



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Ambientales -Programa de Ciencias Ambientales con mención
en Sistemas Acuáticos Continentales

**Evaluación de los efectos de efluentes de plantas
tratamiento de aguas servidas sobre *Oncorhynchus mykiss*
mediante el uso de experimentos de laboratorio y terreno
en la cuenca del río Bío-bío.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales mención
Sistemas Acuáticos Continentales

MARÍA FERNANDA SAAVEDRA MONDACA
CONCEPCIÓN-CHILE
2015



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Ambientales -Programa de Ciencias Ambientales con mención
en Sistemas Acuáticos Continentales

**Evaluación de los efectos de efluentes de plantas
tratamiento de aguas servidas sobre *Oncorhynchus mykiss*
mediante el uso de experimentos de laboratorio y terreno
en la cuenca del río BíoBío.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales mención
Sistemas Acuáticos Continentales

MARÍA FERNANDA SAAVEDRA MONDACA
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Guía: Ricardo Barra Ríos
Dpto. de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales y Centro EULA-Chile
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Ansiaba que llegara este día para poder terminar esta etapa de mi vida, sin embargo lo veía tan lejano que cuando se fijó el día “D”, sentí la alegría y la satisfacción que tanto anhelaba.....

Por la confianza depositada en mí a través de todo este proceso, sus consejos y disposición para esa palabra/comentario que necesité le agradezco al Dr. Ricardo Barra Ríos.

Al EULA en general, creo sinceramente que cada persona que trabaja en el centro, forjó de una u otra forma mi formación como Doctor. Sería egoísta de mi parte nombrar a algunos y que se me olviden otros, por lo cual hago extensiva mi gratitud a cada uno de ellos.

A mi familia, ese maravilloso círculo de energía y amor que me rodea. Mis padres de los cuales adquirí la perseverancia en conseguir las metas que uno se propone en la vida, que nada es tan malo como a veces parece y que cuando todo se ve cuesta arriba, siempre hay alguien que te tiende una mano. Que con las buenas prácticas, el respeto y la disposición no se pueden obtener cosas malas.

A mi marido, W. Oliver Alarcon, esto no hubiese sido posible, quién incansablemente me apoyó, me alentó y aconsejó en cada momento, quién estuvo codo a codo con esta aventura y quién vibra con mis logros casi más que yo. Un gran compañero de vida.

A mi pequeño milagro de vida, mi hija María Ignacia, quién llegó a revolucionar mi mundo y me inyectó la energía que me faltaba para terminar este largo proceso.

Y la virgen María.....por darme la oportunidad de vivir esta experiencia.

FINANCIAMIENTOS

Este proyecto fue financiado por:

1. Beca de Apoyo de Tesis Doctoral N° 24100142 (años 2010-2011) otorgada por CONICYT.



2. Fondo de financiamiento de Centros de investigación en Áreas prioritarias (FONDAP) - Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y Minería (CRHIAM) 150085.



ÍNDICE

FIGURAS.....	7
TABLAS.....	10
RESUMEN.....	12
Capítulo I: INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES GENERALES.....	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	25
HIPÓTESIS GENERAL.....	25
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	25
OBJETIVOS.....	26
OBETIVO GENERAL.....	26
OBETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
Capítulo II: HERRAMIENTAS DE MONITOREO AMBIENTAL DE EFLUENTES.....	28
Paper N°1:.....	29
Health Status of Native Fish (<i>Percilia gillissi</i> and <i>Trichomycterus areolatus</i>) Downstream of the Discharge of Effluent from a Tertiary-Treated Elemental Chorine-Free Pulp Mill in Chile.....	29
Capítulo III: SCREENING DE EFLUENTES DE PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS.....	64
Paper N° 2:.....	65
First report on emerging contaminants in urban wastewater in two towns located in the Biobio river basin, Chile.....	65
Capítulo IV: EVALUACIÓN DE EFECTOS DE EFLUENTES DE PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA SERVIDAS EN EXPERIMENTOS DE LABORATORIO Y TERRENO.....	89
Paper N° 3:.....	90
Respuestas bioquímicas y reproductivas en juveniles de <i>Oncorhynchus mykiss</i> expuesto a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en condiciones de laboratorio y directamente en el ambiente en 2 localidades	90

(ciudades de Los Angeles y Sta. Barbara) de la cuenca del río Biobio, Chile...

Capítulo V: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	140
DISCUSIÓN GENERAL.....	141
CONCLUSIONES.....	147
REFERENCIAS.....	149



FIGURAS

HEALTH STATUS OF NATIVE FISH (*PERCILIA GILLISSI* AND *TRICHOMYCTERUS AREOLATUS*) DOWNSTREAM OF THE DISCHARGE OF EFFLUENT FROM A TERTIARY-TREATED ELEMENTAL CHORINE-FREE PULP MILL IN CHILE

- Figure 1.** Sampling sites in Itata basin for collection of *Trichomycterus areolatus* and *Percilia gillissi*, upstream of the effluent discharge (S1–S3), downstream Velenunque Stream (S4) and downstream pulp mill discharge (S5–S7).....33
- Figure 2.** Size distribution for *Percilia gillissi* in the seven sites sampled, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007, and (C) January 2008.....40
- Figure 3.** Size distribution for *Trichomycterus areolatus* in the seven sites sampled, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007, and (C) January 2008...43
- Figure 4.** Liver ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity for *Percilia gillissi*, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007, and (C) January 2008. Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods.....45
- Figure 5.** Liver ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity for *Trichomycterus areolatus*, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007 and (C) January 2008. Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods. N.D. = no data.....46
- Figure 6.** Percentage ((A), February 2007 and (B), October 2007) and diameter ((C), February 2007 and (D), October 2007) of the different gonad maturation states for *Percilia gillissi*. El: oocyte stage 1, EII: oocyte stage 2, EIII: oocyte stage 3, EIV: oocyte stage 4, EV: oocyte stage 5 (according to Quiroz *et al.*, unpublished data). Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods and maturation stage.....50
- Figure 6.** Continued.....51
- Figure 7.** Percentage ((A), February 2007, (B), October 2007 and (C), January 2008) and diameter ((D), February 2007; (E), October 2007, and (F), January 2008) of the different gonad maturation states for *Trichomycterus areolatus*. El: oocyte stage 1, EII: oocyte stage 2, EIII: oocyte stage 3 EIV: stage 4 (according to Huaquin *et al.* [24]).

Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods and maturation stage.....	53
Figure 7. Continued.....	54

FIRST REPORT ON EMERGING CONTAMINANTS IN URBAN WASTEWATER IN TWO TOWNS LOCATED IN THE BIOBIO RIVER BASIN, CHILE.

Figure 1. Map of the Biobio river basin, Chile. The location of the WWTPs studied are in the cities of Santa Barbara and Los Angeles, respectively.....	69
Figure 2. Log-transformed concentrations of emerging contaminants (ng L ⁻¹) in effluents from the WWTPs in the cities of Los Angeles and Santa Barbara. (a) november, 2010 and (b) april, 2013.....	76

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y REPRODUCTIVAS EN JUVENILES DE *ONCORHYNCHUS MYKISS* EXPUESTO A EFLUENTES DE PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y DIRECTAMENTE EN EL AMBIENTE EN 2 LOCALIDADES (CIUDADES DE LOS ANGELES Y STA. BARBARA) DE LA CUENCA DEL RÍO BIOBIO, CHILE.

Figura 1. Índice gonadosomático (a) e índice hepatosomático (b) en individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos (media ± error estándar).....	100
Figura 2. Hormona testosterona (media ± error estándar) en individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> machos (a) y hembras (b) expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.....	103
Figura 3. Hormona 11-ketotestosterona (media ± error estándar) y hormona 17β-estradiol (media ± error estándar) en individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.....	104
Figura 4. Estado de maduración III (media ± error estándar) en gónadas femeninas de individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento	

de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.....	106
Figura 5. Hematocrito (media \pm error estándar) y recuento de linfocitos (media \pm error estándar) en sangre de individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.....	109
Figura 6. Actividad EROD (media \pm error estándar) y Actividad GST (media \pm error estándar) en hígados de individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.....	111
Figura 7. Índice gonadosomático (a) e índice hepatosomático (b) en individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).....	114
Figura 8. Hormona testosterona (media \pm error estándar) en individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> machos (a) y hembras (b) expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).....	116
Figura 9. Estado de maduración III (media \pm error estándar) en gónadas femeninas de individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).....	118
Figura 10. Hematocrito (media \pm error estándar) y recuento de linfocitos (media \pm error estándar) en sangre de individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).....	121
Figura 11. Actividad EROD (media \pm error estándar) y Actividad GST (media \pm error estándar) en hígados de individuos juveniles de <i>O. mykiss</i> expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).....	123

TABLAS

HEALTH STATUS OF NATIVE FISH (*PERCILIA GILLISSI* AND *TRICHOMYCTERUS AREOLATUS*) DOWNSTREAM OF THE DISCHARGE OF EFFLUENT FROM A TERTIARY-TREATED ELEMENTAL CHORINE-FREE PULP MILL IN CHILE.

Table 1. Summary statistics for <i>Percilia gillissi</i> captured in the Itata River (Chile), by sex and season.....	37
Table 2. Summary statistics for <i>Trichomycterus areolatus</i> captured in the Itata River (Chile), by sex and season.....	41
Table 3. Summary statistics for <i>in vitro</i> gonad steroid production (pg/mg gonad) by species, sex, and season.....	48

FIRST REPORT ON EMERGING CONTAMINANTS IN URBAN WASTEWATER IN TWO TOWNS LOCATED IN THE BIOBIO RIVER BASIN, CHILE.

Table 1. Characteristics of WWTPs in Santa Barbara and Los Angeles cities, Biobío river basin, Chile.....	69
Table 2. List of pharmaceuticals and selected contaminants analyzed.....	71
Table 3. Effluent parameters of WWTP for the cities of Santa Barbara and Los Angeles, Biobio river basin, Chile.....	72
Table 4. Mean concentrations of the 16 emerging contaminant ($\text{ng L}^{-1} \pm$ standard error) in effluents from wastewater treatment plants in the cities of Santa Barbara and Los Angeles, Biobio rive basin, Chile. Samples were collected in november, 2010 and april, 2013. WWTP effluent column represent references to worldwide reported levels. ND: Not detected.....	78

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y REPRODUCTIVAS EN JUVENILES DE *ONCORHYNCHUS MYKISS* EXPUESTO A EFLUENTES DE PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS SERVIDAS EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y DIRECTAMENTE EN EL AMBIENTE EN 2 LOCALIDADES (CIUDADES DE LOS ANGELES Y STA. BARBARA) DE LA CUENCA DEL RÍO BIOBIO, CHILE.

Tabla 1. Coordenadas de ubicación para sitios de pre-impacto, impacto y post-impacto en estero Quilque (Los Angeles) y río Biobio (Sta. Barbara), respectivamente.....94



RESUMEN

Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) son mezclas muy complejas, que liberan altos niveles de contaminantes al ambiente, múltiples estudios han demostrado que efluentes de plantas de tratamiento de agua servidas pueden afectar distintos niveles fisiológicos en organismos acuáticos. Este trabajo investigó la presencia y concentración de 16 contaminantes emergentes de variados grupos químicos (fármacos, productos de cuidado personal, droga psicoestimulante y disruptor endocrino) de 2 efluentes de planta de tratamiento de aguas servidas de 2 ciudades (Sta. Bárbara y Los Ángeles) de la cuenca del Río Biobio en Chile, que atienden una población de 14.000 y 180.000 habitantes respectivamente. Este análisis se desarrolló el año 2010 y 2013. Los compuestos fueron analizados usando extracción fase sólida y cromatografía líquida con ionización por electrospray y detector de masa (HPLC MS/MS). Para evaluar los efectos de efluente de planta de tratamiento de aguas servidas, se expusieron peces juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) por períodos de tiempos 7, 14 y 21 días a diferentes concentraciones de efluente (control, 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100%). Además se realizaron experimentos en terreno, seleccionando sitios de pre-impacto, impacto y post-impacto en el estero Quilque y río Biobio, respectivamente (considerando la descarga de efluente de aguas servidas con el cual se realizaron los experimentos de laboratorio), en cada sitio se expusieron jaulas con truchas juveniles por períodos de 7, 14 y 21 días. Índices somáticos (hepatosomático, gonadosomático y factor de condición), inducción EROD, actividad glutatión-s-transferasa (GST), parámetros hematológicos, niveles hormonales circulantes (testosterona, 17 β -estradiol) y histología gonadal fueron evaluados. Los resultados indicaron la ocurrencia de contaminantes de interés emergente siendo las concentraciones más altas la de los fármacos gemfibrozil (29.783 ng L⁻¹), ibuprofeno (3.800 ng L⁻¹), atenolol (2.590 ng L⁻¹), diclofenaco (1.945 ng L⁻¹), el desinfectante triclosan (1.856,7 ng L⁻¹), cafeína (1.395 ng L⁻¹) y e-carbamazepina (1.345 ng L⁻¹), en el efluente de planta de tratamiento de la ciudad de Los Ángeles, durante el año 2013. Esta tendencia se evidencia en la mayoría de los contaminantes analizados. El experimento con el efluente Los Angeles mostró valores mayores en todas las respuestas medidas.

Evidenciando una tendencia de aumento de valores en inducción de EROD, GST niveles hormonales circulantes, hematocrito, recuento de eritrocitos a mayores concentraciones en los tiempos 7, 14 y 21 días, siendo la concentración 100%, los valores más altos. Esta misma tendencia se encontró para el experimento en terreno en el estero Quilque, con valores mayores que el experimento del río Biobío. Se evidenciaron efectos bioquímicos, alteraciones reproductivas y inmunes en todos los experimentos (laboratorio y terreno), siendo los resultados obtenidos a la concentración 100%, similares o mayores con lo obtenido en sitio de impacto y post-impacto de los experimentos de terreno.



Capítulo I: INTRODUCCIÓN



ANTECEDENTES GENERALES

La contaminación de los cursos de agua, tanto superficiales como profundos, constituye un problema ambiental en Chile (Nuñez 2010).

En la región del Bío-bío, Chile Centro sur, se encuentra el segundo río más largo de país, río Bío-bío que nace en las lagunas Icalma y Galletué ubicadas en el extremo nororiental de la región de la Araucanía en la Cordillera de los Andes, posee una longitud de 380 km. y es el cauce principal de la tercera hoya hidrográfica más grande del país (24.262 km²) (Karrasch et al. 2006). Este río proporciona múltiples servicios ambientales; agua potable, agua de riego, receptor de descargas urbanas e industriales, generación de electricidad, recreación y pesca (Parra & Faranda 1993).

Dentro de las fuentes de contaminación del río Bío-bío, están las descargas de aguas servidas urbanas e industriales. Estas aguas sin tratamiento influyen en la calidad del agua del río, por lo que los ecosistemas acuáticos se ven perturbados y los organismos acuáticos perjudicados (Parra 2004).

A comienzo de la década de los años 90, Chile comenzó en forma incipiente el proceso de construcción de plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) con la tecnología de lodos activados. Desde el año 2000, con la publicación de la Norma de Emisión de Residuos Líquidos a Aguas Marinas y Continentales Superficiales (Ministerio Secretaría General de la Presidencia, Chile 2001), el proceso se aceleró significativamente. Actualmente, aproximadamente el 95% de la población de la región del Bío-bío descarga sus aguas servidas a sistemas que cuentan con tratamiento (Essbio 2014). En la región del Bío-bío, se encuentran en funcionamiento 47 plantas de tratamiento de aguas servidas, sin embargo las que vierten sus efluentes a la cuenca del río Bío-bío son 23 plantas, de las cuales 4 lo hacen directamente en el cauce del río Bío-bío (SISS 2014 *op cit*).

La implementación de plantas de tratamiento de aguas servidas ayudó a disminuir la contaminación del río Bío-bío, sin embargo las plantas de tratamiento reciben una

gran cantidad de compuestos provenientes de descargas domésticas y/o industriales que no son totalmente removidos durante los procesos de tratamiento (Ternes et al. 1999). Por esta razón los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas representan una mezcla compleja de compuestos que no incluyen solo moléculas parcialmente retenidas en el tratamiento, sino que también algunos metabolitos microbianos formados durante los procesos de tratamiento.

Muchos de estos compuestos que son incorporados a los cursos de aguas a través de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas, son denominados como contaminantes emergentes. Estos contaminantes pueden afectar las aguas superficiales como subterráneas, presentado riesgos para la salud humana y el ecosistema (Brooks et al. 2009). En la mayoría de los casos los contaminantes emergentes corresponden a compuestos no regulados, los cuales pueden ser candidatos a una futura regulación dependiendo de la investigación de sus posibles efectos sobre la salud humana y de los resultados de su monitorización. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, ya que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente, considerándolos como compuestos pseudo-persistentes (Kuster et al. 2008).

Entre estos contaminantes podemos encontrar pesticidas, fármacos y productos de cuidado personal (PPCP), disruptores endocrinos, surfactantes, drogas ilícitas y muchos otros grupos de compuestos (Barceló 2003). Las actividades cotidianas como la higiene personal, el cuidado de la salud y tantas otras actividades del día a día, incorporan contaminantes a los cursos de aguas a través de los efluentes de aguas servidas, y si, consideramos que en la actualidad las plantas de tratamiento no están diseñadas para tratar y eliminar estos compuestos, la realidad se vuelve aún más compleja.

Variados estudios han demostrado que efluentes de plantas de tratamiento de agua servidas pueden afectar distintos niveles fisiológicos en organismos acuáticos

(Svenson et al. 2002, Hoeger et al. 2004 y Sepulveda et al. 2004). Existen evidencias de que los efluentes de PTAS causan estrés oxidativo en peces generando efectos subletales como daño oxidativo de proteínas y lípidos (Livingstone 2001 y Yeom et al. 2007). El uso de parámetros de estrés oxidativo en estudios de campo toxicológico esta asociado a defensas antioxidantes (Van Der Oost et al. 2003). Oakes et al. 2004 y Sturve et al. 2008, mencionan que los contaminantes encontrados en PTAS generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden significar una fuente de toxicidad para los organismos acuáticos que viven en ambientes influenciados con descargas de efluentes de PTAS causando disrupciones fisiológicas.

