 y 32). La interpretación no varía, ya que se agruparon cercanamente entre sí los *Sitios* dentro de la condición de no impacto y se separaron de los *Sitios* impactados, aunque en este último caso, los *Sitios* de la *Localidad* Dispersor se alejaron del conjunto de *Sitios* que pertenecen a las *Localidades* del Arroyo Grande y Ushuaia.

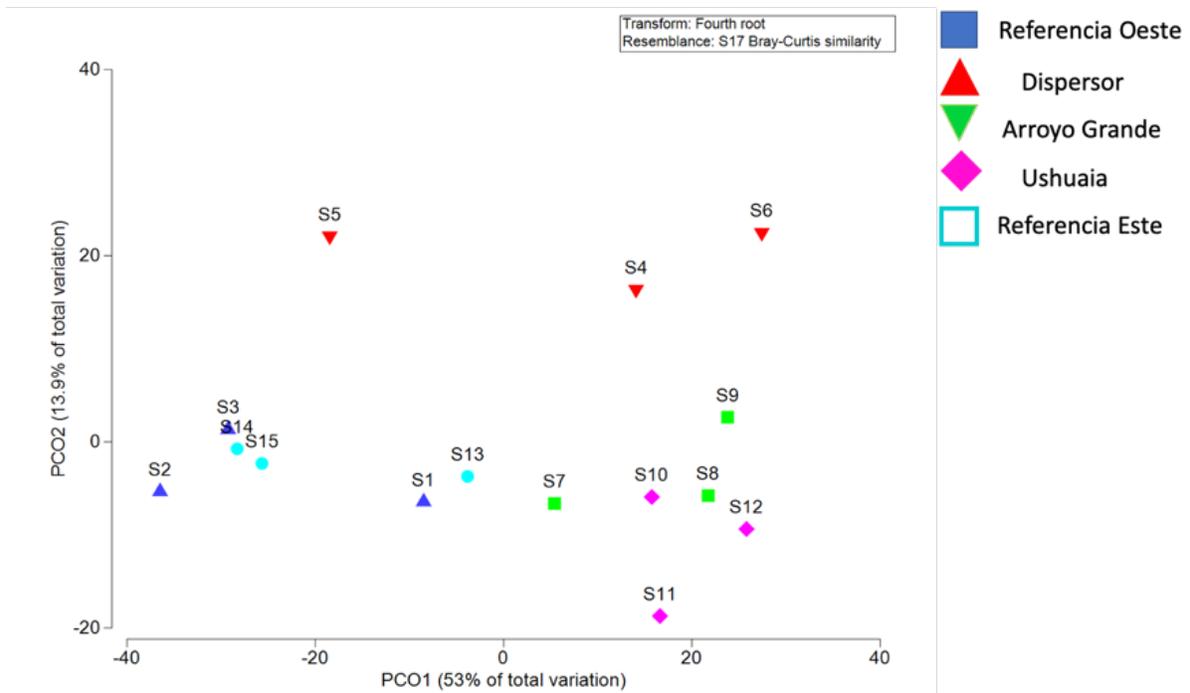


Figura 31. Ordenación de muestras por *Sitio* en cada *Localidad*.

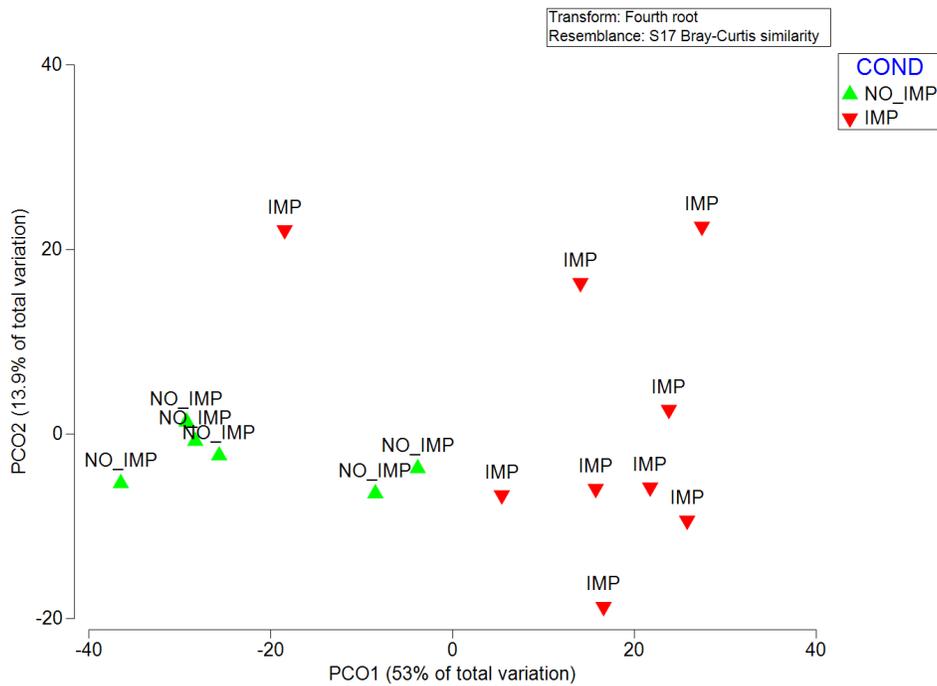


Figura 32. Ordenación de muestras por *Sitio* en cada *Condición*. *Sitios* No Impactados (NO_IMP) y *Sitios* Impactados (IMP).

Más aún, el agrupamiento de localidades entre sí y en función de su *condición* verifica una clara separación en el gradiente ambiental (Figuras 33 y 34).

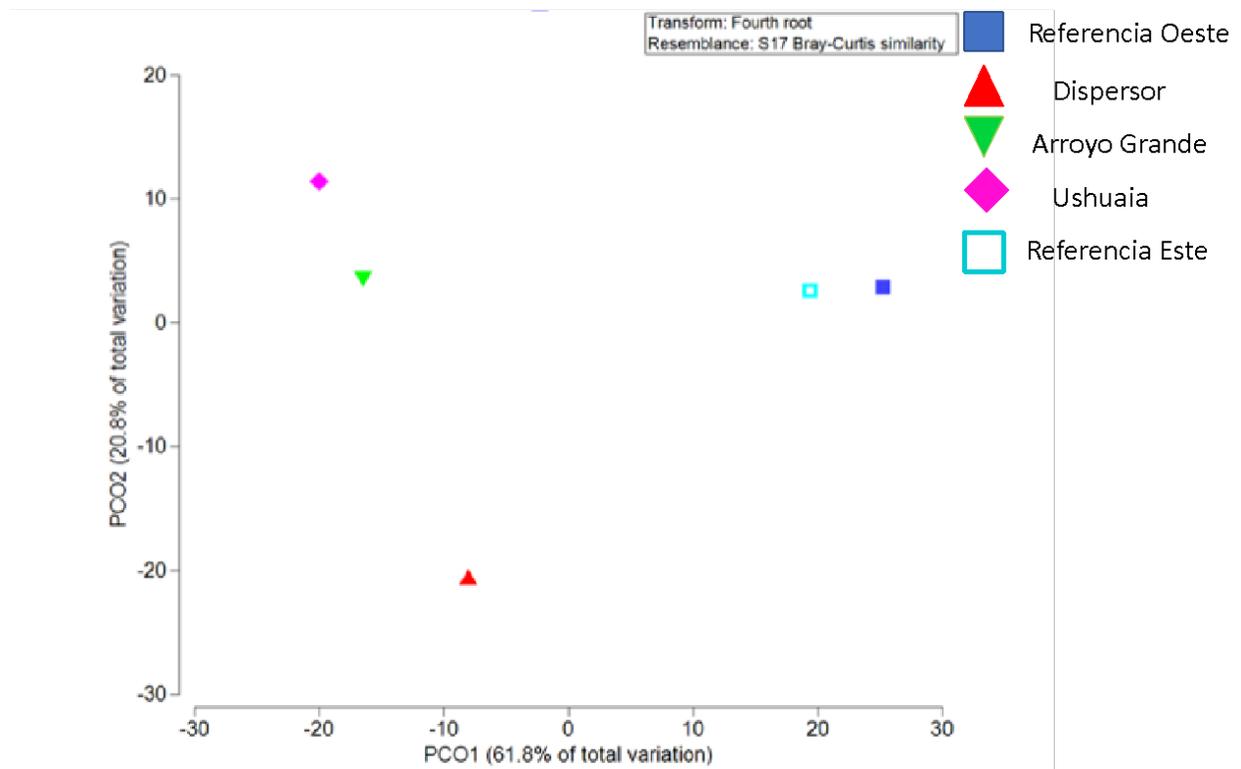


Figura 33. Ordenación de muestras por *Localidad*.

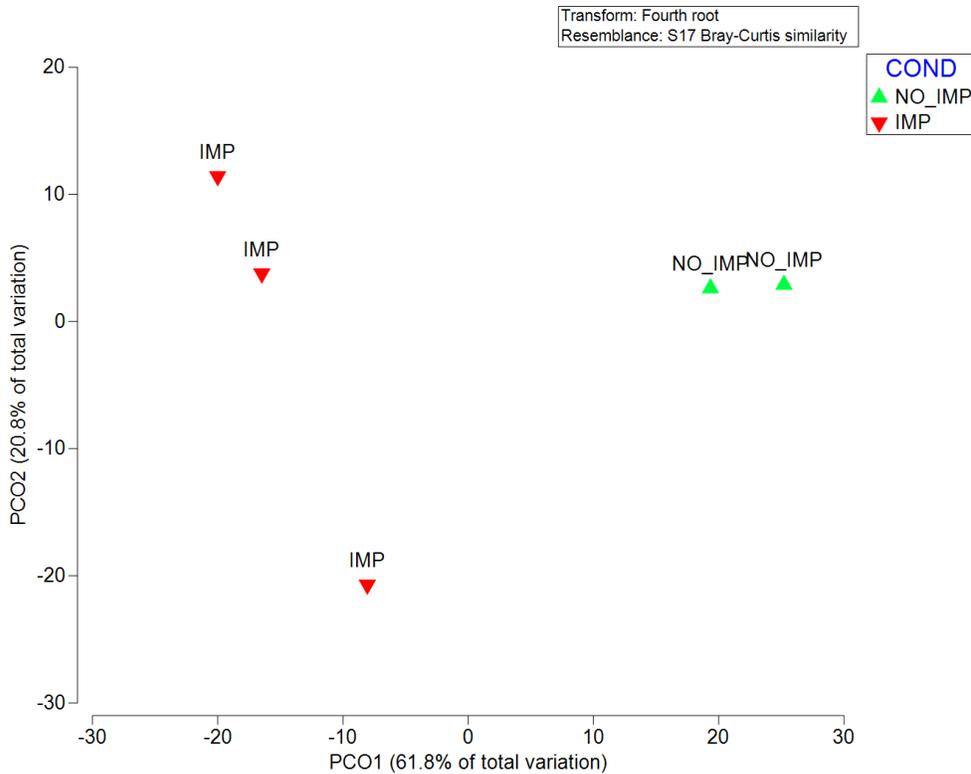


Figura 34. Ordenación de muestras por *Localidad* en función de su *Condición*.
Localidades No Impactadas (NO_IMP) y *Localidades* Impactadas (IMP).

Los gráficos de las Figuras 35 y 36 permiten identificar aquellas especies cuya representación en *Localidades* no impactadas es mayor respecto a las *Localidades* impactadas; mientras que el de la Figura 37 permite identificar aquellas especies o grupos de especies cuya representación se restringe a *Localidades* impactadas.

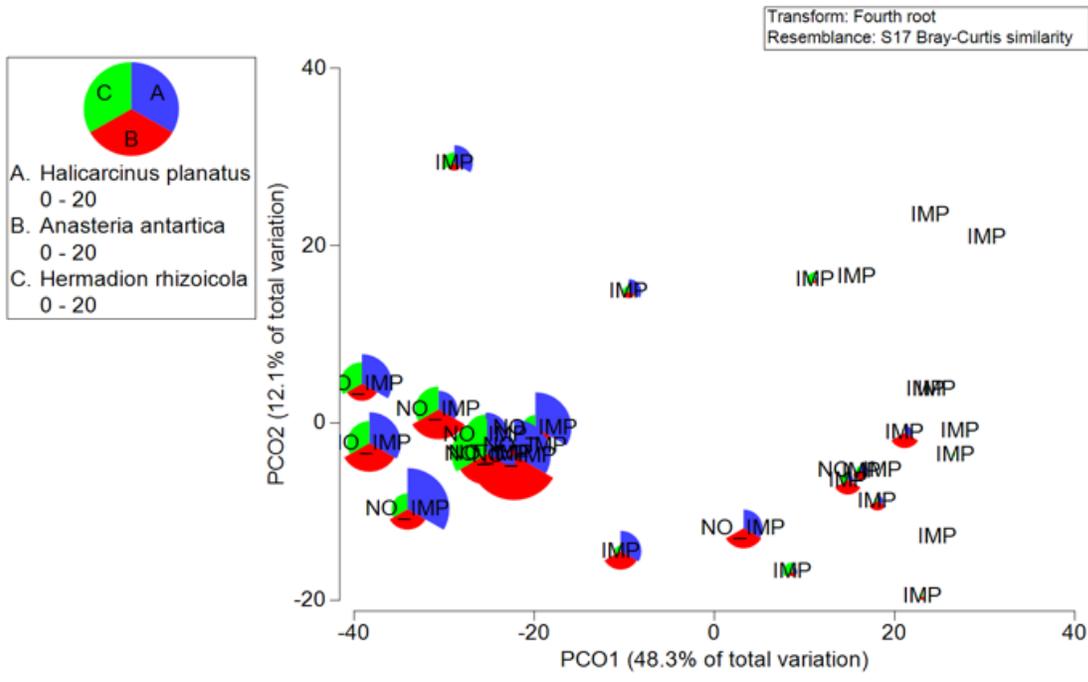


Figura 35. Ordenación de Áreas en *Localidades* No Impactadas (NO_IMP) y en *Localidades* Impactadas (IMP) y representación de una triada de especies indicadoras de buena salud ambiental.

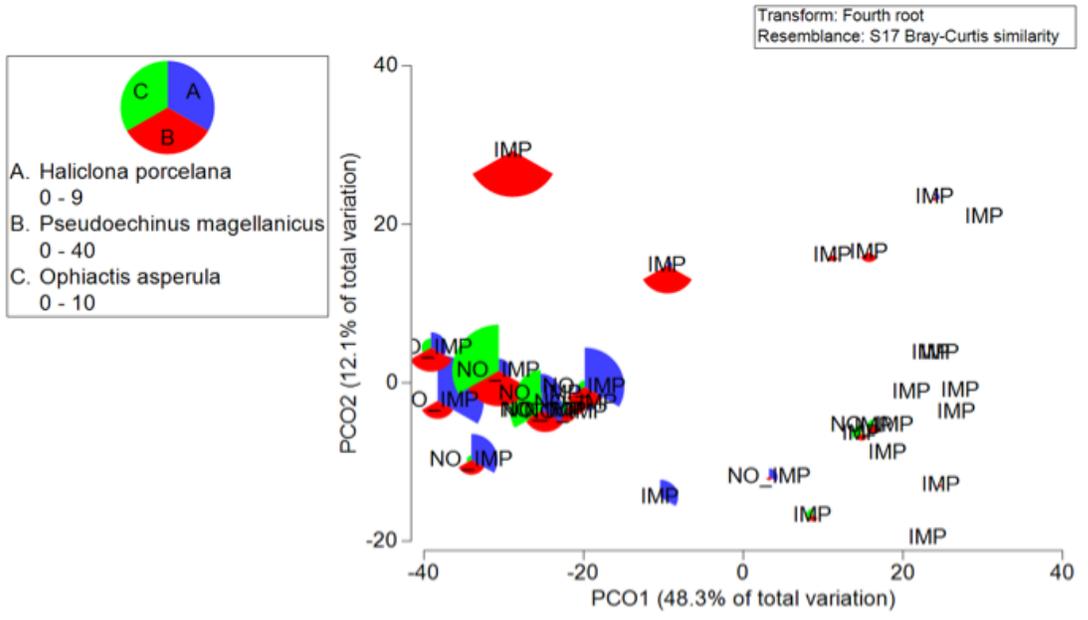


Figura 36. Ordenación de Áreas en *Localidades* No Impactadas (NO_IMP) y *Localidades* Impactadas (IMP) y representación de una triada de especies indicadoras de buena salud ambiental.

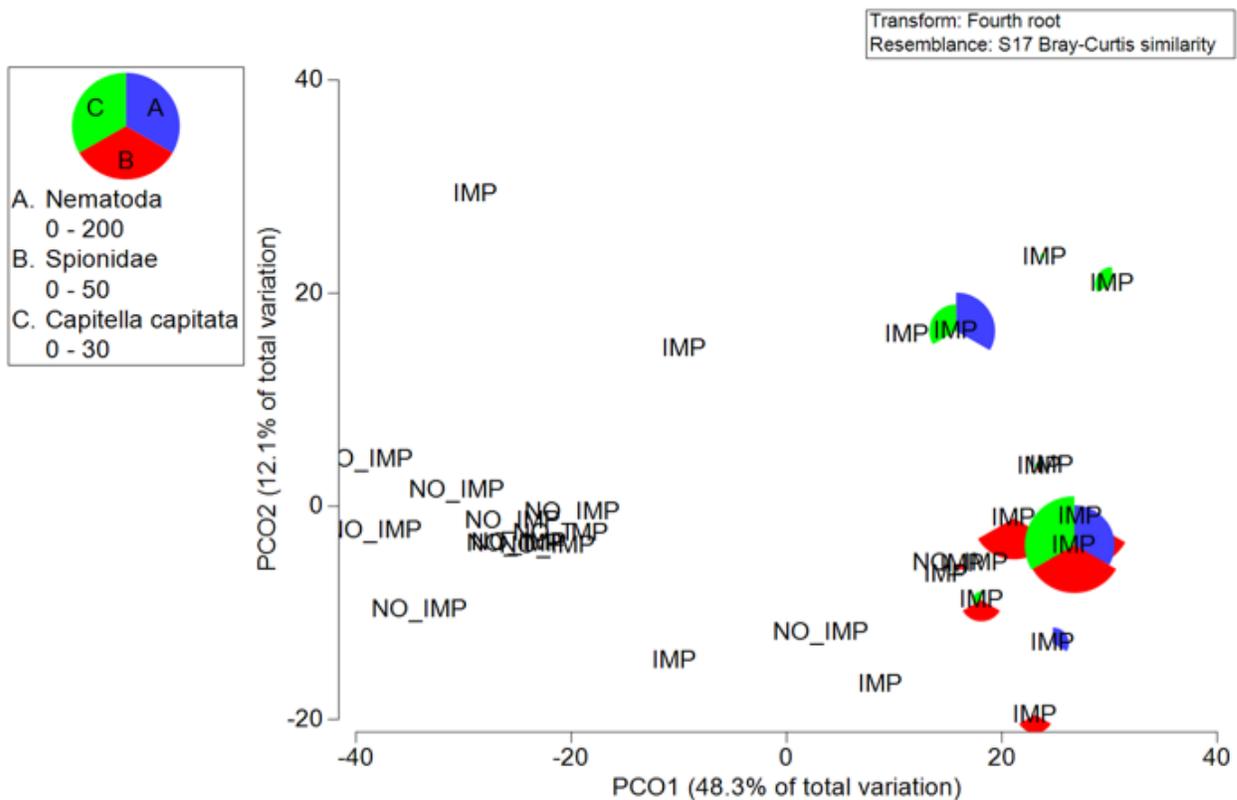


Figura 37. Ordenación de Áreas en *Localidades* No Impactadas (NO_IMP) y *Localidades* Impactadas (IMP) y representación de una triada de especies o grupo de especies indicadoras de mala salud ambiental.

El modelo lineal final obtenido mediante el análisis permutacional de la varianza permitió reconocer que existe variación significativa en la estructura y composición de la CMB del CB a todas las escalas espaciales contempladas en el diseño de muestreo (Tabla 5). A pesar de la variabilidad hallada en todas las escalas geográficas que contemplan los factores aleatorios (*Cuadrantes*, *Áreas*, *Sitios* y *Localidades*), el modelo estimó diferencias significativas ($p = 0,0061$) en el factor fijo *Condición*, que implica los niveles “impactado” vs. “no impactado”. De esta manera el modelo permite detectar diferencias significativas entre las comunidades macrobentónicas de localidades impactadas y no impactadas.

Los componentes de variación en términos porcentuales y basados en la disimilitud de Bray-Curtis se interpretaron únicamente para los factores aleatorios, e

indicaron que la mayor variabilidad en el intermareal del CB es aportada a la menor escala espacial (28% a nivel de cuadrantes, o sea a escala de pocos metros), seguido de la variación a escala de decenas de metros (*Áreas*) y cientos de metros (*Sitios*) con porcentajes de aporte similares (18,8% y 16,8%), respectivamente. La *Localidad*, que representa la variación a escalas de kilómetros, aportó un 13,9 % (Tabla 6).

Tabla 5. Análisis PERMANOVA en el que se detalla los factores incluidos en el modelo (Fuentes de Variación), los grados de libertad (g.l), la suma de cuadrados (SM), los cuadrados medios (CM), el estadístico Pseudo F, el valor de probabilidad (P) por permutaciones (perm), el número de permutaciones (Perms) y la probabilidad estimada por Monte Carlo (MC). Los valores de probabilidad significativa están en negrita.

Fuente Variación	g.l	SC	CM	Pseudo F	P(perm)	Perms.	Perm (MC)
<i>Condición</i>	1	1.01E+05	1.01E+05	4.4181		10	0.0061
<i>Localidad (Condición)</i>	3	68551	22850	2.1675	0.0027	9893	
<i>Sitio (Localidad(Condición))</i>	10	1.05E+05	10542	2.3024	0.0002	9873	
<i>Área (Sitio (Localidad (Condición))</i>	15	68680	4578.7	5.5167	0.0001	9790	
Cuadrantes residuales =	270	2.24E+05	829.96				
Total	299	5.68E+05					

Tabla 6. Componentes de variación para cada factor estimado como el porcentaje de aporte al total.

Factor	Componente de Variación %
Condición	22.6
Localidad (Condición)	13.9
Sitio (Localidad(Condición))	16.8
Área (Sitio (Localidad (Condición))	18.8
Cuadrantes = residuales	28
Total	100

La prueba PERMDISP indicó diferencias en la dispersión multivariada para el factor localidad (F: 20,445; gl1: 4; gl2: 295; P(perm): 0.0001). La Tabla 5 muestra la dispersión promedio por Localidad, la cual es mayor en el Dispensor (ver Figura 24) y la Tabla 6 el test pareado para verificar la existencia de diferencias significativas en la dispersión entre localidades.

Tabla 7. Dispersión promedio y error estándar (ES) para cada Localidad en base a los 60 cuadrantes (N).

Localidad	N	Promedio	ES
Ref_Oeste	60	36.213	0.96175
Dispensor	60	42.13	1.1739
Arroyo Grande	60	35.969	1.3144
Ushuaia	60	28.521	0.91285
Ref-Este	60	32.93	1.1015

Tabla 8. Test de *t* para la comparación pareada de dispersión multivariada entre localidades. El test no contempla corrección por comparaciones múltiples.

Localidades	Estadístico <i>t</i>	P(perm)
(Ref_Oeste,Dispensor)	3.8991	0.0003
(Ref_Oeste,Arroyo Grande)	0.1498	0.8898
(Ref_Oeste,Ushuaia)	5.801	0.0001
(Ref_Oeste,Ref_Este)	2.2455	0.0419
(Dispensor,Arroyo Grande)	3.4961	0.0022
(Dispensor,Ushuaia)	9.1516	0.0001
(Dispensor,Ref_Este)	5.7155	0.0001
(Arroyo Grande,Ushuaia)	4.6541	0.0001
(Arroyo Grande,Ref_Este)	1.7724	0.0883
(Ushuaia,Ref_Este)	3.0816	0.0043

El diseño de muestreo balanceado y el "N" muestral = 300 permite confiar en los resultados obtenidos a pesar de la detección significativa de dispersión.

Los análisis de componentes principales realizados sobre la matriz completa de variables, demostraron una buena agrupación por *sitios* dentro de cada *localidad* aunque con cierta variabilidad. Se verifica en el lado derecho y superior del gráfico (figura 38) el *Sitio 4* de Dispensor y el *Sitio 12* de Arroyo Grande más apartados del resto en el sentido en que apuntan los vectores Fosfatos totales, Coliformes fecales y Materia orgánica total. En el sector derecho e inferior del gráfico se agrupan dos *sitios* de Arroyo Grande, dos de Dispensor y dos de Ushuaia. En el sector izquierdo se agrupan todos los *sitios* de ambas Referencias y uno de Ushuaia (*Sitio 7*) en el sentido contrario al aumento de todas las variables medidas con excepción de salinidad.

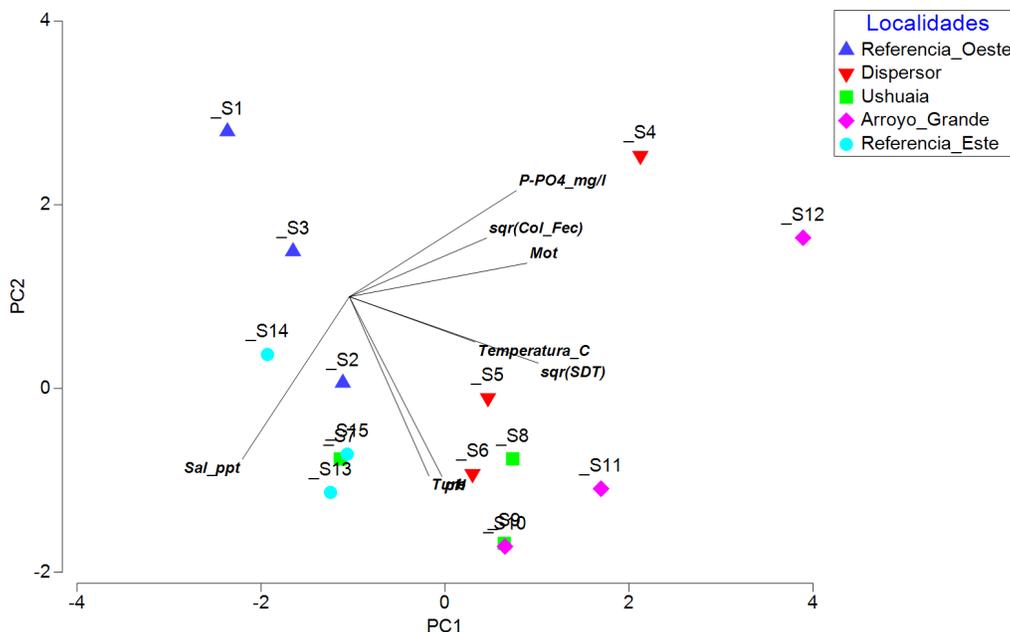


Figura 38. Análisis de componentes principales por *Sitios* dentro de cada *Localidad* utilizando la matriz abiótica completa.

La misma ordenación, pero mostrando la ubicación de las muestras por *Condición* dentro de cada *Localidad*, demuestra un patrón de agrupamiento acorde al gradiente ambiental, en el que las réplicas de localidades impactadas se agrupan

hacia la derecha del gráfico y las réplicas de localidades no impactadas se ubican en el sector izquierdo (con excepción de un sitio de Ushuaia) (Figura 39).

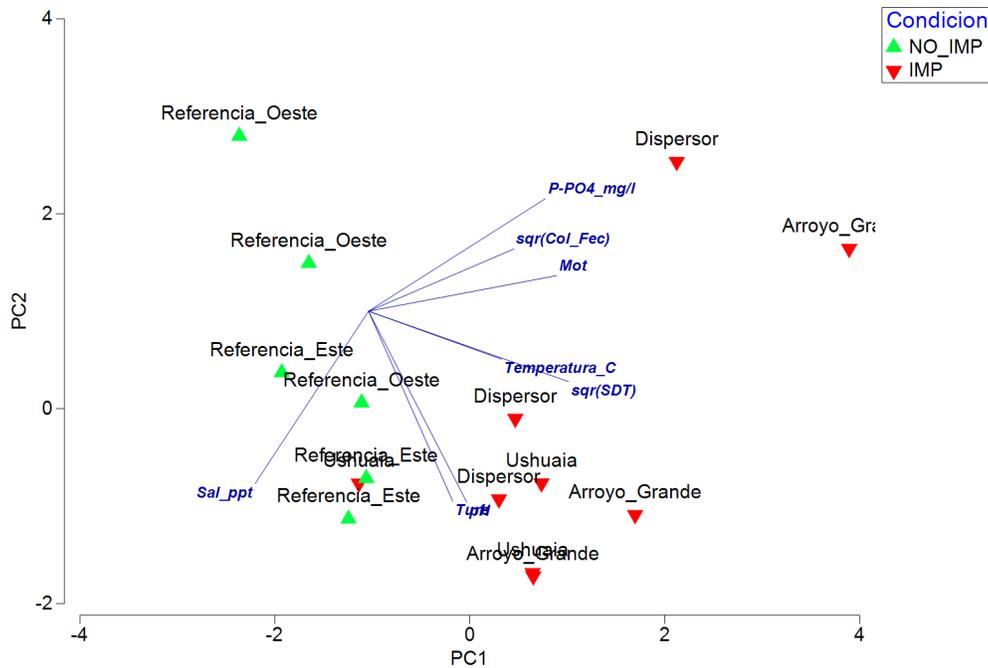


Figura 39. Análisis de componentes principales por *Localidad* dentro de cada *Condición* utilizando la matriz abiótica completa.