La exposición de peces a efluentes de PTAS ha demostrado diversos efectos adversos en la salud de ellos, incluyendo inmunosupresión (Hoeger et al. 2005), alteraciones en la actividad hepática fase I y enzimas de biotransformación fase II (Gagne et al. 2006 y Hoeger et al. 2005). La inmunosupresión puede llevar al aumento de la susceptibilidad a enfermedades y la alteración metabólica puede conducir a la acumulación de contaminantes tóxicos ó a la producción de metabolitos reactivos pudiendo llevar a la muerte de los organismos (Filby et al. 2007 y Liney et al. 2006). En peces como en otros vertebrados los sistemas inmune y endocrino están interrelacionados y los cambios endocrinológicos en peces pueden ser reflejados en cambios en el funcionamiento de las funciones del sistema inmune (Salo et al. 2007).

Estudios se han focalizado en los efectos de los efluentes de PTAS sobre el sistema inmune de peces tanto *in-vivo* como *in-vitro*; reducción de número de linfocitos circulantes en *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* (Narnaware y Baker 1996), decaimiento de producción de anticuerpos y células productoras de anticuerpos en *O. mykiss* (Anderson et al. 1982). El uso de parámetros hematológicos en teleósteos como indicadores de los cambios fisiológicos y bioquímicos producidos por distintos factores, se sustenta en su sensibilidad para determinar los efectos a exposiciones agudas y crónicas de distintos factores (contaminación, estrés, patógenos entre otros), evaluando la relación de los parámetros hematológicos con la función respiratoria a través de la serie roja (eritrocitos) y con los mecanismos defensivos por

medio del estudio de la serie blanca (leucocitos) (Harder 1975).

Se ha correlacionado la exposición a efluentes de PTAS con alteraciones en los niveles de hormonas esteroides en adultos y peces juveniles (Folmar et al. 1996 y Hecker et al. 2002), el desarrollo gonadal alterada en adultos y juveniles (Hemming et al. 2001 y Jobling et al. 2002). Estos efectos se han asociado con la presencia de contaminantes químicos en los efluentes que actúan como agonistas del receptor de estrógeno, incluyendo los esteroides naturales y sintéticos (Desbrow et al. 1998 y Routledge et al. 1998), de alquilfenoles polietoxilados (Gimeno et al. 1997 y Gronen et al. 1999) y los ftalatos y pesticidas (Ankley et al. 2001 y Christiansen et al. 2000).

La evaluación de un ecosistema acuático mediante un biomonitoreo, contempla un uso sistemático de bioindicadores a distintos niveles de complejidad, para evaluar cambios en el ambiente y ayudar a comprender las interacciones entre los contaminantes y el hábitat circundante. El uso de peces como bioindicadores de la calidad del ecosistema acuático se fundamenta en que representan un recurso visible desde el punto de vista económico y recreacional. Además de integrar condiciones ambientales, son útiles para establecer relaciones causales entre agentes estresores y efectos en distintos niveles de organización biológica. Las ventajas de usar peces como organismos modelo incluyen la facilidad de uso en acuario, ya que pueden ser manipulados en laboratorio y expuestos a químicos tóxicos, respondiendo de una manera similar a los altos vertebrados (Alsabti & Metcalfe 1995). En los peces, al igual que en los mamíferos, se ha visto una íntima comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune, esta comunicación es fundamental para poder responder de manera coordinada y eficaz a las situaciones de estrés (Tort et al. 1998).

Los biomarcadores son herramientas útiles en el biomonitoreo, ya que nos permiten evaluar los impactos de los compuestos sobre la salud de los organismos (Busch et al. 2004). En 1987, el Committee on Biological Markers of the National Research Council (NCR), definió el término biomarcador como señales indicadoras en sistemas biológicos o muestras expuestas a químicos (Schlenk 1999). Van Der Oost et al.

(2003) define biomarcador como un cambio en la respuesta biológica la cual puede ser ocasionada por la exposición y/o efectos tóxicos de químicos ambientales. Los biomarcadores se agrupan en 3 categorías: biomarcadores de exposición, efecto y de susceptibilidad. Según distintos autores, los biomarcadores deben presentar ciertas características: (a) ser baratos, fáciles de usar, con metodologías no destructivas y que faciliten el biomonitorio ambiental (Fossi & Marsili 1997), (b) respuestas de los biomarcadores deben ser sensibles a la exposición/efecto de los xenobióticos y servir como una herramienta de alerta temprana (Wu et al. 2005), (c) la biología y fisiología de los organismos seleccionados debe ser bien conocida para minimizar la variabilidad de las respuestas de los biomarcadores (ej. edad, sexo, estado reproductivo) (Pampanin et al. 2005) y (d) las relaciones entre las respuestas biológicas usadas como biomarcadores y la exposición a los xenobióticos deben estar bien definida, así como las relaciones entre las respuestas de los biomarcadores y los impactos en los organismos deben ser claros (Flammarion et al. 2002).

Este estudio pretende evaluar los efectos del efluente de plantas de tratamiento de aguas servidas sobre peces (*O. mykiss*) en experimentos de laboratorio (bioensayos) y experimentos en terreno. Para esto se realizará una evaluación de biomarcadores que hayan sido utilizados en monitoreos de ecosistemas acuáticos expuestos a efluentes (capítulo II). Además se analizará el efluente de planta de tratamiento de aguas servidas para identificar contaminantes emergentes como potenciales agentes que producen efectos sobre *O. mykiss* (capítulo III) y finalmente se compararán los efectos del efluente de planta de tratamiento de aguas servidas entre experimentos de laboratorio y terreno (capítulo IV).

Referencias

- Alsabti, K. & Metcalfe, C. D. (1995). Fish Micronuclei for Assessing Genotoxicity in Water. *Mutation Research-Genetic Toxicology* 343: 121-135.
- Ankley, G.,T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J. & Makynen, E.A. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20, 1276–1290.
- Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*; 22, 1015-1051.
- Brooks, B.W., Huggett, D.B. & Boxall, A.B.A. (2009). Pharmaceuticals and personal care products: research needs for the next decade. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2469–2472.
- Busch, C. R., Heath, D. D. & Hubberstey, A. (2004). Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Gene* 329, 1-10.
- Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. (2000). In vivo comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ Toxicol Chem* 19,1867–1874.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. & Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32; 1549–1558.
- ESSBIO. (2014). Wastewater treatment. The Biobio Sanitary Services Company. Biobio region, Chile.
https://www.essbio.cl/nosotros/nosotros_tratamiento_de_aguas_servidas.php. Accessed 15 July 2014.
- Filby, A. L., Neuparth, T., Thorpe, K. L., Owen, R., Galloway, T. S. & Tyler, C. R. (2007). Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. *Environmental Health Perspectives* 115,1704-1710.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P. & Garric, J. (2002). Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 145-153.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., et al. (1996).

- Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104, 1096–1101.
- Fossi, M. C. & Marsili, L. (1997). The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals. *Biomarkers* 2, 205-216.
- Gagne, F., Blaise, C. & Andre, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 329-336.
- Gimeno, S., Komen, H., Venderbosch, P.W.M. & Bowmer, T. (1997). Disruption of sexual differentiation in genetic male common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to an alkylphenol during different life stages. *Environ Sci Technol* 31, 2884–2890.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D. & Brouwer, M. (1999). Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ Health Perspect* 107, 385–390.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., et al. (2002). Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod.* 66, 272–281.
- Hecker, M., Tyler, C.R., Hoffmann, M., Maddix, S. & Karbe, L. (2002). Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environ Sci Technol* 36, 2311–2321.
- Hemming, J.M., Waller, W.T., Chow, M.C., Denslow, N.D. & Venables, B. (2001). Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas rafinesque*, 1820). *Environ Toxicol Chem* 20, 2268–2275.
- Hoeger, B., Hitzfeld, B., Kollner, B., Dietrich, D.R. & Vanden-Heuvel, M.R. (2005). Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquat. Toxicol.* 73, 79–90.
- Karrasch, B., Parra, O., Cid, H., Mehrens, M., Pacheco, P., Urrutia, R., Valdovinos, C., & Zaror, C. (2006). Effects of pulp and paper mill effluents on the microplankton and

- microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. *Science of the Total Environment*; 359, 194-208.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J. & Barceló, D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progesterones and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*; 358, 112-123.
- Liney, K. E., Hagger, J. A., Tyler, C. R., Depledge, M. H., Galloway, T. S. & Jobling, S. (2006). Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives* 114, 81-89.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656-666.
- Ministry of the Secretary-General of the President. Supreme Decree N° 90. (2001). Emission rules for the regulation of contaminants associated with the discharge of residual liquids to marine and continental surface waters, Chile. <http://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=182637>. Accessed 15 July 2014.
- Narnaware, Y. K. & Baker, B. I. (1996). Evidence that cortisol may protect against the immediate effects of stress on circulating leukocytes in the trout. *General and Comparative Endocrinology* 103, 359-366.
- Nuñez, E. (2010). Water pollution in the region of Maule and Biobío. *Interamerican Journal of Environment and Tourism*; 6, 61-68.
- Oakes, K. D., McMaster, M. E. & Van Der Kraak, G. J. (2004). Oxidative stress responses in longnose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. *Aquatic Toxicology* 67, 255-271.
- Pampanin, D. M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G. & Nasci, C. (2005). Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). *Environmental Pollution* 136, 103-107.
- Parra, O., & Faranda, F. (1993). Assessment of water quality, and riverine and limnetic system ecology of the Biobio river system. Concepcion, Chile: *University of Concepcion*

- Parra, O., Valdovinos, C., Habit, E., & Figueroa, R. (2004). Water quality monitoring programme for the Biobio river system. Technical report, Eula-Chile Environmental Science Centre. Concepcion, Chile: *University of Concepcion*.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. & Sumpter JP. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 32, 1559–1565.
- Sepulveda, M.S, Gallagher, E.P, Wieser, C.M. & Gross, T.S. (2004). Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 431-440.
- Schlenk, D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin* 39, 48-53.
- Sturve, J., Almroth, B.C. & Forlin, L. (2008). Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 70, 446-452.
- Svenson, A., Orn, S., Allard, A.S. Viktor, T., Parkkonen, J., Olsson, P.E., Forlin, L. & Norregren, L. (2002). Estrogenicity of domestic and industrial effluents in Sweden. *Aquatic. Ecosyst. Health Manage* 5, 423-434.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., & Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environmental*, 225, 81-90.
- Tort, L., Rotllant, J. & Rovira, L. (1998). Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* 120, 175-179.
- Van der Oost R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Wu, R. S. S., Siu, W. H. L. & Shin, P. K. S. (2005). Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 51, 623-634.
- Yeom, D. H., Lee, S. A., Kang, G. S., Seo, J. & Lee, S. K. 2007. Stressor identification

and health assessment of fish exposed to wastewater effluents in Miho Stream, South Korea. *Chemosphere* 67, 2282-2292.



HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los compuestos químicos (fármacos, productos de cuidado personal entre otros) presentes en efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas causan efectos de estrés oxidativo, alteraciones reproductivas e inmunes en individuos juveniles de *Oncorhynchus mykiss*. Esto es evidenciado en experimentos en condiciones de laboratorio y terreno. Las respuestas medidas en individuos juveniles de *O. mykiss* en ciudades con mayor número de habitantes presentan valores mayores comparado con ciudades con menor número de habitantes.

Para esta hipótesis, se analizarán los efluentes de dos ciudades: Sta. Bárbara, con ~ 14.000 habitantes y Los Ángeles, con ~ 180.000 habitantes.

Hipótesis Específica 1:

La exposición crónica a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas induce la actividad de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa (GST) y la actividad EROD en tejido hepático de individuos juveniles de *O. mykiss*.

Hipótesis Específica 2:

La exposición crónica a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas disminuye la concentración de linfocitos y aumenta el hematocrito en sangre de individuos juveniles de *O. mykiss*.

Hipótesis Específica 3:

Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas alteran la fisiología reproductiva en individuos juveniles de *O. mykiss*, inhibiendo el crecimiento gonadal, produciendo alteraciones en el grado de desarrollo gonádico y disminuyendo las concentraciones de hormonas esteroides circulantes.

Hipótesis Específica 4:

Respuestas medidas en individuos juveniles de *O. mykiss* para el efluente de la ciudad Los Angeles presenta valores mayores que lo evidenciado para la ciudad Sta. Barbara.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos a la exposición crónica a efluentes de PTAS en individuos juveniles de *Oncorhynchus mykiss* en bioensayos de laboratorio y condiciones de terreno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1:

Identificar mediante un screening el o los principal(es) agente(s) que potencialmente causa(n) efectos de estrés, alteraciones reproductivas e inmunes en individuos juveniles de *O. mykiss*.

Objetivo específico 2:

Evaluar la inducción de la actividad EROD en tejido hepático de individuos juveniles de *O. mykiss*.

Objetivo específico 3:

Evaluar estrés oxidativo a través de la medición de la actividad de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa en tejido hepático de individuos juveniles de *O. mykiss*.

Objetivo específico 4:

Evaluar alteraciones inmunes mediante la determinación de hematocrito y recuento de linfocitos en sangre de individuos juveniles de *O. mykiss*.

Objetivo específico 5:

Evaluar alteraciones reproductivas mediante la determinación de grado de desarrollo gonadal, histología y producción de hormonas circulantes en gónadas de individuos juveniles de *O. mykiss*.

Objetivo específico 6:

Evaluar comparativamente las respuestas obtenidas en la experimentación en terreno versus lo observado durante los bioensayos de laboratorio utilizando como modelo biológico a *O. mykiss*.



Capítulo II: HERRAMIENTAS DE MONITOREO AMBIENTAL DE EFLUENTES



Health status of native fish (*Percilia gillissi* and *Trichomycterus areolatus*) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile

Gustavo Chiang,^{1*} Marck E. McMaster,² Roberto Urrutia,¹ M. Fernanda Saavedra,¹ J. Francisco Gavilán,³ Felipe Tucca,¹ Ricardo Barra,¹ and Kelly R. Munkittrick.⁴

¹EULA–Chile Environmental Sciences Centre, University of Concepción, Concepción, Chile

²Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada

³Department of Cellular Biology, University of Concepción, Chile

⁴Canadian Rivers Institute and Department of Biology, University of New Brunswick, Saint John, New Brunswick, Canada

Chiang G, McMaster M, Urrutia R, Saavedra MF, Gavilan JF, Tucca F, Barra R. (published). Health status of native fish (Percilia gillissi and Trichomycterus areolatus) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile. Environmental Toxicology 30 (8): 1793-1809, 2011.

Abstract

Few data exist on the possible effects of pulp and paper effluent discharge on native fish populations in the Southern Hemisphere, relative to the research done in the Northern Hemisphere. The present research examined two native fish species (*Trichomycterus areolatus* and *Percilia gillissi*) for effects at both the molecular and individual level due to the discharge of effluent from a tertiary treated elemental chlorine-free pulp mill into a fluvial system in Central Chile over three seasons (February 2007, October 2007, January 2008). Different responses were observed between species and between sexes. There was an increase in the production of gonadal 17 β -estradiol in the females of both species but a drop in 11-ketotestosterone production in *P. gillissi* males. Female gonadal size was increased, especially during

the summer period, with corresponding increases the frequency of advanced oocyte development, and in the oocyte diameter in both species. Hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was elevated for both species downstream of the discharge point, although overall it was higher in *P. gillissi* than *T. areolatus*. Decreases in the frequency of smaller sized fish for both species, as well as a drop in the size of the adults downstream of the discharge point, were observed. The present study is the first evidence of endocrine disruption in native freshwater fish associated with modern pulp mills in South America. This study establishes possible links in the reproductive alterations observed at the subindividual and individual levels that could explain the changes observed at the population level.

Keywords: Native fish, pulp mill effluent, tertiary treatment, Chile, altered reproduction

Introduction

The use of sentinel species provides useful information on aquatic health status and the responses or adverse effects observed in individuals under anthropogenic stressors (1). These adverse effects at the individual level may not be associated with alterations in the structure of populations or communities in the aquatic environment (2) due to the dynamics of complex exposure and biological responses in the field (3). Fish characteristics are a reflection of the energy flow through the ecosystem, reflecting factors or characteristics of the sampling sites (4). Consequently, the introduction of a stressor (chemical or physical) that produces changes outside of the natural variation of these biological responses can produce an impact on the health of the environment (5).

Sentinel species have shown a series of alterations at the individual level, such as reduced gonads, diminished fecundity with female age, reduction of secondary sexual characteristics in males, and alteration in reproductive hormones in association with exposure to industrial effluents, such as those from some pulp and paper mills in North America (6–11). While these changes associated with pulp mill exposure have

predominantly been androgenic or antiestrogenic, fish responses to Chilean effluents have been associated with increases in gonadal size, induction of maturation, and estrogenicity in juvenile fish (12–14). Studies in North America have followed changes in performance as production processes have improved and primary/secondary effluent treatments have been implemented (15). Some improvement has occurred in reductions in steroid hormones and the alterations in age to maturity as well as the induction of mixed function oxygenase (MFO) activity (13,15–17) but some whole organism changes are still being observed (18) in the Northern Hemisphere.

Recent construction of large pulp mills in Brazil, Uruguay, and Chile have used more modern technology than that commonly used in North American mills. In Chile, evaluations of the effects of cellulose effluents on aquatic species are scarce. Orrego et al. (13,14) evaluated the effect of pulp and paper mill effluent discharges to the Biobío River on an exotic species the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), in the laboratory or caged in the receiving environment. The use of native species as environmental health sentinels for water bodies receiving pulp and paper mill effluents in Chile has yet to be evaluated in these fluvial systems, and only limited historical data for these species are available (19). These data can establish if the community is intact, but it cannot provide information in the medium/short term, which is required to mitigate possible alterations if observed.

The present study evaluates whether pulp mill effluent discharges from a modern bleached kraft mill is associated with impacts on the native ichthyofauna of fluvial systems in central Chile. The study used a longitudinal gradient design and evaluated the metabolic and reproductive responses in two native species: *Trichomycterus areolatus* and *Percilia gillissi*. These species are representative of the fluvial fish population in central Chile.

Material and methods

Study area: The study area is located in the Itata River Basin in central Chile, which has an area of 11,200 km² (36812' to 37816' S, 71 00' to 73 10' W), a length of 140 Km, an elevation drop of approximately 1,400 m, and a discharge that ranges from >750 m³/s in winter to <20 m³/s in summer [20]. A large forestry complex at Nueva Aldea, located approximately 52 Km from the river's mouth, began producing pulp in August 2006. The industrial complex includes a large pulp mill (2,500 tons daily) with two parallel lines for eucalyptus and pine processing, and a fiberboard plant (575 m³ per day). The mill produces elemental chlorine-free kraft pulp; all effluent receives primary treatment reducing suspended solids, secondary treatment via extended aerated activated sludge and tertiary treatment with aluminum sulfate before discharge. The expected maximum daily discharge of effluent is 97,500 m³/d. To assess the status of wild fish populations, seven sampling sites were selected. Three sites were located upstream from the new industrial complex, including two locations on the Itata River, upstream from the confluence with the Ñuble River (S1: 36°42'0 17,21'' S 72°26' 47,04'' W; S2: 36°41'40,13'' S 72°26' 47,04'' W; Fig. 1), and one site on the Ñuble River (S3: 36°38' 30,00'' S, 72°27' 12,64'' W). Another site was located downstream on the Velenunque Stream, a small stream that discharges into the Itata River and crosses the pulp mill plant property (S4: 36°38'01,39''S, 72°28' 28,88'' W); and three sites downstream of the effluent discharge (S5: 36°37' 27,86''S, 72°29' 21,65''W; S6: 36°37' 17,86''S, 72°29'46,05''W; and S7: 36°36' 38,3'' S 72°3' 56,59'' W) (Fig. 1).