La ordenación de muestras contemplando la matriz de variables ambientales que reflejan impacto demuestran un patrón similar respecto del gradiente de impacto. Sin embargo, se advierte que el *Sitio* 6 que se ubica dentro de la *Localidad* Dispersor pero es el más alejado del efluente, se ubica hacia el centro del gráfico (Figuras 40 y 41)

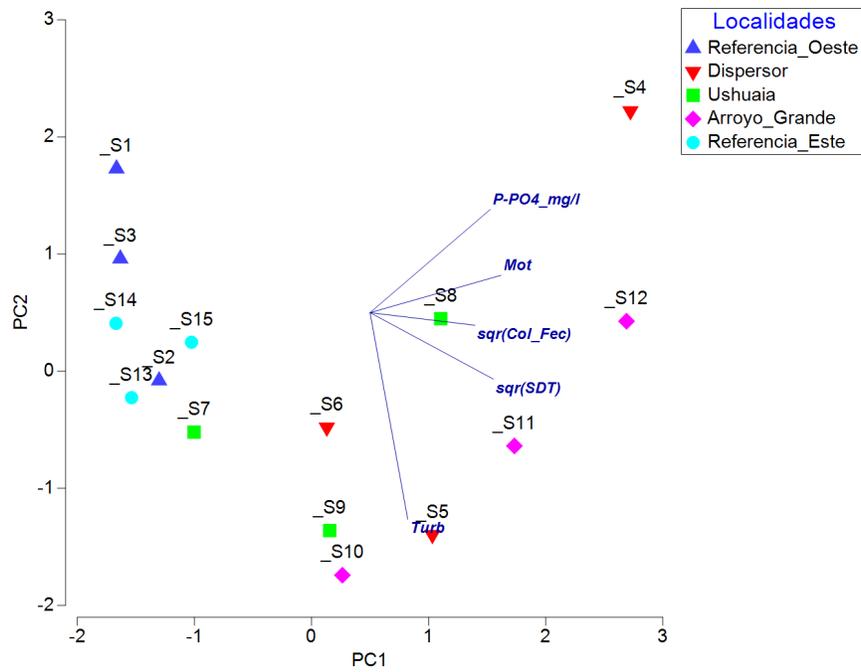


Figura 40. Análisis de componentes principales por *Sítios* dentro de cada *Localidad* utilizando la matriz abiótica que refleja impacto.

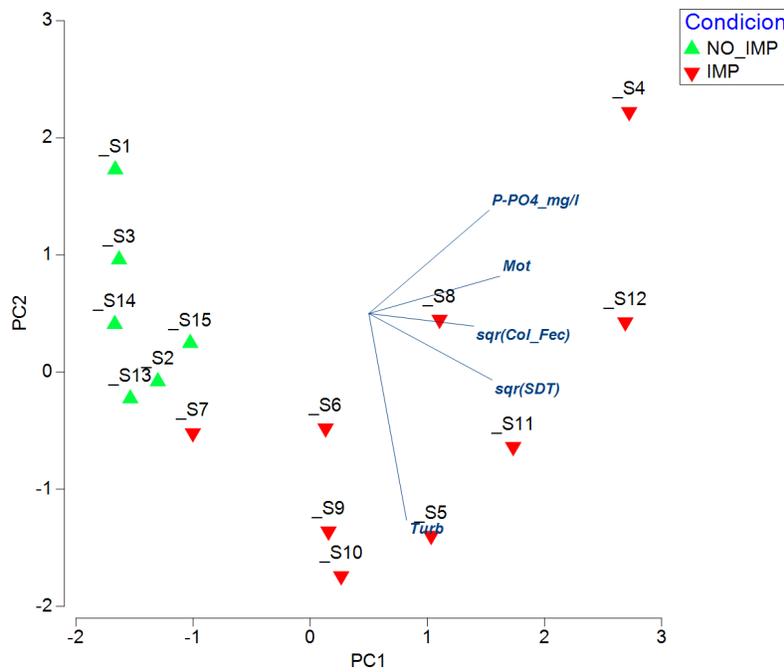


Figura 41. Análisis de componentes principales por *Localidad* dentro de cada *Condición* utilizando la matriz abiótica que refleja impacto.

La Tabla 9 demuestra que esta segunda instancia de análisis mejora el poder explicativo del modelo.

Tabla 9. Eigenvalores, porcentaje de variación individual por eje y acumulada para los dos primeros ejes en el análisis de componentes principales realizados con la matriz completa (totales) de variables ambientales y con la matriz de variables que reflejan impacto (impacto).

Var i abl es	Ej es	Ei genval or es	%Var i aci ón	%Var i aci ón acum
t o t a l e s	1	2. 96	37. 0.	37. 0
t o t a l e s	2	2. 15	26. 9	63. 9
i n p a c t o	1	2. 46	49. 1	49. 1
i n p a c t o	2	1. 23	24. 7	73. 8

La superposición de valores de variables que podrían reflejar mejor el impacto respecto del ordenamiento biótico de las muestras (PCO) confirma que todas ellas aumentan en las muestras registradas como impactadas (Figuras 42 a 46).

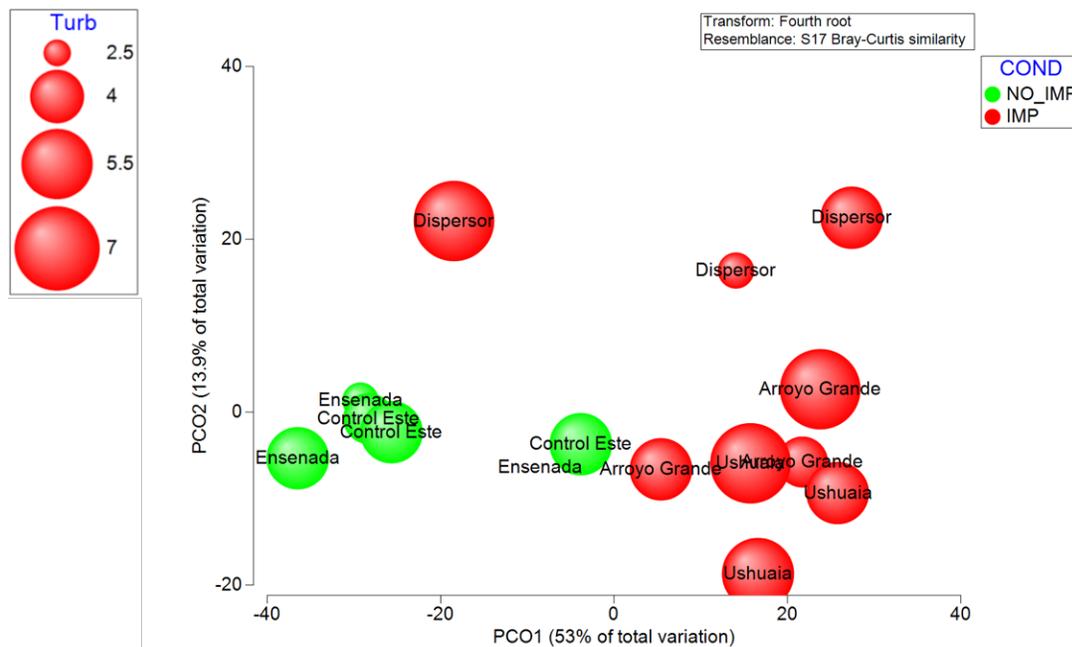


Figura 42. Superposición de burbujas de Turbidez (Turb) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de CMB del intermareal rocoso.

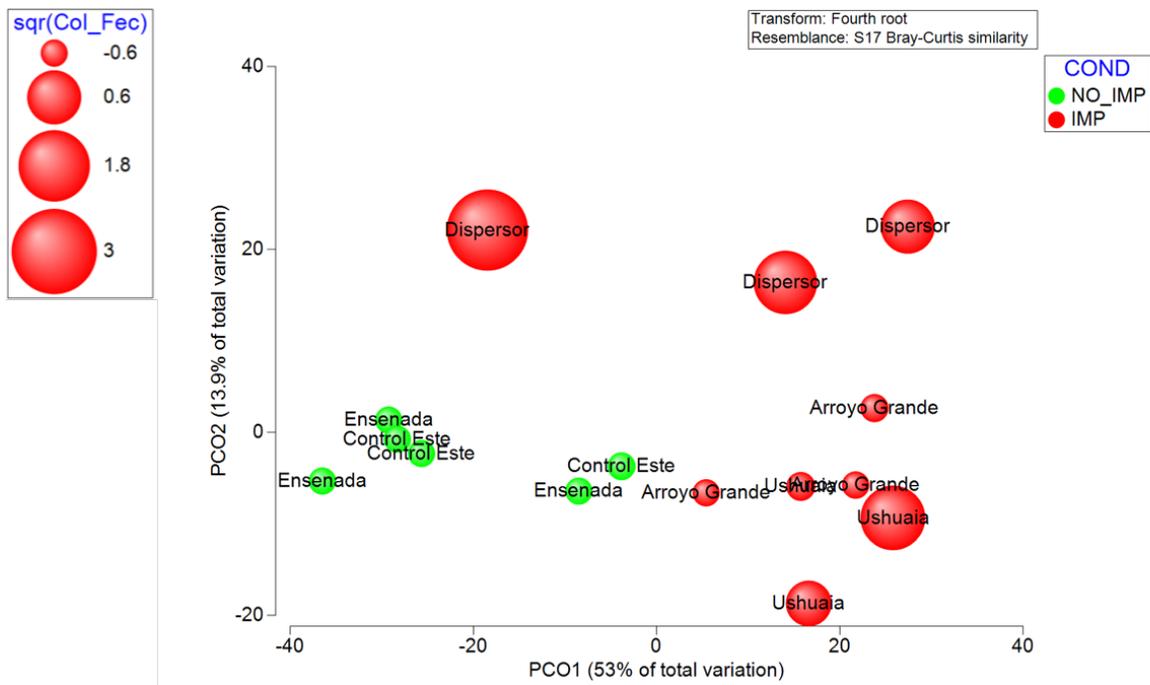


Figura 43. Superposición de burbujas de Coliformes fecales (Col_Fec, $\text{sqr} = \text{raíz cuadrada}$,) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de CMB del intermareal rocoso.

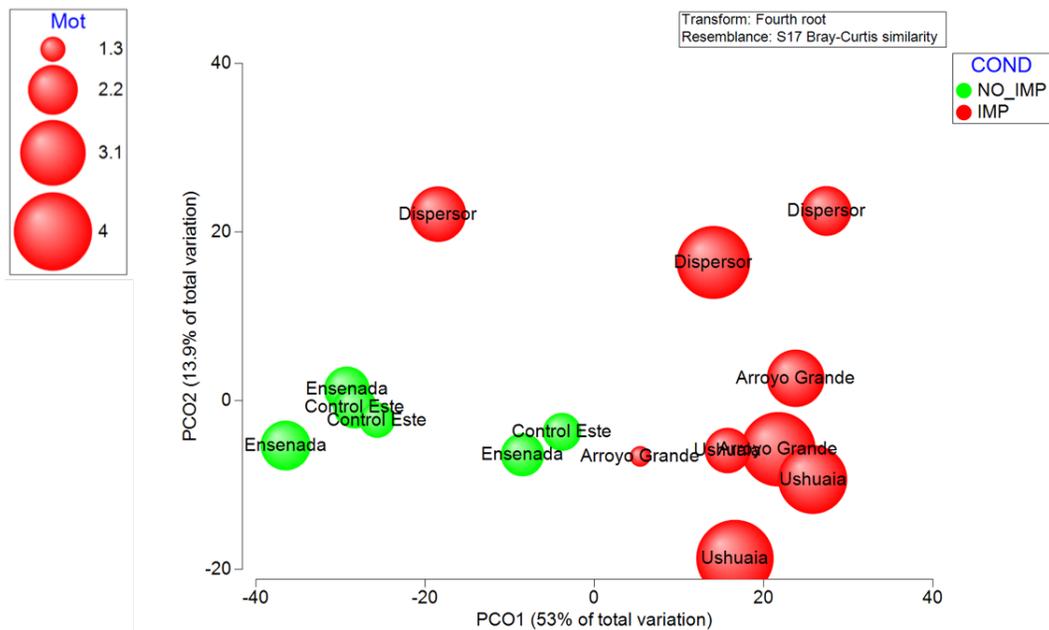


Figura 44. Superposición de burbujas de Materia Orgánica Total (Mot) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas

principales realizado con la matriz biótica de comunidades macro-bentónicas del intermareal
ROCOSO.

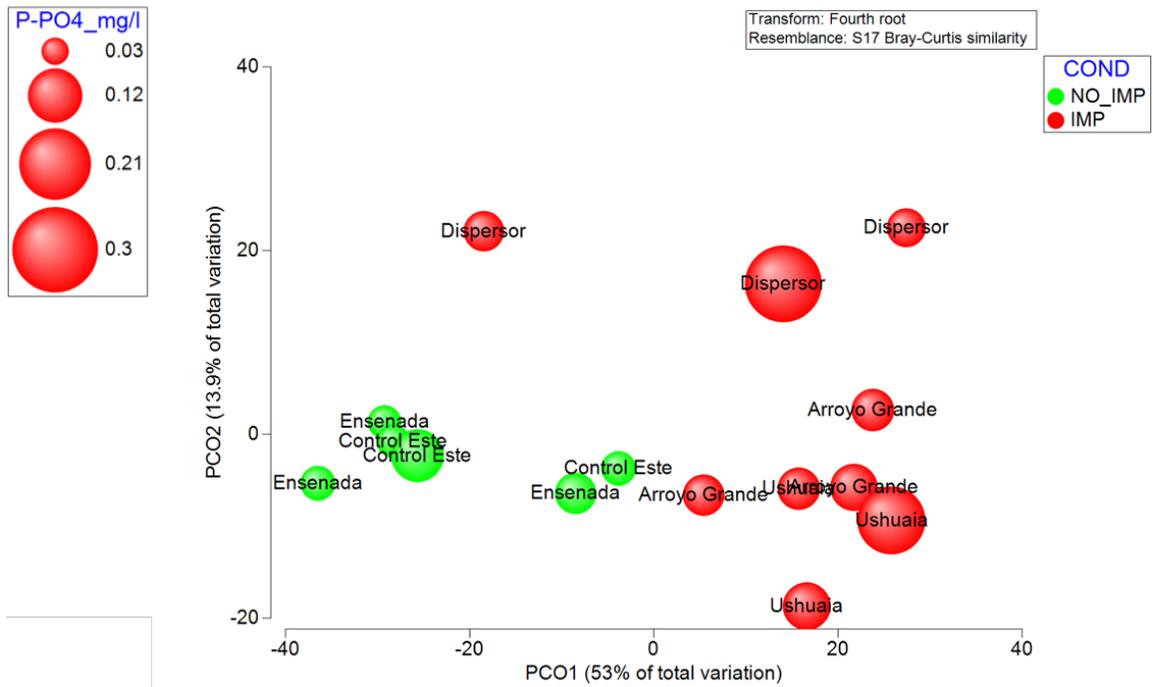


Figura 45. Superposición de burbujas de Fósforo total (P-PO4) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de comunidades macrobentónicas del intermareal rocoso.

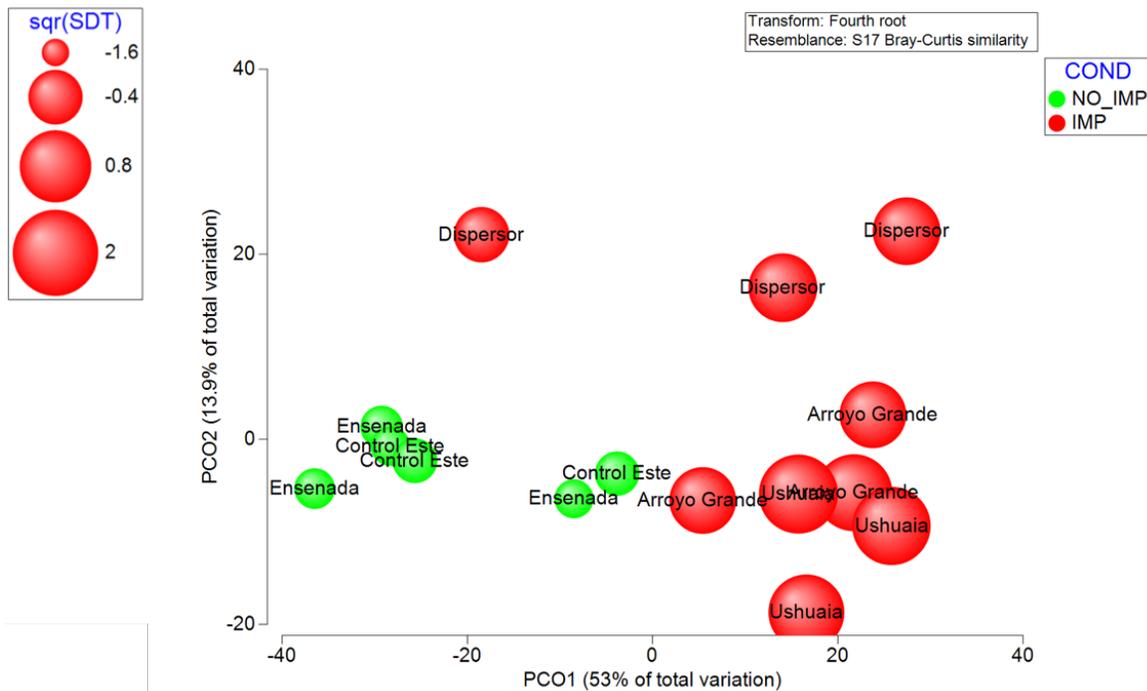


Figura 46. Superposición de burbujas de Sólidos disueltos totales (SDT, $\text{sqr} = \text{raíz cuadrada}$.) por *Localidades* en función de su *Condición* (verdes no impactadas, rojas impactadas) sobre el análisis de coordenadas principales realizado con la matriz biótica de comunidades macrobentónicas del intermareal rocoso.

El análisis BIO_ENV indicó que las dos variables ambientales que están más correlacionadas con el patrón biótico son por separado Sólidos disueltos totales ($\rho = 0,534$) y Coliformes fecales ($\rho = 0,507$) siendo cada una significativa con un $p = 0.01$. En combinación las dos variables alcanzaron un valor ligeramente menor ($\rho = 0,507$) siendo igualmente la correlación no debida al azar ($p = 0.01$). Debido al interés particular que tienen las variables asociadas con el contexto de impacto, se optó por construir el árbol solo con esas variables. El árbol (Figura 47) muestra una primera división entre todas las *Localidades* impactadas por un lado y no impactadas por el otro (con la excepción del *sitio* 13 de la Referencia Este) debido a un valor umbral mínimo y máximo de Coliformes fecales (Figura 48).

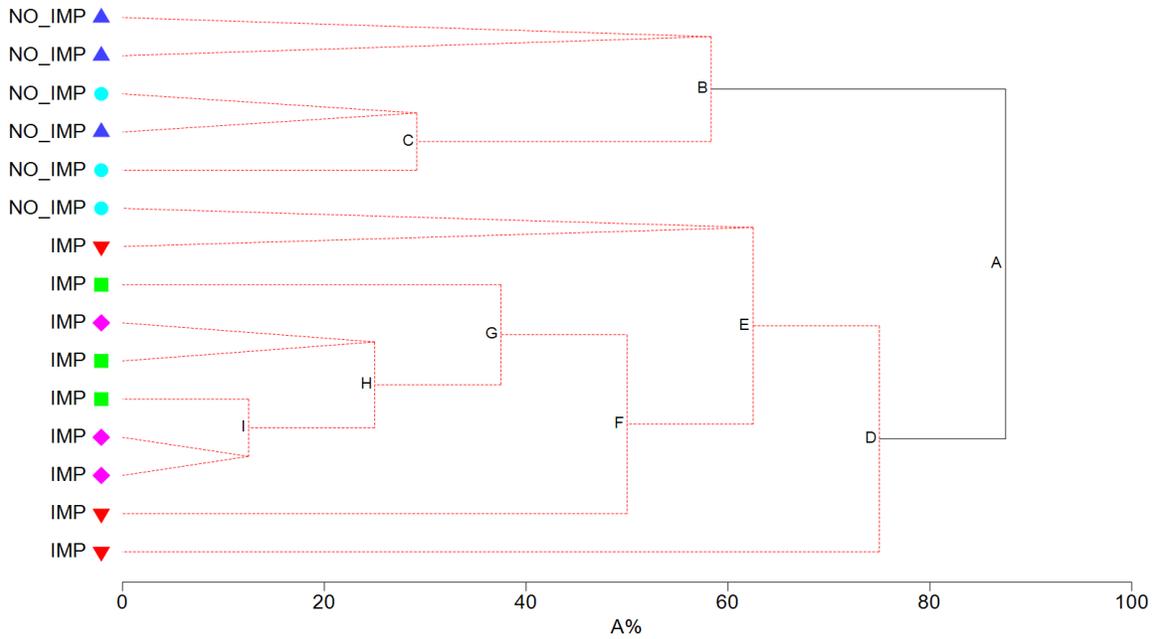


Figura 47. Árbol divisorio de muestras de cada *Localidad* en función de su *Condición*. Las divisiones del árbol se justifican como sigue: A: R=0.69; B%=89; Col_Fec<2.9(>4), B: R=0.25; B%=38; Col_Fec<1.7(>2.9) C: R=0.00; B%=16; P-PO4_mg/l<0.0493(>0.114) D: R=0.93; B%=92; Col_Fec<1.2E+05(>3.5E+05) E: R=0.55; B%=49; P PO4_mg/l<0.0617(>0.0697) F: R=0.67; B%=39; P-PO4_mg/l<0.189(>0.242) G: R=0.32; B%=23; P-PO4_mg/l<0.0697(>0.073) or Col_Fec<4(>7.8) H: R=0.33; B%=19; P PO4_mg/l<0.0737(>0.091) I: R=0.00; B%=23; Col_Fec<7.8(>1.9E+04) or P PO4_mg/l<0.091(>0.0932).

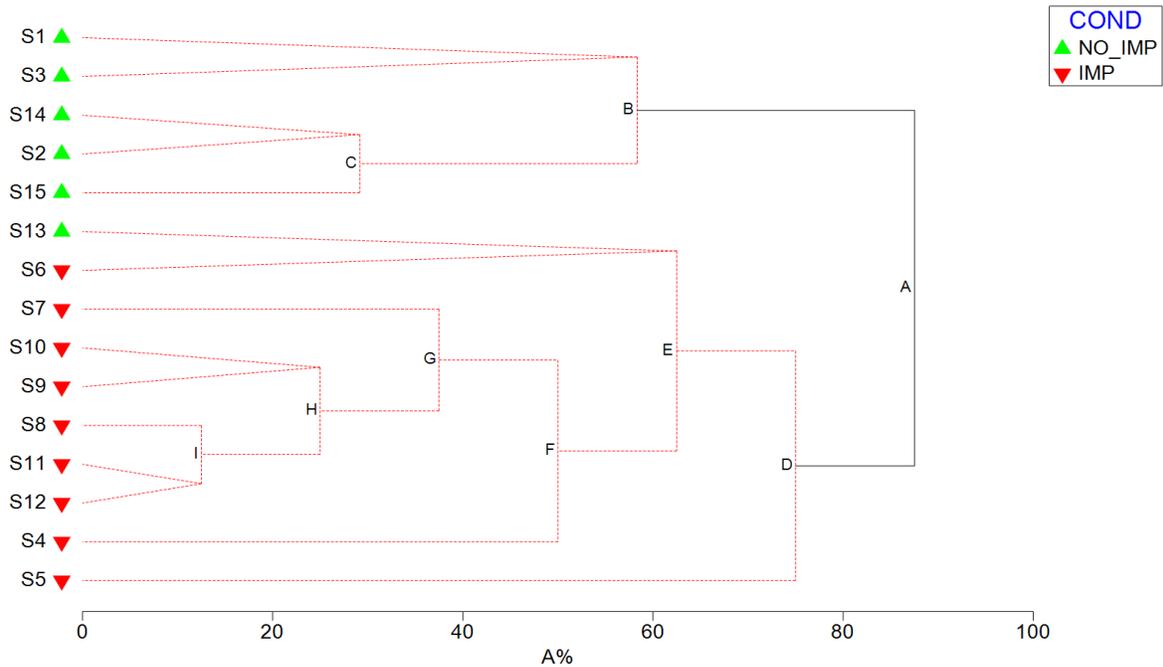


Figura 48. Árbol divisorio de muestras de cada *Sitio* en función de su *Condición*. Las divisiones del árbol se justifican como sigue: A: R=0.69; B%=89; Col_Fec<2.9(>4), B: R=0.25; B%=38; Col_Fec<1.7(>2.9) C: R=0.00; B%=16; P-PO4_mg/l<0.0493(>0.114) D: R=0.93; B%=92; Col_Fec<1.2E+05(>3.5E+05) E: R=0.55; B%=49; P PO4_mg/l<0.0617(>0.0697) F: R=0.67; B%=39; P-PO4_mg/l<0.189(>0.242) G: R=0.32; B%=23; P-PO4_mg/l<0.0697(>0.073) or Col_Fec<4(>7.8) H: R=0.33; B%=19; P PO4_mg/l<0.0737(>0.091) I: R=0.00; B%=23; Col_Fec<7.8(>1.9E+04) or P PO4_mg/l<0.091(>0.0932).

El modelo lineal construido con todas las variables medidas (Figura 49) y con las más directamente relacionadas al impacto por efluentes (Figura 50) demuestran esencialmente similar patrón de agrupamiento y poder explicativo. Las muestras de *Localidades* no impactadas se agrupan cercanamente entre sí y contrarias a los vectores que indican impacto y a los que no indican impacto también (Figura 51). Los *sitios* de la *Localidad* Dispensor muestran mayor variabilidad, siendo el S5 (cercano al efluente) el que se aleja más del resto.

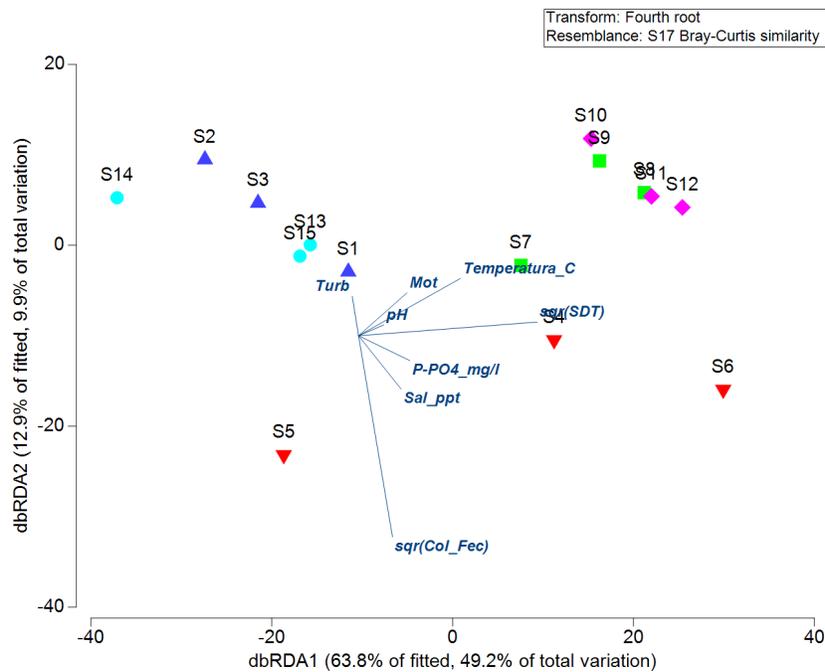


Figura 49. Biplot de muestras biológicas por *Localidad* y todas las variables ambientales medidas.

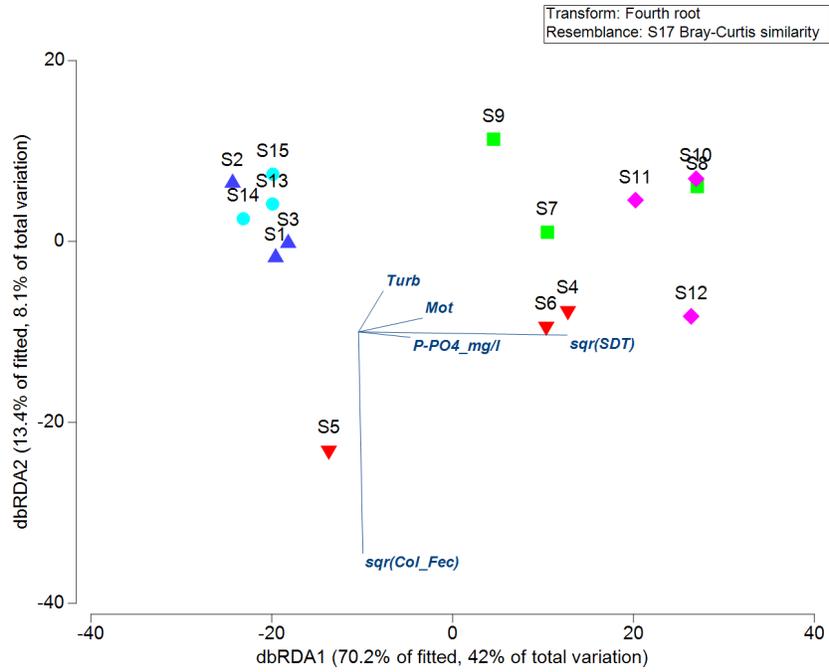


Figura 50. Biplot de muestras biológicas por *Localidad* y las variables ambientales que reflejan impacto.