Fish capture and sampling: The health status of wild fish was assessed during three seasons (February 2007, October 2008, and January 2008), evaluating the responses of fish during the worst possible environmental scenario (low flow, higher effluent concentration in summer), and during the prespawning season. Fish were collected, focusing on adult *P. gillissi* and *T. areolatus*. The fish were captured at sites with similar microhabitat characteristics using a backpack electrofishing unit (Halltech Electrofisher) and a block seine (6 mm mesh) in riffles (0.2–0.3 m/s, 0.2–0.4 m depth) with a boulder-cobble bedrock (15 cm diameter) and/or shallow riffles (0.1–0.2 m/s,

0.1–0.4 m depth) with a cobble (15 cm diameter) and stone bedrock. All fish were identified, measured for length (0.1 mm) and weight (0.01 g), and most were released back to the river. Due to the lack of secondary sexual characteristics for both species, a maximum of 30 adult fish were selected at each site, with sizes greater than 55 mm (*T. areolatus*) and 40 mm (*P. gillissi*) based on previous detailed studies (Chiang et al. [21]). The selected fish were sacrificed by spinal severance, measured for total length and total weight, and livers and gonads removed and weighed (0.0001 g). Population size structure was assessed by separating, when possible, the smaller fish (young of the year [YOY]) from the adult fish, according to previous data [21]. For descriptive purposes, physiological condition indices, such as condition factor (k : $100 \text{ weight(g)}/\text{length}^3(\text{cm})$), gonadosomatic index (GSI: $100 \text{ gonad weight(g)}/\text{total weight(g)}$), and liversomatic index (LSI: $100 \text{ liver weight(g)}/\text{total weight(g)}$) were calculated.

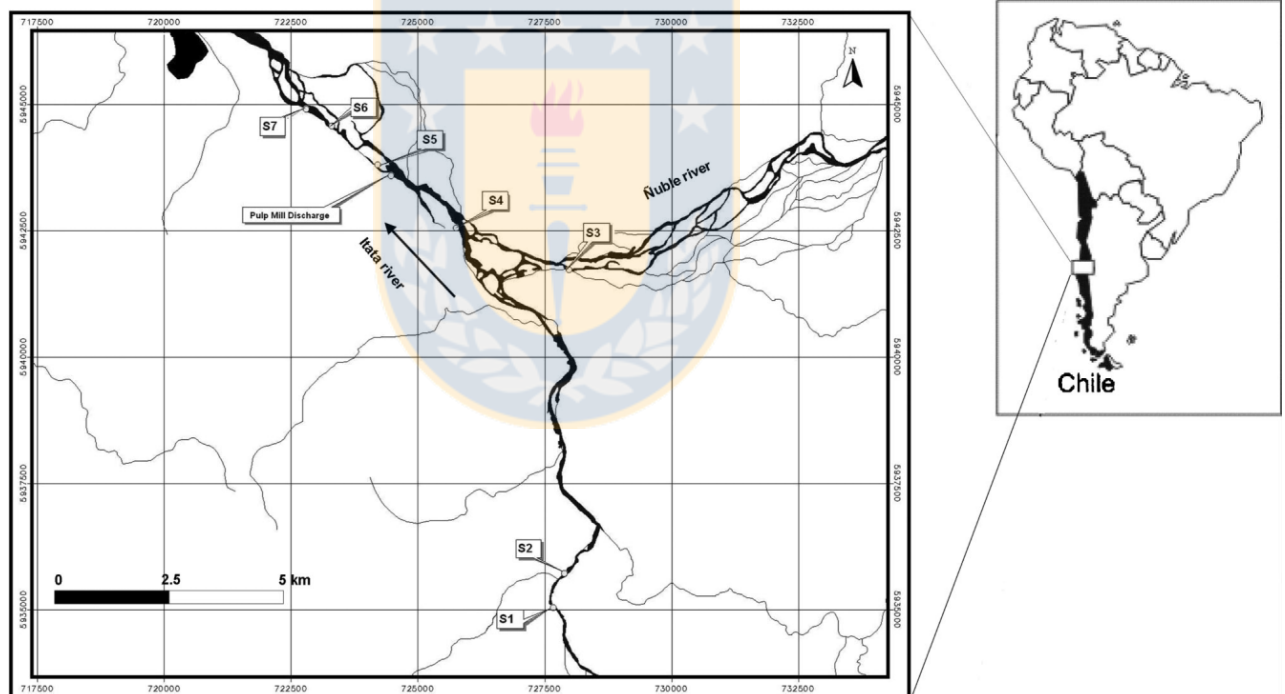


Figure 1. Sampling sites in Itata basin for collection of *Trichomycterus areolatus* and *Percilia gillissi*, upstream of the effluent discharge (S1–S3), downstream Velenunque Stream (S4) and downstream pulp mill discharge (S5–S7).

In vitro sex steroid production

Sex steroid production was analyzed according to the protocol of McMaster *et al.* [22]. A subsample of the gonad (12–30 mg) was kept in M199 medium at 48°C (<6 h) for subsequent in vitro culture for the production of sex steroids in 24-well plates (Falcon 3047, Fisher Scientific, Canada). The tissues were incubated for 24 h at 16°C; M199 contained Hank's salts without bicarbonate (Gibco, Canada) complemented with 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 4.0 mM sodium bicarbonate, 0.01% streptomycin sulfate, and 0.1% bovine serum albumin (pH 7.4). After incubation, the supernatant was drawn off and kept at 80°C until analysis. The steroids (testosterone for both sexes, 17 β -estradiol for females, and 11-ketotestosterone [11KT] for males) were quantified in the laboratories of the National Water Research Institute (Burlington, ON, Canada), using a radio-immunoassay procedure according to a standardized protocol [22].

EROD activity

The EROD activity was analyzed according to the Lubert *et al.* [23] protocol in the floating postmitochondrial supernatant (fraction S9) obtained from livers homogenized in a sucrose buffer (0.1 M, pH 7.5) and centrifuged at 9,000g for 20 min at 4°C. Fluorimetric analyses were performed using an LS 50B spectrofluorometer (PerkinElmer) for 5 min at 25°C; using reduced NAPH as the electron donor. Protein analysis was performed in a microplate reader (Baush & Lomb, DNM, 9602G) using a Biuret microplate method that uses bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) as a reference material. The EROD activity was expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

Gonad histology

After taking the subsample of gonadal tissue for sex steroid production, the remaining female gonadal tissue was fixed in Bouins solution (48 h), then washed in 70% alcohol three times for 15 min. The tissue was subsequently dehydrated with a series of ethanol solutions (70–99%) and chloroform, and then twice infiltrated in liquid

paraffin at 58°C for 2h and embedded in paraffin at room temperature (16°C) for 24 h. The embedded tissue was sectioned (thickness, 7 mm) and stained with a solution of hematoxylin and eosin (0.5%). A total of 10,836 gonad cells were counted (110 cells per fish) and cell and nuclear diameter were measured using a Zeiss Axioplan 2 microscope with a coupled digital camera for photography (Digital Nikon DXM 1200). The proportion of cells in the distinct maturation stages for the different sites along the Itata River were assigned according to a defined scale for *T. areolatus* [24] and *P. gillissi* (M. Quiroz, Department of Cell Biology, Faculty of Biologic and Molecular Sciences, University of Concepción, unpublished data).

Statistical analysis

Due to the nature of the study, analyses examined individual data within sex and species between sites for each of the three sampling seasons. Responses between sites were assessed using an analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$) and confirmed by post-hoc analysis (Tukey) for EROD activity, histological data, and size structure of the population by site, while length and weight data were log transformed prior to analysis. Gonad size, liver size (using body weight as a covariate), and body weight (using body length as a covariate) were log transformed and the differences between sites were analyzed using analysis of covariance (ANCOVA) and confirmed by post-hoc analysis (Tukey). According to Barrett et al. [25], data groups with less than three data points were excluded. In the case of sex steroids and nonnormal data, a nonparametric statistical analysis (Kruskal–Wallis) was used between sites (Minitab®15.1.30.0.).

Results

Physiological indices and population size structure

Percilia gillissi, February 2007. No differences in size or weight of the fish were found for female *P. gillissi* (ANOVA, $p > 0.05$, Table 1), although significant differences in the relationship between gonad weight / total weight were observed at the downstream sites (S5 and S7) (ANCOVA, $p = 0.008$). Smaller fish generally had larger gonads (S5, 70–80% larger and S7 65–76% larger) with respect to the reference sites and the upstream sites (Table 1). The same females also demonstrated significant differences in liver weight (ANCOVA, $p < 0.001$): at S5, they were 20 to 50% larger with respect to the reference sites (S2 and S3), 51% with respect to the upstream site (S4), while the site farthest from the discharge (S7) had livers 26% bigger with respect to the upstream site (S4) (Table 1). Females did not have any significant differences (ANCOVA, $p > 0.05$) in the condition factor because total weight relative to size was quite variable between sites during this season (16 to 14%) (Table 1).

The few males collected during the first summer sampling presented significant differences in gonad and liver size: testes were 144% larger (ANCOVA, $p = 0.009$), and livers 25% larger at S5 with respect to S4 (ANCOVA, $p = 0.028$). No significant difference was found in the condition factor (ANCOVA, $p = 0.641$) (Table 1). In addition, during the first summer sampling the *P. gillissi* populations had abundant adults (>94%) at sites downstream of the discharge with sizes in the range 46 to 60 mm for total length. Young of the year (<38 mm) (10–60% of the sample) and adult individuals (>38 mm) (40–90% of the sample) were both abundant at the reference sites (Fig. 2A). No size differences were observed for the YOY, although the adults from the reference sites (S1–S3) and the upstream site (S4) were statistically smaller in size (ANOVA, $p < 0.001$) with respect to the fish collected downstream (S5–S7).

Table 1. Summary statistics for *Percilia gillissi* captured in the Itata River (Chile), by sex and season.

Date	Sex	Site	Length (mm)	Weight (g)	Condition factor	Gonadosomatic index	Liversomatic index
Feb 2007	Females	S1	50.3 ± 2.9 (7)A	1.86 ± 0.32 (7)A	1.33 ± 0.12 (7)A	1.18 ± 0.17 (7)B	1.34 ± 0.07 (6)BC
		S2	50.4 (2)	1.57 (2)	1.21 (2)	1.25 (2)	1.15 (2)
		S3	47.9 ± 2.5 (5)A	1.37 ± 0.20 (5)A	1.21 ± 0.08 (5)A	1.02 ± 0.22 (5)B	1.05 ± 0.07 (5)BC
		S4	51.4 ± 1.8(11) A	1.71 ± 0.17(11) A	1.22 ± 0.03(11)A	0.89 ± 0.12(11) B	1.03 ± 0.06(11)C
		S5	51.9 ± 0.9(7) A	1.81 ± 0.12(8) A	1.23 ± 0.05(7)A	2.58 ± 0.44(8)*	1.54 ± 0.12(8)A
		S6	45.6 ± 3.4(3) A	1.18 ± 0.28(3) A	1.19 ± 0.08(3)A	1.25 ± 0.66(3) B*	1.19 ± 0.01(3)BC
		S7	51.1 ± 1.3(10) A	1.73 ± 0.14(10)A	1.27 ± 0.03(10)A	2.07 ± 0.73(10) A	1.20 ± 0.08(10)B
	Males	S1	61.0 (2)	2.84 (2)	1.25 (2)	0.44 (2)	1.40 (2)
		S2	—	—	—	—	—
		S3	—	—	—	—	—
		S4	55.3 ± 2.5(8)A	2.16 ± 0.31(8)A	1.22 ± 0.02(8)A	0.24 ± 0.02(8)B	0.86 ± 0.05(8)B
		S5	53.4 ± 2.4(8)A	1.89 ± 0.21(8)A	1.25 ± 0.05(8)A	0.64 ± 0.15(8)A	1.09 ± 0.08(8)A
		S6	51.5 (2)	1.56 (2)	1.14 (2)	0.38 (2)	0.65 (2)
		S7	54.6 (2)	2.15 (2)	1.24 (2)	0.45 (2)	0.67 (2)
Oct 2007	Females	S1	53.4 ± 1.9(12)A	2.20 ± 0.30(12)AB	1.36 ± 0.04(12)A	9.76 ± 1.04(12)A	2.89 ± 0.13(12)AB
		S2	50.9 ± 1.5(12)AB	1.76 ± 0.19(12)AB	1.28 ± 0.03(12)AB	8.98 ± 1.38(12)A	2.44 ± 0.20(12)B
		S3	51.3 ± 1.3(14)A	1.89 ± 0.13(14)AB	1.38 ± 0.04(14)A	11.03 ± 0.52(14)A	3.16 ± 0.13(14)A
		S4	50.7 ± 1.7(15)AB	1.79 ± 0.19(15)AB	1.32 ± 0.03(15)A	8.55 ± 1.01(15)A	2.49 ± 0.09(15)AB
		S5	45.8 ± 0.9(13)BC	1.19 ± 0.08(13)BC	1.19 ± 0.03(13)B	7.53 ± 1.18(13)A	2.19 ± 0.16(13)B
		S6	48.8 ± 1.2(14)ABC	1.42 ± 0.12(14)B	1.19 ± 0.02(14)B	8.59 ± 1.3(14)A	2.41 ± 0.16(14)B
		S7	43.7 ± 1.6(11)C	1.01 ± 0.11(11)BC	1.22 ± 0.02(11)B	7.10 ± 0.35(11)A	2.54 ± 0.13(11)AB
	Males	S1	54.0 ± 1.8(15)A	2.03 ± 0.22(15)A	1.25 ± 0.02(15)A	3.78 ± 0.43(13)BC	1.43 ± 0.07(15)A
		S2	50.0 ± 0.8(14)AB	1.58 ± 0.08(14)AB	1.25 ± 0.02(14)A	2.65 ± 0.32(14)CD	1.54 ± 0.08(14)A
		S3	51.1 ± 2.5 (8)AB	1.76 ± 0.25 (8)AB	1.22 ± 0.03 (8)AB	3.35 ± 0.62 (8)BC	1.43 ± 0.09 (8)A
		S4	49.4 ± 1.0(11)AB	1.50 ± 0.09(11)AB	1.22 ± 0.03(11)AB	4.21 ± 0.37(11)B	1.33 ± 0.09(11)B
		S5	46.3 ± 0.5(5)BC	1.20 ± 0.05(5)BC	1.21 ± 0.028(5)AB	5.44 ± 0.55(5)A	1.38 ± 0.09(5)AB*
		S6	49.0 ± 1.9(8)ABC	1.36 ± 0.20(8)BC	1.10 ± 0.02(8)B	4.28 ± 0.24(8)A	1.42 ± 0.11(8)AB
		S7	41.6 ± 1.1(7)C	0.87 ± 0.08(7)C	1.19 ± 0.07(7)B	1.39 ± 0.51(7)D	1.59 ± 0.14(7)A
Jan 2008	Females	S1	53.6 ± 1.1(17)AB	2.21 ± 0.11(17)A	1.41 ± 0.03(16)A	2.21 ± 0.40(16)B	1.89 ± 0.07(16)A
		S2	55.7 ± 1.1(15)A	2.45 ± 0.16(15)A	1.39 ± 0.03(15)A	3.41 ± 0.43(15)B	1.93 ± 0.11(15)A
		S3	58.1 ± 2.5 (7)A	2.68 ± 0.40 (7)A	1.27 ± 0.02 (7)AB	3.16 ± 0.53(7)B	1.39 ± 0.11 (7)B
		S4	50.3 ± 1.2(18)B	1.65 ± 0.12(18)B	1.25 ± 0.02(18)B	2.50 ± 0.35(18)B	1.42 ± 0.08(18)B
		S5	51.7 ± 1.0(11)AB	1.89 ± 0.12(11)AB	1.35 ± 0.04(11)AB	3.69 ± 0.71(11)*	1.49 ± 0.13(11)B
		S6	51.9 ± 1.1(15)AB	1.92 ± 0.12(15)AB	1.36 ± 0.03(15)AB	4.32 ± 0.43(15)A	1.45 ± 0.06(15)B
		S7	57.7 ± 1.9(13)A	2.24 ± 0.22(13)AB	1.22 ± 0.03(13)A	5.09 ± 0.41(12)A	1.69 ± 0.09(13)B
	Males	S1	55.5 ± 1.1(13)A	2.37 ± 0.12(13)A	1.37 ± 0.05(13)AB	0.56 ± 0.16(13)C	1.28 ± 0.04(12)AB
		S2	55.5 ± 1.4(15)A	2.44 ± 0.18(15)A	1.42 ± 0.03(14)A	0.73 ± 0.12(15)BC	1.26 ± 0.06(15)AB
		S3	55.9 ± 1.1(20)A	2.19 ± 0.14(20)A	1.25 ± 0.02(18)C	1.14 ± 0.11(18)AB	1.16 ± 0.05(18)BC
		S4	54.2 ± 1.6(12)A	2.03 ± 0.17(12)A	1.25 ± 0.03(12)C	0.66 ± 0.11(12)BC	1.04 ± 0.06(12)BC
		S5	53.1 ± 1.3(17)A	2.02 ± 0.14(17)A	1.33 ± 0.02(17)BC	1.14 ± 0.14(15)A	1.38 ± 0.06(14)A
		S6	55.0 ± 1.1(14)A	2.19 ± 0.10(14)A	1.31 ± 0.03(14)BC	1.18 ± 0.11(13)A	1.01 ± 0.05(13)C
		S7	55.6 ± 1.1(14)A	2.13 ± 0.13(14)A	1.21 ± 0.16(14)BC	1.43 ± 0.22(14)A	1.08 ± 0.05(14)C

Values are mean standard error (n), and values sharing uppercase letters are not significantly different between sites within a season and sex (analysis of variance $p < 0.05$; analysis of covariance $p < 0.05$). Values marked with an asterisk (*) present a significant slope difference in the ANCOVA analysis of covariance ($p > 0.05$).

October 2007. The sacrificed individuals of both sexes from downstream sites were statistically shorter and lighter (ANOVA, $p < 0.05$, Table 1) than reference fish. No significant differences in gonadal size were observed for female fish (ANCOVA, $p < 0.05$), although they did have significantly smaller livers (28% at S4 and 26% at S5) (ANCOVA, $p < 0.001$, Table 1). These female fish also have reduced condition factor (between 10 and 14%) at sites S5, S6, and S7 with respect to the reference sites S1

and S3 (ANCOVA, $p = 0.001$) and between 9.6 and 9.8% smaller with respect to the upstream site (S4) (Table 1).

In males, an increase of up to 140% in gonad weight was found for two of the downstream sites (S5–S6) (ANCOVA, $p = 0.002$, Table 1), but S7 gonads were smaller than most other sites. At S5, there were significant differences in the liver/total weight relationship relative to all other sites (ANCOVA, $p < 0.05$); small fish had larger livers (Table 1). Male condition factor was significantly lower (ANCOVA, $p = 0.003$) at the two sites farthest downstream from the discharge: S6 between 13 to 14% and S7 9 to 10% with respect to the reference sites (S1–S3) and S6 had a 11% decrease with respect to the upstream site (S4) (Table 1).

During spring 2007 (October) (Fig. 2B), no YOY were observed at the reference sites (S1–S3), while the YOYs represented 10% abundance at S4 and S5, <7% in S6 and S7 with no observable difference in size (ANOVA, $p = 1.00$). Adult individuals formed most of the population and presented significant differences in size with larger size fish found at the reference sites (S1–S3) with respect to the sites S4, S5, and S6 (ANOVA, $p > 0.001$).

January 2008. During the third sampling, females from the reference sites were the largest and heaviest (Table 1). In addition to these differences, females from S5 (closest downstream to the discharge) had significant interactions in the relationship of gonad weight/total weight (ANCOVA, $p = 0.002$). On average, fish from sites S6 and S7 had larger gonads than upstream reference fish (Table 1). ANCOVA indicated a significant reduction ($p < 0.001$) in liver weight in females from sites S3 to S7 (24 to 28%) relative to S1 and S2 upstream on the Itata River from the discharge (S1–S2) (Table 1). A significant reduction ($p < 0.001$) in female condition factor was found downstream of Velenunque stream at S4 (12%) with respect to S1 and S2.

Males had significant increases ($p < 0.001$) in gonad size at sites S3 (37–128%), S5 (20–101%), S6 (46–144%), and S7 (61–169%) with respect to the two reference sites (S1–S2) and the upstream site (S4) (Table 1). Furthermore, the site closest to the

discharge point (S5) had a significant increase ($p < 0.001$) in liver size (19 and 38%) with respect to one reference site (S3) and to the upstream site (S4), while the sites farthest downstream from the discharge (S6 and S7) had smaller livers ($p < 0.001$), between 6 to 23% smaller with respect to two reference sites (S1–S2) (Table 1). The condition factor was between 8 to 14% lower ($p < 0.001$) for all the sites downstream of S2 with respect to the reference site S2. Generally, condition factor was lower downstream (Table 1).

Greater abundance of small individuals occurred at the sites closest to the discharge, representing 47% (S4) and 32% (S5), compared with the upstream (<14%) and furthest downstream (3%) sites (Fig. 2C). The size of the YOY at S4 and S5 was not significantly different from the fish collected at the reference sites ($p > 0.36$). No significant difference was observed ($p = 0.455$) for adult fish size between the reference sites and S5, but they were significantly longer relative to S4 and S6 ($p = 0.009$).

Trichomycterus areolatus, February 2007. Females did not show differences in size or weight (ANOVA, $p > 0.05$), although significant increases in gonad size were observed ($p = 0.006$) downstream with increases of 18 to 41% (S5), 25–54% (S6), and 20–48% (S7) with respect to the reference (S1–S3) and the upstream (S4) sites (Table 2). Generally, liver size was increased in females downstream of the discharge; however, only site S5 was significant ($p < 0.001$) (Table 2). The condition factor in females was variable, with few consistent site differences.

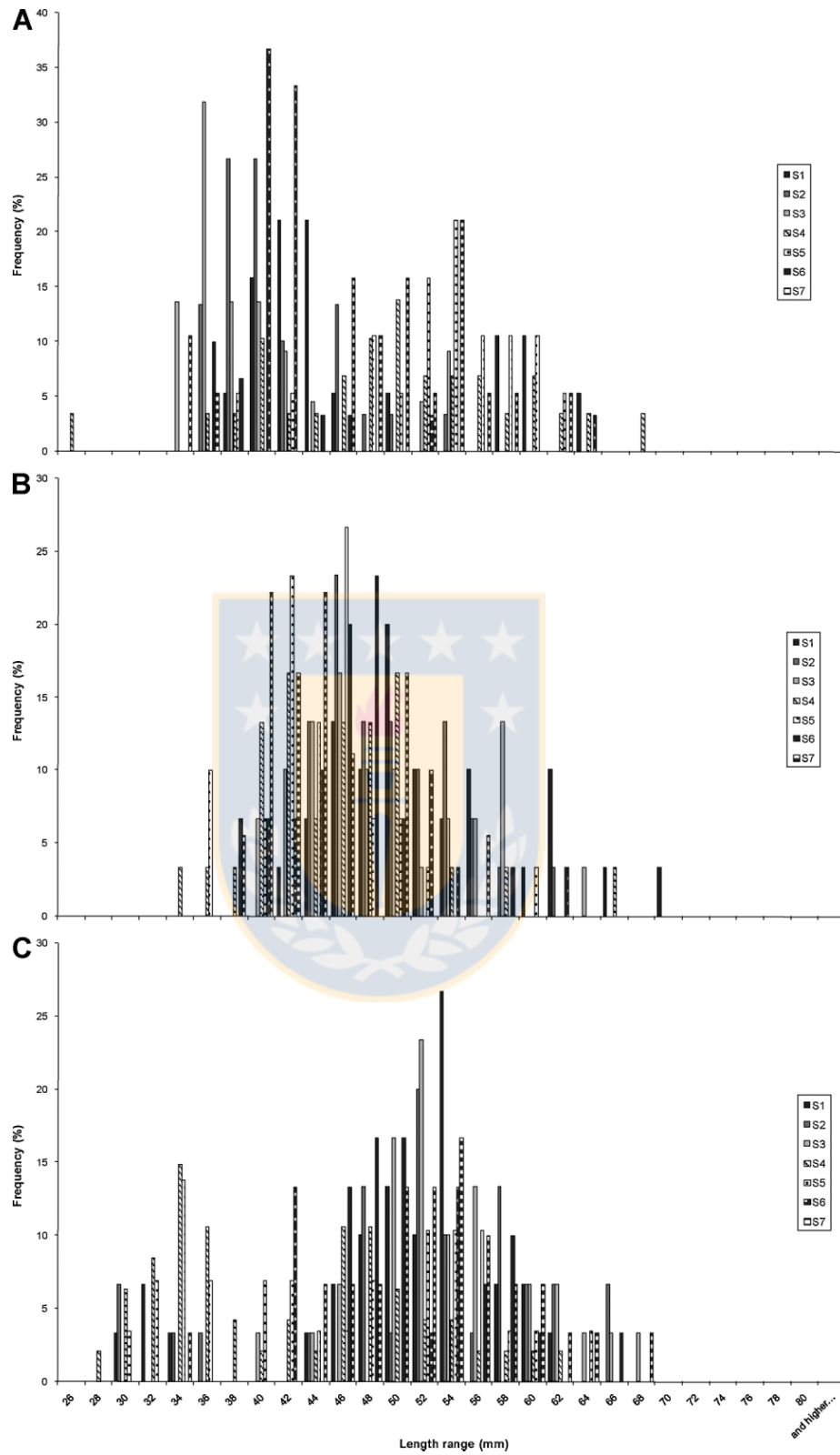


Figure 2. Size distribution for *Percilia gillissi* in the seven sites sampled, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007, and (C) January 2008.

Males were smaller at S5 and had reduced weights at S3 and S5 ($p < 0.05$, Table 2). No statistical differences were observed in testis weight ($p = 0.442$), even though site differences of up to 20% were observed (Table 2). Liver weights were similar between sites except for site S5, which had a significant interaction of the relationship between liver weight and body weight from the other sites ($p = 0.004$) (Table 2). The only difference in male condition factor was that reference site S1 had increased condition relative to the other three upstream sites ($p < 0.001$, Table 2).

Table 2. Summary statistics for *Trichomycterus areolatus* captured in the Itata River (Chile), by sex and season.

Date	Sex	Site	Length (mm)	Weight (g)	Condition	Gonadosomatic index	Liversomatic index
Feb 2007	Females	S1	67.3 ± 0.17(12)A	1.93 ± 0.14(12)A	0.62 ± 0.03(12)A	1.10 ± 0.12(11)B	0.76 ± 0.05(12)B
		S2	64.9 ± 0.20(18)A	1.63 ± 0.16(18)A	0.57 ± 0.01(18)AB	0.94 ± 0.09(18)B	0.69 ± 0.05(18)B
		S3	66.2 ± 0.14(14)A	1.58 ± 0.10(14)A	0.54 ± 0.01(14)B	1.06 ± 0.11(14)B	0.58 ± 0.05(14)BC
		S4	64.4 ± 1.3(18)A	1.51 ± 0.09(18)A	0.56 ± 0.01(18)AB	1.09 ± 0.09(18)B	0.65 ± 0.03(18)B
		S5	62.9 ± 1.5(16)A	1.57 ± 0.12(16)A	0.61 ± 0.02(16)A	1.57 ± 0.44(16)A	0.85 ± 0.04(16)A
		S6	66.1 ± 1.3(13)A	1.69 ± 0.09(13)A	0.58 ± 0.01(13)AB	1.57 ± 0.22(13)A	0.82 ± 0.07(13)B
		S7	66.9 ± 1.7(17)A	1.69 ± 0.14(17)A	0.55 ± 0.01(17)AB	1.84 ± 0.65(17)A	0.81 ± 0.06(17)B
	Males	S1	69.4 ± 0.19(18)A	2.16 ± 0.17(18)A	0.63 ± 0.02(18)A	1.29 ± 0.08(18)A	0.62 ± 0.03(16)A
		S2	64.8 ± 0.21(12)AB	1.55 ± 0.14(12)B	0.56 ± 0.01(12)B	1.10 ± 0.09(12)A	0.53 ± 0.05(12)A
		S3	70.3 ± 0.18(13)A	1.95 ± 0.10(14)AB	0.55 ± 0.02(12)B	1.16 ± 0.12(13)A	0.46 ± 0.03(13)A
		S4	69.3 ± 3.5(12)A	2.02 ± 0.35(12)AB	0.57 ± 0.01(12)B	1.23 ± 0.10(12)A	0.55 ± 0.03(12)A
		S5	60.8 ± 1.8(14)B	1.45 ± 0.11(14)B	0.64 ± 0.02(14)AB	1.35 ± 0.11(14)A	0.67 ± 0.02(14)*
		S6	68.8 ± 1.9(11)A	1.89 ± 0.11(11)AB	0.58 ± 0.03(11)AB	1.24 ± 0.09(11)A	0.71 ± 0.06(11)A
		S7	64.3 ± 1.5(13)AB	1.61 ± 0.13(13)AB	0.58 ± 0.02(13)AB	1.13 ± 0.07(13)A	0.75 ± 0.04(13)A
Oct 2007	Females	S1	76.5 ± 0.13(24)A	3.61 ± 0.11(24)A	0.80 ± 0.02(21)A	16.81 ± 1.36(17)A	2.59 ± 0.10(23)A
		S2	72.4 ± 0.14(20)AB	2.96 ± 0.16(19)B	0.76 ± 0.04(20)A	11.79 ± 1.29(17)B	1.83 ± 0.10(17)BC
		S3	67.7 ± 0.14(21)BC	2.25 ± 0.11(21)C	0.72 ± 0.02(19)BC	10.09 ± 1.39(14)B	2.31 ± 0.13(19)AB
		S4	66.6 ± 1.1(19)C	2.54 ± 0.19(19)BC	0.81 ± 0.02(18)AB	11.38 ± 1.47(18)B	1.75 ± 0.07(19)C
		S5	69.9 ± 1.1(17)BC	2.47 ± 0.13(17)BC	0.68 ± 0.02(15)C	12.43 ± 1.65(17)*	2.23 ± 0.09(17)A
		S6	69.1 ± 2.6(13)BC	2.59 ± 0.22(13)BC	0.79 ± 0.05(13)BC	14.29 ± 2.11(13)AB	2.02 ± 0.14(13)BC
		S7	72.4 ± 1.4(15)ABC	2.86 ± 0.17(15)B	0.75 ± 0.02(15)BC	15.57 ± 1.29(15)AB	1.93 ± 0.15(15)BC
	Males	S1	78.7 ± 0.41 (7)A	3.72 ± 0.37 (7)A	0.73 ± 0.04(7)A	1.11 ± 0.07 (7)A	0.95 ± 0.05(7)A
		S2	70.5 ± 0.19 (9)A	2.61 ± 0.26 (9)A	0.73 ± 0.02(9)A	0.77 ± 0.07 (8)A	1.01 ± 0.08(9)A
		S3	68.8 ± 0.22 (9)A	2.29 ± 0.21 (9)A	0.69 ± 0.02(9)A	0.88 ± 0.06 (9)A	1.08 ± 0.08(8)A
		S4	71.8 ± 1.9(10)A	2.63 ± 0.29(10)A	0.68 ± 0.03(10)A	0.93 ± 0.07(9)A	1.01 ± 0.07(9)A
		S5	71.4 ± 1.2(12)A	2.56 ± 0.19(12)A	0.66 ± 0.02(11)A	0.94 ± 0.09(11)A	0.79 ± 0.05(12)B
		S6	69.7 ± 2.4(14)A	2.58 ± 0.27(14)A	0.73 ± 0.02(14)A	0.86 ± 0.07(14)A	1.01 ± 0.06(14)AB
		S7	76.7 ± 3.6(11)A	3.19 ± 0.49(11)A	0.67 ± 0.02(11)A	0.96 ± 0.06(11)A	1.02 ± 0.05(11)AB
Jan 2008	Females	S1	76.9 ± 0.18(15)A	2.94 ± 0.25(15)A	0.62 ± 0.01(14)A	1.37 ± 0.13(13)B	1.03 ± 0.13(15)AB
		S2	76.7 ± 0.17(18)AB	2.71 ± 0.19(18)A	0.60 ± 0.02(17)A	1.49 ± 0.20(17)B	0.93 ± 0.06(17)AB
		S3	71.3 ± 0.20(11)ABC	2.13 ± 0.20(11)AB	0.57 ± 0.02(11)A	1.11 ± 0.10(10)B	0.87 ± 0.08(11)AB
		S4	66.2 ± 0.9(16)C	1.79 ± 0.07(16)B	0.60 ± 0.01(15)A	1.05 ± 0.06(15)B	0.72 ± 0.05(16)B
		S5	69.6 ± 1.4(11)ABC	2.08 ± 0.10(11)AB	0.62 ± 0.02(11)A	1.95 ± 0.37(10)A	0.97 ± 0.04(11)A
		S6	69.8 ± 1.5(16)BC	2.02 ± 0.11(16)B	0.58 ± 0.02(16)A	1.45 ± 0.15(16)B	0.99 ± 0.05(16)A
		S7	71.8 ± 1.7(14)ABC	2.15 ± 0.16(14)AB	0.57 ± 0.02(14)A	1.30 ± 0.14(14)B	0.86 ± 0.05(14)AB
	Males	S1	71.8 ± 0.09(15)AB	2.38 ± 0.07(15)AB	0.64 ± 0.01(14)A	1.22 ± 0.08(14)A	0.71 ± 0.04(14)A
		S2	78.2 ± 0.32(12)A	2.96 ± 0.31(12)A	0.59 ± 0.02(11)AB	1.30 ± 0.09(11)A	0.74 ± 0.07(12)A
		S3	74.2 ± 0.15(19) AB	2.54 ± 0.15(19) AB	0.59 ± 0.02(17)AB	1.17 ± 0.07(18)A	0.67 ± 0.03(17)A
		S4	67.8 ± 1.8(10)B	2.00 ± 0.14(10)B	0.64 ± 0.03(10)AB	1.39 ± 0.09(10)A	0.65 ± 0.05(10)A
		S5	73.5 ± 1.3(18) AB	2.39 ± 0.11(18) AB	0.60 ± 0.01(18)AB	1.25 ± 0.08(16)A	0.68 ± 0.03(16)A
		S6	72.4 ± 1.6(9) AB	2.27 ± 0.18(9) AB	0.59 ± 0.02(9)AB	1.45 ± 0.12(9)A	0.58 ± 0.03(8)A
		S7	75.4 ± 2.8(10) AB	2.45 ± 0.27(10) AB	0.56 ± 0.01(10)B	1.43 ± 0.08(9)A	0.64 ± 0.07(10)A

Values are mean standard error (n), and values sharing uppercase letters are not significantly different between sites within a season and sex (analysis of variance $p < 0.05$; analysis of covariance $p < 0.05$). Values marked with an asterisk (*) present a significant slope difference in the analysis of covariance ($p > 0.05$).

During February 2007, no YOY (<50 mm) of *T. areolatus* were observed at the sampling sites; adult fish represented 100% of the captured populations (Fig. 3A). Among the adults, significant differences were observed, as reference fish were significantly larger than those from the two downstream sites closest to the discharge (S5 and S6) ($p = 0.012$).

October 2007. Smaller females were found at S4 and at the downstream sites (S5–S7) with respect to the reference sites, while total weights were higher for the Itata River reference sites (S1 and S2) ($p < 0.05$, Table 2). A significant interaction was found with the relationship between gonad weight and body weight. At the first downstream site (S5) ($p = 0.001$), larger fish had larger gonads, 51 to 80% larger with respect to the reference sites (S1–S3), 62% with respect to the upstream site (S4) and between 45 to 63% greater with respect to the sites farthest from the discharge (S6–S7). Smaller fish at S5 tended to have smaller gonads, 15 to 120% smaller than the reference sites, 62% smaller relative to S4, and 45 to 62% relative to sites S6 and S7 (Table 2). No general trend was observed in female liver size with exposure, although site differences did exist ($p < 0.001$) (Table 2). The condition factor for the females sampled at upstream sites was generally larger ($p < 0.001$) in comparison with the downstream sites (S1 10–20% > S3–S7; S2 14–15% > S3 and S5; Table 2).

For the male fish, no significant differences in size or weight were observed between sites, even though individuals from S1 on average were larger and heavier ($p > 0.05$, Table 2). No significant differences in testis size were noted during the October sampling period ($p = 0.160$, Table 2). The relative liver size in the males at S5 was significantly smaller (20–28%, $p = 0.016$) in comparison with all upstream sites (S1–S4), and no differences were observed between sites for the condition factor ($p = 0.51$) (Table 2).