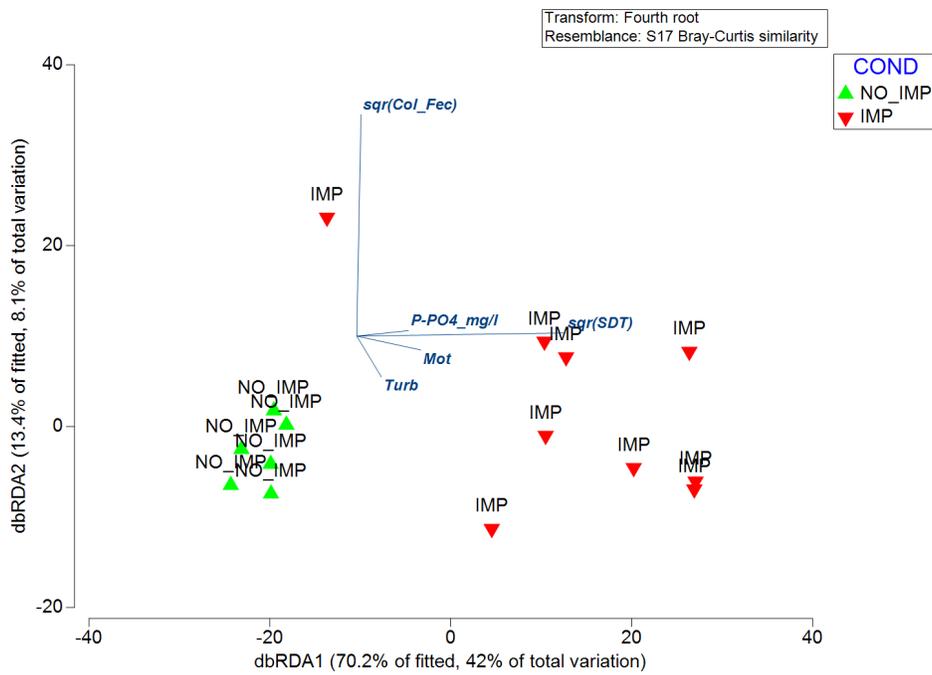


Figura 51. Biplot de muestras biológicas por *Condición* y las variables ambientales que reflejan impacto.

Finalmente, se graficaron en burbujas sobre el mismo modelo lineal, aquellas variables que están más correlacionadas con el patrón biótico según el procedimiento BIO-ENV. Estas gráficas confirman que el patrón biótico está relacionado con el aumento de bacterias coliformes y sólidos disueltos totales (Figuras 52 y 53).

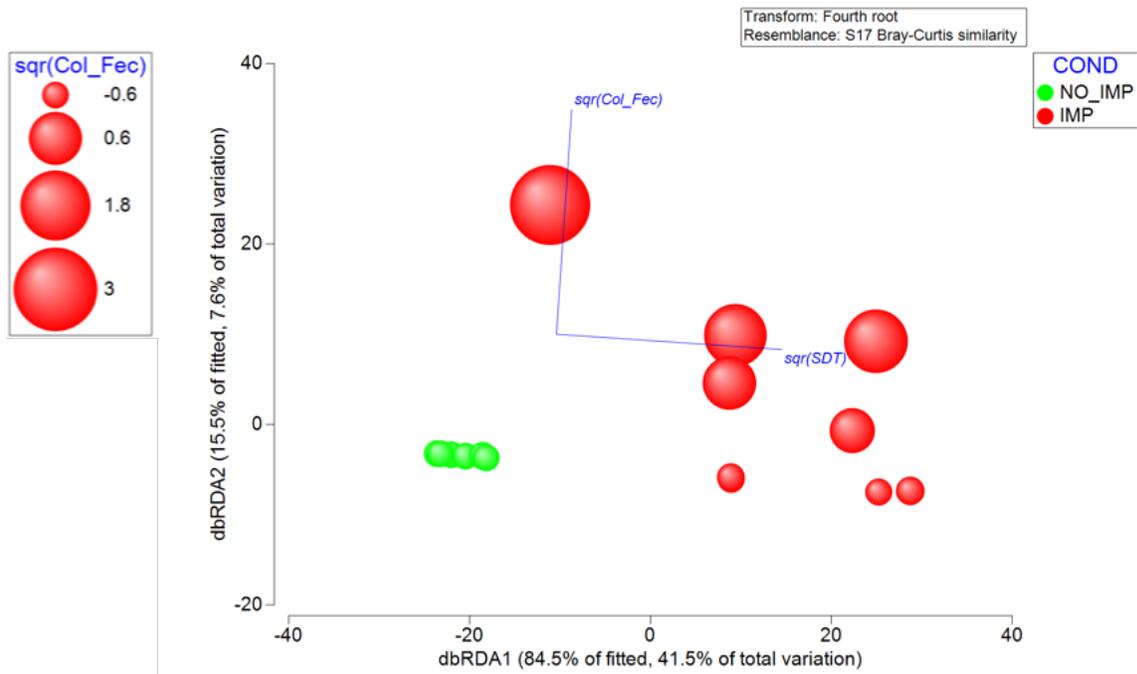


Figura 52. Biplot de muestras biológicas por *Condición* y la variable ambiental que mejor refleja el impacto super-impuesta como burbuja.

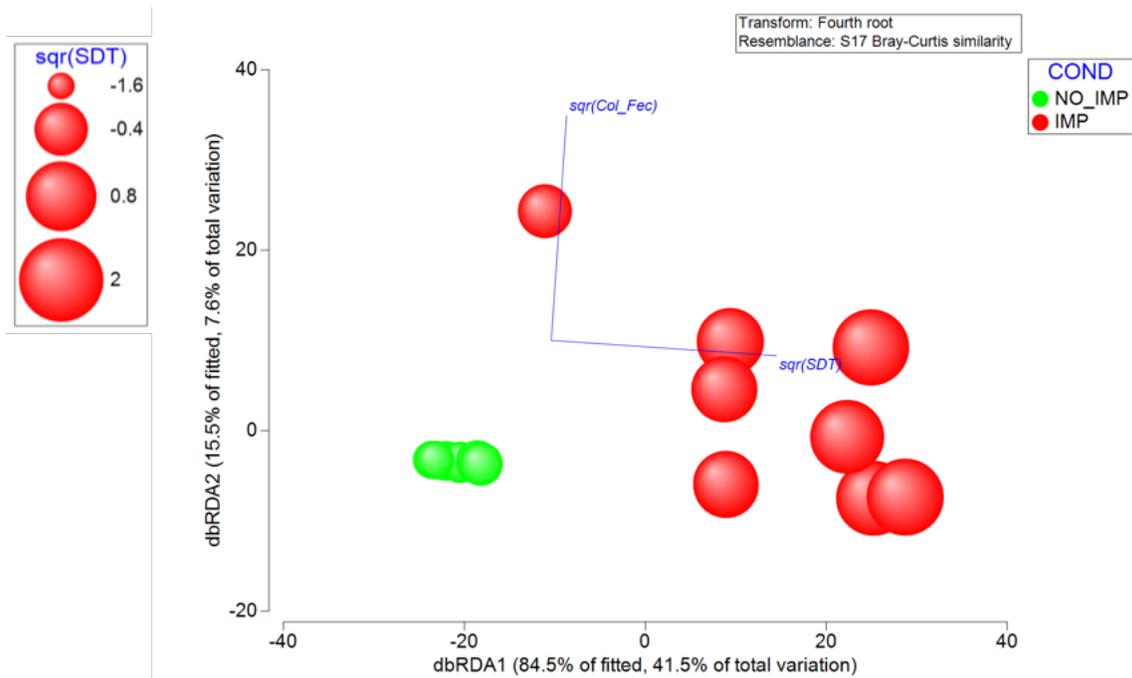


Figura 53. Biplot de muestras biológicas por *Condición* y la variable ambiental que en segundo lugar mejor refleja el impacto super-impuesta como burbuja.

Una versión animada de la figura que incluye los valores de coliformes fecales como burbujas puede verse haciendo click aquí ([https://drive.google.com/file/d/1rEco79vfDk2yTmBzBk8WPvRTmaOT3YCH/view?usp=share link](https://drive.google.com/file/d/1rEco79vfDk2yTmBzBk8WPvRTmaOT3YCH/view?usp=share_link))

2.h. Discusión

Los estudios de evaluación ambiental comúnmente desarrollados en Argentina, Brasil y Uruguay se siguen basando en muestreos realizados a escalas espaciales (y temporales) bastante restringidas, sin adecuada replicación y con abordajes descriptivos y correlativos derivados de la ecología descriptiva clásica. Las técnicas correlativas univariadas difícilmente consiguen diferenciar efectos que podrían deberse a variabilidad natural de aquella provocada por el impacto de la contaminación y eutrofización. Estos estudios no siempre cumplen con los objetivos esperados en una evaluación de impacto y en el posterior monitoreo ambiental. Esta

modalidad de trabajo ha sido fuertemente criticada, si se considera el principal producto científico-técnico esperado, que es la demostración de los efectos de la contaminación sobre la biota. Esto es posible desde el punto de vista cuantitativo si se analizan zonas replicadas impactadas y no impactadas a diferentes escalas espacio-temporales. Otras veces, la imposibilidad de establecer zonas de referencia confiables (i.e controles eficaces o blancos) dificulta evaluar la hipótesis de impacto, aspecto esencial para la demostración fehaciente de las relaciones de causalidad entre la presencia de un contaminante y las respuestas de la biota (Munis et al. 2013). En este trabajo el diseño de muestreo propuesto se fundamenta en la posibilidad real de encontrar zonas no degradadas en el CB que puedan ser eficazmente comparadas con zonas impactadas. Esta ventaja natural fue incorporada en un diseño de muestreo asimétrico, balanceado y replicado a tres escalas espaciales especialmente dispuesto en la geografía para detectar impacto en CB, y acompañado por modelos estadísticos robustos que otorgan confiabilidad a los resultados obtenidos.

La diversidad de macro-invertebrados marinos bentónicos en el intermareal rocoso del CB supera la cantidad de 100 repartidos en al menos 11 diferentes Phyla, aunque estudios sistemáticos morfológicos y/o moleculares pormenorizados podrían superar largamente esta cifra. Entre ellas, 63 especies o rangos taxonómicos mayores (denominadas como especies de aquí en adelante) fueron registradas consistentemente en la zona de estudio a través de las *Localidades/Sitios/Áreas* y han sido las empleadas para evaluar el potencial impacto ambiental. Entre ellas, existe un sub-conjunto de especies de la CMB compuesto por Moluscos del género *Nacella*, *P. plumbea*, *S. lessoni*; Crustáceos Cirripedios y Anfípodos; Poliquetos Nereididae y Glyceridae; y el Nemertino *P. corrugatus* que se registraron en todas las localidades independientemente de su condición ambiental y en general con alta frecuencia. Este sub-conjunto conforma la porción dominante de la CMB en el intermareal del Canal Beagle y como su patrón de presencia-ausencia no refleja impacto dado el carácter de ubicuas, es de interés la variabilidad de sus abundancias a lo largo del gradiente ambiental para caracterizar el impacto. Además, ni el número de especies ni la identidad de las mismas resultaron similares

a lo largo de la zona de estudio al considerar el resto de las especies registradas en el intermareal rocoso. Las localidades asignadas *a priori* en la condición impactada según la calidad ambiental demostrada en trabajos previos (DPOSS 2022, Diodato et al. 2018) contiene una comunidad macro-bentónica intermareal empobrecida en número de especies respecto a las localidades no impactadas. A nivel *Localidad*, la pérdida de especies promedio entre las dos no impactadas (Referencia Este y Referencia Oeste) y las tres impactadas (Dispensor, Ushuaia y Arroyo Grande) es de un 30% aproximadamente. El fenómeno de disminución de la diversidad de organismos macro-bentónicos del intermareal debido a un impacto ambiental se ha teorizado y documentado en varios trabajos previos que utilizaron una metodología de trabajo similar al realizado en este trabajo (Pearson & Rosenberg 1978, Roberts 1996). Las comunidades más diversas de las localidades no impactadas contienen especies indicadoras de buena salud ambiental en el CB, es decir aquellas más sensibles al impacto, como por ejemplo los Equinodermos *Anasterias antartica* y *Pseudoechinus magellanicus*; el Crustáceo *Halicarcinus planatus*; y los Moluscos *Margarella violacea*, *Tonicia* sp. y *Plaxyphora aurata*. En contraste, las *Localidades* impactadas contienen organismos tolerantes que aparecen en ambientes modificados como por ejemplo los Poliquetos de la familia Spionidae (en Arroyo Grande y Ushuaia), *Capitella capitata* (en Ushuaia) y Nematoda (en Dispensor y Ushuaia). La presencia del complejo de especies *Capitella capitata* es utilizado como indicador de impacto ambiental en todo el mundo (Dean 2008), inclusive en Argentina (Rivero et al. 2005). Además, la familia Spionidae ha sido reportada en distintos trabajos en áreas impactadas (ver revisión de Elías et al. 2021). Otros alteran su abundancia disminuyéndola como por ejemplo los Poliquetos de la familia Serpulidae y *Hermadion rizholicola*; o aumentan como, por ejemplo, Amphipoda, Glyceridae y *Siphonaria lessoni*.

La riqueza por *Sítios* confirma el patrón de disminución de la diversidad y también reafirma la necesidad de utilizar réplicas por *Localidad*, puesto que de haber escogido solo el *Sitio* 13 dentro de la *Localidad* Referencia Este se podría haber llegado a conclusiones opuestas. Más aún, y como ha sido reportado en otros trabajos que hallaron variación de la diversidad en escalas espaciales de residuales

(Guerra-Castro et al. 2020), aquí se demuestra que puede existir variabilidad natural en el número de especies a escalas de pocos metros, e incluso dentro de las dos *Áreas* que pertenecen al mismo *Sitio* y la misma *Localidad*.

Las figuras de análisis de componentes principales a todas las escalas espaciales contempladas demuestran un patrón de agrupamiento de muestras según un gradiente ambiental que refleja impacto. Esta situación fue confirmada mediante el test de hipótesis. En éste, aún considerando la mayor variabilidad natural en el intermareal rocoso del Canal Beagle que se da a la menor escala espacial (28% a través de los cuadrantes dentro de las áreas del mismo sitio y misma localidad), el contraste del factor fijo *Impacto* vs. *No Impacto* arrojó diferencias significativas. Se concluye que, aún considerando variaciones naturales internas entre las localidades que conforman una misma *condición*, existen diferencias entre la composición y la estructura de la comunidad macro-bentónica entre zonas impactadas y no impactadas del Canal Beagle. Además, las localidades anidadas en condiciones no impactadas tienden a formar un solo agrupamiento, demostrando que la condición de no impacto tiene características comunitarias claramente similares entre sí. El *Sitio* 1 y *Área* 1 de Referencia Oeste (Ensenada) y el área 25 del *Sitio* 13 de la Referencia Este (Playa Larga) representan una composición y estructura comunitaria atípica dentro de la condición de no impacto. En términos bióticos, fue posible establecer diferencias en la CMB de la localidad Dispensor respecto de las de Arroyo Grande y Ushuaia. Aunque los datos propios del recuento del número más probable de bacterias coliformes fecales (y totales) fueron bajas en comparación con los valores históricos registrados (Esteves & Amin 2004, Diodato 2013, DPOSS 2017), estos podrían explicar las diferencias, ya que se hallaron valores superiores en todos los sitios del Dispensor (próximos al efluente cloacal) respecto de los de Arroyo Grande y de Ushuaia. Sin bien recuentos previos también indican mayores valores de bacterias coliformes en la zona del Dispensor respecto de otras zonas de Canal Beagle, también se han hallado valores altos de bacterias coliformes en Arroyo Grande (DPOSS 2022, Diodato et al. 2018). La CMB dentro de la *Localidad* Dispensor muestra alta variabilidad interna, probablemente indicando un gradiente ambiental interno a esta localidad. La CMB dentro de la

Ushuaia son similares entre sí y también con respecto a las de Arroyo Grande. Al menos un área dentro del *Sitio 13 (Localidad Referencia Este)*, que es la localizada cerca de Playa Larga y, por lo tanto, más próxima a la ciudad de Ushuaia, demostró una CMB similar a la media de Arroyo Grande y Ushuaia. Es decir, si bien ese *Sitio* fue considerado como de referencia posee características que lo acercan a una *Condición* de impacto. En este sentido, las gráficas de agrupamiento de muestras según la matriz abiótica ubican consistentemente al *Sitio 13* con cierta afinidad hacia las muestras impactadas. De hecho, el árbol de relaciones de muestras de la CMB divisivo respecto de variables abióticas relacionadas al impacto ubica a este *Sitio* en un *cluster* común con aquellos impactados. Esto puede explicarse por el traslado de aguas pre-tratadas del dispersor hacia ese *Sitio*, que realiza la corriente dentro de la Bahía Ushuaia en condiciones particulares de marea (Ballestrini et al. 1998) y en particular en el margen costero de la bahía (Cucco et al. 2022). Dicho *Sitio* además podría estar recibiendo contaminantes de aguas no tratadas desde la desembocadura del Arroyo Grande y/o de la cercana desembocadura del Río Olivia. Por todo ello, consideramos de suma importancia realizar un estudio de modelado de la dirección predominante y alcance de las plumas de las aguas contaminadas y/o de las provenientes de las desembocaduras de los ríos en cada una de las zonas de reconocida descarga de efluentes cloacales y pluvio-cloacales. Dicho estudio podría sustentar o rechazar esta idea.

Los análisis de correlación entre la matriz abióticas y biótica, junto con el modelo de descomposición de la varianza de la CMB respecto de las variables abióticas que reflejan impacto indicaron que estas últimas explican significativamente el patrón ambiental detectado. En particular, las cinco variables ambientales medidas y cuyos niveles podrían reflejar más claramente los efectos de los vertidos sobre el agua de mar, es decir: Sólidos disueltos totales, bacterias coliformes fecales, turbidez, materia orgánica total y fosfatos totales explican la separación de las *Localidades*. En coincidencia, la alta concentración de sólidos disueltos totales coincidió con los más altos valores de turbidez y de materia orgánica particulada (B° Canal de Beagle, rebalse del B° Bahía y desembocadura del Arroyo Grande) por Diodato et al. (2018) quienes lo relacionan al aporte de

descargas domésticas no tratadas. Fueron estas variables, especialmente sólidos disueltos totales y bacterias coliformes, las variables que significativamente mejor explicaron el patrón biótico detectado (condición impactada y no impactada).

Con base en estos resultados se concluye que la detección de una CMB con una mayor diversidad específica y complejidad estructural, que denota una comunidad en buen estado natural, únicamente dentro las localidades no impactadas en contraposición con lo hallado en las localidades impactadas guarda relación con los productos vertidos por los efluentes.

3. ANÁLISIS DE ADN AMBIENTAL POR *METABARCODING*.

3.a. Introducción

La metodología de ADN_a se basa en el hecho de que los organismos liberan células en el medio en que habitan, por descamación ya sea a través de la piel, heces u orina. Esto permite que, a partir de una muestra ambiental, de agua, sedimento o aire, se pueda detectar la presencia de una especie en particular o estimar la composición de una comunidad. En este último caso, como la detección de especies es masiva (dado que las comunidades pueden estar compuestas por un gran número de especies), la metodología de análisis se denomina *metabarcoding*, o sea, identificación simultánea de secuencias cortas de ADN de múltiples taxones. El metabarcoding de ADN_a revolucionó la forma de abordar los estudios de biodiversidad y su monitoreo (Deiner et al. 2017, Kelly et al. 2014, Valentini et al. 2016). El uso de métodos moleculares para detectar particularmente especies acuáticas ha proliferado en los últimos años en todo el mundo. Un paso fundamental para optimizar y refrendar los resultados obtenidos por metabarcoding de ADN_a es contar con una base de datos genéticos de las especies locales. Para ello, los códigos de barra genéticos obtenidos a partir de la secuenciación del gen de la Citocromo Oxidasa I (COI) mitocondrial se utilizan a nivel mundial como “huella digital” de las diferentes especies.

El análisis propuesto para este proyecto se apoya en la obtención previa (260 individuos de referencia) de códigos de barra genéticos de las diversas especies de la CMB del CB. A partir de las muestras colectadas con este estudio se incorporaron 90 secuencias más, constituyendo una base de referencia final con 350 secuencias locales. De cada ejemplar se extrajo ADN siguiendo el protocolo propuesto por Gemmell y Akiyama (1986). Luego se amplificó y secuenció el gen de la COI. Las secuencias de ADN fueron editadas y alineadas manualmente por medio del programa MEGA v.7 (Kumar et al. 2016) (Figura 54) y su identidad se corroboró por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI

(National Center for Biotechnology Information). En todos los casos se alcanzó el nivel taxonómico de Familia y en algunos el de especie. La matriz de referencia de códigos de barra genéticos desarrollada a partir de individuos de especies de la CMB del CB es fundamental para la implementación de metodologías de monitoreo basadas en ADN en la región. Esta información es muy valiosa dado que conforma una lista de especies genéticas a nivel local en el CB y porque salva distancias con las bases de datos internacionales generalmente engrosadas a partir de especies de otros lugares del mundo y por complementarlas. Así se podrán refrendar de manera más detallada las secuencias de ADN obtenidas en otros estudios como el presente.

3.b. Colecta de muestras, obtención de ADN y secuenciado.

Siguiendo el diseño muestral de la CMB, se colectó una muestra de agua de 5 litros por cada *Área x Sitio x Localidad*, contabilizando 30 muestras en toda la zona de estudio (Figura 55). Las mismas fueron filtradas utilizando un tren de filtración con bomba de vacío (Figura 56). Se utilizaron monitores con filtros estériles de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro. Todos los filtros fueron debidamente rotulados y almacenados a -80C para su correcta preservación hasta el momento de la extracción de ADN.

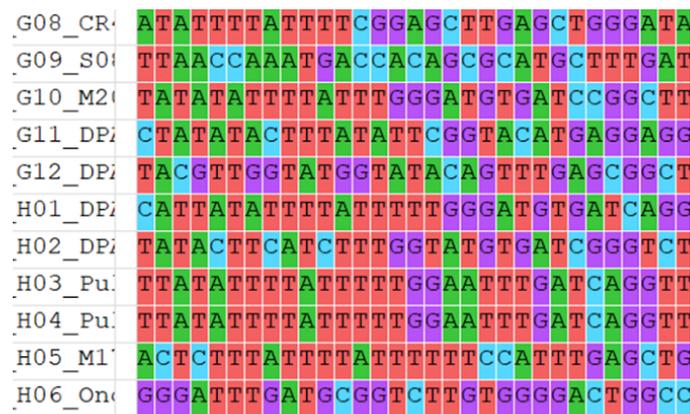


Figura 54. Extracto de una sección del alineamiento generado en el programa MEGA v7 a partir de las secuencias de ADN del gen COI.



Figura 55. Toma de muestra de agua para análisis de ADN.



Figura 56. Filtrado de la muestra en laboratorio y filtros finales.

La extracción de ADN se realizó a partir de la mitad de cada filtro, conservando la otra en freezer a -80°C . Para su obtención se utilizó Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB por sus siglas en inglés de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) a partir del cual se obtuvo un buen rendimiento de ADN total por muestra (ver Figura 57 y 58).

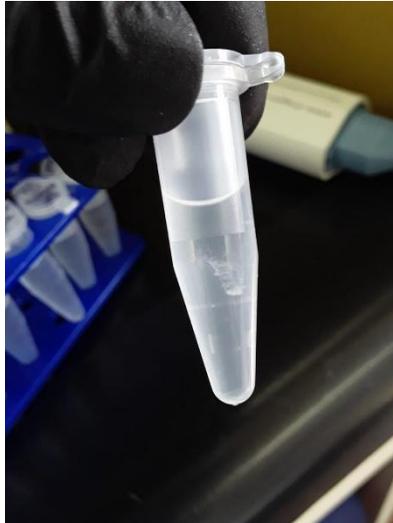


Figura 57. ADN ambiental en suspensión de isopropanol.

A partir del ADN total obtenido se realizó el amplificado del fragmento de ADN de interés del gen de la enzima Citocromo oxidasa 1 (COI, aprox. 313 pares de bases de la región 5'). Los cebadores que se utilizaron fueron los siguientes: mICOLintF-XT 5'-GGWACWRGWTGRACWITITAYCCYCC-3' (modificado de Leray et al. 2013); jgHCO2198 5'-TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA-3' (Geller et al. 2013). Se incluyó un control denominado "blanco", que se generó a partir del filtrado de 1 litro de agua MiliQ (control interno de los procesos de toma de agua, filtrado y extracción de ADN), y un control "negativo". Este último consiste en agregar agua estéril en lugar de ADN al momento de la PCR (control interno del funcionamiento de la PCR).

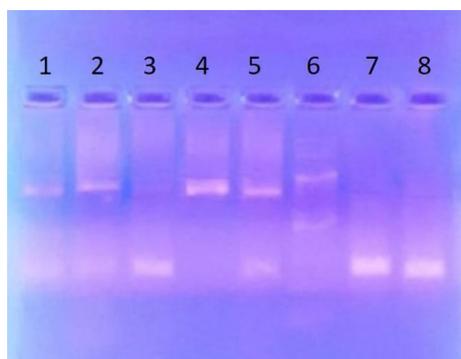


Figura 58. Gel de agarosa al 2% donde se observan los amplificados positivos (calles 1 a 5), el marcador de peso molecular de referencia (calle 6) y los controles Negativo y Blanco (calles 7 y 8, respectivamente).

Los productos de PCR se purificaron por medio de un kit comercial basado en columnas de sílica. Posteriormente y para construir la biblioteca genómica se realizó una segunda PCR por medio de la cual se añadieron las etiquetas moleculares que identifican cada muestra (Figura 59).



Figura 59. Gel de agarosa al 2% utilizado para corroborar la unión de las etiquetas moleculares a los amplificados de la PCR1. En la calle 1 se observa el producto de PCR1 y en la calle 2 la misma muestra luego de la PCR2, se corrobora mayor intensidad y tamaño.

Cada producto de PCR de la PCR2 se purificó nuevamente por medio de columnas y se cuantificó en un fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific). Este paso es muy importante dado que para el armado de la librería genómica es necesario incorporar la misma cantidad de ADN de cada muestra. Se construyó el *pool* de productos de PCR o librería, y la misma se envió para su secuenciación al servicio del Instituto Malbrán en la ciudad de Buenos Aires. A continuación, se detallan los valores obtenidos para cada una de las muestras, tanto en número de lecturas como en porcentaje de guanina y citosina (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de los parámetros obtenidos por medio de la secuenciación Illumina Mi-Seq.

<i>Muestra x Sitio x Área</i>	<i>Profundidad de lectura</i>	<i>%GC</i>	<i>Muestra x Sitio x Área</i>	<i>Profundidad de lectura</i>	<i>%GC</i>
S1-A1	33405,59X	39	S9-A17	10467,95X	41
S1-A2	35037,09X	38	S9-A18	18103,38X	39
S2-A3	16450,54X	38	S10-A19	23969,24X	45
S2-A4	35170,12X	38	S10-A20	13654,4X	43
S3-A5	33813,46X	38	S11-A21	24707,19X	39
S3-A6	14696,05X	39	S11-A22	32559,72X	40
S4-A7	9928,31X	37	S12-A23	26050,03X	40
S4-A8	18986,9X	39	S12-A24	10427,8X	51
S5-A9	16970,11X	43	S13-A25	12911,44X	43
S5-A10	9973,49X	38	S13-A26	25613,29X	47
S6-A11	14973,41X	42	S14-A27	2241,43X	44
S6-A12	25073,65X	39	S14-A28	23976,78X	45
S7-A13	17650,32X	39	S15-A29	17561,22X	42
S7-A14	21951,21X	39	S15-A30	15762,8X	44
S8-A15	28600,19X	47	Control Negativo	3323,24X	52
S8-A16	31979,91X	39	Control Blanco	233,43X	49

Para el análisis de las secuencias se utilizó un procedimiento bioinformático denominado Barque v1.8.5 (Mathon et al. 2021). En base al mismo se realizó un análisis de metabarcoding sobre la región de la enzima COI. Primero realiza una exclusión de las secuencias de mala calidad y luego, con el conjunto de datos seleccionado, realiza una asignación taxonómica sobre una base de datos provista, en este caso con las secuencias de referencia procedentes del Canal Beagle mencionadas más arriba (ver inciso 3.a). De esta forma agrupa las secuencias en Unidades Taxonómicamente Operativas (OTUs por sus siglas en inglés), y se registra para cada una el número de lecturas existente por OTU por muestra. En este proceso, la asignación taxonómica se realizó con un porcentaje de similitud mínima del 98% y pudieron asignarse a nivel de especie, género o familia.