During the spring sampling, YOY were more abundant at reference sites (up to 50%), compared to the first site downstream the discharge (S5; <13%), although no significant differences were observed for size ($p = 0.618$) (Fig. 3B). Despite the differences in abundance, the adults were similar in size between sites ($p = 0.278$).

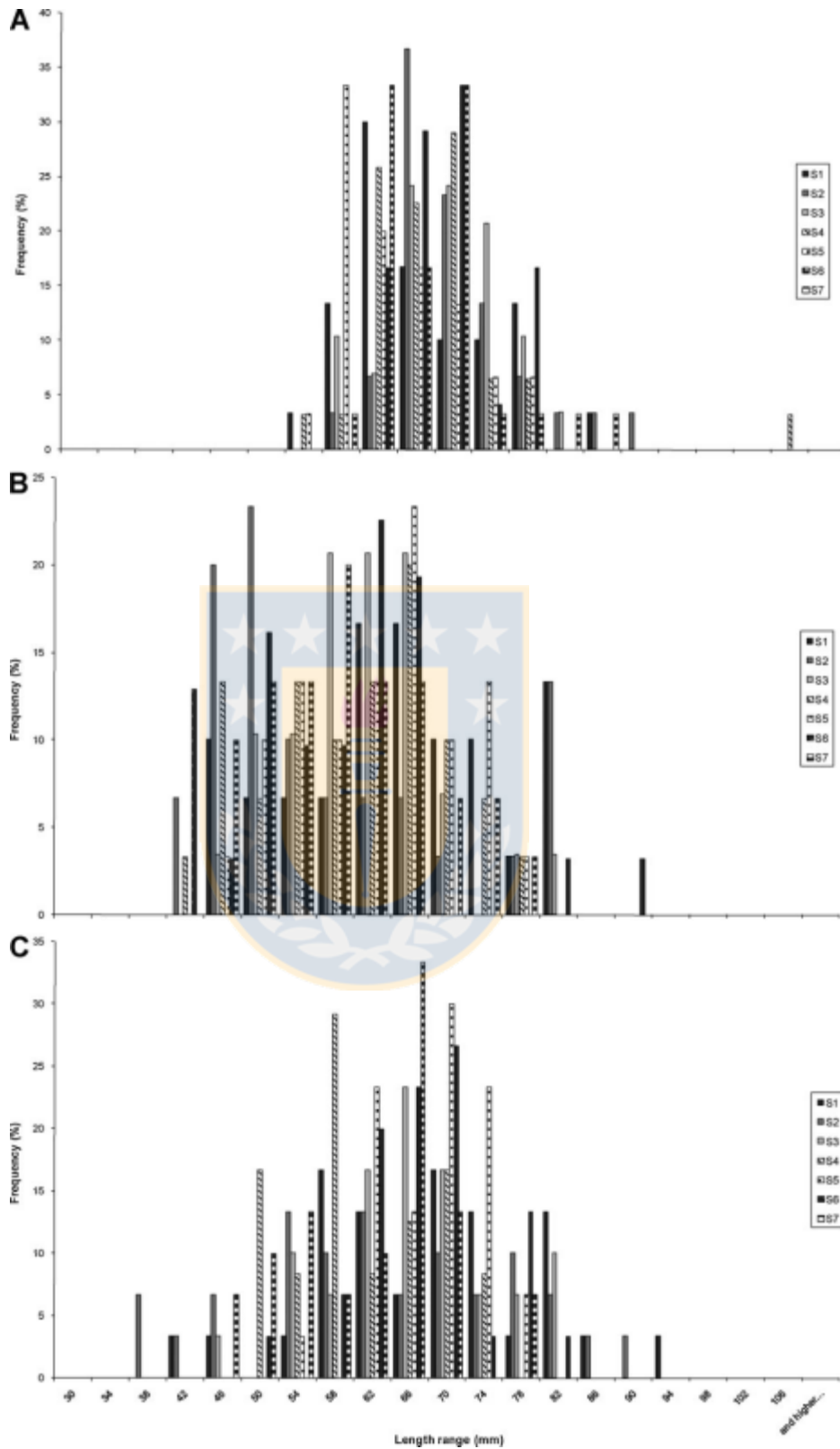


Figure 3. Size distribution for *Trichomycterus areolatus* in the seven sites sampled, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007, and (C) January 2008.

January 2008. In the summer of 2008, females were similar in size and weight at all sampling sites except S4, where the individuals were smaller and lighter ($p < 0.05$, Table 2). Despite this, females from the downstream site closest to the discharge (S5) had larger gonads (>30–80%, $p < 0.001$) relative to all the other sites (Table 2). No consistent differences were found for female liver size and no significant differences were observed in the condition factor ($p = 0.248$), which did not vary more than 7% between sites (Table 2).

Males from site S4 were generally smaller and lighter than the other sites ($p < 0.05$). No significant differences were found for gonad development or liver size between any of the sites, despite changes between 10 to 22% in organ weight. Condition factor was lower at site S7 but only relative to the farthest upstream site S1 ($p = 0.032$, Table 2).

During the second summer of sampling (January 2008), YOY abundance at reference sites was between 4 to 17% (S1–S3), >16% at S4, 0% at the downstream site closest to the discharge (S5), then increased as one went downstream of the discharge, >3% at S6 and 16% at S7 (Fig. 3C). At the sites where YOY were collected, no significant differences were observed for size ($p = 0.8$). Adults did not show size differences between sites ($p = 0.066$).

Separating the abundance (capture per unit effort, data not shown) of fish into two regions (upstream of the discharge and downstream), we observed seasonal differences in responses. *Percilia gillissi* showed no differences between upstream and downstream sites during February 2007 ($p = 0.827$) and January 2008 ($p = 0.127$), but higher abundance upstream during October 2007 ($p = 0.050$). *Trichomycterus areolatus* showed no site differences during February 2007 ($p = 0.127$) or October 2007 ($p = 0.827$), but higher abundance upstream during January 2008 ($p = 0.050$).

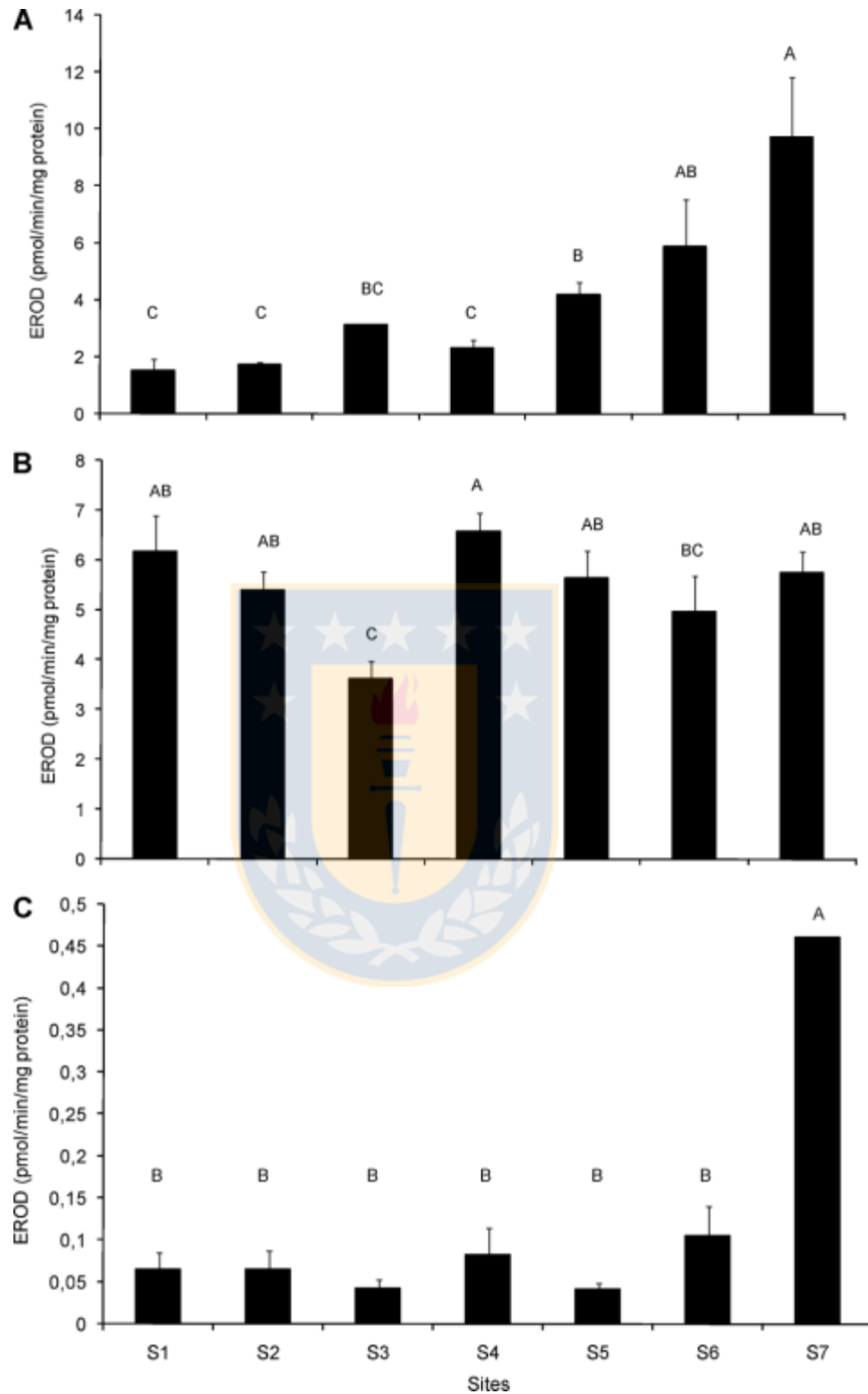


Figure 4. Liver ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity for *Percilia gillissi*, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007, and (C) January 2008. Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods.

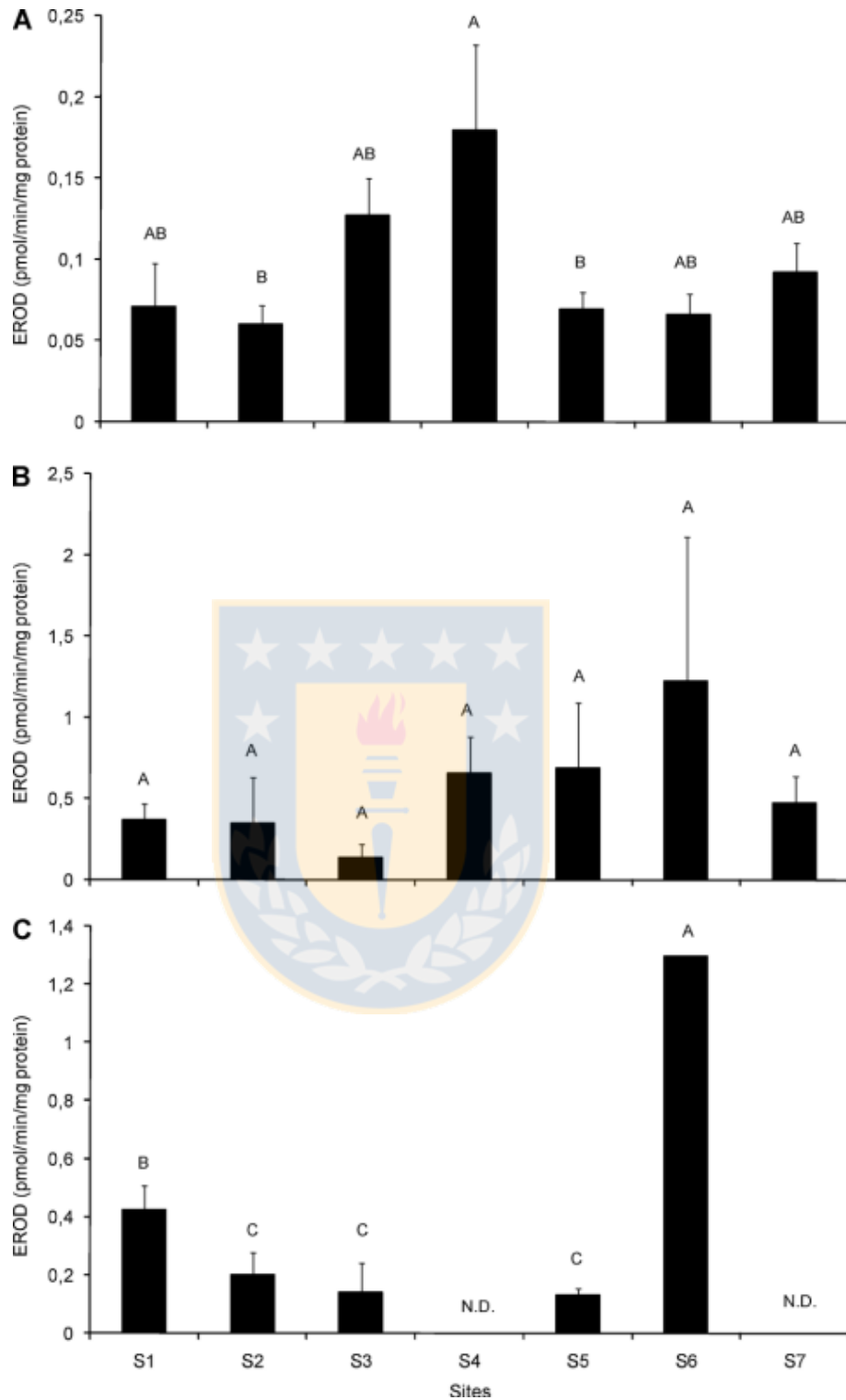


Figure 5. Liver ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity for *Trichomycterus areolatus*, during three seasons (A) February 2007, (B) October 2007 and (C) January 2008. Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods. N.D. = no data.

EROD activity

Induction of hepatic EROD activity was observed in *P. gillissi* from the sites downstream of the discharge (S6 and S7) during February 2007 (Fig. 4A) and only at site S7 during October 2007 (Fig. 4B). Due to the high variability within site, the induction downstream of the discharge was not significant in January 2008 (Fig. 4C). Large variability in EROD activity for *T. areolatus* between sites prevented consistent site differences in February (Fig. 5A) and October 2007 (Fig. 5B). In January 2008, induction of EROD activity was found downstream of the discharge at S6 (Fig. 5C).

In vitro sex steroid production

Percilia gillissi females exhibited the highest production of 17 β -estradiol in February and October 2007 at the Velenunque Stream site (S4) and at the sites downstream of the discharge (S5–S7). In January 2008 the values were similar. *In vitro* testosterone production was increased in February 2007 at S5 (ANOVA, $p < 0.05$), as these values were greater on average than the reference values (Table 3). Males had increased *in vitro* testosterone production at the site downstream closest to the discharge (S5) in February 2007 as all other sites were below detection (ANOVA, $p < 0.05$); in October, inhibition of 11KT was observed at all downstream sites as well as at the Velenunque Stream site (S4) (ANOVA, $p < 0.05$) (Table 3).

Testosterone production in *T. areolatus* females was not different between sites during the first two sampling periods (February and October 2007). In January 2008, sites downstream of the discharge generally had reduced testosterone production, as did the Velenunque Stream site (S4) (Table 3). 17 β -estradiol was significantly increased at downstream sites including S4 during February and October 2007, with production at S5 (near the effluent discharge) always highest. In January 2008, gonadal production of 17 β -estradiol was generally lower at the downstream sites, although only significantly different than the S1 reference location (Table 3). The males presented different responses during the different seasons studied: *in vitro* testosterone production in February 2007 was more than double at the sites located

between the Velenunque Stream site (S4) and the farthest downstream (S7) site. In October 2007, testosterone production was decreased downstream of the discharge. The 11KT production in this species was increased downstream of the discharge (S5–S7) in February 2007, but were significantly decreased at the same sites (S5–S7) in October 2007, and no consistent changes during January 2008 (Table 3).

Table 3. Summary statistics for *in vitro* gonad steroid production (pg/mg gonad) by species, sex, and season.

Date	Species	Site	Males		Females	
			Testosterone	11-Ketotestosterone	Testosterone	17 β -Estradiol
Feb 2007	<i>Percilia gillissi</i>	S1	<DL	0.096 \pm 0.00 A	0.083 \pm 0.063 B	<DL
		S2	ND	ND	<DL	<DL
		S3	ND	ND	0.125 \pm 0.125 B	<DL
		S4	<DL	<DL	1.858 \pm 0.249 AB	4.460 \pm 0.510 A
		S5	4.328 \pm 0.951 A	<DL	3.870 \pm 1.249 A	9.806 \pm 4.312 A
		S6	<DL	<DL	1.597 \pm 0.490 AB	3.815 \pm 2.114 A
		S7	<DL	<DL	0.980 \pm 0.073 AB	3.611 \pm 0.551 A
	<i>Trichomycterus areolatus</i>	S1	0.154 \pm 0.070 C	1.162 \pm 0.219 C	0.937 \pm 0.150 A	0.100 \pm 0.036 B
		S2	0.503 \pm 0.223 BC	1.337 \pm 0.582 BC	1.271 \pm 0.183 A	0.208 \pm 0.037 B
		S3	0.596 \pm 0.217 BC	1.810 \pm 0.394 BC	1.555 \pm 0.313 A	0.194 \pm 0.070 B
		S4	1.299 \pm 0.127 AB	0.917 \pm 0.459 C	1.611 \pm 0.309 A	6.790 \pm 0.618 A
		S5	1.142 \pm 0.171 AB	4.894 \pm 1.323 AB	0.994 \pm 0.185 A	8.508 \pm 1.177 A
		S6	1.070 \pm 0.229 AB	5.993 \pm 0.990 A	1.478 \pm 0.246 A	6.695 \pm 0.765 A
		S7	1.516 \pm 0.182 A	6.738 \pm 1.571 A	1.101 \pm 0.306 A	6.516 \pm 2.116 A
Oct 2007	<i>Percilia gillissi</i>	S1	1.480 \pm 0.206 AB	0.470 \pm 0.177 AB	7.385 \pm 1.338 A	0.259 \pm 0.048 C
		S2	1.223 \pm 0.122 B	0.340 \pm 0.113 AB	5.602 \pm 1.147 A	0.277 \pm 0.056 C
		S3	2.379 \pm 0.329 A	0.946 \pm 0.437 A	7.158 \pm 1.004 A	0.266 \pm 0.038 C
		S4	1.084 \pm 0.134 AB	0.089 \pm 0.039 B	8.344 \pm 1.650 A	4.469 \pm 0.717 B
		S5	1.795 \pm 0.203 AB	<DL	4.852 \pm 1.215 A	4.334 \pm 0.779 B
		S6	1.025 \pm 0.434 B	<DL	6.021 \pm 1.228 A	13.030 \pm 2.268 A
		S7	2.085 \pm 0.379 AB	<DL	7.332 \pm 1.626 A	6.643 \pm 0.935 B
	<i>Trichomycterus areolatus</i>	S1	1.161 \pm 0.102 A	1.993 \pm 0.390 A	1.890 \pm 0.406 A	<DL
		S2	1.822 \pm 0.307 A	2.293 \pm 0.389 A	1.512 \pm 0.233 A	<DL
		S3	1.588 \pm 0.415 A	1.567 \pm 0.269 AB	<DL	<DL
		S4	1.758 \pm 0.373 A	1.080 \pm 0.624 B	1.958 \pm 0.527 A	1.019 \pm 0.258 A
		S5	0.843 \pm 0.122 A	0.372 \pm 0.162 CB	1.725 \pm 0.377 A	1.747 \pm 0.321 A
		S6	1.449 \pm 0.343 A	<DL	1.179 \pm 0.193 A	1.319 \pm 0.206 A
		S7	0.782 \pm 0.257 A	0.678 \pm 0.224 CB	1.791 \pm 0.333 A	1.122 \pm 0.186 A
Jan 2008	<i>Percilia gillissi</i>	S1	2.074 \pm 1.137 A	3.227 \pm 1.170 A	5.022 \pm 1.068 A	6.800 \pm 1.437 A
		S2	5.196 \pm 0.940 A	3.895 \pm 0.740 A	7.994 \pm 1.938 A	11.560 \pm 4.011 A
		S3	2.967 \pm 0.477 A	3.167 \pm 1.041 A	3.034 \pm 0.631 A	4.628 \pm 1.472 A
		S4	4.849 \pm 1.100 A	4.239 \pm 1.392 A	5.508 \pm 1.771 A	8.591 \pm 2.112 A
		S5	4.160 \pm 0.504 A	3.163 \pm 0.313 A	5.600 \pm 1.221 A	7.697 \pm 2.368 A
		S6	3.156 \pm 0.386 A	2.216 \pm 0.245 A	9.083 \pm 2.312 A	6.488 \pm 0.906 A
		S7	3.603 \pm 0.400 A	2.449 \pm 0.226 A	4.885 \pm 2.025 A	4.564 \pm 1.129 A
	<i>Trichomycterus areolatus</i>	S1	2.626 \pm 0.401 AB	5.223 \pm 1.508 AB	2.984 \pm 0.212 A	12.021 \pm 1.610 A
		S2	3.150 \pm 0.493 A	8.823 \pm 1.827 A	1.437 \pm 0.242 B	4.650 \pm 1.498 B
		S3	2.562 \pm 0.319 AB	8.020 \pm 0.667 A	2.288 \pm 0.44 A	10.413 \pm 1.004 AB
		S4	1.056 \pm 0.204 B	2.307 \pm 1.043 B	0.989 \pm 0.192 B	9.519 \pm 1.055 AB
		S5	2.059 \pm 0.120 B	6.470 \pm 0.730 AB	1.015 \pm 0.310 B	5.683 \pm 1.064 B
		S6	1.346 \pm 0.487 B	6.713 \pm 1.585 AB	1.335 \pm 0.401 B	5.598 \pm 0.898 B
		S7	1.679 \pm 0.389 B	8.175 \pm 1.440 AB	1.421 \pm 0.326 B	7.462 \pm 0.825 B

Values are mean standard error (n), and values sharing uppercase letters are not significantly different between sites within a season and sex (analysis of variance $p < 0.05$).

<DL = below detection limit (<0.078 pg/mg gonad).

ND = No data

Female gonad histology: During the first summer sampling (February 2007), *P. gillissi* female ovaries had an increase in the number of oocytes in the most advanced maturation states stages at the site directly downstream of the discharge (S5, Fig. 6A), with a consequent increase in the cellular diameter due to the incorporation of vitelium in the oocytes of these fish (ANOVA, $p < 0.001$, Fig. 6C). The same effect was not observed during the second summer sampling (January 2008), with an increase in the number of oocytes in stage 3 of maturation at site S4 (Velenunque Stream) (Fig. 6B) was observed but without an increase in the cellular diameter of the oocytes (Fig. 6D).

The *T. areolatus* individuals collected downstream of the discharge had 3 to 5% more oocytes in stage 3 at S4 and S5 during February 2007 (Fig. 7A), but no increase in cellular diameter of oocytes; possibly a slight decrease in diameter at S4 (ANOVA $p < 0.05$) (Fig. 7D). During October 2007 at site S5 downstream of the discharge, a larger number of oocytes were in stage 4 state IV (Fig. 7B) and oocytes had an increased diameter, both in stage 2 state II and stage 4 state IV of gonadal maturation (ANOVA $p < 0.001$, Fig. 7E). In the second summer sampling (January 2008) only the oocytes in stage 3 from S4 had a smaller diameter than the other sites (ANOVA $p < 0.05$, Fig. 7F).

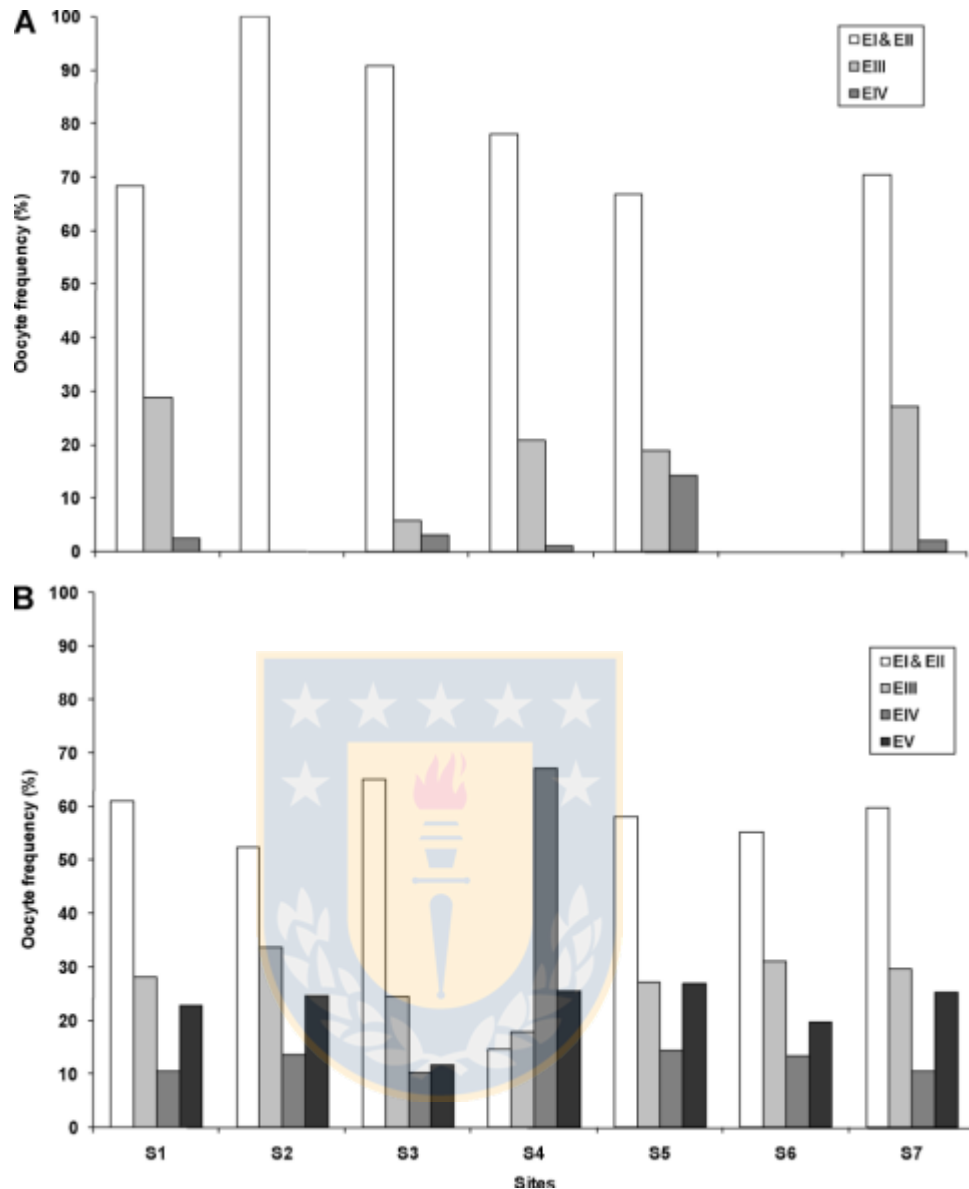


Figure 6. Percentage ((A), February 2007 and (B), October 2007) and diameter ((C), February 2007 and (D), October 2007) of the different gonad maturation states for *Percilia gillissi*. EI: oocyte stage 1, EII: oocyte stage 2, EIII: oocyte stage 3, EIV: oocyte stage 4, EV: oocyte stage 5 (according to Quiroz *et al.*, unpublished data). Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods and maturation stage.

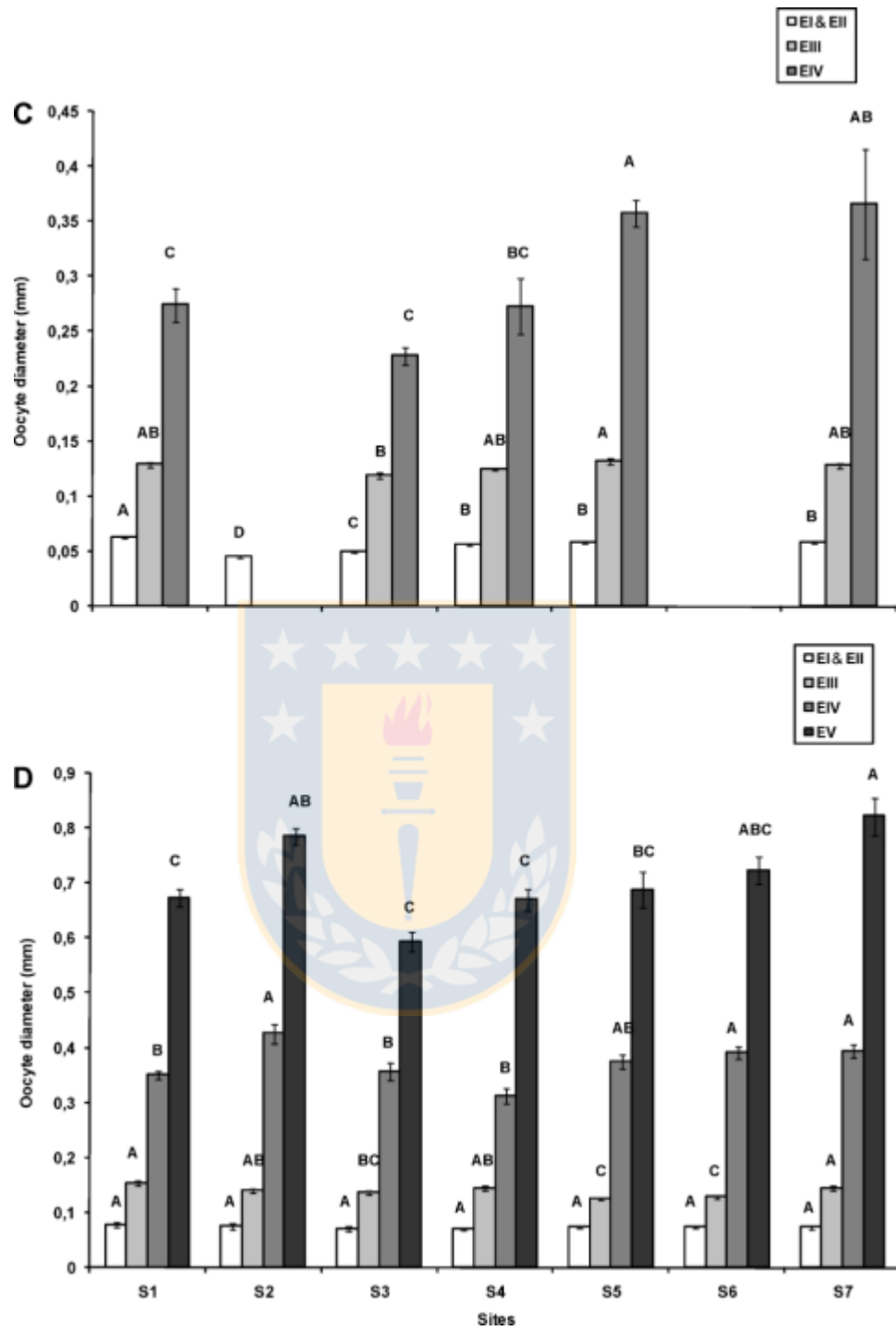


Figure 6. Continued.

Discussion

Basic biological information on native fish in Chile is scarce [19], and there was no baseline information available on biological, reproductive, or physiological endpoints for either species studied here. Both species show maximum gonadal development at reference sites during October and November [21], so that this prespawning period occurs during the time of low flow and maximum effluent exposure. These results are in agreement with Habit and Belk [26] with respect to the congeneric species *P. irwinii* and with Manríquez *et al.* [27] for *T. areolatus*, which suggested maximum gonadal development in the spring–summer period.

The principal effect observed as a result of exposure to pulp mill effluents in these species at this site occurred at the level of reproduction, with responses most significant during the prespawning period. Females of both species showed an induction in gonadal production of 17β -estradiol, which was highest at the site immediately downstream of the discharge during the first sampling period that diminished in the summer postspawning period (January 2008). These results, together with the increase in the oocyte size at sites downstream of the discharge and a significant increase in the gonadal size for *P. gillissi* and *T. areolatus* females during the postspawning period are consistent with a disruption in reproduction. The results found for females are in agreement with the results of Orrego *et al.* [12–14], who indicated a stimulation of the reproductive system and consequently an induction of gonadal maturation in females downstream of the pulp mill discharges on the Biobío River. These results differ from observed reduced gonad size and steroid hormones in wild fish in the Northern Hemisphere [17,18,28,29]. In comparison, *T. areolatus* males showed an increase in 11KT gonad production during the recrudescence/postspawning periods and a decrease in 11KT production for both species during the spawning period; changes in the response could be due to changes in plant processes or levels of exposure to effluent [17,18,30]. No other important sources of endocrine disruptors appear to exist upstream the pulp mill effluent discharge in the basin [31] and no change in fish habitat between sites was observed in the study area during this research or recent studies on the basin [32].

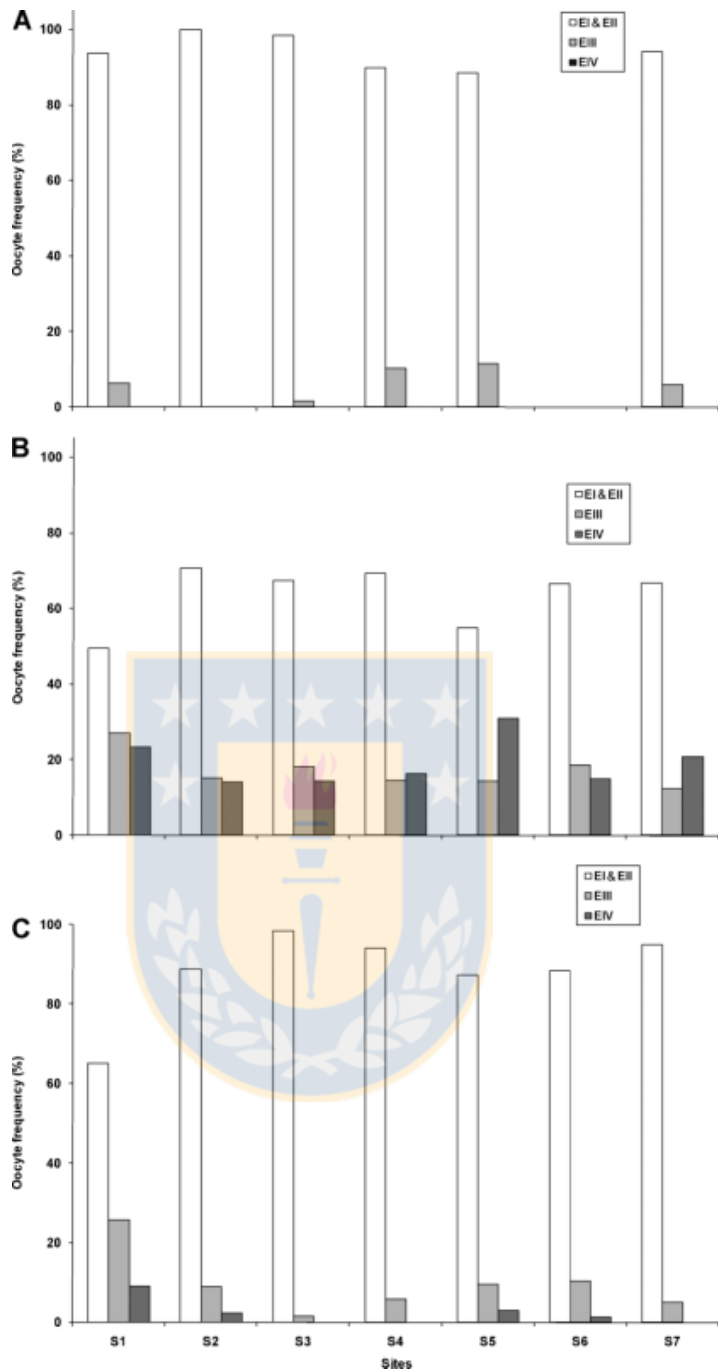


Figure 7. Percentage ((A), February 2007, (B), October 2007 and (C), January 2008) and diameter ((D), February 2007; (E), October 2007, and (F), January 2008) of the different gonad maturation states for *Trichomycterus areolatus*. EI: oocyte stage 1, EII: oocyte stage 2, EIII: oocyte stage 3 EIV: stage 4 (according to Huaquin et al. [24]). Values sharing an uppercase letter are not significantly different within sampling periods and maturation stage.