El detalle de los pasos realizados es el siguiente: filtrado y supresión de las regiones de mala calidad de las secuencias crudas (en este paso se retira la secuencia de los cebadores), ensamblado de las secuencias *forward* y *reverse* en una única lectura consenso. Búsqueda de quimeras y eliminación del “ruido” de las lecturas. Finalmente, identificación de especies (utilizando la base de datos generada con las muestras de organismos del CB complementada con las bases

de datos en línea BOLD y GenBank) u OTUs asociadas con lecturas únicas y de buena calidad.

La matriz obtenida por cada una de las 5 localidades de muestreo fue analizada estadísticamente según los mismos procedimientos implementados para el análisis de comunidades (ver sección 2.f). Se añadió una estandarización por el total de la matriz biótica, previa transformación y posteriormente se cálculo de disimilitud de Bray-Curtis.

3.c. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos según el análisis de coordenadas principales (Figura 60) muestran una leve tendencia hacia tres agrupamientos según el PCO1, a) Ref. Este - Ushuaia, b) Referencia Oeste, y c) Dispensor y Arroyo Grande. A diferencia del análisis de CMB (ver inciso 2.g), no es posible separar las *Localidades* según la *Condición* (Impactada - No Impactada). Los porcentajes que explican ambos ejes son menores al 50%, por lo que aunque es posible observar una tendencia, no es posible considerar estos como agrupamientos robustos.

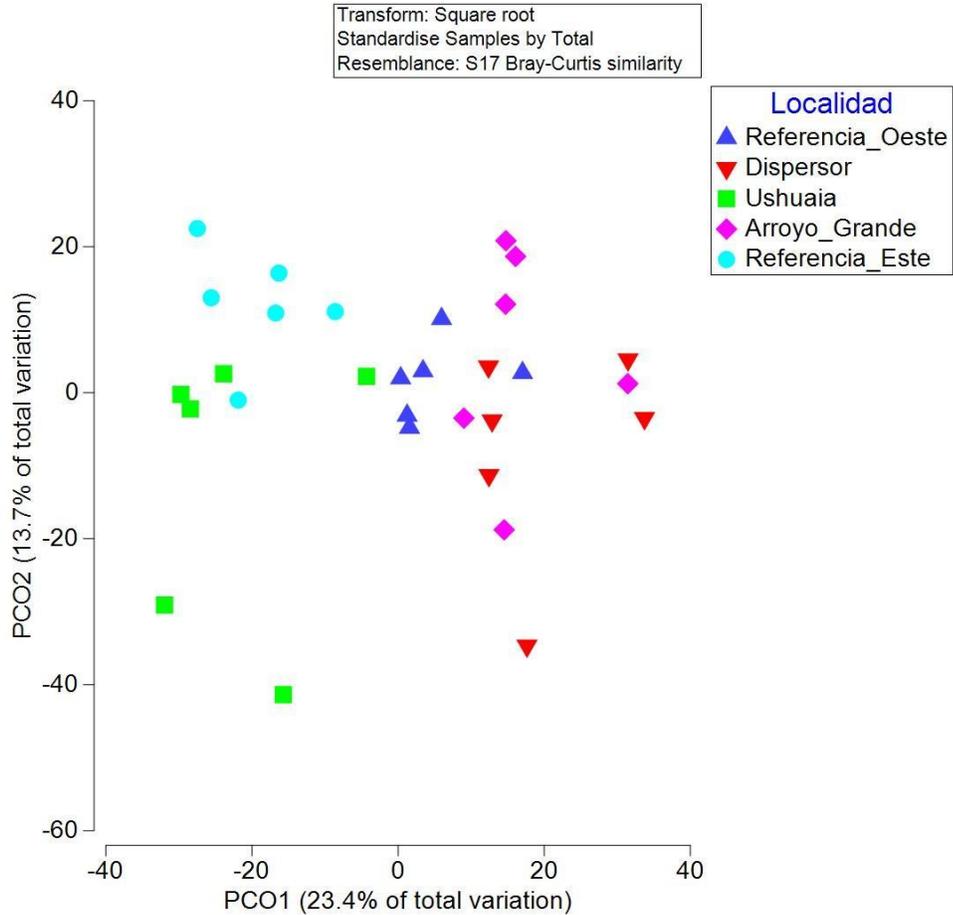


Figura 60. Gráfico de componentes principales. En distintos colores se representan las *Localidades*.

Algo muy similar ocurrió en el análisis de sombras (Figura 61), donde no se observa un patrón que agrupa las *Localidades* por condición; cada *Localidad* presenta una caracterización propia. La Ref. Oeste presenta mayor diversidad respecto de la Ref. Este. En los sitios impactados, algunos grupos como por ejemplo el de los artrópodos, presentan una mayor frecuencia de aparición.

y las del Océano Atlántico, más cálidas y saladas. Iachetti et al. (2021) observaron, en base a factores abióticos, la diferenciación en dos zonas, ubicadas a los lados de dicho paso, una denominada “interna” (al oeste) y otra “externa” (al este). Los autores sugieren que esta sectorización ambiental debería tener un correlato biótico. Actualmente, parte de nuestro grupo de trabajo se encuentra llevando a cabo un observatorio de biodiversidad del CB, que busca responder esta hipótesis, basándose en ADN ambiental y en 10 estaciones de muestreo equidistantes que abarcan desde Bahía Saenz Valiente hasta Isla Picton. Considerando la hipótesis de un gradiente biótico de Oeste a Este, deberíamos esperar que las *Localidades* se distribuyan según su diversidad de especies del siguiente modo: Ref. Oeste - Dispensor - Ushuaia - Arroyo Grande - Referencia Este. Para el caso del CB, Iachetti et al. (2021) presentan valores de salinidad que aumentan levemente hacia el Este, por lo tanto sería esperable que la biodiversidad bentónica del intermareal siga este mismo patrón (diversidad decreciente en sentido Oeste - Este). Un tipo similar de gradiente fue propuesto por Lacoursière-Roussel et al. (2018), quienes estudiando la comunidad del bentos en el Ártico a través de ADN ambiental, encontraron que la riqueza específica decrece con el aumento de la salinidad. Según el análisis de Componentes Principales (Figura 60) podemos observar que la relación de ambas Referencias (Oeste y Este) se encuentran en un orden, pero los sitios Impactados se ven desplazados, según el PCO1: Ref Este - Ushuaia - Ref. Oeste - Arroyo Grande - Dispensor.

Considerando que distintos métodos de muestreo pueden obtener información diferente de un mismo ambiente o ecosistema, los resultados obtenidos por ADN ambiental no son totalmente comparables a aquellos obtenidos por observación directa de organismos, sino que son complementarios (Beng et al. 2020, Weber et al. 2024). Por lo tanto, podemos estar frente a un patrón modificado del gradiente mencionado debido al efecto de los efluentes cloacales sobre la comunidad bentónica. Kelly et al. (2016), quienes realizaron un estudio similar en el Estrecho de Puget (costa noroeste de América del Norte), encontraron que los sitios más urbanizados tenían una diversidad consistentemente mayor que los sitios menos urbanizados (los primeros presentaron 1295 OTUs, mientras que los

segundos tuvieron 790 OTUs). Posiblemente esto mismo esté sucediendo en este caso, donde la tendencia que se observa es la de una mayor diversidad en los sitios impactados en relación a los no impactados. Posiblemente, el proyecto de “Observatorio de Biodiversidad del Canal Beagle” demuestre cuál es el patrón de diversidad biológica natural (datos en proceso de análisis), dado que las muestras se tomaron alejadas de la costa (en general a más de 500 m), ya que son puntos alejados de la influencia de las descargas cloacales y pluvio-cloacales asociadas a la ciudad.

Como se evidenció en el estudio de CMB, en el análisis de bivalvos y en los niveles de nutrientes y materia orgánica, existe un impacto localizado. Dado el movimiento de las masas de agua y particularmente la mezcla que se da en la zona intermareal, se sugiere incorporar muestras de sedimento (además de las de agua somera) para estudios futuros de ADN dado que así puede reducirse el efecto de mezcla de las aguas (Keeley et al. 2018).

Cabe destacar que es la primera vez que se realiza un estudio de ADN ambiental en el CB con el objetivo de evaluar impacto ambiental por descarga de efluentes cloacales. Es el primer estudio de estas características que se combina con metodologías tradicionales para el estudio de la diversidad biológica del bentos marino. Por ello, constituye una instancia de gran valor para determinar cuál es el conjunto de herramientas que permitan realizar una mejor evaluación del estado de este ecosistema en particular y la interacción de la actividad humana sobre él. Destacamos la necesidad de estandarizar los estudios de ADN ambiental en el espacio y el tiempo para evaluar con precisión los cambios en la estructura de la comunidad y consideramos de suma importancia repetirlos a lo largo de las distintas estaciones del año.

4. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE TOXICIDAD EN PECES

4.a. Introducción

A medida que la población humana aumenta y progresa rápidamente, numerosos hábitats acuáticos naturales se destruyen debido a, entre otros factores, procesos de expansión urbana (Geist & Hawkins 2016). La urbanización conduce a la destrucción y fragmentación del hábitat, la modificación de los canales de agua, la degradación de la calidad y la composición química del ambiente, el aumento de la sedimentación, el aumento de la temperatura del agua y la inestabilidad general de los ecosistemas. En consecuencia, estos factores representan una amenaza significativa para los organismos que habitan estos ecosistemas (Paul & Meyer 2001, Di Prinzio et al. 2009, Miserendino et al. 2008, 2011). Entre los factores estresantes asociados a la urbanización sobre los ecosistemas acuáticos, la descarga de aguas residuales se considera uno de los factores más dañinos debido a sus altas concentraciones de una amplia gama de contaminantes acuáticos (Du et al. 2019, Mehdi et al. 2019).

Diferentes procesos celulares en los organismos acuáticos pueden verse afectados negativamente por la exposición a estos contaminantes. Dichos efectos, pueden detectarse de manera temprana, mediante una batería de biomarcadores. Estos biomarcadores son respuestas biológicas que deben ser sensibles a niveles bajos de contaminantes, pero aun así representativas de un riesgo real o potencial para el organismo individual o la población.

La mayoría de los organismos han desarrollado un complejo sistema antioxidante que protege las membranas celulares y orgánulos de los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), siendo los principales sistemas enzimáticos la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Nagarani et al. 2011). Este proceso de desbalance entre especies oxidantes y antioxidantes, que requiere la activación de mecanismos celulares para ser subsanado, se denomina estrés oxidativo. La cuantificación de la

actividad de estas enzimas es utilizada como biomarcador de este proceso y suelen ser útiles en monitoreos para establecer posibles efectos de estresores ambientales. En este sentido, se ha evidenciado que fluctuaciones en la temperatura del agua, generan respuestas enzimáticas al estrés oxidativo en el pez de intermareales rocosos *Gobius paganellus* (Vinagre et al. 2014). En respuesta a altos niveles de metales pesados originados por derrames mineros, se han detectado efectos en las enzimas antioxidantes de distintas especies de peces estuariales (Gabriel et al. 2020).

Dentro de los biomarcadores de alarma temprana, también se ha destacado la evaluación del daño al ADN en organismos acuáticos, dado que posibles efectos genotóxicos podrían conducir al inicio de un proceso de carcinogenicidad cuando el objetivo son células somáticas, y a mutaciones hereditarias y defectos de reproducción cuando las células germinales se ven afectadas. Estos eventos pueden conducir a deterioro reproductivo y cambios posteriores en la dinámica poblacional (Belfiore & Anderson 2001, Bony et al. 2008, 2010). La evaluación de la genotoxicidad en peces expuestos a contaminantes se ha realizado clásicamente utilizando la prueba de micronúcleos (MN) (Iturburu et al. 2018). Las respuestas genotóxicas pueden desencadenar una cadena dañina de cambios biológicos (por ejemplo, alteraciones de la reproducción, inhibición del crecimiento, carcinogénesis), algunos de los cuales pueden transmitirse a las siguientes generaciones. Estas respuestas también pueden conducir a una pérdida de diversidad genética (Mitchelmore & Chipman 1998, Jha 2004, Baršienė et al. 2013). Pueden ocurrir diferentes tipos de daño en el ADN cuando los organismos están expuestos a la contaminación ambiental. Estos tipos de daño incluyen roturas de una o dos hebras, entre hebras e intra-hebras, entrecruzamientos, aductos de ADN y entrecruzamientos de proteínas de ADN (Wood et al, 2001). La cuantificación de las roturas de las cadenas de ADN (mediante electroforesis o medición de fluorescencia) se considera un indicador sensible de genotoxicidad a nivel molecular (Olive 1988, Gagne & Blasé 1995, Silva et al. 2012, Maranhó et al. 2012, Parolini et al. 2013). A nivel cromosómico, la formación de micronúcleos y anomalías nucleares en los eritrocitos de los peces también se ha utilizado con éxito como indicadores

de genotoxicidad causada por la contaminación ambiental (i. e., Souza & Fontanetti 2012, Hoshina et al. 2008). Varios estudios han informado de una mayor frecuencia de micronúcleos y anomalías del núcleo en células de peces después de la exposición a, por ejemplo, diferentes metales en condiciones tanto de campo como de laboratorio (Al-Sabti & Metcalfe 1995, Cavas et al. 2005, Cavaş 2008, Isani et al. 2009, Yadav Trivedi 2009).

Otro de los posibles efectos que los contaminantes pueden producir en los organismos acuáticos, es la disfunción de la función nerviosa. Detectar este tipo de efectos de manera temprana, podría evitar efectos a niveles comportamentales, que pudieran comprometer la supervivencia de los organismos (Huang et al. 2022). En particular, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, encargada de degradar el neurotransmisor acetilcolina en el botón sináptico para finalizar el impulso nervioso, se destaca como biomarcador de alarma temprana de este tipo de efectos (Galgani et al. 1992).

Considerando lo previamente expuesto, se estableció como objetivo: analizar biomarcadores de estrés oxidativo, genotoxicidad y neurotoxicidad en peces del intermareal que habitan localidades potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales, y compararlos con zonas potencialmente no impactadas por las descargas.

4.b. Materiales y métodos

4.b.1 Recolección de peces y preparación de muestras

Los ejemplares colectados fueron mantenidos en agua de mar bajo aireación hasta su transporte al laboratorio. Antes de ser sacrificados mediante sección de la médula espinal, los individuos fueron anestesiados con benzocaína (0,01%) en agua, luego pesados y medidos.

4.b.2. Biomarcadores de Estrés Oxidativo y Biotransformación

En las muestras de hígado se cuantificó la actividad de las enzimas catalasa

(CAT) y la glutatión-S-transferasa (GST). La primera desdobra la especie reactiva de oxígeno H_2O_2 a O_2 y H_2O , por lo que es un biomarcador clásico de estrés oxidativo. La GST es una familia de enzimas de fase 2, que conjuga el tripéptido glutatión a diferentes moléculas para que puedan ser metabolizadas/eliminadas. Dentro de esas moléculas se encuentran no solo contaminantes, sino también peróxidos lipídicos producto del estrés oxidativo. Por lo tanto, la GST se puede considerar un biomarcador de biotransformación y de estrés oxidativo a la vez. Los biomarcadores evaluados se analizaron por espectrofotometría a partir de extractos enzimáticos de los tejidos mencionados. La extracción de enzimas se realizó de acuerdo a Iturburu et al. (2018): se realizaron homogenatos en buffer fosfato de sodio 0,1 M a pH 6,5, Ditioneitol (DTE) 14 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante para la cuantificación de actividad enzimática. La actividad de la enzima catalasa (CAT) se cuantificó mediante la medición de desaparición del reactivo peróxido de hidrógeno (a 240 nm) según Claiborne (1985). La actividad de glutatión-S-transferasa (GST) fue determinada utilizando la reacción del glutatión reducido (GSH) con 1- cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) como sustrato (Habig et al. 1974), que da como resultado un producto colorimétrico (1-(S-glutatión)-2,4-dinitrobenceno) con absorbancia a 340 nm de longitud de onda. Al igual que para los homogenatos de músculo y encéfalo, se realizó la cuantificación de la concentración de proteínas según el método de Bradford (1976).

4.b.3. Biomarcadores de Genotoxicidad

Se seleccionaron las muestras de la especie *Patagonotothen cornucola* debido a que fue encontrada en todos los sitios estudiados. Además, se eligió la especie bioindicadora *P. cornucola* por ser una especie potencialmente expuesta a sedimentos contaminados en las localidades estudiadas, dado que tiene hábitos demersales, se alimenta principalmente de macrobentos (especialmente crustáceos y poliquetos) y pasa todo su ciclo de vida en el intermareal (Hüne & Vega 2016). Para medir los biomarcadores de genotoxicidad, se analizó sangre periférica

extraída del cono arterioso usando jeringas heparinizadas para hacer prueba de micronúcleos (MN) y pruebas de anormalidades nucleares (AN). Se colocaron inmediatamente alícuotas de sangre en portaobjetos de vidrio para microscopía. Antes de secarse al aire, el frotis se fijó con metanol absoluto (30 min) y se tiñó con naranja de acridina. Para cada ejemplar se examinaron 1000 eritrocitos bajo un microscopio de epifluorescencia Leica con un aumento de 1000X y se calificaron en función de la presencia de MN y AN típicos. Las pruebas de MN se realizaron de acuerdo con Heddle (1973) y Schmid (1975), mientras que las AN (con invaginaciones, evaginación) se caracterizaron de acuerdo con Carrasco et al. (1990).

4.b.4. Biomarcadores de neurotoxicidad

En las muestras de encéfalo y músculo se cuantificó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), un biomarcador de neurotoxicidad. La misma se cuantificó según Ellman et al. (1961) a partir de tejidos homogeneizados individualmente en buffer fosfato 0,1 M (pH 8). El homogenato se centrifugó y se separó el sobrenadante resultante para posteriormente medir la actividad de AChE por espectrofotometría (405 nm). El principio de esta medición es la reacción de yoduro de tiocolina y ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), que produce un producto colorimétrico (ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico). Para los homogenatos de ambos tejidos se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), para luego referir la actividad enzimática a la concentración de proteínas (nkat/mg prot).

4.b.5. Cálculos y estadísticas

La estadística exploratoria para cada marcador consistió en comparar entre especies sin considerar el sitio, y posteriormente dentro de cada especie comparando entre sitios. Dicha evaluación se realizó mediante un ANOVA de una vía y con una prueba post hoc de Tukey en los casos que se cumplieron los

supuestos de normalidad y homocedasticidad. En los casos contrarios, se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn.

4.c. Resultados

4.c.1. Estrés Oxidativo y Biotransformación

4.c.1.1. Actividad de la enzima Catalasa en hígado

La actividad de la enzima catalasa, cuando fue comparada entre especies (sin considerar los sitios), evidenció una diferencia significativa (Figura 62). El análisis *post hoc* evidenció que la actividad de *P. cornucola* es significativamente mayor que la de *A. depressiceps*. Al evaluarse entre los distintos sitios muestreados considerando cada especie por separado, la actividad de catalasa en hígado no evidenció diferencias significativas (Figura 62B, 62C, 62D).

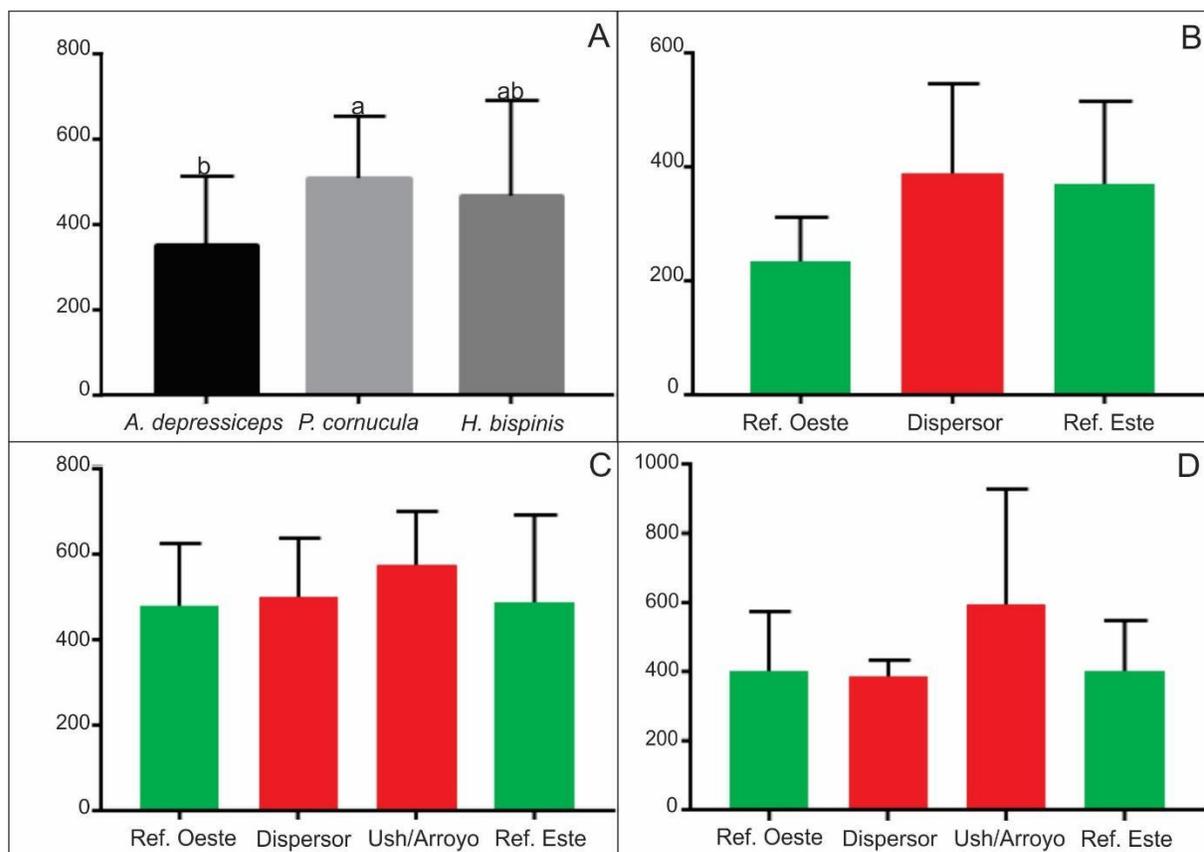


Figura 62. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en hígado en las especies *Austrolycus depressiceps*, *Patagonotothen cornucola* y *Harpagifer bispinis* colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de la enzima catalasa en hígado en *Austrolycus depressiceps* (B), *Patagonotothen cornucola* (C) y *Harpagifer bispinis* (D) comparando entre los diferentes sitios muestreados (valor de $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles basales entre las diferentes especies.

4.c.1.2. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa en hígado

La actividad de la enzima GST se cuantificó en el hígado de las tres especies colectadas. Al realizarse la comparación entre especies (sin considerar las localidades), se observaron diferencias significativas entre las tres (Figura 63A). El análisis post hoc evidenció que la actividad de GST en *A. depressiceps* es significativamente mayor que en *P. cornucola* y ésta a su vez, mayor que la de *H. bispinis*. Por otro lado, cuando se consideró la comparación por especie entre sitios, no se observaron diferencias significativas en *A. depressiceps* ni en *P. cornucola* (Figuras 63B y 63C). Sin embargo, en el caso de la especie *H. bispinis*, la actividad de GST en hígado resultó menor en Ushuaia/ Arroyo Grande que en Referencia Este (Figura 63D).

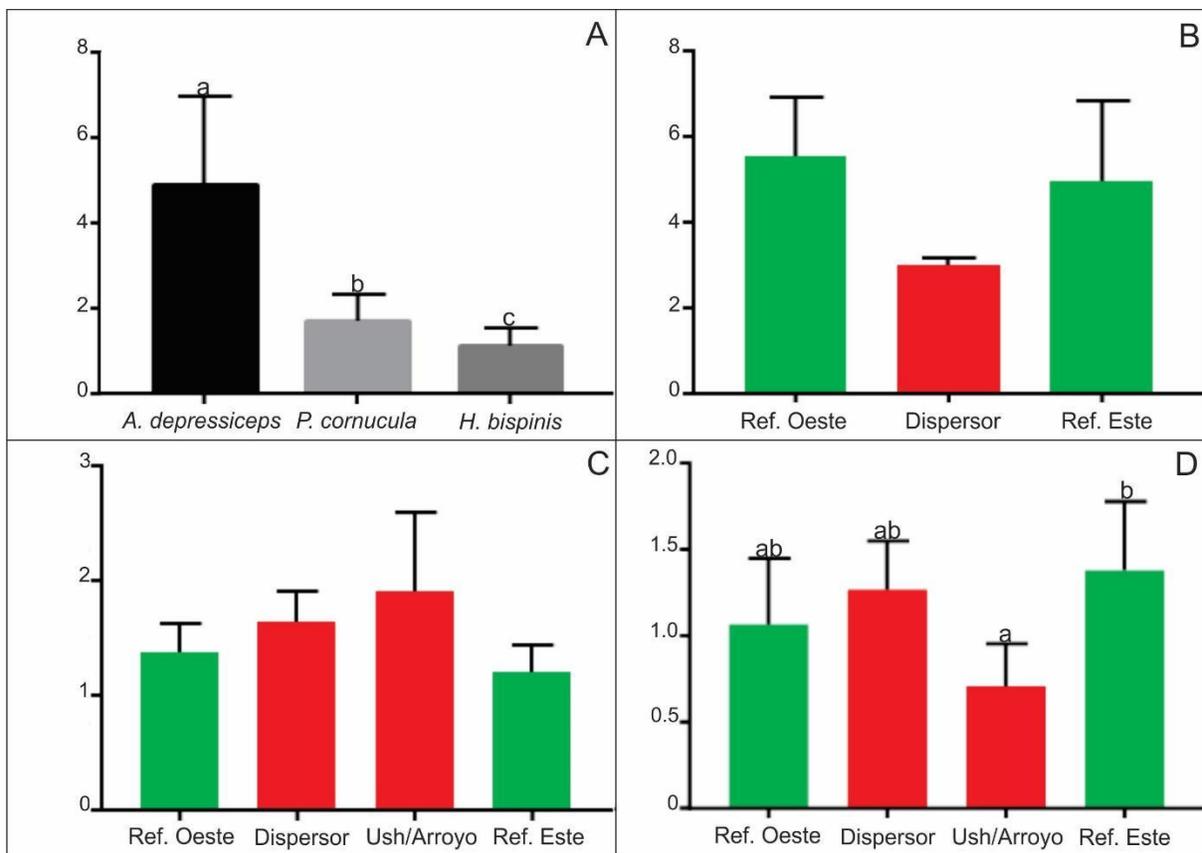


Figura 63. Actividad enzimática de glutatión S- transferasa (GST), en hígado de las especies *Austrolycus depressiceps*, *Patagonotothen cornucula* y *Harpagifer bispinis* colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de la enzima GST en hígado *Austrolycus depressiceps* (B), *Patagonotothen cornucula* (C) y *Harpagifer bispinis* (D) comparando entre los diferentes sitios muestreados (valor de $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles basales entre las diferentes especies. Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles enzimáticos entre la Bahía Ushuaia/ Arroyo Grande y la Referencia Este.

4.c.2. Genotoxicidad

En los preparados sanguíneos de *P. cornucula* se pudieron observar eritrocitos con morfologías normales, algunos con la presencia de micronúcleos (MN) y otros con la presencia de anomalías nucleares (AN) (Figura 64). Ambos biomarcadores (MN y AN) empleados evidenciaron daño en el ADN en las células sanguíneas de *P. cornucula* (Figura 65). Tanto la frecuencia de micronúcleos como la de anomalías nucleares en la condición impactada, mostraron valores

mayores a los encontrados en la condición no impactada. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas entre las alteraciones nucleares totales ($p < 0.05$, Figura 66).

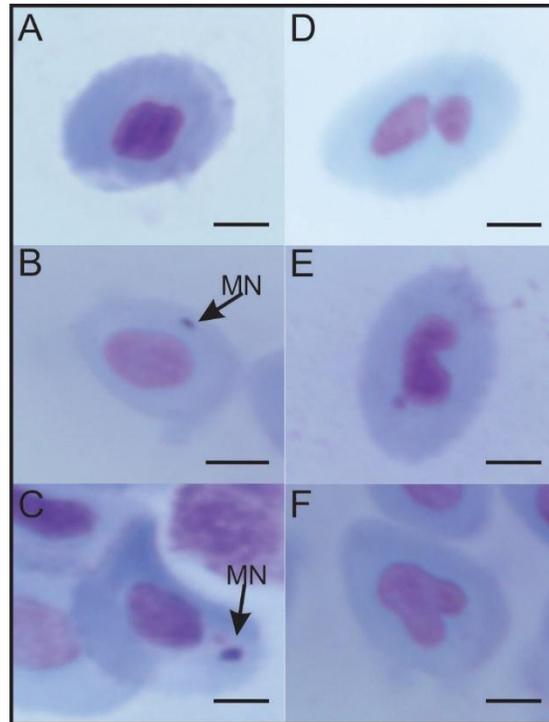


Figura 64. Fotomicrografías de eritrocitos periféricos de *Patagonotothen cornucola* colectados en sitios cercanos a la ciudad de Ushuaia teñidos con colorante Giemsa 15 %. A: eritrocito normal; B,C: células con núcleo normal pero con presencia de un micronúcleo; D: célula binucleada; E: núcleo que presenta la anomalía nuclear de tipo muesca; F: núcleo que presenta la anomalía nuclear de tipo yema. Tamaño de la barra negra: 5 μm .

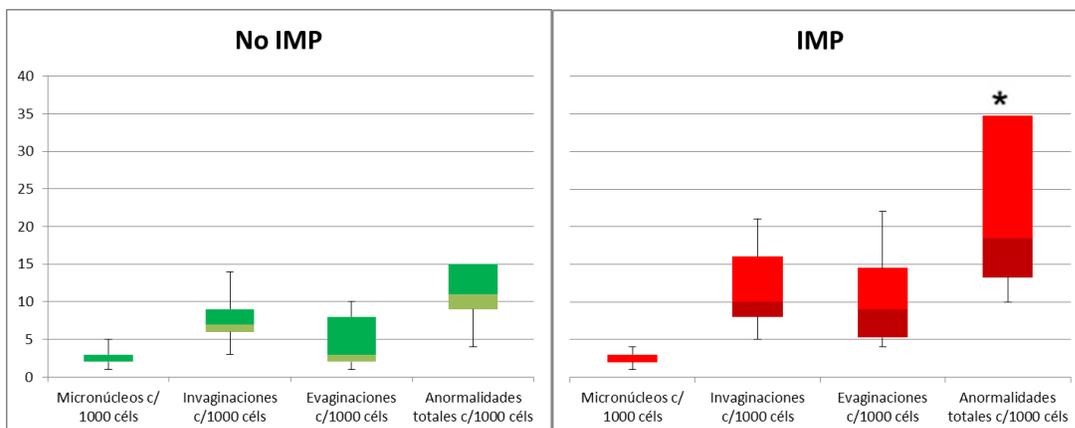


Figura 65. Frecuencias de micronúcleos (MN), invaginaciones, evaginaciones y anomalías nucleares totales en eritrocitos de *Patagonotothen cornucola* en condición impactada y en condición no impactada. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre los niveles impactado y no impactado ($p < 0.05$).

4.c.3. Biomarcador de neurotoxicidad

4.c.3.1. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en encéfalo

Los valores de actividad de AChE en encéfalo comparados entre especies (sin considerar la localidad), evidencia niveles de actividad similares entre las mismas (Figura 66). Considerando a cada especie por separado, la actividad de AChE en *A. depressiceps* y *H. bispinis* no evidenció diferencias al ser comparada entre localidades (Figuras 66B y 66D). Sin embargo, al realizar una comparación entre localidades para la enzima AChE de la especie *P. cornucola*, se observó una mayor actividad en encéfalo para la localidad Dispensor (Figura 66C) comparativamente con la localidad Referencia Oeste.

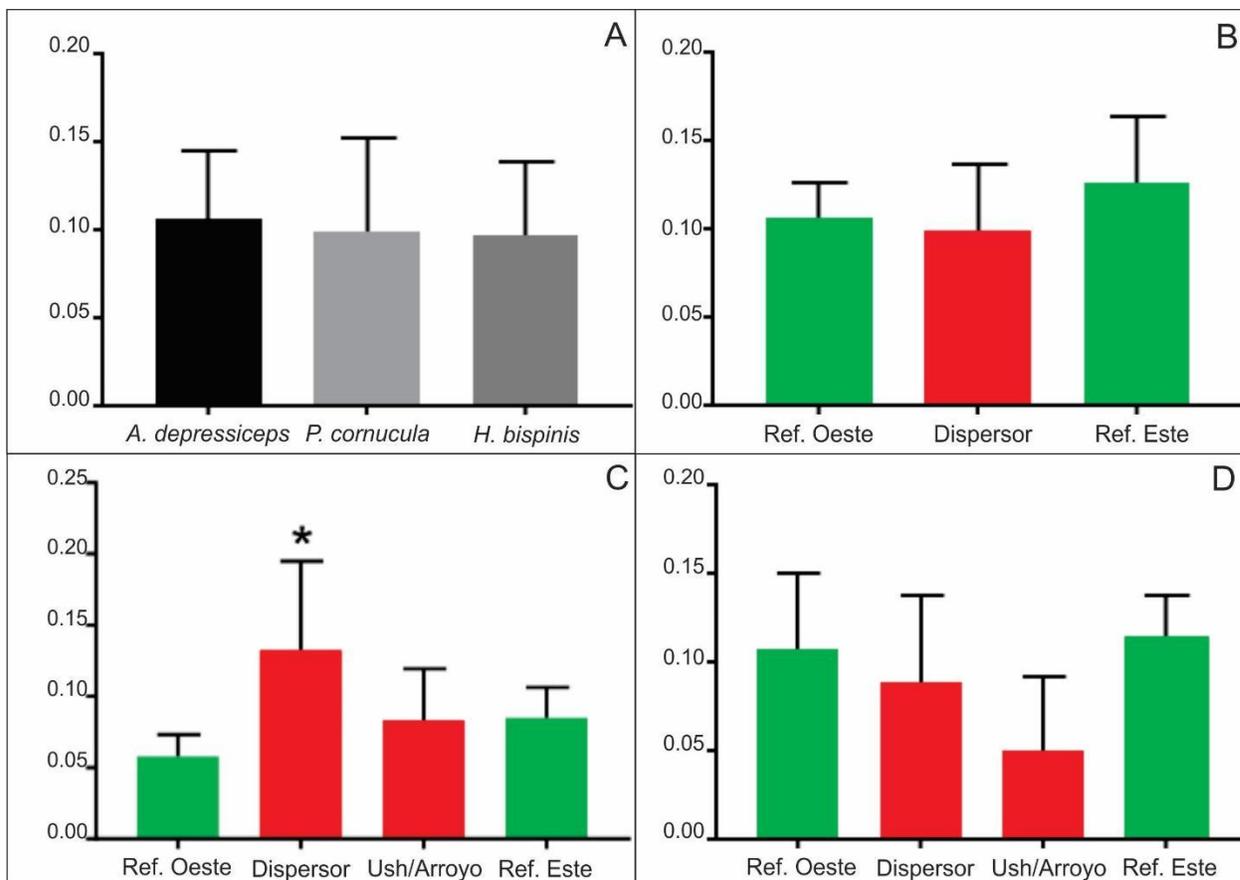


Figura 66. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en encéfalo en las especies *Austrolycus depressiceps*, *Patagonotothen cornucula* y *Harpagifer bispinis* colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de AChE en encéfalo en *Austrolycus depressiceps* (B), *Patagonotothen cornucula* (C) y *Harpagifer bispinis* (D) comparando entre las diferentes localidades muestreadas. El asterisco (*) indica una diferencia significativa con sus entre los valores encontrados en el Dispensor y la Referencia Oeste (valor de $p < 0,05$).

4.c.3.2. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en músculo

La actividad de AChE en músculo, a diferencia de lo que sucedió en encéfalo, evidenció diferencias significativas entre especies (sin considerar la localidad), siendo la actividad de *A. depressiceps* mayor a la de *H. bispinis*, y esta superior a la actividad de *P. cornucula* (Figura 67A). Sin embargo, cuando se compara entre localidades considerando cada especie por separado, no se evidenciaron diferencias significativas para ninguna de las especies en la actividad de AChE en

músculo (Figura 67B, 67C, 67D).

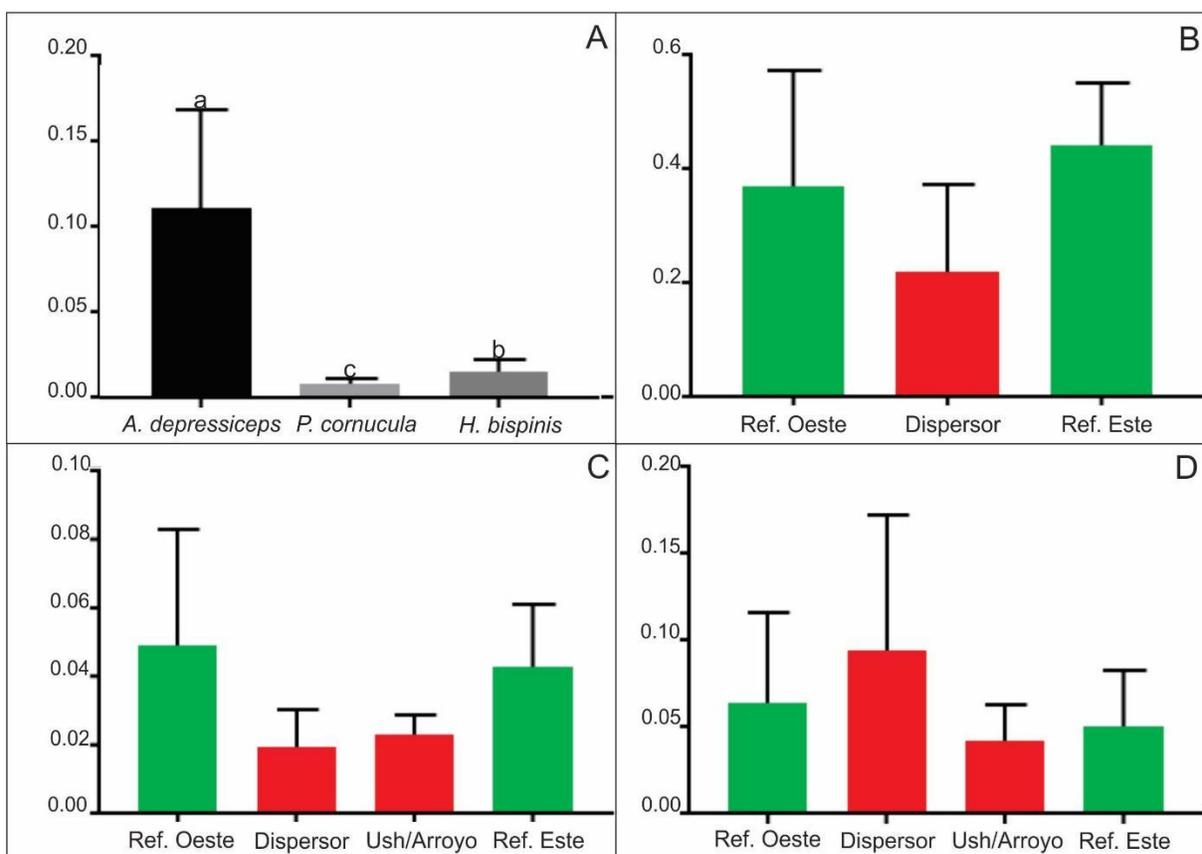


Figura 67. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en músculo en las especies *Austrolycus depressiceps*, *Patagonotothen cornucola* y *Harpagifer bispinis* colectados en cercanías de la ciudad de Ushuaia (A). Actividad de AChE en músculo en *Austrolycus depressiceps* (B), *Patagonotothen cornucola* (C) y *Harpagifer bispinis* (D) comparando entre las diferentes localidades muestreadas. (Valor de $p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias en los niveles basales entre las diferentes especies.

4.d. Discusión

Se pudieron cuantificar los cuatro biomarcadores bioquímicos (catalasa y GST en hígado, acetilcolinesterasa en encéfalo y músculo) originalmente propuestos en las tres especies monitoreadas: *A. depressiceps*, *P. cornucola* y *H. bispinis*. En lo que respecta a actividad basal de las especies, a excepción de AChE en encéfalo, los otros biomarcadores mostraron diferencias significativas entre especies. Sin embargo, los patrones de CAT y GST en hígado y AChE en músculo no mostraron

que la misma especie sea la que mayor actividad enzimática tenga en todos los casos. Los altos niveles de las enzimas (AChE y GST) en *A. depressiceps* podrían estar relacionados con una posible sensibilidad de la especie a determinadas condiciones ambientales: mientras que presentó los niveles basales de actividad más altos, en las áreas *a priori* más impactadas esta especie no fue siquiera encontrada. Ya es conocido que los organismos pueden variar su respuesta ante los contaminantes (Ball & Mudge, 2008). Algunos organismos son muy sensibles ante las condiciones de impacto, otros pueden tolerar diferentes grados de *stress*, indicado como especies oportunistas las que alcanzan grandes números en áreas impactadas (Grime 1977). Podría ser el caso de *P. cornuola* que fue colectada en la mayoría de los *sitios* muestreados en gran número.

Respecto al análisis de cada biomarcador por especie y por localidad, se observaron dos efectos. El primero fue un aumento de la actividad de AChE en el encéfalo de *P. cornuola* en el Dispensor con respecto a la Referencia Oeste; dicho aumento enzimático pondría en evidencia un efecto neurotóxico de algún compuesto en el área del Dispensor. El segundo efecto es una disminución de GST en *Harpagifer bispinis* en Ushuaia/Arroyo Grande respecto a Referencia Este; esta baja en la actividad enzimática podría ser un efecto de daño oxidativo en la molécula de la enzima por algún componente presente en Ushuaia/Arroyo Grande. Otra posible explicación podría estar asociada a la carga microbiológica presente en el cuerpo de agua: en diferentes especies de peces se encontraron bajos niveles de actividad de la enzima GST asociados a la presencia de parásitos (Frank et al. 2011). Por lo tanto, nuestros resultados enfatizan la necesidad de enfoques más integradores en la investigación de la contaminación ambiental para identificar claramente las posibles causas de los bajos niveles de GST en *H. bispinis*, en un esfuerzo por desarrollar biomarcadores para evaluar la salud ambiental.

La evaluación de la genotoxicidad a partir de anomalías nucleares en *P. cornuola* evidenció que la frecuencia de estos biomarcadores fue mayor en la condición impactada respecto de la no impactada, con diferencias significativas en el número de anomalías nucleares. Tanto los micronúcleos como las anomalías nucleares ya han demostrado presentar mayores frecuencias en peces que se

encuentran en áreas impactadas por contaminantes orgánicos entre otros componentes (Ayllon & Garcia-Vazquez 2000, Cavas & Ergene-Gozukara 2003, Carrasco et al. 1990, Bombail et al. 2001). Los análisis de genotoxicidad han sido considerados un indicador de contaminación eficiente, especialmente por su sensibilidad y correlación con la zona impactada. El tejido sanguíneo presenta una mayor capacidad de respuesta a los contaminantes debido a la mayor vida útil de las células eritrocitos en comparación con las células de los tejidos de riñón, hígado y branquias (Ramsdorf et al. 2009). Además, los datos de genotoxicidad pueden usarse como señales de alerta temprana de degradación, permitiendo la implementación de medidas de control siempre que se detecte un riesgo biológico (Pisoni et al. 2004).

Resultaría relevante a futuro, evaluar estos biomarcadores en otras estaciones del año, dado que los mecanismos de reparación del ADN pueden ser más eficaces cuando la temperatura del agua es más alta (situación que también aumenta el metabolismo de los peces). Estudios anteriores demostraron el papel de las bajas temperaturas en el daño del ADN: sería probable que esto ocurra porque la síntesis de proteínas disminuye como resultado de las bajas tasas de traducción del ARN (Benincá et al. 2012, Pellacani et al. 2006, Buschini et al. 2003). Por lo tanto, los mecanismos de reparación del ADN pueden ser más lentos y menos eficientes, y eventualmente pueden conducir a daño genético (Pellacani et al. 2006, Buschini et al. 2003). El uso de respuestas de genotoxicidad para la evaluación de impacto ambiental de AMP debe tener en cuenta las variaciones estacionales en los mecanismos de reparación del ADN y los cromosomas.

5. TALLA Y BIOMASA DE MITÍLIDOS COMO INDICADORES DE IMPACTO

5.a. Introducción

Los bivalvos en general y los pertenecientes al género *Mytilus* spp. en particular son considerados organismos centinelas para la detección de impacto ambiental por contaminación antropogénica (Rocchetta et al. 2014, Giarratano 2010, Pampanin et al. 2005), ya que presentan ciertos atributos (Farrington y col. 1983):

- son cosmopolitas y esto posibilita comparar resultados;
- son sésiles, por lo que reflejan el estado de contaminación de una zona determinada;
- concentran sustancias, muchas de ellas contaminantes de interés, de 2 a 5 órdenes de magnitud por sobre los valores presentes en el agua, facilitando su detección;
- permiten una evaluación más precisa del grado de contaminación por ciertas sustancias, ya que toleran mayores niveles de exposición que otros grupos de organismos;
- tienen poblaciones locales estables, lo que permite monitoreos a corto y largo plazo.

Los índices son herramientas ampliamente utilizadas en programas de monitoreo ambiental, ya que resumen información compleja convirtiéndola en datos fácilmente interpretables por diferentes actores sociales (Culhane et al. 2019). Uno de los índices más usados para evaluar impacto ambiental es el “índice de condición” (IC), que indica el estado fisiológico o de salud de los organismos (Pampanin et al. 2005, Derbali 2023). Los IC son de tipo morfométricos y generalmente tienen en cuenta las dimensiones y la biomasa de los ejemplares. En el caso particular de los bivalvos, habitualmente se considera la talla de las valvas (largo, ancho y/o alto), y la biomasa, ya sea del ejemplar completo, del tejido blando

y/o de las valvas (Giarratano 2010, Castaños 2016, Rocchetta et al. 2014; Veiga et al. 2020, Lander et al. 2012; Kristan et al. 2014). Dependiendo de los parámetros que se utilicen para calcular el IC, puede resultar más o menos costoso en tiempo de trabajo, ya que para la obtención de algunas de las variables es necesario procesar el material biológico en forma previa al cálculo, por ejemplo: secado en estufa de los ejemplares, separación del tejido blando de las valvas, entre otros. Además de los IC, la estructura de tallas de bivalvos suele utilizarse como indicador de impacto ambiental, ya que varía ante la presencia de disturbios (Veiga et al. 2020; de la Ossa Carretero et al. 2008).

En el intermareal del canal Beagle se observan bancos compuestos por tres especies de bivalvos pertenecientes a la familia Mytilidae: *Mytilus chilensis* (mejillón), *Aulacomya atra* (cholga) y *Brachidontes purpuratus* (mejillín). El objetivo del presente apartado, como complemento al análisis de comunidades macrobentónicas, consistió en valerse de parámetros morfométricos para detectar impacto ambiental debido a las descargas de efluentes cloacales y/o pluvio-cloacales asociados a las *Localidades* estudiadas (ver Apartado 2.c, Figura 9). Además, se calcularon 3 (tres) diferentes IC que tienen en cuenta diferentes parámetros morfométricos, con distinto costo en cuanto a tiempo de trabajo, para evaluar si eran o no equivalentes y poder ofrecer opciones de monitoreo más expeditivas.

5.b. Materiales y métodos

Previo al comienzo del muestreo de comunidades, se tomaron muestras de mitílidos de banco en la parte más baja del intermareal: mejillones (*Mytilus chilensis*), cholgas (*Aulacomya atra*) y mejillines (*Brachidontes purpuratus*). El nombre *Brachidontes purpuratus* fue utilizado en el presente informe para nombrar a la especie, aunque es sinonimia de *Perumytilus purpuratus* que es el nombre aceptado actualmente (WoRMS Editorial Board 2024). En cada *Sitio*, se colectaron 2 (dos) muestras de mitílidos por cada *Área* (total de cuatro por *Sitio*) utilizando un *corer* (sacabocado) cilíndrico de 11 cm de diámetro y 10 cm de alto con una espátula

para despegar a los ejemplares del sustrato (Vallarino 2002) (Figura 69). En algunos *Sitios* con alto porcentaje de cobertura de sustratos de pequeña granulometría (arena, arcilla, limo) y escasa presencia de rocas, los mitílidos se encontraban asentados predominantemente sobre el sustrato blando y en pequeños parches que no llegaban a abarcar el volúmen total del *corer*. En estos casos, se optó por extraer ejemplares de diferentes parches, intentando cubrir todo el volúmen del sacabocado. Se tomaron 60 muestras en total que fueron congeladas en freezer a -20°C hasta su procesamiento (Veiga et al. 2020). El procesamiento de las muestras consistió en el registro del largo y el ancho (Figura 70) de cada individuo mediante un calibre (Vallarino 2002), y en la toma del peso húmedo y del peso seco de cada ejemplar (utilizando una balanza de precisión), luego del secado en estufa durante 72 horas a 60°C de temperatura (Sylvester 2006) (Figura 71). El peso seco se tomó de la porción blanda (musculatura más vísceras) y seca (valvas) por separado. Cada ejemplar fue identificado individualmente mediante un rótulo, procedimiento que resultó muy difícil de aplicar sobre ejemplares de tallas pequeñas. Por este motivo, se tomó la decisión de utilizar ejemplares con tallas iguales o mayores a 5 mm de largo.



Figura 68. Colecta de mitílidos con *corer*.

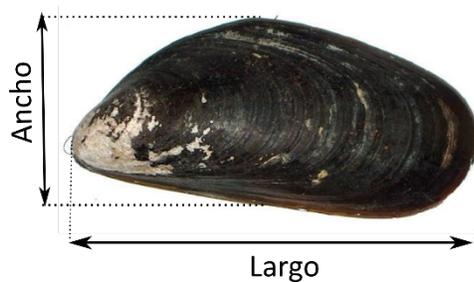


Figura 69. Longitudes registradas en cada uno de los ejemplares de mitílidos recolectados.



Figura 70. Procesamiento de mitílidos en laboratorios del ICPA.

Existen diversas formas de evaluar la condición fisiológica o de salud de los bivalvos (Giarratano 2010, Castaños 2016, Rocchetta et al. 2014; Veiga et al. 2020, Lander et al. 2012, Kristan et al. 2014), aunque el índice de condición de Walne (ICW) es uno de los más utilizados (Walne 1976). Este se calcula según la ecuación (1):

$$ICW = 100 \cdot \frac{PSB}{PSV} \quad (1)$$

donde PSB es el peso seco del tejido blando y PSV es el peso seco de la valva.

La obtención de una relación teórica entre la longitud (Largo) y el peso (seco o húmedo) de una población de mitílidos está representada por la ecuación (2):

$$P = a \cdot L^b \quad (2)$$

y permite estimar el peso de un organismo determinado en función de su longitud. Los parámetros a (intercepto) y b (pendiente), pueden determinarse por mínimos cuadrados con base en los datos longitud (en milímetros) y peso (en gramos) de los organismos obtenidos en campo. La longitud es una medida en una dimensión, mientras que el peso, influenciado por el volumen, existe en tres dimensiones. Por ello la relación entre ambas variables es cúbica, es decir con un b igual o cercano a 3 (tres). El factor de condición de Fulton, que se calcula según la ecuación (3):

$$K = 100 \cdot \frac{P}{L^b} \quad (3)$$

se utiliza para evaluar el bienestar general o condición de los organismos. En el contexto de detección de impacto ambiental debido al vertido de efluentes, puede esperarse que la condición de los mitílidos se vea favorecida (i.e mayor peso) por el enriquecimiento orgánico si ese material extra es ingerido directamente por los organismos filtradores o favorece la proliferación de otros ítems presas que son finalmente filtrados por los mitílidos.

En el caso del ICW, a diferencia del de Fulton, los ejemplares requieren un procesamiento previo (secado en estufa de los ejemplares, separación del tejido blando de las valvas, entre otros). En este trabajo, se utilizaron 3 índices diferentes, con el objeto de proveer opciones de trabajo con distinto nivel de dificultad a la hora de obtener la información necesaria para los cálculos, y para evaluar si los resultados obtenidos con las metodologías más sencillas son o no equivalentes a los obtenidos con las más complejas. Los IC utilizados fueron los siguientes:1) KnH

(h = húmedo): utilizando el peso del tejido sin secar en estufa 2) KnS (s = seco): utilizando el peso del tejido seco en estufa; 3) ICW: utilizando el peso seco de tejido y valva.

De las 3 especies de mitílidos colectadas en los *corer*, *Mytilus chilensis* fue la única que presentó un número de ejemplares adecuado para poder llevar adelante las mediciones y cálculos de los diferentes IC, por lo que se trabajó sólo con esta especie. Además, para esta especie se analizó la distribución de tallas del largo de las valvas en función del factor *Condición* (impactado vs no impactado). Las tallas de los organismos pueden modificar su condición por lo que esta variable fue controlada para los análisis comparativos. La condición media de *Mytilus chilensis* fue calculada por *Localidad*, por *Sitio* y fue representada por medio de gráficos de barras con sus respectivos desvíos estándar.

Cabe mencionar que el índice de condición puede variar debido a múltiples factores, como variaciones estacionales, diferencias de género, madurez de las gónadas, etc. El ciclo reproductivo de *Mytilus chilensis* en la Bahía Ushuaia presenta un periodo de emisión de gametas prolongado para ambos sexos, con emisiones parciales asincrónicas desde mayo hasta enero, aunque un pico de mayor intensidad en mayo-junio y otro más importante en octubre-noviembre (Giarratano 2010). Para el sector de Bahía Brown, aproximadamente 80 km al este de Bahía Ushuaia, se describieron características similares en cuanto al periodo de emisión de gametas en ambos sexos, cuyas poblaciones también presentan emisiones asincrónicas y un pico de mayor intensidad en octubre-diciembre (Castaños 2016). El presente muestreo se realizó durante los meses de octubre y noviembre de 2023, momento en el cual es esperable que los ejemplares se encuentren emitiendo gametas. Esto debe tenerse en cuenta, ya que los ejemplares pierden masa de tejido blando al liberar las gametas al medio, parámetro que se tuvo en cuenta al calcular el índice de condición. Sin embargo, Castaños (2016) encontró que ambos sexos de la población de Bahía Brown tienen una fase de recuperación en la que proliferan células sexuales, que ocurre en simultáneo con la fase de emisión de gametas, cuya máxima actividad se produce durante el pico más importante de emisión en octubre-diciembre. Esta característica fue asociada con la ausencia de

relación entre los dos índices de condición calculados en ese estudio (que tienen en cuenta el peso húmedo de los ejemplares) y el ciclo gonadal de *M. chilensis*. Si bien los ejemplares estudiados en el trabajo mencionado fueron cultivados en líneas de producción (*long-lines*), los resultados de Castaños (2016) coinciden con los de Tortorelli (1987), quien estudió ejemplares de banco de esta misma especie en la Bahía Ushuaia. De igual modo, cabría esperar que el índice de condición de los ejemplares de este sector geográfico no varíe con el ciclo reproductivo. Cabe señalar que la época de muestreo del presente estudio (octubre-noviembre de 2023) fue escogida teniendo en cuenta los ciclos de vida y reproductivos a nivel de la comunidad del intermareal del CB, cuyas especies presentan un pico de actividad reproductiva durante la primavera (septiembre-diciembre), y el estudio de los mitílidos fue presentado como un complemento por su potencial como herramienta bioindicadora de impacto ambiental.

5.c. Resultados

Se contabilizaron unos 987, 131 y 244 ejemplares de mejillón (*Mytilus chilensis*), cholga (*Aulacomya atra*) y mejillín (*Brachidontes purpuratus*), respectivamente, sumando un total de 1362 individuos. En cuanto a la composición específica, *Mytilus chilensis* fue más abundante en la *Localidad* de Referencia Este con un 82%, y en la de Referencia Oeste con un 77%; *Aulacomya atra* tuvo sus mayores porcentajes en la *Localidad* Dispensor y en los alrededores de la desembocadura del Arroyo Grande, con un 20 y un 12%, respectivamente; *Brachidontes purpuratus* tuvo porcentajes máximos similares en la *Localidad* de Arroyo Grande y en la de Ushuaia, con 26 y 25%, respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Composición porcentual de las especies en cada una de las bahías relevadas.

Localidad	<i>Mytilus chilensis</i>	<i>Aulacomya atra</i>	<i>Brachidontes purpuratus</i>
Dispensor	73%	20%	7%
Ushuaia	74%	1%	25%
Arroyo Grande	62%	12%	26%
Referencia Oeste	77%	4%	19%
Referencia Este	82%	7%	11%

Las tallas medidas como el largo de las valvas de *Mytilus chilensis* tuvieron un mínimo de 16,82 mm y un máximo de 76,93 mm, *Aulacomya atra* presentó un mínimo de 8,48 mm y un máximo de 68,30 mm, y *Brachidontes purpuratus* presentó un mínimo de 17,50 mm y un máximo de 43,54 mm.

La distribución de tallas indica que en zonas impactadas presenta una clara dominancia porcentual de *Mytilus chilensis* en los cinco primeros intervalos de talla (los más pequeños) y una reversión de dominancia porcentual de organismos mayores en condiciones no impactadas (Figura 71).