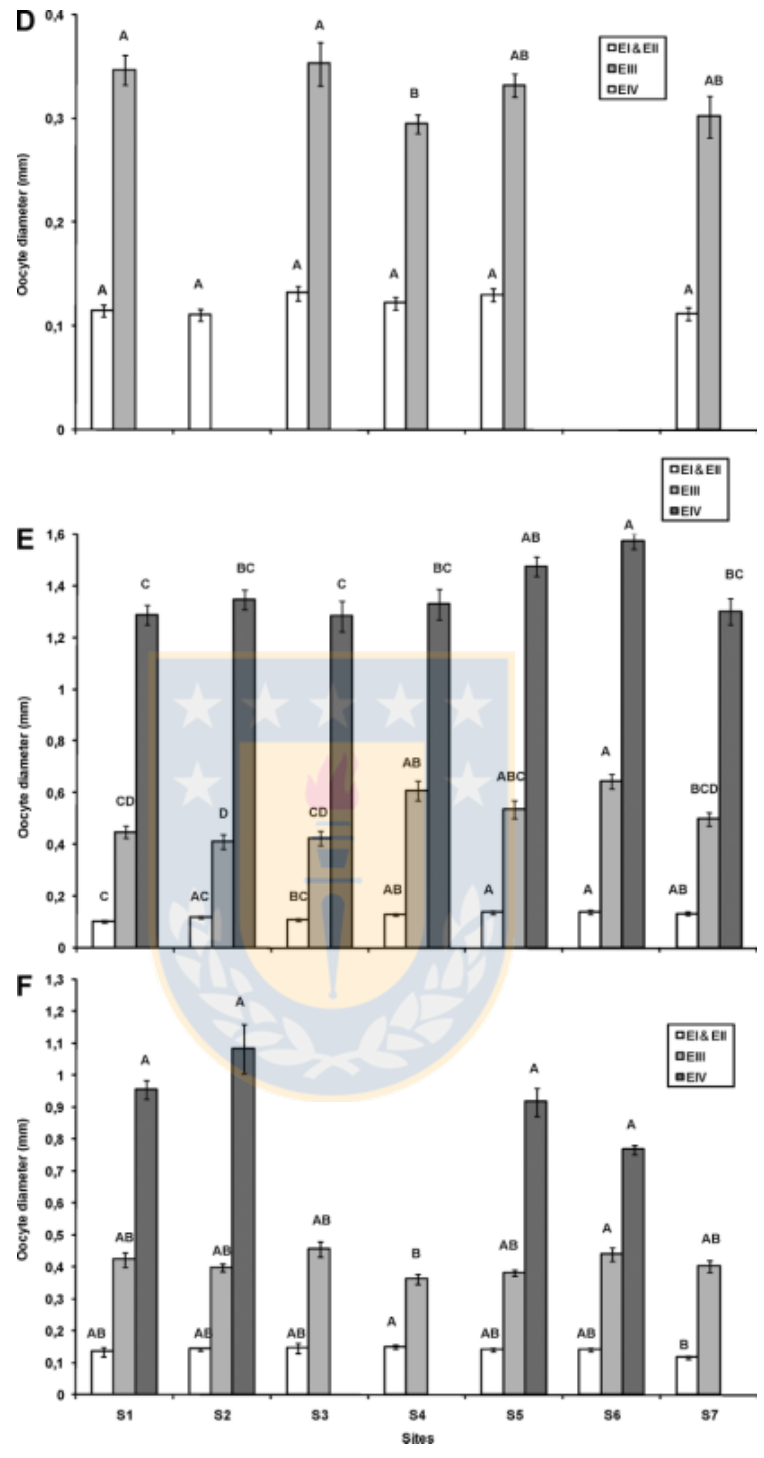


Figure 7. Continued.

This estrogenic response differs from the results in the Northern Hemisphere. Worldwide, the principal response in sites downstream of pulp mill discharge has been a reduction in gonad size, as has been seen in Canada [7,33–39], the United States [40–42], Sweden [43], Finland [44], and New Zealand [45], where the possible causes are a reduction in the fishes steroid production capacity [46–48].

The alterations we observed at the reproductive level in individuals downstream of the discharge could be responsible for the differences in the size structure of the populations of both species, in which there is a temporal tendency toward a loss of smaller sizes. Along with these reproductive impacts, there might be a metabolic disruption observed as a loss of adults of larger sizes, which is consistent with the work of Aedo et al. [49] for the Biobío Basin on *P. irwinii*, where a loss in the growth rate of this species is notable in areas of low environmental quality and those impacted by pulp mill effluent [12,13].

During the postspawning period, *Trichomycterus* showed larger livers and larger gonads, although the differences were small (<10%). Even when alterations occurred in different metabolic aspects (condition factor, liver size, EROD-hepatic activity) in both species, the increase in liver size could indicate that this response was caused by an increase in nutrients in the affected zone, similar to that observed by Galloway et al. [50] and McMaster et al. [35]. Indeed, this increase occurred only when the Itata River had lower flows (Summer 2007 and 2008). During the rivers second peak in the spring, a drop in both the condition factor and LSI was observed.

In addition, an induction of EROD-hepatic activity seems to be linked to the morphological and seasonal changes in the rivers. Even if the increase in hepatic EROD activity is a typical response of fish exposed to pulp mill effluent [7,51], a differential response is observed in the two species studied. Lower basal activity values are observed in *P. gillissi* for the reference sites (S1–S3), while a tendency towards increases in these values is observed at sites S4 and S7. The maximum is achieved at site S7, which corresponds to a rithron-potamon transition zone, and thus there is lower river energy and a higher residence time for the sediments and

particulate matter, which would facilitate greater accumulation of the compounds capable of inducing EROD activity [12,52,53]. Some authors have documented the induction of EROD activity in a benthic species due to a close relation with hydrophobic-type pollutants that are associated with the sediment and can be directly ingested in the diet or by intimate contact with this matrix [54].

Because all individuals analyzed in this study were adults, their reproductive state could affect EROD results, as activity has been shown to decline during the spawning period and near ovulation [55,56]. This influence on EROD activity is related to high estradiol levels (E2) in spawning females [56], and the high E2 levels observed (in *P. gillissi* females) in the postdischarge sites could influence our EROD responses. Still, these three endpoints (condition factor, LSI, and EROD activity) in both species seem to be highly dependent on the fluctuations in river flow during the year.

This article represents the first study in Chile that provides evidence of endocrine disruption at a hormonal level in native freshwater fish in response to exposure of an industrial discharge. It also establishes possible links in the reproductive alterations observed at a subindividual and individual level that could explain potential changes in the long-term reproductive behavior of the fish, and consequently with possible alterations at the population level.

Acknowledgement

The researchers thank M. Rivas, C. Concha, W. San Martín, H. Alonso, A. Peña, A. Araneda, and P. Bahamonde for their support during the field sampling and sample analysis; A. Ancalaf, L. Unzueta, and A. Acuña for the support in histological analysis; G. Tetreault for support during the sex steroid analysis. The study forms part of Gustavo Chiang's PhD thesis supervised by R. Barra and was supported by funding from a Graduate Student Exchange Program fellowship from Foreign Affairs Canada and Grant 08 CH S2 357 F10 from INNOVA BioBío to G. Chiang; funding from the Canada Research Chairs program to K.R. Munkittrick; and Environment Canada funding to M.E. McMaster.

References

1. Munkittrick KR, McMaster ME, Van Der Kraak GJ, Portt C, Gibbons WN, Farwell A, Gray M. 2000. Development of Methods for Effects- Driven Cumulative Effects Assessment Using Fish Populations: Moose River Project. SETAC, Pensacola, FL, USA.
2. Maltby L, Burton GA. 2006. Field-based effects measures. *Environ Toxicol Chem* 25:2261–2262.
3. Crane M, Burton GA, Culp JM, Greenberg MS, Munkittrick KR, Ribeiro R, Salazar MH, Saint-Jean SD. 2007. Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis. *Integr Environ Assess Manag* 3:234–245.
4. Bowman MF, Somers KM. 2005. Considerations when using the reference condition approach for bioassessment of freshwater ecosystems. *Water Qual Res J Can* 40:347–360.
5. Munkittrick KR, McMaster ME, Portt CB, Van Der Kraak GJ, Smith IR, Dixon DG. 1992. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed function oxygenase activity, and presence of external lesions in lake white sucker (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *Can J Fish Aquat Sci* 49:1560–1569.
6. McMaster ME, Van Der Kraak GJ, Portt CB, Munkittrick KR, Sibley PK, Simth IR, Dixon DG. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker population (*Catostomus commersoni*) exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 21:199–218.
7. Munkittrick KR, Portt CB, Van Der Kraak GJ, Smith IR, Rokosh DA. 1991. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1371–1380.
8. Gibbons WN, Munkittrick KR, Taylor WD. 1998. Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species 1: Response of Spoonhead sculpin (*Cottus ricei*) downstream of a bleached-kraft pulp mill. *Environ Toxicol Chem* 17:2227–2237.

9. Gibbons WN, Munkittrick KR, McMaster ME, Taylor WD. 1998.
10. Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species 2: Comparison between responses of trout-perch (*Percopsis omiscomaycus*) and white sucker (*Catostomus commersoni*) downstream of a pulp mill. *Environ Toxicol Chem* 17:2238–2245.
11. Mellanen P, Soimasuo M, Holmbom B, Oikari A, Santti R. 1999. Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:133–137.
12. Tetreault GR, McMaster ME, Dixon DG, Parrott JL. 2003. Using reproductive endpoints in small forage fish species to evaluate the effects of Athabasca oil sands activities. *Environ Toxicol Chem* 22:2775–2782.
13. Orrego R, Moraga-Cid G, González M, Barra R, Valenzuela A, Burgos A, Gavilán JF. 2005. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environ Toxicol Chem* 24:935–1943.
14. Orrego R, Burgos A, Moraga-Cid G, Inzunza B, González M, Valenzuela A, Barra R, Gavilán JF. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Biomarker responses along a pollution gradient in the Biobío river, Chile. *Environ Toxicol Chem* 25:2280–2287
15. Orrego R, Guchardi J, Hernández V, Krausse R, Roti L, Armour J, Ganeshakumar M, Holdway D. 2009. Pulp and paper mill effluent treatments have differential endocrine disrupting effects on rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 28:181–188.
16. Munkittrick KR, Servos MR, Carey JH, Van Der Kraak GJ. 1997. Environmental impacts of pulp and paper wastewater: Evidence for a reduction in environmental effects at North American pulp mills since 1992. *Water Sci Technol* 35:329–338.
17. Munkittrick KR, Van Der Kraak GJ, McMaster ME, Portt CB. 1992. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroid to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environ Toxicol Chem* 11:1427–1439.
18. McMaster ME, Hewitt LM, Parrott JL. 2007. A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: Field studies and mechanistic research. *J Toxicol Environ Health Part B* 9:319–339.


19. Bowron LK, Munkittrick KR, McMaster ME, Tetreault G, Hewitt LM. 2009. Responses of white sucker (*Catostomus commersoni*) to 20 years of process and waste treatment changes at a bleached kraft pulp mill, and to mill shutdown. *Aquat Toxicol* 95:117–132.
20. Habit E, Belk MC, Tuckfield RC, Parra O. 2006. Response of the fish community to human induced changes in the Biobío River in Chile. *Freshw Biol* 51:1–11.
21. Parra O, Castilla JC, Romero H, Quiñones R, Camaño A. 2009. La cuenca hidrográfica del río Itata aportes científicos para su gestión sustentable. Editorial Universidad de Concepción, Concepción, Biobío, Chile.
22. Chiang G, Munkittrick KR, Saavedra MF, Tucca F, McMaster ME, Urrutia R, Tetreault G, Gavilán JF, Barra R. (in press) Seasonal changes in reproductive endpoints in *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) and *Percilia gillissi* (Perciformes, Perciliidae), and the consequences for environmental monitoring. *Stud Neotrop Fauna Environ* (in press).
23. McMaster ME, Munkittrick KR, Jardine JJ, Robinson RD, Van Der Kraak GJ. 1995. Protocol for measuring in vitro steroid production by fish gonadal tissue. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci* 1961:1–78.
24. Lubert RA, Nims RW, Mayer RT, Cameron JW, Schechtman LM. 1985. Measurement of cytochrome P450 dependent dealkylation of alkoxypheoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: Effects of dicumarol. *Mutat Res* 142:127–131.
25. Huaquin LG, Veliz D, Arratia G. 2002. Estudio comparativo de ovarios y cubiertas ovocitarias en peces siluriformes de aguas continentales de Chile. *Gayana* 66:269–274.
26. Barrett TJ, Tingley MA, Munkittrick KR, Lowell RB. 2010. Dealing with heterogeneous regression slopes in analysis of covariance: New methodology applied to environmental effects monitoring fish survey data. *Environ Monit Assess* 166:279–291.
27. Habit E, Belk MC. 2007. Threatened fishes of the world: *Percilia irwini* Eigenmann, 1927 (Perciliidae). *Environ Biol Fishes* 78:213–214.

28. Manríquez A, Huaquín L, Arellano M, Arratia G. 1988. Aspectos reproductivos de *Trichomycterus areolatus* Valenciennes, 1846 (Pisces: Teleostei: Siluriformes) en río Angostura, Chile. *Stud Neotrop Fauna Environ* 23:89–102.
29. Karels A, Oikari A. 2000. Effects of pulp and paper mill effluents on the reproductive and physiological status of perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) during the spawning period. *Ann Zool Fenn* 37:65–77.
30. Karels A, Markkula E, Oikari A. 2001. Reproductive, biochemical, physiological, and population responses in perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) downstream of two elemental chlorine-free pulp and paper mills. *Environ Toxicol Chem* 20:1517–1527.
31. Hewitt LM, Kovacs TG, Dube´ MG, MacLatchy DL, Martel PH, McMaster ME, Paice MG, Parrott JL, van den Heuvel MR, Van Der Kraak GJ. 2008. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: Roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environ Toxicol Chem* 27:682–697.
32. Bertin A, Inostroza PA, Quiñones RA. 2009. A theoretical estimation of the concentration of steroid estrogens in effluents released from municipal sewage treatment plants into aquatic ecosystems of central- southern Chile. *Sci Total Environ* 407:4965–4971.
33. Habit E, Ortiz N. 2009. Composición, distribución y conservación de los peces de agua dulce de la cuenca del río Itata. In Parra O, Castilla JC, Romero H, Quiñones R, Camaño A, eds, *La Cuenca Hidrográfica del río Itata, Aportes Científicos para su Gestión Sustentable*. Editorial Universidad de Concepción, Concepción, Chile, pp 127–141
34. Hodson PV, McWhirther M, Ralph K, Gray B, Thivierge D, Carey J, Van Der Kraak GJ. 1992. Effects of bleached kraft mill effluent on fish in the St. Maurice River, Quebec. *Environ Toxicol Chem* 11:1635–1651.
35. Lowell RB, Ring B, Pastershank G, Walker S, Trudel L, Hedley K. 2005. National Assessment of pulp and paper environmental effects monitoring data: Findings from Cycle 1 through 3. NWRI Scientific Assessment Report Series 5. Burlington, ON, Canada.

36. McMaster ME, Evans MS, Alaei M, Muir DCG, Hewitt LM. 2006. Northern Rivers Ecosystem Initiative: Distribution and effects of contaminants. *Environ Monit Assess* 113:143–165.
37. Munkittrick KR, Van Der Kraak GJ, McMaster ME, Portt CB, van den Heuvel MR, Servos MR. 1994. Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mill. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environ Toxicol Chem* 13:1089–1101.
38. Munkittrick KR, McGeachy SA, McMaster ME, Courtenay SC. 2002. Overview of freshwater fish studies from the pulp and paper environmental effects monitoring program. *Water Qual Res J Can* 37:49–77.
39. Munkittrick KR. 2004. Chapter 16: Environmental effects of effluents from pulp and paper mills. In Northcote TG, Hartman GF, eds, *Fishes and Forests: An Approach to Fish-Forestry Interaction*. Blackwell Science, Oxford, ON, Canada, pp 336–361.
40. Parrott JL, Wood CS, Boutot P, Dunn S. 2004. Changes in growth, secondary sex characteristics, and reproduction of fathead minnows exposed for a life cycle to bleached sulfite mill effluent. *J Toxicol Environ Health A-Current Issues* 67:1755–1764.
41. Felder DP, D'Surney SJ, Rodgers JH, Deardorff TL. 1998. A comprehensive environmental assessment of a receiving aquatic system near an unbleached kraft mill. *Ecotoxicology* 7:313–324.
42. Foster EP, Fitzpatrick MS, Feist GW. 2001. Plasma androgen correlation, EROD induction, reduced condition factors and the occurrence of organochlorine pollutants in reproductively immature white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) from the Columbia River, USA. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:182–191.
43. Sepúlveda MS, Johnson WE, Higman JC, Denslow ND, Schoeb TR, Gross TS. 2002. An evaluation of biomarkers of reproductive function and potential contaminant effects in Florida largemouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St. Johns River. *Sci Total Environ* 289:133–144.

44. Sandström O, Förlin L, Grahn O, Landner L, Larsson A, Lindesjö E. 1997. Environmental impacts of pulp and paper mill effluents: A strategy for future environmental risk assessments. Report 4785. Swedish Environmental Protection Agency, Stockholm, Sweden.
45. Lehtinen KJ, Kierkegaard A, Jakobsson E, Wandell A. 1990. Physiological-effects in fish exposed to effluents from mills with 6 different bleaching processes. *Ecotoxicol Environ Saf* 19:33–46.
46. Van Den Heuvel MR, Michel C, Stevens MI, Clarke AC, Stolting KN, Hicks BJ, Tremblay LA. 2007. Monitoring the effects of pulp and paper effluent is restricted in genetically distinct populations of common bully (*Gobiomorphus cotidianus*). *Environ Sci Technol* 41:2602–2608.
47. Dubé MG, MacLatchy DL. 2001. Identification and treatment of a waste stream at a bleached-kraft pulp mill that depresses a sex steroid in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Toxicol Chem* 20:985–995.
48. McMaster ME, Portt CB, Munkittrick KR, Dixon DG. 1992. Milt characteristics, reproductive-performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 23:103–117.
49. Van Der Kraak GJ, Munkittrick KR, McMaster ME, Portt CB, Chang JP. 1992. Exposure to bleached kraft pulp-mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol Appl Pharmacol* 115:224–233.
50. Aedo JR, Belk MC, Habit EM. 2009. Geographic variation in age, growth and size structure of *Percilia irwini* from south-central Chile. *J Fish Biol* 74:278–284.
51. Galloway BJ, Munkittrick KR, Currie S, Gray MA, Curry RA, Wood CS. 2003. Examination of the responses of slimy sculpin (*Cottus cognatus*) and white sucker (*Catostomus commersoni*) collected on the Saint John River (Canada) downstream of pulp mill, paper mill, and sewage discharges. *Environ Toxicol Chem* 22:2898–2907.
52. Ahokas JT, Holdway DA, Brennan SE, Goudey RW, Bibrowska HB. 1994. MFO activity in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated pulp and paper-mill effluent in Lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX, and muscle PCDD PCDF. *Environ Toxicol Chem* 13:41–50.