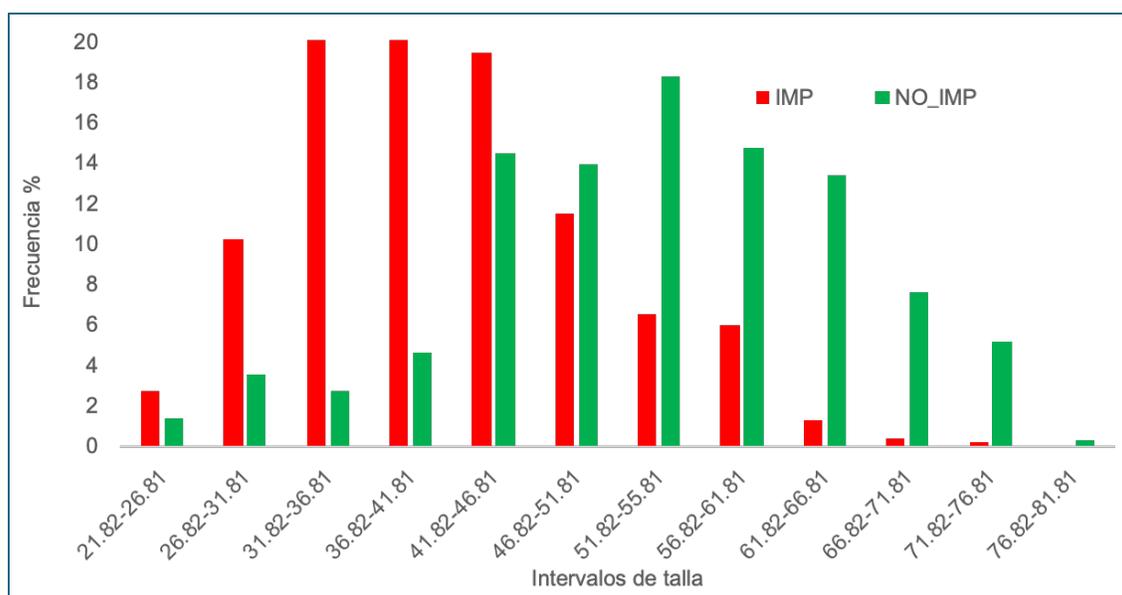


Figura 71. Distribución de tallas porcentual de *Mytilus chilensis* en condiciones impactadas (barras rojas) y no impactadas (barras verdes) considerando la suma de los organismos colectados en los corer.

El estado de *Mytilus chilensis* por *Localidad* en función de su condición indica que en términos generales los organismos en zonas impactadas tienen mayor peso (en gramos) por unidad de medida (en milímetros) (Figura 72, 73 y 74). En todos los casos, Dispensor alcanzó los mayores valores medios y Referencia Oeste los menores. Las *Localidades* Ushuaia y Arroyo Grande contienen *Mytilus chilensis* con similar condición, y sólo con KnH las diferencias con Referencia Este son apreciables.

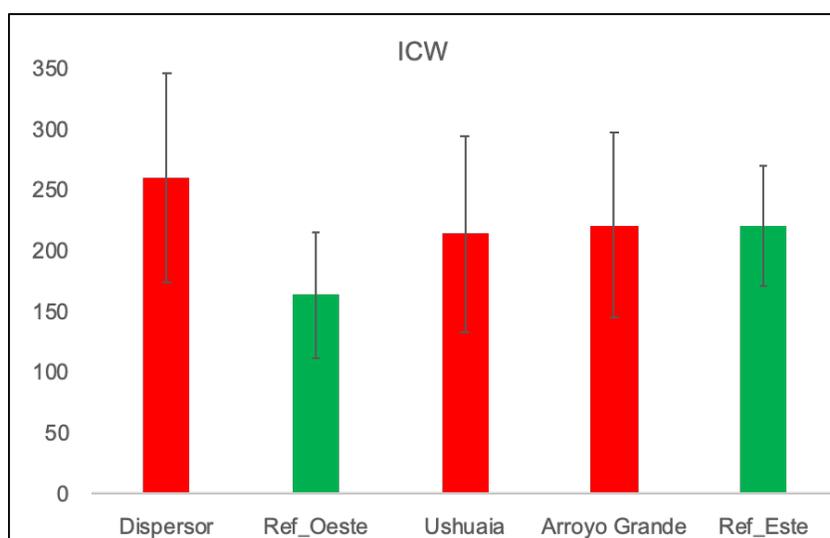


Figura 72. Índice de condición de Walne (ICW) por *Localidad* indicando aquellas impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.

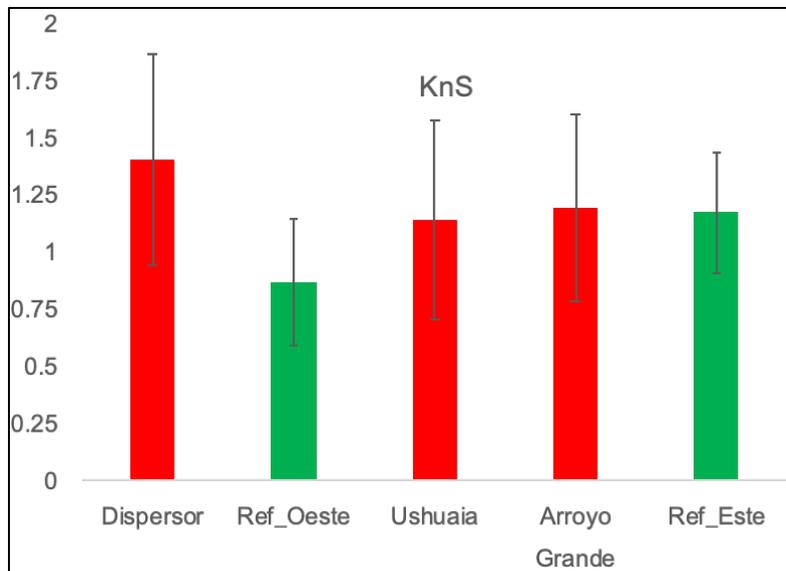


Figura 73. Índice de condición de Fulton utilizando el peso seco (KnS) por *Localidad* indicando aquellas impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.

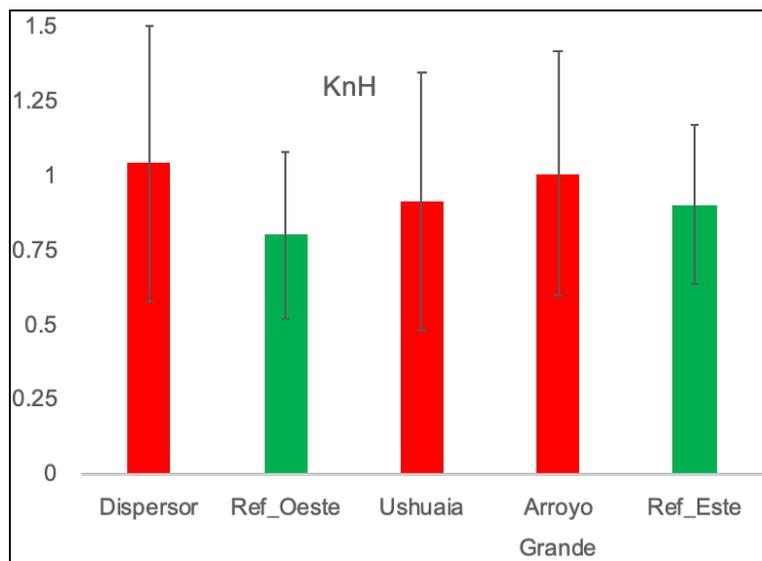


Figura 74. Índice de condición de Fulton utilizando el peso húmedo (KnH) por *Localidad* indicando aquellas impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.

La condición media de *Mytilus chilensis* por *Sitios* dentro de cada *Localidad* demuestra el mismo patrón general y una mayor variación en la condición entre *Sitios* dentro de las *Localidades* impactadas (Figura 75, 76 y 77).

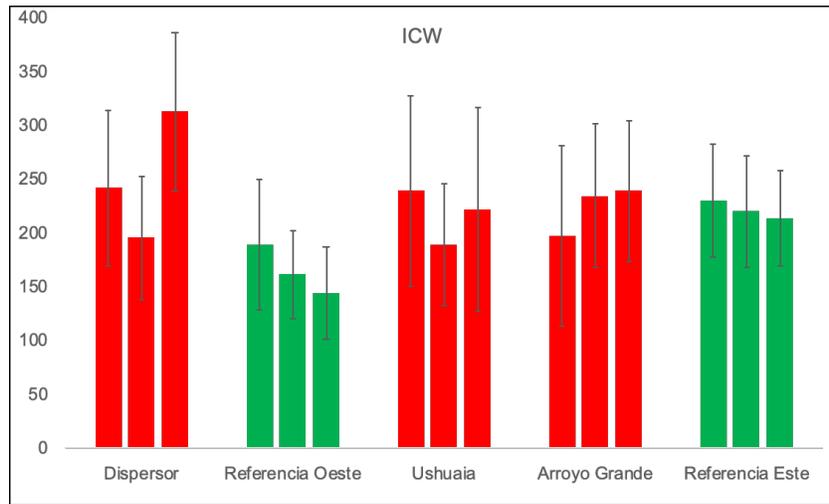


Figura 75. Índice de condición de Walne por *Sitios* dentro de cada *Localidad* identificada como impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.

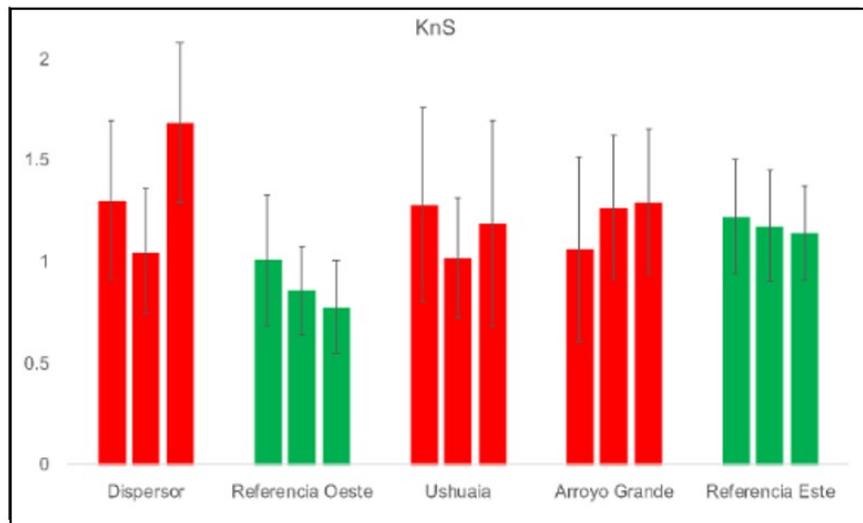


Figura 76. Índice de condición de Fulton utilizando el peso seco (KnS) por *Sitios* dentro de cada *Localidad* identificada como impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.

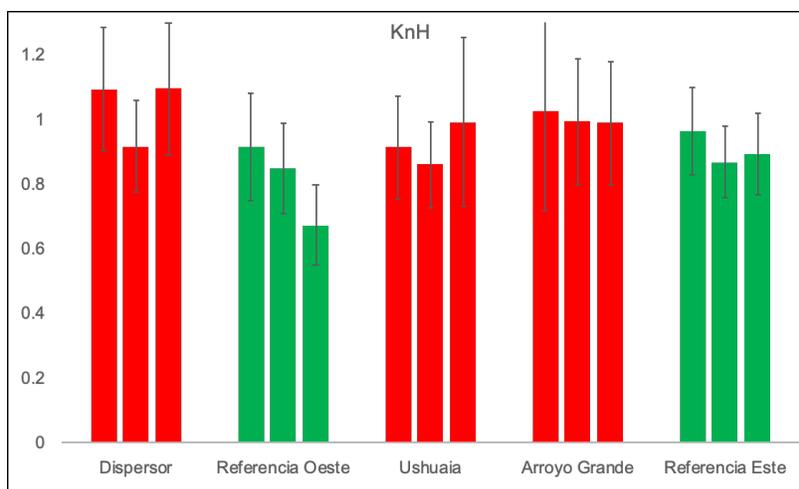


Figura 77. Índice de condición de Fulton utilizando el peso húmedo (KnH) por *Sitios* dentro de cada *Localidad* identificada como impactadas (barras rojas), no impactadas (barras verdes) y sus respectivos desvíos estándar.

La correlación entre los valores medios por *Localidad* entre los tres índices calculados se muestra en la Tabla 12. La misma demuestra un nivel alto y positivo entre ICW y KnS, aunque el acuerdo es más bajo con KnH y entre ambas variantes de Kn.

Tabla 12. Coeficiente de correlación entre los valores medios de condición entre el Índice de condición de Walne, Índice de condición de Fulton utilizando el peso seco (KnS) e Índice de condición de Fulton utilizando el peso húmedo (KnH).

Corr	KnS	KnH
ICW	0.99	0.72
KnH	0.73	---

5.d. Discusión

Las tallas de *M. chilensis* en las *Localidades* Dispensor, Ushuaia y Arroyo Grande presentan una mayor frecuencia de organismos de tallas pequeñas (sesgo de la distribución de tallas hacia la izquierda), a diferencia de las *Localidades* Referencia Oeste y Referencia Este, en donde la mayor parte de los organismos

tienen tallas de tamaños intermedios a grandes. Esto podría deberse a dos aspectos no mutuamente excluyentes. Por un lado, a una supervivencia diferencial a lo largo del ciclo de vida entre las condiciones impactadas y no impactadas. Se interpreta una mayor mortalidad en zonas impactadas, donde la población no alcanza las mayores tallas esperadas para la especie como las que sí ocurren en zonas no impactadas del Canal Beagle. La falta de los ejemplares de tallas grandes podría estar relacionado a que los bivalvos de las tallas pequeñas presentan una tasa metabólica más alta, lo que les permite eliminar rápidamente los metales pesados de los tejidos impidiendo la bioacumulación (Stankovic & Jovic 2012). Ya se ha demostrado en diferentes especies de bivalvos que hay una correlación negativa entre la talla y la concentración de contaminantes, especialmente metales. El trabajo realizado por de la Ossa Carretero y colaboradores (2008), mostró que los ejemplares de la almeja *Spisula subtruncata* que vivían en los alrededores de descargas de efluentes cloacales, presentaban menores tallas que los que se hallaban entre 200 m a 1 km de distancia del punto de descarga. Los autores lo atribuyeron a altas tasas de mortalidad, tanto en los eventos de asentamiento como en etapas post-asentamiento, ya que la abundancia de adultos era muy baja o nula en los sitios afectados. Contrariamente, en un estudio realizado en Mar del Plata (Pcia. de Bs. As.) que evaluó el impacto del dispersor cloacal de la ciudad sobre las poblaciones de *B. rodriguezii*, a medida que disminuía la distancia al punto de descarga del efluente, las tallas de los ejemplares eran cada vez más grandes (Vallarino 2002). Un estudio de supervivencia, tasas de reclutamiento y edad-crecimiento comparada podría arrojar luz sobre esta hipótesis. Paralelamente, en Dispersor, Arroyo Grande y Ushuaia, se obtuvieron porcentajes de *A. atra* y *P. purpuratus* mayores a los que aparecen en Referencia Oeste y Referencia Este (*A. atra* <10% y *P. purpuratus* <20%). Como las comunidades de mitílidos son más equitativas en Dispersor, Arroyo Grande y Ushuaia, cabría esperar que los ejemplares de *M. chilensis* sean más pequeños, por competencia interespecífica por el espacio. López Gappa (1990) observó que en sitios disturbados por efluentes cloacales en la localidad de Quequén (Pcia. de Bs. As.), *Brachidontes rodriguezii* disminuía su densidad en comparación con los sitios no disturbados, en donde era

la especie dominante de la comunidad. El autor hipotetizó que en consecuencia otras especies ocuparían los espacios no colonizados por este bivalvo y así aumentaría la riqueza específica. Vallarino (2002) llegó a las mismas conclusiones cuando estudió el impacto del dispersor cloacal sobre mejillinares de esa misma especie en la localidad de Mar del Plata (Pcia. de Bs. As.). El tamaño del sustrato y la distancia a las descargas de agua dulce de ríos y glaciares también son determinantes en la estructura de tallas de bivalvos. LaBarre y colaboradores (2023) encontraron que los ejemplares de *Mytilus trossulus* que crecían sobre sustratos de mayor tamaño y aquellos que estaban en contacto con descargas de agua dulce tenían tallas mayores. Estos factores no fueron tenidos en cuenta en el presente estudio, pero podrían estar relacionados al patrón observado.

Si bien el índice de condición en esta especie no varía con el ciclo gonadal (Castaños 2016, Giarratano 2010, Tortorelli 1987), este disminuye cuando los ejemplares están expuestos a contaminación por metales pesados (Giarratano 2010, Regoli 1998). Particularmente, Giarratano (2010) encontró que el índice de condición se asociaba positivamente con el nivel de nitrato y de pH, y negativamente con los niveles de metales pesados bioacumulados y con el nivel de oxígeno disuelto. En cambio, si en las descargas de los efluentes predomina la materia orgánica, proveniente de residuos domésticos y cloacales con pre-tratamiento o ningún tratamiento, y éstas aportan directa o indirectamente a la bioenergética de los organismos podría esperarse que los ejemplares presenten mayor masa de tejido blando y consecuentemente un mayor IC. Por ejemplo, Rochetta et al. (2014) hallaron un aumento en el tejido blando de almejas *Diplodon chilensis* expuestas a aguas de un dispersor cloacal con niveles altos de bacterias coliformes fecales, lo que dio como resultado índices de condición mayores en ese sitio, al compararlos con los de individuos presentes en un sitio control a 20 km del dispersor y carente de contaminación. Hindell & Quinn (2020) trabajaron con exposición de poblaciones de *Brachidontes rostratus* a descargas de un dispersor cloacal y encontraron que los ejemplares expuestos presentaron menor crecimiento de la valva, pero mayor crecimiento de tejido blando somático, cuando se los comparó con ejemplares de sitios control no expuestos a contaminación cloacal. Sin embargo, otros trabajos

encontraron que la cercanía a un dispensor cloacal disminuía el índice de condición de los bivalvos estudiados (Vallarino 2002, López Gappa et al. 1990). En el Canal Beagle, las *Localidades* Dispensor, y en menor medida en Arroyo Grande y Ushuaia, presentan mitílicos en promedio más pesados a la misma longitud respecto a ambas Referencias. En la literatura general, organismos con mayores valores de índice de condición se asumen en mejor estado de salud. Sin embargo, en el contexto de este trabajo la evaluación de condición se realizó en *Sitios* donde existe una fuente conocida de aporte orgánico donde se han registrado valores altos de bacterias coliformes totales y fecales (DPOSS 2022, Diodato 2018, ver Figura 9) entre otros componentes alóctonos. Es aquí, en la *Localidad* Dispensor, Arroyo Grande y Ushuaia donde se han estimado los valores más altos de condición en *M. chilensis*, pero si bien esto significa un mayor peso no debe interpretarse como una mejor condición. La medida y la manera en que *M. chilensis* utiliza los productos orgánicos y/o es afectado por los no orgánicos que se vuelcan en las proximidades del dispensor y también en el Arroyo Grande está fuera del alcance de la presente propuesta de trabajo, pero es de interés no sólo para determinar el mecanismo de afectación de la bioenergética natural de un organismo sésil y filtrador en condiciones de impacto, sino considerando su utilización para consumo humano.

Con referencia a las variantes de índices para calcular condición, se concluye que el ICW y el KnS arrojan valores muy similares entre sí. El KnS sólo insume la utilización de estufa para obtener el peso seco del tejido, por lo que se considera de menor relación costo-eficiencia respecto del ICW. El KnH, de mayor facilidad para obtener las variables de interés, si bien muestra el mismo patrón general de condición, se correlaciona positivamente en 0,7 respecto de los índices anteriormente descritos. Con base en estos resultados, y para un monitoreo futuro de impacto utilizando *M. chilensis* de zonas impactadas y no impactadas en Canal Beagle se recomienda el uso de ICW o KnS. De realizarse un estudio de estas características, se recomienda hacerlo durante el otoño (marzo-abril) o durante el invierno (julio-agosto), momentos en los que no habría emisión de gametas en forma masiva, intentando recolectar las muestras dentro del mismo mes, a lo sumo

extenderlo 2 (dos) meses, para acotar posibles variaciones asociadas al ciclo reproductivo.

6. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA, NITRÓGENO Y FÓSFORO.

6.a. Introducción

En los ecosistemas marinos del continente americano se ha reportado la existencia de contaminantes en sedimentos, agua (en la fase disuelta y particulada) y en los organismos que lo habitan, con concentraciones que van desde valores bajos a moderados y zonas puntuales con altos niveles de contaminación teniendo en cuenta los límites establecidos por regulaciones internacionales (Barra et al. 2007, Pampanin & Sydnes 2013). En estos ecosistemas, además existen otros agentes estresantes medibles como la falta o el exceso de nutrientes, hipoxia, turbidez, regímenes hidrológicos alterados, y sobrepoblación (Recabarren-Villalón et al. 2019). Dependiendo de cuán por encima de los niveles de referencia se encuentren algunos elementos químicos como nitrógeno (N), fósforo (P) y carbono (C), la materia orgánica se considera un indicador de aportes exógenos naturales o antrópicos. Las descargas domiciliarias son un ejemplo particularmente importante de este último caso y en el marco del estudio de este informe.

La relación que existe entre el nitrógeno (N) y el fósforo (P) en un ambiente determinado es muy importante, dado que el valor óptimo de dicha relación es diferente para las distintas especies que lo habitan. Una proporción N:P alterada por aportes de materia orgánica puede llegar a un extremo que puede beneficiar sólo a algunas pocas especies y perjudicar a la mayoría. Si esto se mantiene en el tiempo en un lugar determinado, muchas especies tenderán a desaparecer de la comunidad, lo que producirá en primera instancia una disminución en la diversidad biológica en la zona y luego un proceso de simplificación ecológica y pérdida de la capacidad productiva del ecosistema, a riesgo de sobrepasar la capacidad de resiliencia de éste, que entonces ya no podrá volver a su estado inicial.

En Tierra del Fuego, la Ley Provincial N° 1126 constituye el régimen jurídico hídrico de aplicación en territorio provincial y su objeto es administrar y regular el

recurso hídrico provincial y los permisos y concesiones de uso, entre otros aspectos. Por otro lado, en el Decreto 0450/21 se establece la reglamentación de la aplicación de la citada ley y en su Anexo II “Niveles guía de agua superficial, subterránea y sedimento”, se establecen los niveles máximos permitidos de vertidos de sustancias debidos a la actividad humana a los “cuerpos receptores”, es decir los valores de concentración de dichas sustancias en el ambiente. Entre ellas se encuentran los nitratos (N-NO₃) y fosfatos (P-PO₄), cuyos niveles guía en aguas superficiales son menores o iguales a 25 mg/l y ≤ 0.5 mg/l respectivamente. Por otro lado, el carbono (C) también es un factor ambiental importante. El C total (CT) es todo el carbono contenido en una muestra, tanto inorgánico como orgánico. Mientras que el C inorgánico (CI, que se encuentra contenido en carbonatos, bicarbonatos, y dióxido de carbono disuelto) es el material derivado de fuentes no ligadas a los seres vivos, el C orgánico (CO) es el material derivado fundamentalmente de la descomposición de las algas, el crecimiento bacteriano y las actividades metabólicas de los organismos vivos. Por lo tanto, la medición de estos parámetros químicos resulta relevante como aproximación a la calidad (i.e. grado de deterioro) del ambiente y por ende para la interpretación cabal de los resultados de la composición de la comunidad de organismos.

La toma de muestras de materia orgánica en agua y sedimento y las lecturas de C y N no estaba planeada originalmente en el contrato de obra, pero se incluyó para mejorar la capacidad explicativa de la potencial relación entre los cambios de la estructura de la comunidad bentónica y el grado de impacto ambiental que pueda detectarse en las diferentes localidades estudiadas. Los costos asociados a la medición de estas variables tanto en agua como en sedimento fueron afrontados enteramente por el equipo técnico dentro del presupuesto planteado originalmente.

6.b. Materiales y métodos

El muestreo de agua llevado adelante en este trabajo siguió el esquema general de 2 *Áreas* por cada uno de los 3 *Sitios* por cada una de las 5 *Localidades* ya descrito, tomándose una muestra de 1 litro por *Área*. La lectura de los niveles

de N, P y C tanto inorgánico como orgánico fue realizada en laboratorios del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET). En el caso del carbono, las mediciones fueron hechas en un equipo Shimadzu TOC L-series siguiendo las recomendaciones del fabricante, que trabaja con los mismos principios que los indicados en la American Public Health Association (APHA 2017). Las muestras de agua fueron filtradas con filtros de fluoruro de polivinilideno de 0,22 μm de poro y por ello los valores de carbono obtenidos corresponden a la fracción denominada “disuelta” de compuestos carbonados. El equipo de medición descompone las cadenas carbonadas en sus componentes atómicos por lo que puede medir así la concentración real del carbono como elemento. Este valor es denominado carbono total (CT o TC por *total carbon* en inglés). En un segundo paso, el equipo mide la fracción de carbono denominada *no purgable* (CONP o NPOC en inglés) o *no volátil* de la muestra, que desde un punto de vista biológico es equivalente al carbono orgánico disponible en el ambiente como nutriente o insumo para procesos metabólicos de los organismos. Entonces CT menos el CONP da como resultado el carbono inorgánico (CI) disuelto en dicha muestra, también denominado *purgable* (COP o TIC por *total inorganic carbon* en inglés) o *volátil*, que corresponde a CO_2 disuelto, carbonatos y bicarbonatos. Dada la metodología con la que se efectúan las mediciones es posible asimilar al CONP como valor de carbono orgánico total, de manera que si le restamos este valor al CT obtenemos el CI de la muestra ($\text{CT} - \text{CONP} = \text{CI}$). Por otro lado, existe una relación directamente proporcional entre el CONP y los niveles de materia orgánica en suspensión que fue filtrada al comienzo del procedimiento. Por ello los valores del CONP pueden utilizarse como indicadores de la cantidad de materia orgánica en el agua, siendo así un referente de, por ejemplo, variaciones debidas a aportes exógenos en un ambiente determinado.

Las mediciones de P y N se realizaron en un analizador de microflujo de alta performance QuAAtro 39. Las muestras fueron tratadas por el método de ácido ascórbico para fosfatos, el método de diazotación para nitritos y el método de reducción con cadmio para nitratos, siguiendo los protocolos indicados por el

fabricante (Method No. Q-048-04 Rev. 3 para fosfatos y Method No. Q-119-11 Rev. 2 para nitritos y nitratos), según los principios indicados en APHA (2017).

6.c. Resultados y Discusión

Los niveles de materia orgánica, N total y P total son los tres parámetros más relevantes en el marco de este estudio, dado que son los que mejor reflejan una posible condición de impacto debida a aportes exógenos (naturales o antrópicos) en un ambiente dado. Los valores de CONP, N y P por *Sitio* y por *Localidad* pueden observarse en la Tabla 13 y una representación gráfica de su distribución a lo largo de las *Áreas* muestreadas en la Figura 78.

Tabla 13. Lecturas de CONP, N y P de las muestras de agua tomadas en cada *Área* por *Sitio* por *Localidad* expresadas en miligramos por litro (mg/l). En negrita: valores elevados en relación al valor medio del parámetro en el área de estudio.

Localidad	Muestra	CONP	N-NO3 tot.	P-PO4 tot.	N/P
Ref.Oeste	A1	1,25	0,25755	0,0653	3,94
	A2	0,9538	0,2547	0,0735	3,47
	A3	1,248	0,2793	0,05115	5,46
	A4	1,107	0,279	0,0474	5,89
	A5	1,093	0,28125	0,0472	5,96
	A6	1,022	0,28285	0,0437	6,47
Dispensor	A7	2,001	0,48165	0,2053	2,35
	A8	2,108	0,56645	0,2777	2,04
	A9	1,329	0,30295	0,0655	4,63
	A10	1,243	0,29845	0,0671	4,45
	A11	1,339	0,30285	0,0569	5,32
	A12	1,516	0,29605	0,0664	4,46
Ushuaia	A13	1,018	0,29825	0,0604	4,94
	A14	1,179	0,31425	0,0789	3,98
	A15	1,365	0,30475	0,0697	4,37
	A16	1,158	0,3165	0,11225	2,82
	A17	1,296	0,2929	0,06765	4,33
	A18	1,398	0,30445	0,07975	3,82
ArroyoGde.	A19	2,523	0,2997	0,07245	4,14
	A20	1,882	0,3137	0,0736	4,26
	A21	1,178	0,31095	0,09165	3,39
	A22	1,142	0,31625	0,0948	3,34
	A23	3,635	0,38685	0,1244	3,11
	A24	3,803	0,44465	0,25335	1,76
Ref.Este	A25	1,643	0,2883	0,05065	5,69
	A26	1,528	0,2955	0,0462	6,40
	A27	1,379	0,2662	0,0431	6,18
	A28	2,07	0,2932	0,0461	6,36
	A29	1,435	0,44695	0,1669	2,68
	A30	1,151	0,288	0,06015	4,79

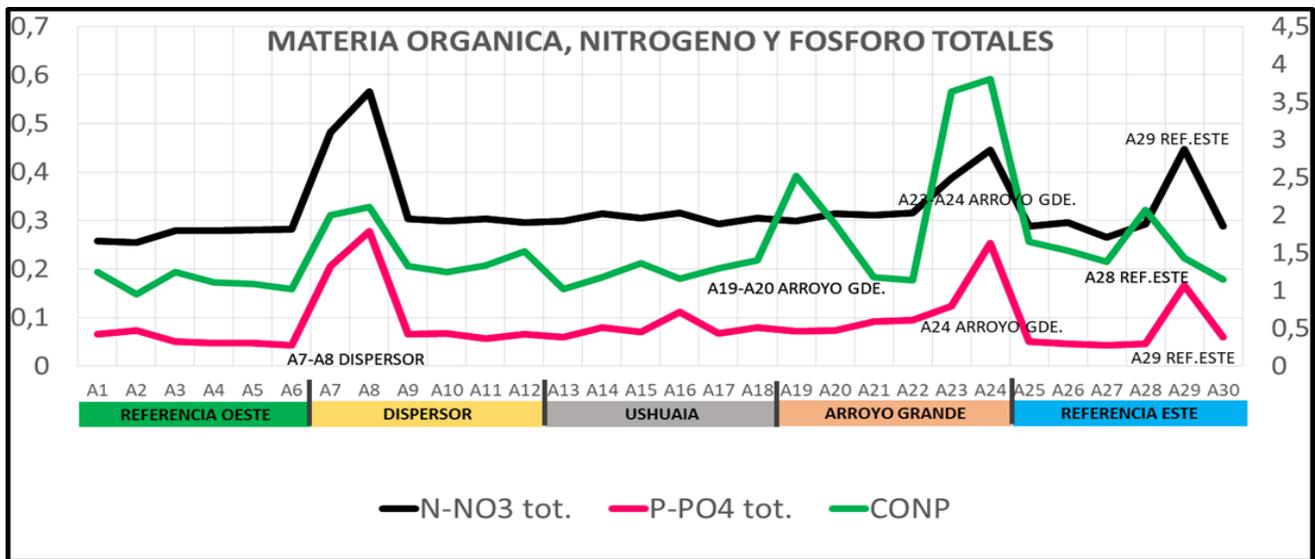


Figura 78 Curvas de materia Orgánica (verde), N (negro) y P (fucsia) por Áreas de muestreo. Los valores están expresados en mg/l; la serie del eje izquierdo corresponde a N y P mientras que la del derecho a la materia orgánica.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir del estudio de las comunidades del intermareal rocoso y del de talla de bivalvos que indican impacto a escala local como resultado general, los valores más elevados de materia orgánica se dieron justamente a la escala de *Sitios* particulares. Los *Sitios* detectados como impactados son el n°4 (*Localidad* Dispersor, *Áreas* 7 y 8); el *Sitio* n° 10 (*Áreas* 19 y 20) y *Sitio* n° 12 (*Áreas* 23 y 24) de la *Localidad* Arroyo Grande y el *Sitio* n° 14 (sólo *Área* 28 en este caso) de la *Referencia* Este (ver Figura 78). En el primer caso, el *Sitio* se corresponde con el lugar donde se realizan los vertidos del dispersor, mientras que en los otros dos de la misma *Localidad*, dichos valores disminuyen inmediatamente. Nótese que en el segundo caso el patrón general de impacto localizado es aún más notorio dado que mientras que los *Sitios* 10 y 12 presentan una carga mayor de materia orgánica, los valores del *Sitio* intermedio n° 11 se encuentran incluso por debajo del valor promedio de todas las *Áreas* (1,2 mg/l). En el tercer caso, el impacto detectado se dio incluso a un nivel aún más localizado, siendo sólo el *Área* 28 de la *Localidad* Referencia Este la que presentó valores de materia orgánica elevados.

Este mismo patrón de contaminación localizada por vertidos cloacales ha sido hallado en estudios previos realizados en Mar del Plata, que mostraron una correlación entre los valores de materia orgánica y la distancia a los sitios de vertidos, siendo altos cerca de éstos (Elías et al. 2005).

Los valores de nitratos en la zona costera de Ushuaia son naturalmente altos (Diodato et al. 2018). El promedio de los valores de los nitratos totales medidos en este estudio fue de 0,322 mg/l. Sin embargo, encontramos valores muy por encima de dicho promedio que se dieron en general a nivel de *Sitio* (ver Tabla 13 y Figura 78), al igual que en el caso de la materia orgánica. Estos *Sitios* fueron el n° 4 (*Áreas* 7 y 8 de la *Localidad* Dispensor), el n° 12 (*Áreas* 23 y 24 de la *Localidad* Arroyo Grande) y sólo en el *Área* 29 de la *Localidad* Referencia Este. Notoriamente, al igual que la materia orgánica, en esta última *Localidad* sólo se detectó un valor alto de N en una sola *Área*, aunque distinta. La distribución de estos valores elevados también coincidió con la detección de impacto a partir de los análisis de comunidades y de la distribución de tallas de los *corers* de bivalvos.

Por otro lado, desde un punto de vista ecológico el fósforo es un elemento de sumo interés debido a su importante papel en el metabolismo biológico. Dada su escasez en la hidrósfera en comparación con la abundancia natural de otros importantes componentes nutritivos y estructurales de la materia viva como el carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre, el fósforo actúa como limitante de la productividad biológica (Wetzel 1981). Así, niveles alterados de este elemento pueden causar desbalances en la estructura de las comunidades acuáticas. El patrón que presentan los valores elevados de P en este estudio es similar al que presentaron los valores elevados de N. Coincide totalmente con los registrados a nivel de *Sitio* en la *Localidad* Dispensor (*Áreas* 7 y 8) y a nivel del *Área* 29 en la *Localidad* Referencia Este. La excepción se presentó en el *Sitio* 12 de la *Localidad* Arroyo Grande, donde sólo se presentaron valores elevados de P en el *Área* 24 (mientras que en el caso del N fueron elevados en ambas *Áreas*, la 23 y la 24). Es llamativo que los valores de estos nutrientes en la *Localidad* Referencia Este hayan dado elevados sólo en el *Área* 29, mientras que los de materia orgánica hayan sido elevados sólo en el *Área* 28. A nivel general, esto podría deberse a la influencia del

Río Olivia, que descarga sus aguas aproximadamente 3 km hacia el oeste y que son transportadas por la corriente del CB hacia el este. En el caso particular del Área 29, los elevados valores de nutrientes podrían, además, deberse a la morfología de la costa donde se ubica, que se encuentra expuesta hacia el oeste, por ende a la corriente del canal y a los vientos preponderantes. En contraposición, el Área n° 30, está protegida dado que se ubica hacia el este (ver Figura 9). En el caso del Área n° 28, al encontrarse al pie de un cañadón costero, los valores elevados de materia orgánica posiblemente se deban al aporte local por escurrimiento del lavado del suelo del bosque.

Por otro lado, es contundente el impacto localizado que evidencian los niveles de nutrientes registrados en el *Sitio* 4, debidos a los vertidos del dispersor, en el *Sitio* 12 debido a la influencia del Arroyo Grande, que recibe efluentes cloacales aún sin tratamiento. En segunda instancia, en el *Sitio* n° 10, que recibe un efluente de vertidos pluviales los niveles de materia orgánica fueron llamativamente elevados en relación a los del *Sitio* 11 que recibe vertidos pluvio-cloacales sin tratamiento (ver Figura 78).

7- CONCLUSIONES FINALES

El presente trabajo representa una línea de base biótica realizada sobre distintos componentes de la comunidad macro-bentónica que habita el intermareal rocoso del Canal Beagle. En términos de diversidad de técnicas de estudio, herramientas de trabajo y análisis de información utilizadas, este informe técnico supera ampliamente los alcances y requerimientos planteados inicialmente para la línea c "Estudio de línea de base de las comunidades bentónicas intermareales y submareales de las zonas afectadas por las descargas de las plantas de tratamiento Bahía Golondrina y Arroyo Grande".

Las conclusiones a las que se llegó en cada una de las líneas de trabajo en particular se detallan a continuación.

1) Comparar la diversidad, abundancia y densidad de especies intermareales bentónicas en localidades potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales, con zonas potencialmente no impactadas por las descargas (i.e. zonas referencia). Este es el principal y prioritario tema de estudio en este informe por cuanto responde directamente a lo planteado en la línea "c". Por ello, revistió el mayor esfuerzo y logística de muestreo, la participación en campo de todo el equipo de trabajo y los análisis de datos más robustos. Los resultados obtenidos permitieron arribar a conclusiones que además están sólidamente sustentadas por la bibliografía mundial en relación a la detección de impacto ambiental. Dichos resultados demuestran que la comunidad macro-bentónica del intermareal rocoso de las zonas impactadas por los efluentes cloacales es diferente a la de las zonas no impactadas. En las primeras, la comunidad está simplificada en composición y estructura producto de la desaparición de especies o grupos de especies sensibles y en este escenario es donde aparecen especies indicadoras de impacto como resultado de los efluentes pre-tratados vertidos por el dispersor, por los crudos volcados al Arroyo Grande y por otras descargas pluvio-cloacales en Bahía Ushuaia.

Un aspecto faltante en relación al efecto del impacto ambiental actual de los vertidos cloacales que debe considerarse muy especialmente en la estrategia que se implemente y en futuros monitoreos, es la capacidad de dilución de las masas de agua sobre dicho impacto. Los puntos de descargas de efluentes pluviales, cloacales y pluvio-cloacales de la ciudad de Ushuaia al Canal Beagle (o al Arroyo Grande) son varios y están distribuidos a lo largo de la línea de costa (Figura 79). Desde el punto de vista de su ordenamiento, evaluación y manejo se distinguen dos cuencas (Tabla 14).

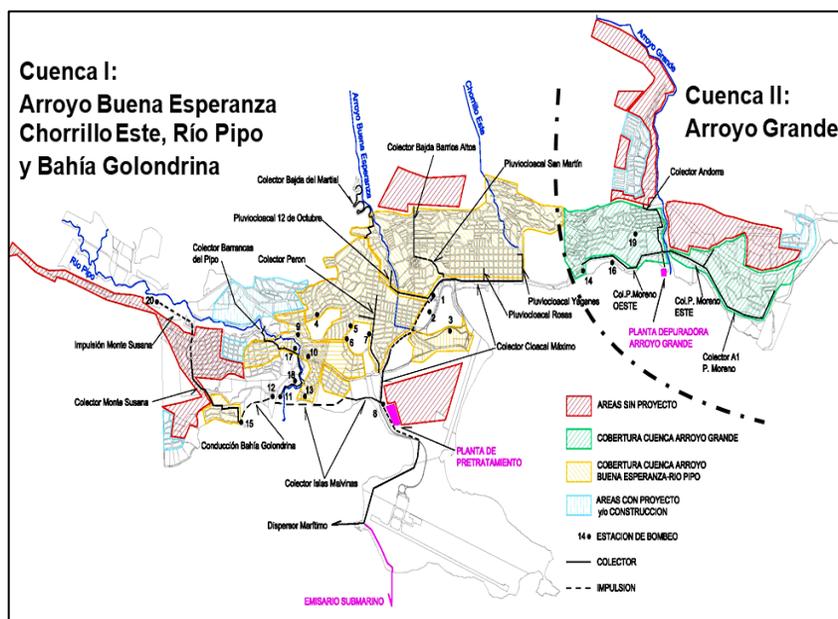


Figura 79. Cuencas servidas en Ushuaia. Fuente: DPOSS.

Tabla 14. Caracterización de los efluentes por Cuenca. Fuente: DPOSS.

Cuenca I	Cuenca II
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistema: mixto (pluvio cloacal) ▪ % población servida: 72% aprox. ▪ Población servida 2044: 101858 hab. ▪ Dotación de agua pot. pob. est.: 320 l/día ▪ Dotación de agua pot. pob. Flot.: 150 l/día ▪ Coeficiente de vuelco: 0.80 ▪ Caudal medio efluentes 2044: 2189 m3/hr 608 l/seg ▪ Caudal pico efluente 2044: 3940 m3/hrm3/hr 1094 l/seg ▪ Caracterización efluente crudo: <ul style="list-style-type: none"> ✓ DBO5: 44 mg/l ✓ Coliformes totales: 1000000 UFC/100 ml ✓ Temperatura: 11.9°C ✓ pH: 7.8 ✓ Oxígeno disuelto: 1.12 mg/l ✓ Salinidad: 0.23‰ ✓ Conductividad: 4.72 microS/cm ✓ Sólidos disueltos: 228 g/l 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistema: separado (cloacal) ▪ % población servida: 28% aprox. ▪ Población servida 2044: 48262 hab. ▪ Dotación de agua pot. pob. est.: 320 l/día ▪ Dotación de agua pot. pob. Flot.: 150 l/día ▪ Coeficiente de vuelco: 0.80 ▪ Caudal medio efluentes 2044: 747 m3/hrm3/hr 207 l/seg (c/seg.etapa) ▪ Caudal pico efluente 2044: 1344 m3/hrm3/hr 373 l/seg (c/seg.etapa) ▪ Caracterización efluente crudo : <ul style="list-style-type: none"> ✓ DBO5: 200 mg/l ✓ Coliformes totales: 3000000 UFC/100 ml ✓ Temperatura: 12.6°C ✓ pH: 7.38 ✓ Oxígeno disuelto: 3.31 mg/l ✓ Salinidad: 0.32‰ ✓ Conductividad: 664 microS/cm ✓ Sólidos disueltos: 324 g/l

En este trabajo se ha verificado la existencia de impacto biótico como consecuencia de los vertidos en ambas cuencas. En los puntos de vertidos, la comunidad de macroinvertebrados que habita el ambiente rocoso intermareal muestra una disminución del número de especies, reemplazo de especies (i.e especies sensibles) por otras, aparición de otras especies (i.e especies resistentes al impacto) y variación no natural en la abundancia de otras. Sin embargo, es de destacar que las distancias entre las localidades impactadas y las localidades de referencia son escasas: entre el Dispensor (Aeropuerto internacional de Ushuaia) y Estancia Túnel hay 15,2 km; entre Arroyo Grande y Estancia Túnel hay 9,2 km; entre el Dispensor y Referencia Oeste (Bahía Ensenada en Parque Nacional Tierra del Fuego) = 23,2 km; entre Arroyo Grande y Referencia Oeste = 17,2 km (distancias aproximadas en kilómetros siguiendo la línea de costa según Google Maps). Esto indica que el impacto producido por los efluentes tiene carácter mayormente localizado, es decir que la zona de influencia directa de impacto biótico se limita a pocos kilómetros. Independientemente de la influencia de las corrientes en la dispersión de las aguas donde se ubican las fuentes contaminantes, se evidenció que en los límites este y oeste del diseño muestral (Ref. Este y Ref. Oeste respectivamente), hay indicios de buena salud biótica y ambiental. Esta conclusión se advierte al reconocer que la CMB contiene una composición variada (más de 100

especies de al menos 11 Phyla distintos) y una estructura compleja (nichos tróficos que van de filtradores a depredadores) en Referencia Oeste (Bahía Ensenada) y Este (Estancia Túnel). Por lo tanto, el mayor impacto se restringe actualmente a las zonas próximas al ejido urbano y a escasos kilómetros de la ciudad de Ushuaia. Esta conclusión debería poder extenderse a otras zonas (*Localidades*) de la línea de costa no contempladas en el presente trabajo, por ejemplo, más allá de los límites Este y Oeste tomados como referencia en este trabajo, para definir el alcance de dicha conclusión. También deberían analizarse otros sectores dentro del actual o futuro ejido urbano, como por ejemplo el segmento costero del Monte Susana (urbanización Costa Susana) cuyas playas próximas al Parque Nacional podrían contener una CMB sensible al impacto ambiental en el corto plazo. En este sentido, se recomienda la centralización de los vertidos previo pre-tratamiento o tratamiento en zonas que actualmente ya son de sacrificio en vez de realizar múltiples vertidos en diferentes áreas que aún no cuentan con un diagnóstico ambiental. La misma interpretación puede extenderse a los ambientes costeros de islas e islotes cercanos a la desembocadura de los efluentes y a la ciudad de Ushuaia, donde en principio es esperable hallar efectos de impacto.

Si bien la conclusión del impacto mayormente localizado podría asumirse como auspiciosa, debería sostenerse en el tiempo, especialmente considerando el contexto de constante crecimiento poblacional de la ciudad y el permanente fomento del turismo que aumentarán inevitablemente la cantidad de efluentes vertidos al Canal Beagle. En este sentido, dada la estacionalidad de la afluencia de turismo a Ushuaia, la temporada de cruceros, sumado a la variabilidad natural propia de los ambientes templado-fríos debido al paso de las estaciones del año, se advierte la necesidad de replicar este estudio durante el verano, el otoño y el invierno para dimensionar el alcance del impacto en el tiempo bajo otras condiciones socio-ambientales.

2) Estimar la estructura de la comunidad del intermareal rocoso a través del metabarcoding del ADN ambiental en bahías potencialmente afectadas por una presión continua y acumulada de efluentes cloacales, comparando los resultados con los obtenidos en zonas potencialmente no impactadas por las

descargas. Esta técnica novedosa fue propuesta originalmente, dado que requiere de un esfuerzo de campo mucho menor por cuanto sólo necesita de la toma de muestras ambientales como por ejemplo agua o suelo/sedimento. Los resultados obtenidos no se ajustaron a aquellos arrojados por el estudio de comunidades, específicamente en relación a la separación entre *Localidades* impactadas vs. no impactadas. Por otro lado, los resultados podrían estar mostrando una tendencia a la alteración del gradiente biótico en sentido oeste-este propuesto para el CB (posiblemente causado por un gradiente de salinidad) debido al efecto del impacto de los efluentes cloacales. La capacidad limitada de identificación taxonómica de muchas de las secuencias de ADN encontradas en las muestras ambientales, debida a la ausencia de una base de datos de referencia, fue otro factor importante que resultó en un panorama incompleto de la estructura de las comunidades. Además, el efecto de la mezcla de las masas de agua costeras por los vientos y el oleaje puede sesgar los resultados obtenidos por esta técnica hacia el relevamiento de un conjunto diferente de organismos de aquel obtenido por el relevamiento mediante cuadrantes, es decir que es posible que se hayan relevando comunidades diferentes. Esto explica la detección de taxones en las muestras ambientales que no aparecieron en el relevamiento por cuadrantes. Para salvar diferencias y alcanzar una complementariedad que permita ampliar los alcances de un estudio que utilice ambos métodos de relevamiento, sería recomendable utilizar muestras ambientales de sedimentos, que en principio tendrían un carácter mucho más localizado, que acompañen a las de agua. Consideramos de gran importancia continuar ajustando la implementación de la técnica de metabarcoding de ADN dada su potencia de detección de taxones y su versatilidad y simplicidad, por ejemplo en estaciones del año donde un muestreo prolongado en campo es difícil de llevar a cabo (otoño e invierno). Para el monitoreo futuro se propone, entonces, realizar el análisis de ADN ambiental con muestras de sedimentos del intermareal y la utilización de *primers* que se restrinjan a metazoos.

3) Analizar el estrés oxidativo en peces del intermareal que habitan localidades potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales con zonas potencialmente no impactadas por las

descargas. Se analizaron diferentes tejidos y se midieron diversas variables de tres especies de peces del intermareal rocoso. Los resultados más claros en relación a la detección de impacto ambiental fueron los obtenidos con *P. cornucola* y *H. bispinis*. Los individuos estudiados de la primera especie difirieron en las alteraciones nucleares en zonas impactadas vs. las no impactadas y en la actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa en encéfalo entre el Dispensor y Referencia Oeste. El nivel de la enzima glutation s-transferasa en hígado en *H. bispinis* difiere en Arroyo Grande y Ushuaia respecto de Referencia Este. Por lo tanto, esta línea de investigación demostró signos de impacto en algunas circunstancias y en otras no. Para el monitoreo futuro se propone restringir el análisis a la especie *P. cornucola* por ser de ocurrencia común en las localidades impactadas y no impactadas, focalizar los esfuerzos de análisis en las alteraciones nucleares en sangre producto de la relativa simplicidad de la técnica y su sensibilidad para detectar impacto.

4) Contrastar las variaciones en talla y biomasa en organismos clave que puedan ser útiles como indicadores (mejillones) en localidades potencialmente afectadas por presión continua y acumulada de efluentes cloacales con zonas potencialmente no impactadas por las descargas. Entre las tres especies de moluscos mitílidos muestreados, la condición media de *Mytilus chilensis* ha aportado sólidas evidencias de impacto. Los tres índices utilizados demuestran una mayor relación de peso a la misma longitud de los organismos que habitan *Localidades* impactadas, lo que se infiere como no natural y producto del "aprovechamiento" directo o indirecto de los efluentes. Para el monitoreo futuro se recomienda la utilización del índice de Walne (1976) por ser de uso rutinario en bivalvos o el de condición "seco", ya que otorga resultados similares con menor esfuerzo de trabajo en laboratorio.

5) Parámetros ambientales en agua y materia orgánica en sedimento y 6) determinación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo. El análisis de los parámetros ambientales en conjunto y en particular para los que tienen una relación más directa con el impacto por efluentes, mostró separación entre *Localidades* impactadas y no impactadas. Ambas matrices de datos abióticos, al relacionarlas

con la comunidad macro-bentónica intermareal, demostraron buen poder explicativo y por lo tanto son las que afectan significativamente a su estructura y composición. Los valores de *materia orgánica, nitrógeno y fósforo muestran mayores valores en Sitios/Áreas* impactadas. Para el monitoreo biótico futuro, es indispensable contar con datos ambientales contemporáneos a los muestreos biológicos a las escalas espaciales adecuadas. Se destaca la necesidad de contar con datos de las mismas variables que fueron medidas en agua, en el sedimento.

Para salvaguardar mayores efectos ambientales adversos se ha avanzado en la construcción de una planta de tratamiento en las cercanías del Arroyo Grande, (<https://dposs.gob.ar/obra/planta-de-tratamiento-de-efluentes-arroyo-grande/>) donde en la actualidad son volcados los efluentes cloacales domiciliarios del sector Este de la ciudad en crudo hacia el Canal Beagle. Es de particular interés su puesta en funcionamiento en el corto plazo. Esta línea de base biótica servirá de referencia para evaluar si los cambios ambientales se reflejan en la salud del sistema biológico una vez comenzado su funcionamiento.

Paralelamente, se planteó la construcción de un emisario submarino que impulse los efluentes hacia aguas más profundas y de mayor corriente para maximizar las propiedades de dilución. Aunque a primera vista es conveniente, existen trabajos en otros lugares del mundo (Andrew-Priestley et. al 2022) y en Argentina (emisario de Mar del Plata, Elías 2005) que indican efectos de los vertidos cerca de la salida del emisario submarino. Con base en los resultados obtenidos de impacto localizado por efluentes, y a los fines de tener una línea de base biótica *a priori* de potenciales impactos en la comunidad biótica, es de interés monitorear los ambientes costeros y el bentos infaunal próximo al sitio donde se emplazará el emisario submarino. En este sentido, se considera de suma importancia realizar un estudio de modelado de la forma, dirección predominante y alcance de las plumas de dilución de las aguas contaminadas y/o de las provenientes de las desembocaduras de los ríos, en cada una de las zonas de descarga de efluentes cloacales y pluvio-cloacales.

Finalmente, habiendo concluido este trabajo y reunido localmente el *expertise* necesario para la detección de impacto en la ciudad de Ushuaia, se espera

poder realizar la evaluación en la zona de implantación del emisor de efluentes tratados de la planta Margen Sur y en la futura implantación del emisario submarino Margen Norte en la ciudad de Río Grande.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acha EM, Mianzan HW, Guerrero RA, Favero M, Bava J, 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South America: Physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems* 44: 83-105.

Adami ML, Gordillo S, 1999. Structure and dynamics of the biota associated with *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) from the Beagle Channel, Tierra del Fuego. *Scientia Marina (S1)*: 183-91.

Adler PB, Lauenroth WK, 2003. The power of time: spatiotemporal scaling of species diversity. *Ecology Letters* 6: 749-756.

Amin O, Comoglio L, Sericano J, 2011. Polynuclear aromatic and chlorinated hydrocarbons in mussels from the coastal zone of Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Environmental Toxicology Chemistry* 30: 521-529.

Amin O, Ferrer L, Marcovecchio J, 1996. Heavy metal concentrations in littorals sediments from the Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* 41 (3): 219-231.

Anderson MJ, 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32-46. Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR, 2007. *Permanova+ for primer: guide to software and statistical methods*. PRIMER-E, Plymouth.

Anderson MJ, Gorley RN, Clarke KR, 2008. *PERMANOVA+for PRIMER – Guide to Software and Statistical Methods*. Primer-E Ltd, Plymouth, UK.

Anderson MJ, Robinson J, 2003. Generalised discriminant analysis based on distances. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* 45:301–318

Anderson MJ, ter Braak CJF, 2003. Permutation tests for multi-factorial analysis of variance. *Journal of Statistical Computation and Simulation* 73: 85-113.

Anderson MJ. 2006. Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics* 62: 245-253.

Anderson RN, Clarke KR, Gorley MJ, 2007. *PERMANOVA+ for PRIMER: guide to software and statistical methods*, PRIMER-E,2007.

APHA. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA; Washington DC, USA.

Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.* 467, 177–186.

Balestrini C, Manzella G, Lovrich GA, 1998. Simulación de corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. Servicio de Hidrografía Naval. Departamento de Oceanografía. Informe Técnico 98, 58p.

Ball, A.S., Mudge, S.M., 2008. *Methods in Environmental Forensics*. CRC Press. 386 pp.

Barra R, Castillo C, Torres JPM , 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the South American environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York. 1-22 p.p

Baršienė J, Rybakovas A, Lang T, Andreikėnaite L, Michailovas A, 2013. Environmental genotoxicity and cytotoxicity level in fish from the North Sea off shore region and Atlantic coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 68 (1-2), 106–116.

Belfiore NM, Anderson SL. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat Res* 2001;489:97–122.

Beng KC, Corlett RT, 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and conservation*, 29(7), 2089-2121.

Benincá C, Ramsdorf W, Vicari T, Oliveira Ribeiro CA, Almeida, MI, Silva De Assis H C, 2012. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina coast-southern of Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 184, n. 4, p. 2045–56.

Bombail W, Aw D, Gordon E, Batty J, 2001. Application of comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere* 44 (03), 383–392.

Bony S, Gaillard I., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 421–428.

Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., Devaux, A., 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* 89, 197–203.

Borja A, Bricker S, Dauer D, Demetriades N, Ferreira J, Forbes A, Hutchings P, Jia X, Kenchington R, Marques J, Zhu C, 2008. Overview of integrative tools and methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. *Marine Pollution Bulletin* 56 (9): 1519-37.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.

Bravo G, Kaminsky J, Bagur M, Alonso CP, Rodríguez M, Fraysse C, Lovrich G, Bigatti G, 2023. Roving Diver Survey as a Rapid and Cost-Effective Methodology to Register Species Richness in Sub-Antarctic Kelp Forests. *Diversity* 15: 354.

Bravo ME, Carcedo MC, Dos Santos EP, Fiori, SM, 2021. Taxonomic and Functional assessment of subtidal macrobenthic communities in the Bahía Blanca estuary (Argentina). *The Bahía Blanca Estuary. Ecology and Biodiversity* 215-251.

Bray JR, Curtis JT. 1954. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27: 326-349.

Bruno DO, Victorio MF, Acha EM, Fernández DA, 2018. Fish early life stages associated with giant kelp forests in sub-Ant-arctic coastal waters (Beagle Channel, Argentina). *Polar Biology* 41: 365-375.

Bujalesky GG, 2011. The flood of the Beagle valley (11000 yr B.P.), Tierra del Fuego. *Anales Instituto Patagonia (Chile)*, 39 (1) pp. 5-21.

Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C, 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymoha*. *Mutat. Res.* 537, 81–92. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00050-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00050-0).

Camiolo MD, Luppi TA, 2016. Hábitat y historia de vida de *Pachycheles laevidactylus* (Crustacea, Anomura, Porcellanidae) en el intermareal rocoso de Mar del Plata, Argentina. *Iheringia, Série Zoologia*.

Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS, 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123–2136

Castaños C, 2016. Programa de desarrollo pesquero y acuícola sustentable (PRODESPA). Dirección General de Desarrollo Pesquero y Acuícola, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Informe final, 33 pp.

Cavaş T, 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 352–358.

Cavaş T, Ergene-Gözükara S, 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>

Chapman FSA, Underwood J, Skilleter GA, 1995. Variability at different spatial scales between a subtidal assemblage exposed to the discharge of sewage and two control assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 189: 103-122.

Claiborne A, 1985. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Catalase activity. CRC Press, Inc Boca Raton, FL.

Claiborne A. 1985. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Catalase activity. CRC Press, Inc Boca Raton, FL.

Clarke KR, 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117-143.

Clarke KR, Tweedley JR, Valesini FJ, 2014. Simple shade plots aid better long-term choices of data pre-treatment in multivariate assemblage studies. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 94(1):1-16.

Clarke KR, 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.*, 18: 117-143

Clarke KR, Gorley RN, 2015. PRIMER v7: User Manual/Tutorial. PRIMER-E: Plymouth

Clarke KR, Somerfield PJ, Gorley RN, 2008. Testing of null hypotheses in exploratory community analyses: similarity profiles and biota-environment linkage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 366: 56-69

Cochran WG, 1963. *Sampling Techniques*, Wiley, New York.

Colwell R, 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. – *Ecology* 85: 2717–2727

Colwell R, 2009. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.2. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>

Colwell R, Coddington JA, 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 345: 101-118

Conti ME, Tudino MB, Grazia Finioia M, Simone C, Stripeikis J, 2019. Managing complexity of marine ecosystems: From the monitoring breakdown structure (MBS) to the baseline assessment. Trace metal concentrations in biomonitors of the Beagle Channel, Patagonia (2005-2012). *Ecological Indicators* 104, 296-305.

Covich AP, Palmer MA, Crowl TA, 1999. The role of benthic invertebrates species in freshwater ecosystems. *BioScience* 49: 119-127.

Cruz-Jiménez AM, 2019. Ensamblajes de peces en los bosques de kelp de *Macrocystis pyrifera* en el Canal Beagle, Tierra del Fuego: estructura comunitaria y variación espacio-temporal. Unpubl PhD Thesis, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 1-193 p.

Cucco A, Martín J, Quattrocchi G, Fenco H, Umgieser G, Fernández DA, 2022. Water Circulation and Transport Time Scales in the Beagle Channel, Southernmost Tip of South America. *Journal of Marine Science and Engineering* 10: 941.

Cuello G, Elizabeth N, Llanos G, Garaffo V, Jaubet ML, 2019. Emisario submarino de Mar del Plata (Argentina): ¿Cómo impactó su construcción en la comunidad bentónica intermareal? *Ecología Austral* 12.

Culhane FE, Briers RA, Tett P, Fernandes TF. 2019. Response of a marine benthic invertebrate community and biotic indices to organic enrichment from sewage disposal. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99:1721-1734. <https://doi.org/10.1017/>

Curelovich J, 2013. Mecanismos Reguladores de la Estructura y Dinámica de la Comunidad Intermareal Rocosa de Ensenada Zaratiegui, Tierra del Fuego. PhD thesis. University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Curelovich JN, Lovrich GA, Calcagno JA, 2014. Comunidades intermareales rocosas fueguinas. *Fundacion Azara No 2 / 51 Número 2-2014*

Curelovich JN, Lovrich GA, Cueto GR, Calcagno JA, 2016. Recruitment and zonation in a sub-Antarctic rocky intertidal community. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 98(2): 411-422.

Dauvin JC, Bellan G. y Bellan-Santini, D. 2010. Benthic indicators: from subjectivity to objectivity-Where is the line? *Marine Pollution Bulletin* 60:947-953.

de la Ossa Carretero JA, del Pilar Ruso Y, Giménez Casalduero F, Sánchez Lizaso JL. 2008. Effect of sewage discharge in *Spisula subtruncata* (da Costa 1778) populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54:226-235.

Dean HK, 2008. The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. *Revista de Biología Tropical*, 56, 11–38.

Derbali A, 2023. Seasonal changes in the reproductive cycle and condition index of the surf clam *Macra stultorum* (Molusca: Bivalvia) in the Gulf of Gabes, Tunisia. *Oceanographical and Hydrobiological Studies*, 52(3). <https://doi.org/10.26881/oahs-2023.3.00>

Di Prinzio CY, Casaux RJ, Miserendino ML (2009) Effects of land use on fish assemblages in Patagonian low order streams. *Ann de Limnology-International J Limnol* 45:267–277. <https://doi.org/10.1051/limn/2009030>

Diodato S, Comoglio L, Camilion C. et al. 2021. Integrated biomarker response in *Mytilus chilensis* exposed to untreated urban discharges along the coast of Ushuaia Bay (Beagle Channel, Argentina). *Environmental Science and Pollution Research* 28: 39892-39906.

Diodato S, Comoglio L, Moretto A, Marcovecchio J, 2018. Dinámica e impacto de la eutrofización por aportes urbanos en las cuencas hídricas y zona costera de la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego. In EM, Abraham RD, Quintana G, Mataloni (Eds.), *Agua+Humedales*. Buenos Aires: UNSAM EDITA.

Diodato S, Nohra Y, Noir G, Escobar J, Mansilla R, Moretto A, 2021. Water Quality Assessment in Urban Watersheds of Tierra del Fuego: A Perspective from the Integrated Water Resources Management. In: Torres, A.I. Campodonico, V.A. (eds) Environmental Assessment of Patagonia's Water Resources. Environmental Earth Sciences. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-89676-8_13.

Diodato S, 2013. Respuestas de especies locales a procesos de eutrofización en la zona costera próxima a la ciudad de Ushuaia, Tierra del Fuego. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca. 234p.

Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios 2017a. INFORME N°265, Plan de Remediación Ambiental de Ushuaia (PRAU).

Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios 2017b. INFORME N°266, Programa de Monitoreo del Plan de Remediación Ambiental de Ushuaia (PRAU).

Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios 2021. Programa de Monitoreo del Plan de Remediación Ambiental de Ushuaia (PRAU). Etapa II: Estudios de evolución de la remediación.

Dirección Provincial de Obras y Servicios Sanitarios 2022. Informe de Resultados Monitoreo Ambiental marzo 2022, Avance de la Remediación Ambiental del Canal de Beagle.

DPOSS. 2017. <https://dposs.gob.ar/#!/>

Du, SNN, McCallum ES, Vaseghi-Shanjani M, Choi JA, Warriner TR, Balshine S, Scott GR, 2018. Metabolic costs of exposure to wastewater effluent lead to compensatory adjustments in respiratory physiology in bluegill sunfish. *Environ. Sci. Technol.* 52, 801e811.

Duarte C, Giarratano E, Amin O, Comoglio L, 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62: 1895-1904.

Elías R, 1992. Quantitative benthic community structure in Blanca Bay and its relationship with organic enrichment. *Publicazione di la Stazione Zoologica di Napoles I, Marine Ecology* 13: 189-201.

Elías R, Bremec CS, 1995. Biomonitoring water quality using benthic communities in Blanca Bay, Argentina. *The Science of Total Environment* 158: 45-49.

Elías R, Bremec CS, 1997. First record of Magelonidae, *Magelona riojai* Jones, 1963 (Polychaeta), in coastal waters of Argentina. *Neritica* 11: 111-117.

Elías R, Bremec CS, Vallarino EA, 2001a. Polychaetes from a southwestern shallow shelf Atlantic area (Argentina, 38 S) affected by sewage discharge. *Rev. Chil. Hist. Nat.* v.74 n.3 <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2001000300003>.

Elías R, Jaubet ML, Llanos EN, Sánchez MA, Rivero MS, Garaffo GV, Sandrini Neto L, 2015. Effect of the invader *Boccardia proboscidea* (Polychaeta: Spionidae) on richness, diversity and structure of SW Atlantic epilithic intertidal community. *Marine Pollution Bulletin* 91, pp. 530-536, 10.1016/j.marpolbul.2014.10.007.

Elías R, Méndez N, Muniz P, Cabanillas R, Gutiérrez-Rojas C, Rozbaczylo N, Londoño-Mesa MH, Gárate Contreras PJ, Cárdenas-Calle M, Villamar F, Laverde-Castillo JJA, Brauko KM, Araki Braga M, Da Cunha Lana P, Díaz-Díaz O, 2021. Los poliquetos como indicadores biológicos en Latinoamérica y el Caribe. *Marine and Fishery Sciences* 34.

Elías R, Vallarino EA, Bremec CS, & Gravina MC, 2001b. Los poliquetos de la comunidad intermareal como bioindicadores de enriquecimiento orgánico en el Atlántico Sudoccidental. Resumen expandido del VIII COLACMAR, Trujillo, Perú. Vol II: 904-905.

Elias R, Vallarino EA, Bremec CS, 2000. *Protoariciella uncinata* Hartmann Schröder, 1962 (Polychaeta, Orbiniidae): a new record for intertidal mussel beds of the Southwestern Atlantic shore affected by sewage effluents. *Revista de biología marina y oceanografía* 35(2): 181-184.

Ellman GL, Courtney KD, Andres JrV, Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7(2): 88- 95.

Esteves J, Amin O, 2004. Evaluación de la contaminación urbana de las Bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina. Informe Técnico del Programa de Implementación y Consolidación del Plan de Manejo de la Zona Costera Patagónica (GEF- PNUD). 64p.

Farrington JW, Goldberg ED, Risebrough RW, Martin JH, Bowen VT. 1983. U.S. "Mussel Watch" 1976-1978: An Overview of the Trace-Metal, DDE, PCB, Hydrocarbon, and Artificial Radionuclide Data. *Environmental Science and Technology*, 17:490-496.

Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2010;24(1):19–30.

Gabriel F , Hauser-Davis RA, Soares L, Mazzuco ACA., Rocha RCC, Saint Pierre TD, Bernardino AF, 2020. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ*, 8, e10266.

Gagne F, Blasé C, 1995. Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 217–229.

Galgani F, Bocquené G, Cadiou Y, 1992. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 77-82.

Geist J, Hawkins SJ, 2016. Habitat recovery and restoration in aquatic ecosystems: current progress and future challenges, *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.*, 26(5), 942–962.

Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H, 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all! taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources* 13(5): 851–861.

Gemmell NJ, Akiyama S, 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in genetics* 9(12): 338-339.

Giarratano E, Amin O, 2010. Heavy metals monitoring in the southern most mussel farm of the world (Beagle Channel, Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1378-1384.

Giarratano E, Duarte C, Amin O, 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 270-279.

Giarratano E, Gil M, Malanga G, 2011. Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Marine Pollution Bulletin* 62(6): 1337-1344.

Giarratano E, 2010. Evaluación de la contaminación en la zona costera próxima a Ushuaia (Tierra del Fuego) mediante el uso del mejillón *Mytilus edulis chilensis* como especie indicadora. Universidad Nacional del Comahue. Tesis Doctoral, 254 pp.

Giesecke R, Martín J, Piñones A, Höfer J, Garcés-Vargas J, Flores-Melo X, Alarcón E, Durrieu de Madron X, Bo Furrin, González HE, 2021. General Hydrography of the Beagle Channel, a Subantarctic Interoceanic Passage at the Southern Tip of South America. *Frontiers in Marine Science* 8.

Giesecke R, Höfer J, Vallejos T, González HE, 2021. Death in southern Patagonian fjords: Copepod community structure and mortality in land- and marine-terminating glacier-fjord systems. *Prog. Oceanogr.* 174, 162–172.

Glasby TM, 1997. Analysing data from post-impact studies using asymmetrical analyses of variance: a case study of epibiota on marinas. *Australian Journal of Ecology* 22:448-459.

Gotelli NJ, Colwell RK, 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4:379-391.

Gower JC, 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. En: *Biometrika* 53: 325-338.

Green RH, 1979. Sampling design and statistical methods for environmental biologists. John Wiley and Sons, New York.

Grime JP, 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* 111, 1169–1194.

Guerra-Castro E, Hidalgo G, Castillo-Cupul RE, Muciño-Reyes M, Noreña-Barroso E, Quiroz-Deaquino J, Simoes N, 2020. Sandy beach macrofauna of Yucatán state (Mexico) and oil industry development in the Gulf of Mexico: first approach for detecting environmental impacts. *Frontiers in Marine Science*, 7, 589656.

Guidetti P, Terlizzi A, Frascchetti S, Boero F, 2003. Changes in Mediterranean rocky-reef fish assemblages exposed to sewage pollution. *Marine Ecology Progress Series* 253: 269-278.

Habig WH, Pabst M, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry* 249(22): 7130-7139.

Heddle JA, 1973. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat. Res.* 18, 187–192.

Heiri O, Lotter AF, Lemcke G, 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology* 25: 101–110.

Henn JJ, CB Anderson, G Martinez Pastur, 2016. Landscape-level impact and habitat factors that explain invasive beaver distribution in Tierra del Fuego. *Biological Invasions* 18(6): 1679-1688.

Hindell JS, Quinn GP, 2020. Effect of sewage effluent on the population structure of *Brachidontes rostratus* (Mytilidae) on a temperate intertidal rocky shore. *Marine Freshwater Research*, 51:543-551.

Hoshina MM, de Franceschi de Angelis D, Marin-Morales MA, 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutat. Res.* 656, 44–48.

Huang JN, Wen B, Xu L, Ma HC, Li XX, Gao JZ, Chen ZZ, 2022. Micro/nano-plastics cause neurobehavioral toxicity in discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*): Insight from brain-gut-microbiota axis. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126830.

Hüne M, Vega R. 2016. Feeding habits in two sympatric species of Notothenioidei, *Patagonotothen cornucola* and *Harpagifer bispinis*, in the Chilean Patagonian channels and fjords. *Polar Biol* 39:2253–2262.

Hurlbert SA, 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54: 187-211.

Iachetti CM, Lovrich G, Alder VA, 2021. Temporal variability of the physical and chemical environment, chlorophyll and diatom biomass in the euphotic zone of the

Beagle Channel (Argentina): Evidence of nutrient limitation. Programa Oceanográfico 195

Isani G, Andreani G, Cocchioni F, Fedeli D, Carpené E, Falcioni G, 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 224–230.

Iturburu FG, Bertrand L, Mendieta JR, Amé MV, Menone ML, 2018. An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid. *Ecological Indicators* 93: 351-357.

Jaubet ML, Garaffo GV, Cuello GV, Hines E, Elías R, Llanos EN, 2024. Submarine outfall and new sewage treatment plant modulate the response of intertidal benthic communities in a SW Atlantic area. *Marine Pollution Bulletin* 199: 115946.

Jaubet ML, Garaffo GV, Sánchez MA, Elías R, 2013. Reef-forming polychaetes outcompetes ecosystem engineering mussels. *Marine Pollution Bulletin* 71(1-2): 216-221.

Jaubet ML, Sanchez MA, Rivero MS, Garaffo GV, Vallarino EA, Elias R, 2011. Intertidal biogenic reefs built by the polychaete *Boccardia proboscidea* in sewage-impacted areas of Argentina, SW Atlantic. *Marine Ecology* 32:188-197.

Jha AN, 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res.* 552, 1–17.

Jiménez-Valverde A, Hortal J, 2003. Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología* 8: 151-161.

Keeley N, Susanna A, Wood XP, 2018. Development and preliminary validation of a multi-trophic metabarcoding biotic index for monitoring benthic organic enrichment, *Ecological Indicators*, Volume 85 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.11.014>.

Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Martone RG, Lowell N, 2014. Harnessing DNA to improve environmental management. *Science*, 344(6191), 1455–1456. doi:10.1126/science.1251156

Kelly RP, O'Donnell JL, Lowell NC, Shelton AO, Samhoury JF, Hennessey SM, Feist BE, Williams GD. 2016. Genetic signatures of ecological diversity along an urbanization gradient. *PeerJ* 4:e2444 <https://doi.org/10.7717/peerj.2444>

Kristan U, Kanduc T, Osterc A, Slejkovec Z, Ramsak A, Stibilj V. 2014. Assessment of pollution level using *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species: The case of the Gulf of Trieste. *Marine Pollution Bulletin*, 89:455-463.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* 33(7): 1870-1874.

LaBarre A, Konar B, Iken K. 2023. Influence of environmental conditions on *Mytilus trossulus* size frequency in two glacially influenced estuaries. *Estuaries and Coasts*, 46:1253-1268. <https://doi.org/10.1007/s12237-023-01175-0>

Lacoursière-Roussel A, Howland K, Normandeau E, Grey EK, Archambault P, Deiner, K, Bernatchez L, 2018. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecology and evolution*, 8(16), 7763-7777.

Lander TR, Robinson SMC, MacDonald BA, Martin JD. 2012. Enhanced growth rates and condition index of blue mussels (*Mytilus edulis*) held at integrated multitrophic aquaculture sites in the Bay of Fundy. *Journal of Shellfish Research*, 31(4):997-1007.

Lardicci C, Rossi F, Maltagliati F, 1999. Detection of thermal pollution: variability of benthic communities at two spatial scales in an area influenced by a coastal power station. *Marine Pollution Bulletin* 38:296-303.

Legendre P, Anderson MJ, 1999. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecol. Monogr.* 69: 1-24

Leray M, Yang J, Meyer CP, Mills SC, Agudelo N, Ranwez V, Machida RJ, 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* 10: 34.

Lewis JR, 1964-The Ecology of Rocky Shores. London; The English Universities Press: xii+323 p.

Llanos EN, 2018. Biodiversidad y patrones sucesionales en comunidades bentónicas intermareales de Mar del Plata afectadas por contaminación orgánica. Tesis doctoral, Universidad Nac. De Mar del Plata. 190 p.

Lloris D, Rucabado J, 1991. Ictiofauna del Canal Beagle (Tierra del Fuego), aspectos ecológicos y análisis biogeográfico Publicaciones especiales del Instituto Español de Oceanografía 8: 1-182.

López-Gappa J, Tablado NM, 1990. Influence of sewage pollution on a rocky intertidal community dominated by the mytilid *Brachidontes*. Marine Ecology Progress Series, 63, 163-175.

Lovrich GA, Tapella F, 2014. Southern king crabs. En: Stevens BG (ed) King crabs of the world: biology and fisheries management. CRC Press, Boca Ratón, 449-485 p.

Lovrich GA, Tapella F, 2016. Estado poblacional de la centolla *Lithodes santolla* en el Canal Beagle -Informe presentado al Cluster de Pesca Artesanal de Tierra del Fuego Convenio específico de asistencia técnica CONICET-UNTDF (Res. 361/15).

Maranho LA, Pereira CDS, Choueri RB, Cesar A, Gusso-Choueri PK, Torres RJ, 2012. The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys. J. Environ. Monit. 14 (10), 2608–2626.

Martin J, Malits A, Lovrich G, Iachetti C, Kreps G, Flanagan R, 2016. Procesos oceanográficos e implicaciones ambientales en un pasaje interoceánico subpolar: El Canal Beagle (Tierra del Fuego, Argentina). V Simp. Int. Ciencias del Mar, Alicante, Spain, pp. 207–208.

Mathieson AC, Nienhuis PH, 1991. "Intertidal and Littoral Ecosystems (Ecosystems of the World 24)." Elsevier. London, United Kingdom. 516 p.

McArdle, B.H., Anderson, M.J. (2001). Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. Ecology 82: 290-297

Miserendino ML, Casaux R, Archangelsky M, Di Prinzio CY, Brand C, Kutschker AM (2011) Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. Sci Total Environ 409:612–624.

Muniz P, Lanap C, Venturini N, Elías R, Vallarino E, Bremec C, Sandrini-Neto L, Martins C, 2013. Un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos. 1ra edición. Montevideo: Editora de la Universidad de la República (UDeLAR) 129 p.

Nagarani, N., Devi, V.J., Kumaraguru, A.K., 2011. Mercuric chloride induced proteotoxicity and structural destabilization in marine fish (*Therapon jarbua*). *Toxicol. Environ. Chem.* 93, 296–306.

Ojeda J, Rodríguez JP, Rosenfeld S, Vega N, 2017. Comparación de la estructura comunitaria entre plataformas y bolones del intermareal en isla Navarino, Reserva de Biósfera Cabo de Hornos. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 45(3), 33-43.

Ojeda J, Rosenfeld S, Marambio J, Rozzi R, Mansilla A, 2014. Patrones estacionales y espaciales de la diversidad de moluscos intermareales de bahía Róbaló, canal Beagle, Reserva de la Biosfera Cabo de Hornos, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3): 493-509.

Ojeda M, Cossi PF, Rimondino GN, Chiesa IL, Boy CC, Pérez AF, 2021. Microplastics pollution in the intertidal limpet, *Nacella magellanica*, from Beagle Channel (Argentina), *Science of The Total Environment*, 1 48866, ISSN 0048-9697.

Olive, P.L., 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 487–495.

Otway NM, Gray CA, Craig JR, McVea TA, Ling JE, 1996. Assessing the impacts of deep-water sewage outfall on spatially and temporally-variable marine communities. *Marine Environmental Research* 41: 45-71.

Pampanin DM, Sydnes MO, 2013. Hydrocarbon, edited by V. Kutcherov & A. Kolesnikov, pp. 83–118. Rijeka: InTech.

Pampanin DM, Volpato E, Marangon I, Nasci C. 2005. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* 140:41-52.

- Parolini M, Pedriali A, Binelli A, 2013. Chemical and biomarker responses for sitespecific quality assessment of the LakeMaggiore (northern Italy). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (8), 5545–5557.
- Patricio J, Neto JM, Teixeira H, Salas F, Marques JC, 2009. The robustness of ecological indicators to detect long-term changes in the macrobenthos of estuarine systems. *Marine Environmental Research* 68: 25-36.
- Paul JM, Meyer JL, 2001. Streams in the urban landscape. *Annu Rev Ecol Syst* 32:333–365
- Pearson TH, Rosenberg R, 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* 16: 229-311
- Pisoni M, Cogotzi L, Frigeria A, Corsi I, Bonacci S, Iacocca A, Lancini L, Mastrototaro, F, Focardi S, Svelto M, 2004. DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environ. Res.* 96,163-175.
- Quinn GP, Keough MJ, 2002. *Experimental design and data analysis forbiologists* (1st ed.). Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Ramsdorf WA, Ferraro MVM, Oliveira-Ribeiro CA, Costa JRM, Cestari MM, 2009.Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ. Monit. Assess.* 158, 77–85. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-008-0566-1>.
- Recabarren-Villalón T, Ronda AC, Arias AH, 2019. Uso de biomarcadores en la evaluación ambiental de ecosistemas marinos en América. *JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático* 1(2): 1-18.
- Reish DJ, 1957. The relationship of the polychaetous annelid *Capitella capitata* (Fabricius) to waste discharges of biological origin. In: Tarzwell CM (ed) *Biological problems in water pollution*: 195-200. United States Public Health Service, Philadelphia, Pennsylvania.
- Reish DJ, 1963. A quantitative study of the benthic polychaetous annelids of Bahía de San Quintin, Baja California. *Pacific Naturalist* 3: 399-436.

Rivero MS, Elías R, Vallarino EA, 2005. First survey of macrofauna in the Mar del Plata Harbor (Argentina), and the use of polychaetes as pollution indicators. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 40: 101-108.

Roberts DE, 1996. Effects of the North Head deep-water sewage outfall on nearshore coastal reef macrobenthic assemblages. *Marine Pollution Bulletin*, 33(7-12), 303-308.

Roberts DE, Smith A, Ajani P, Davis AR, 1998. Rapid changes in encrusting marine assemblages exposed to anthropogenic pointsource pollution: a 'Beyond BACI' approach. *Marine Ecology Progress Series* 163: 213-224

Rocchetta I, Pasquevich MY, Heras H, Ríos de Molina MC, Luquet CM. 2014. Effect of sewage discharges on lipid and fatty acid composition of the Patagonian bivalve *Diplodon chilensis*. *Marine Pollution Bulletin*, 79:211-219.

Rodríguez JP, Rosenfeld S, Bahamonde F, Rozzi R, Mansilla A, 2021. Variabilidad espacial de ensamblajes bentónicos intermareales en bahía Yendegaia, canal Beagle, ecorregión subantártica de Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 49, 18.

Salas F, Neto MCJ, Patrício J, Pérez-Ruzafa A, Marques J. 2006. Userfriendly guide for using benthic ecological indicators in coastal and marine quality assessment. *Ocean and Coastal Management* 49 (5-6): 308-331.

Schloss I, Pizarro G, Cadaillon A, Giesecke R, Hernando MP, Almandoz GO, Latorre MP, Malits A, Flores-Melo X, Saravia LA, Martín J, Guzmán L, Iachetti C, Ruiz C, 2023. *Alexandrium catenella* dynamics and paralytic shellfish toxins distribution along the Beagle Channel (southern Patagonia) *Journal of Marine Systems*: 239.

Schmid W, 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9–15.

Sericano J, Wade T, Jackson T, Brooks J, Tripp B, Farrington J, Mee L, Readman J, Villeneuve J, Goldberg E, 1995. Trace organic contamination in the Americas: An overview of the U.S. National Status and Trends and the International "Mussel Watch" Programs. *Mar Pollut Bull* 31: 214-225.

Sessa GS, 2013. El ambiente intermareal y sus especies: cuadernillo para el aula. Sessa GS, Estanislao VE, Martínez Godoy MS. 1ed. Puerto Madryn: Fund. Patagonia Natural 48 p.

Silva C, Mattioli M, Fabbri E, Yáñez E, DelValls TA, Martín-Díaz ML, 2012. Benthic community structure and biomarker responses of the clam, *Scrobicularia plana* in a shallowtidal creek affected by fish farm effluents (Rio San Pedro, SW Spain). *Environ. Int.* 47, 86–98.

Smith SDA, Simpson RD, 1993. Effects of pollution on the holdfast macrofauna of the kelp *Eklonia radiata*: discrimination at different taxonomic levels. *Marine Ecology Progress Series* 96: 199-208.

Somerfield PJ, Clarke KR, 2013. Inverse analysis in non-parametric multivariate analyses: distinguishing groups of associated species which covary coherently across samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 449: 261-273.

Souza TS, Fontanetti CS, 2012. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 7, 17–22.

Stephenson TA, Stephenson A, 1972. *Life between Tide marks on Rocky Shores*. San Francisco; Freeman: 425 p.

Sylvester F, 2006. *Biología alimentaria y ecología del molusco invasor Limnoperna fortunei (Mytilidae) en el Paraná inferior y Río de la Plata*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires 177 p.

Terlizzi A, Benedetti-Cecchi L, Bevilacqua S, Fraschetti S, Guidetti P, Anderson MJ, 2005. Multivariate and univariate asymmetrical analyses in environmental impact assessment: a case study of Mediterranean subtidal sessile assemblages. *Marine Ecology Progress Series*, 289: 27-42.

Underwood AJ 1992, Beyond BACI: the detection of environmental impact on populations in the real, but variable, world. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161(2): 145–178.

Underwood AJ, 1994. On beyond BACI: sampling designs that might reliably detect environmental differences. *Ecological Applications* 4(1): 3–15

Underwood AJ, 1991. Beyond BACI: experimental designs for detecting human environmental impacts on temporal variation in natural populations. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 42(5): 569-587.

- Underwood AJ, 1997. *Experiments in Ecology: Their logical design and interpretation using Analysis of Variances*. Cambridge University Press, Cambridge, 504 p.
- Underwood AJ, 2000. Trying to detect impacts in marine habitats: comparisons with suitable reference areas. In: *Statistics in Ecotoxicology*. Sparks T. (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester.
- Underwood AJ, Chapman MG, 1996. Scales of spatial patterns of distribution of intertidal invertebrates. *Oecologia* 107: 202-224.
- Underwood AJ, Chapman MG, 2005. Design and analysis in benthic surveys. *Methods for the study of marine benthos*. A. Eleftheriou & A. D. McIntyre. Oxford, Blackwell Science: 1-42.
- Underwood AJ, Peterson CH, 1988. Towards an ecological framework for investigating pollution. *Marine Ecology Progress Series* 46: 227-234.
- Valenzuela A, Anderson C, Fasola L, Cabello J, 2014. Linking invasive exotic vertebrates and their ecosystem impacts in Tierra del Fuego to test theory and determine action. *Acta Oecologica* 54: 110-118.
- Vallarino E, Rivero MS, Gravina MC, Elías R, 2002. The community-level response to sewage impact in intertidal mytilid beds of the Southwestern Atlantic, and the use of the Shannon index to assess pollution. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37 (1): 25-33.
- Vallarino EA, 2002. La comunidad bentónica intermareal de *Brachidontes rodriguezii* (D'Orb.) y su relación con el efluente cloacal de la ciudad de Mar del Plata (38° S). Tesis doctoral, Universidad Nac. De Mar del Plata. 190 pp.
- Vallarino EA, Elías R, 2000. Respuesta de corto plazo de la comunidad intermareal de Mitílidos sujeta a contaminación orgánica por el efluente cloacal de Mar del Plata. IV Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Puerto Madryn, Argentina.
- Vanella F, Fernández DA, Romero M, Calvo J, 2007. Changes in the fish fauna associated with a sub-Antarctic *Macrocystis pyrifera* kelp forest in response to canopy removal. *Polar Biology* 30:449-457.

Veiga P, Ramos-Oliveira C, Sampaio L, Rubal M. 2020. The role of urbanisation in affecting *Mytilus galloprovincialis*. PLoS ONE, 15(5):e0232797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232797>

Vinagre C, Madeira D, Mendonça V, Dias M, Roma J, Diniz MS. 2014. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. Marine environmental research, 97, 10-14.

Walne PR, 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterflyfish *Venerupis decusata* L. Aquaculture, 8:371-381.

Warwick RM, 1993. Environmental impacts studies on marine communities: pragmatical considerations. Australian Journal of Ecology 18: 63-80.

Weber S, Stothut M, Mahla L, Kripp A, Hirschler L, Lenz N, Krehenwinkel H, 2024. Plant-derived environmental DNA complements diversity estimates from traditional arthropod monitoring methods but outperforms them detecting plant–arthropod interactions. Molecular Ecology Resources, 24(2), e13900.

Whittaker RH, 1972. Evolution and measurement of species diversity. Taxon 12: 213-251.

Wilber DH, Clarke DG, 1998. Estimating secondary production and benthic consumption in monitoring studies: a case study of the impacts of dredged material disposal in Galveston Bay, Texas. Estuaries 21(2): 230-245.

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T, 2001. Human DNA repair genes. Science 291 (5507), 1284–1289.

WoRMS Editorial Board (2024). World Register of Marine Species. Available from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2024-04-24.

Yadav KK, Trivedi SP, 2009. Sublethal exposure of heavymetals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. Chemosphere 77, 1495–1500.

Zaixso HE, Boraso de Zaixso AI, López Gappa JJ, 1978. Observaciones sobre el mesolitoral rocoso de la zona de Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina). Ecosur 5(10): 119-130.