53. Peck V, Daley R. 1994. Toward a greener pulp and paper-industry — the search for mill effluent contaminants and pollution prevention technology. *Environ Sci Technol* 28:A524–A527.
54. Tollefsen KE, Bratsberg E, Boyum O, Finne EF, Gregersen IK, Hegseth M, Sandberg C, Hylland K. 2006. Use of fish in vitro hepatocyte assays to detect multi-endpoint toxicity in Slovenian river sediments. *Mar Environ Res* 62:S356–S359.
55. Hugla JL, Philippart JC, Kremers P, Goffinet G, Thome JP. 1995. PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the River Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change. *Neth J Aquat Ecol* 29:135–145.
56. Larsen H, Celander M, Goksøyr A. 1992. The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. *Fish Physiol Biochem* 10:291–301.
57. Gray ES, Woodin BR, Stegeman JJ. 1991. Sex-differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of p450 forms by estradiol. *J Exp Zool* 259:330–342



**Capítulo III: SCREENING DE EFLUENTES DE
PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS
SERVIDAS**

First report on emerging contaminants in urban wastewater in two towns located in the Biobio river basin, Chile.

Maria F. Saavedra¹, Gustavo Chiang², Leslie M. Bragg³, Mark R. Servos³ & Ricardo Barra¹.

¹Aquatic Systems Department, Faculty of Environmental Sciences and EULA Chile Centre, University of Concepcion, Concepcion, Chile.

²Canadian Rivers Institute and Biology Department, University of New Brunswick, Saint John, NB, Canada.

³Canada Rivers Institute and Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, ON Canada.

Saavedra MF, Chiang G, Bragg L, Sevovs M, Barra R. (submitted). First report on emerging contaminants in urban wastewater in two towns located in the Biobio river basin, Chile. Environmental Monitoring and Assessment.

Abstract

This study investigates the presence and concentrations of 16 emerging contaminants from various chemical groups (i.e. pharmaceuticals, personal care products, psycho-stimulating drugs, and endocrine disruptors) in the effluents from two wastewater treatment plants situated in the Biobío river basin in Chile. The wastewater treatment plants serve the cities of Santa Barbara and Los Angeles, with respective populations of 14,000 and 180,000 inhabitants. The analysis was carried out during November, 2010 and April, 2013. Wastewater effluents components were extracted using solid phase extraction, and analyzed by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry detection (HPLC MS/MS). The results indicated the presence of several notable emerging contaminants. In Los Angeles city the final effluent of the wastewater treatment plant showed high concentrations of gemfibrozil (29,783 ng L⁻¹), ibuprofen (3,800 ng L⁻¹), atenolol (2,590 ng L⁻¹), diclofenac (1,945 ng L⁻¹), triclosan disinfectant (1,856.7 ng L⁻¹), caffeine (1,395 ng L⁻¹) and carbamazepine (1,345 ng L⁻¹). Additionally, the observed concentrations in these

treatment plants effluents are comparable to those reported from other studies taken in various different countries on a global scale.

Keywords: wastewater treatment plants, emerging contaminants, Biobio river basin, solid phase extraction, HPLC MS/MS, Chile.

1. Introduction

Water contamination is an environmental problem worldwide, both in surface waters and groundwater. (Nuñez 2010). The implementation of wastewater treatment plants has helped to reduce eutrophication of the aquatic ecosystems (Ternes et al. 1999); however, the wastewater treatment plants (WWTPs) are generally not designed to deal with emerging contaminants. They were built and upgraded with the principal aim of removing easily or moderately biodegradable carbon, nitrogen and phosphorus compounds and microbiological organisms (MPN; Most Probable Number per gram of the total solid), which regularly arrive at the WWTP in concentrations in the order of mg L^{-1} and at least 10^6 MPN/100 mL, respectively. The anthropogenic substances in WWTPs include pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) (Lishman et al. 2006), household, industrial chemicals and natural or synthetic hormones (Ying et al. 2009). In addition, their chemical and physical properties, (solubility, volatility, adsorbability, biodegradability, polarity and stability), vary greatly (Le Minh et al. 2010; Ziyilan and Ince 2011), which effect their behavior during the treatments and consequently their removal efficiencies.

Many of these compounds, known as emerging contaminants, are incorporated into water bodies through the discharge of effluent waters from wastewater treatment plants. These contaminants can affect surface waters as well as the groundwater, presenting risks to human health and the ecosystem (Brooks et al. 2009).

In the majority of cases emerging contaminants are non-regulated compounds. The priority of concerning will depend on results from ongoing and future investigations about their potential effects on human health. (Barceló 2003). These groups of

contaminants are considered as pseudo-persistent compounds, characterized by the fact that they do not need to persist in the environment in order to cause negative effects, as high rates of removal or processing is compensated by the continual input into the environment. (Kuster et al. 2008).

During the early 90's, Chile initiated the process of constructing wastewater treatment plants (WWTPs) with activated sludge technology. Since 2000, along with a Regulation Framework for wastewater discharges to marine and continental surface waters (Ministry of the Secretary-General of the President, Chile 2001), this process has accelerated considerably. Despite the lack of studies about emerging compounds in WWTP in Chile, it is difficult to believe that Chile is not also part of this agenda. Chile has a growing economy, with a booming industry and with access to the same chemical compounds and medical drugs used in the rest of the world.

The Biobio river is located in the Biobio river basin of southern Central Chile. The Biobio river is the second largest river in the country and originates in the Icalma and Galletué lakes, which are located in the extreme northeast of the Araucania region in the Andes mountain range. The river has a total length of 380 km and is the main channel of the third largest hydrographic basin in the country (24,262 km²) (Karrasch et al. 2006). It supports many economical activities and is one of the most important river basins in Chile. Some of the major waters uses are drinking water for more than 1 million inhabitants in the second most populated area in the country (Parra and Faranda 1993). The discharges of urban and industrial treated wastewater are part of the contamination sources for the Biobío river. Without adequate treatment wastewater, the effluent could affect the river water quality, and consequently may disturb the aquatic ecosystems and potentially harm aquatic organisms and human health (Parra et al. 2004).

Currently the Biobio river basin has 23 active WWTPs. Four of them discharge directly into the Biobio river (Director of sanitary services (SISS) 2014, personal comment). At present, approximately 95% of wastewater from Biobio river basin is discharged to treatment systems (Essbio 2014).

Many emerging contaminants are non-volatile, polar, and do not biodegrade, which means they are not efficiently removed by primary or secondary WWTP processes. These compounds represent the bulk of the load into aquatic environments. Therefore, a good understanding of their concentrations present in WWTP effluents is key in improving knowledge of their fate in the environment (Lacey et al. 2012).

Considering that there are many treatment plants discharging throughout the river, there is drinking water source at the end of the basin Biobio river water and there is very little information currently known for the basin, the aim of this work was to evaluate the presence of emerging contaminants (pharmaceuticals and personal care products, psycho-stimulating drugs and endocrine disruptors) in effluents from wastewater treatment plants in the communities of Santa Barbara and Los Angeles, both cities within the Biobio river basin of Chile.

2. Materials and methods

2.1 Study area and sampling procedures

The effluents were collected from two Chilean WWTPs. Santa Barbara's WWTP (37° 39'44, 34''S, 72° 2'3, 14''W) is situated at the foot of the Andes mountain range in the Biobio river basin, while Los Angeles WWTP (37° 28'17, 58''S, 72° 23'25, 45''O) is situated in the lowlands of the Biobio river basin (Fig. 1). These sites were selected for discharge location and the population served by the treatment plant. Both plants had secondary treatment (activated sludge) and chlorine disinfection before discharging the effluent to the river (Table 1).

Composite wastewater samples were collected in triplicated in 100 mL glass bottles every two hours, over a 24-hour period (composite samples), in November, 2010 and April, 2013. The samples were preserved onsite with sodium azide (200 gr L⁻¹), stabilized with ascorbic acid (20 gr L⁻¹), and then transported to the lab. Samples were stored at 4 °C prior to analysis.

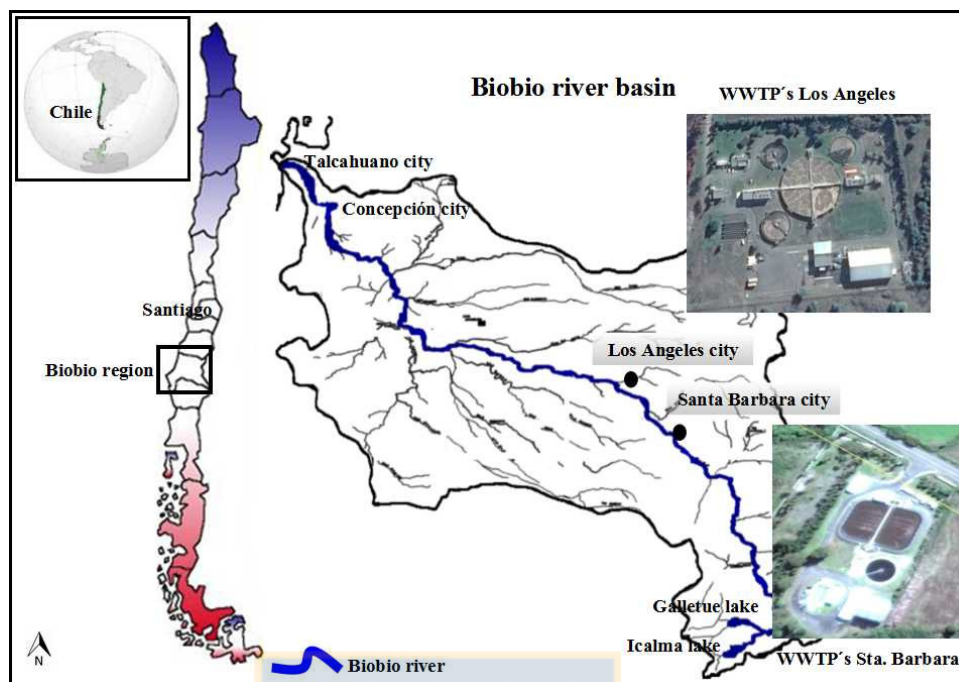


Figure 1. Map of the Biobio river basin, Chile. The location of the WWTPs studied are in the cities of Santa Barbara and Los Angeles, respectively.

Table 1. Characteristics of WWTPs in Santa Barbara and Los Angeles cities, Biobío river basin, Chile.

Wastewater treatment plant city	Population 2010 / 2013 ^a	Mean flow (m ³ /day) in 2010/2013	Treatment	Additional treatment	Source of wastewater ^b
Sta. Barbara	14,271/14,387	950/1,123	Activated sludge	Chlorine disinfection	Domestic
Los Angeles	166,556/187,494	38,880/41,472	Activated sludge	Chlorine disinfection	Domestic Industrial

^a National Institute of Statistics,(INE), 2002/2012

^b Director of Sanitary Services, (SISS) 2014 (personal comm)

2.2 Sample extraction

The emerging contaminants analysed are representative of commonly used pharmaceuticals in human medicine, including analgesics, anti-inflammatory, β -blockers, anti-fungal agents, and anti-convulsants and reported them in published literature. These have a high sales rate and are commonly used for the inhabitants of the Biobio river basin. Pharmaceuticals and selected contaminants from wastewater samples were extracted by solid phase extraction (SPE). Samples were spiked with

deuterated standards (with the exception of lincomycin and monensin since isotopically labelled standards were unavailable) prior to extraction to compensate for possible matrix effects from the analysis. Oasis HLB cartridges (6cc, 500 mg) were used to extract a wide variety of neutral and acidic compounds from the samples. Manual extractions were completed using a Supelco SPE vacuum manifold (Pennsylvania, USA). Cartridges were preconditioned sequentially with methanol, methyl tert-butyl ether (MTBE) and water prior to the addition of 100 mL sample at a flow rate of ~ 5mL/min. Cartridges were eluted with methanol and methanol:MTBE (10:90 v/v), dried to dryness with a gentle stream of nitrogen gas and reconstituted with 500 μ L of methanol plus internal standards (lorazepam and chloramphenicol). Samples are stored at -20 °C until analysis.

2.3 HPLC MS/MS analysis

Analysis of the contaminants of interest was completed using a 1200 Agilent LC with a Sciex API 3200 QTRAP MS with electrospray ionization using multiple reaction monitoring (California, USA). The column used was an Agilent Eclipse XBD-C18 (5 μ m x 4.6 mm x 150mm). Samples were injected in both positive and negative modes for more sensitivity of particular analytes (Table 2). An elution gradient at a flow rate of 0.8 mL/min was used for both positive and negative modes. Mobile phase A was water with 5 mM of ammonium acetate and mobile phase B was 100% methanol. The ion source parameters were tuned for the batch of compounds and are listed in the tables below for positive and negative mode. Other compound dependant parameters were tuned for each analyte as well and are available upon request. Optimized HPLC MS/MS parameters for the identification and quantification of the 16 emerging contaminants (e.g., mobile phases, source dependant parameters) are shown in the Supplementary Materials (SM) (Table S1 and Table S2).

Table 2. List of pharmaceuticals and selected contaminants analyzed.

	Name	Abbv	Mode	MDL (ng/L)	Precursor Ion	Product Ion	Relevance
1	Atenolol	ATEN	Pos	2	267	145	Beta Blocker
	Atenolol - d7				274	145	
2	Atorvastatin	ATOR	Pos	8	559	440	Lipid regulator
	Atorsvastatin - d5				564	445	
3	Carbamazepine	CBZ	Pos	1	237	174	Anti-epileptic
	Carbamazepine - d10				247	204	
4	Fluoxetine	FLU	Pos	3	310	44	Anti-depressant
	Fluoxetine - d5				315	44	
5	Limcomycin	LIN	Pos	1	407	126	Veterinary antibiotic
6	Sulfamethoxazole	SULF	Pos	1	254	156	Antibiotic
	Sulfamethoxazole - d4				258	160	
7	Trimethoprim	TRIM	Pos	1	291	261	Antibiotic
	Trimethoprim - d3				294	230	
8	e-carbamazepine	e-CB	Pos	10	253	174	Metabolite
	e-carbamazepine - d10	Z			263	190	
9	Caffeine	CAFF	Pos	10	195	123	Phsyco-stimulating
	Caffeine - d3				198	123	
10	Diclofenac	DCF	Neg	7	294	250	Anti-inflammatory
	Diclofenac - d4				298	254	
11	Naxopren	NPX	Neg	3	229	170	Anti-inflammatory
	Naxopren - d3				232	173	
12	Bisphenol A	BPA	Neg	4	227	211	Industrial chemical
	Bisphenol A - b16				241	142	
13	Triclocarban	TCCB	Neg	4	315	162	Antibacterial
	Triclocarban - d4				317	160	
14	Triclosan	TCS	Neg	10	287	35	Antibacterial
	Triclosan - d3				290	35	
15	Gemfibrozil	GFZ	Neg	3	249	121	Lipid regulator
	Genfibrozil - d6				255	121	
16	Ibuprofen	IBU	Neg	2	205	161	Anti-inflammatory
	Ibuprofen - d3				208	164	

Calibration curves in an appropriate range were completed before each sample batch was injected onto the instrument. Confirmation of peak shape, retention time and peak area was carried out before samples were analyzed. Each sample was injected once at a volume of 20 μ L. Methanol blanks were run in between each sample. The detection limits of all compound in clean water were below 10 ng L⁻¹.

3. Results and discussion

3.1 Physical-chemical parameters in WWTP effluents

Most of the physical-chemical parameters lists in Table 3 in WWTP effluents were below the limits of discharge. However, during the study three parameters in the effluents from Santa Barbara (2010) had higher levels than the regulatory limits. Those parameters were BOD₅ (biochemical oxygen demand), total phosphorus and TSS (total suspended solids) with levels of 47.4 mg O₂ L⁻¹ and 16.6 mg L⁻¹ and 84.5 mg L⁻¹, respectively (Table 3). During 2013 Los Angeles effluent showed higher levels than Santa Barbara effluent in the following parameters; total phosphorus (8.9 mg L⁻¹), Kjeldahl Total Nitrogen (36.5 mg L⁻¹), TSS (32.5 mg L⁻¹) and Fecal coliforms (300 MPN per 100 mL), while Santa Barbara's WWTP effluent evidenced higher BOD₅ (22.6 mgO₂ L⁻¹). However, those levels were under the regulatory limits. This is related to a major earthquake that occurred in the Biobio river basin in 2010, where Santa Barbara's WWTP was not working under normal standards (Director of sanitary services (SISS) 2010, personal comm).

Table 3. Effluent parameters of WWTP for the cities of Santa Barbara and Los Angeles, Biobio river basin, Chile.

Parameters	Los Angeles city		Santa Barbara city		Decree 90 ^a	Units
	2010	2013	2010	2013		
BOD ₅						
Total phosphorous	28.2	< 2.0	47.4	22.6	35	mgO ₂ /L
Total Nitrogen Kjeldahl	7.43	8.9	16.6	5.4	10	mg/L
pH	15.71	36.5	6.38	31.37	50	mg/L
TSS	6.49	6.57	6.55	6.32	6.0-8.5	-
Temperature	36.5	32.5	84.5	3.3	80	mg/L
Coliforms Fecal	18.1	18.3	19.6	19	35	°C
	400	300	500	< 2	1000	NMP/100 ml

a. Supreme Decree N° 90. Regulation Framework for wastewater discharges to marine and continental surface waters (Ministry of the Secretary-General of the President, Chile 2001).

The Chilean directive, according to Supreme Decree N° 90. Regulation Framework for wastewater discharges to marine and continental surface waters (Ministry of the Secretary-General of the President, Chile 2001), has strict parameters governing the effluents from wastewater treatment plants at the moment they are discharged into external water bodies.

3.2 Emerging contaminants (pharmaceuticals and personal care products, phyco-stimulating drugs and endocrine disruptors).

16 emerging compounds were detected in Los Angeles and Santa Barbara WWTPs effluents respectively. Overall, Los Angeles WWTP effluents showed higher concentrations than Santa Barbara WWTP in emergents contaminants. In addition, was observed a temporal increase from 2010 to 2013 in the concentrations the selected compounds in both cities.

Three pharmaceuticals drugs (diclofenac, ibuprofen and naxopren) occur in higher concentrations in the effluents of the Los Angeles (Table 4) in both 2010 and 2013. For example, diclofenac had higher concentration in 2013 (concentrations equivalent to $701.7 \pm 31.6 \text{ ng L}^{-1}$ and $1,945 \pm 111.3 \text{ ng L}^{-1}$ in Santa Barbara and Los Angeles, respectively) than concentrations detected in 2010 ($81.3 \pm 13.5 \text{ ng L}^{-1}$ and $158 \pm 72.6 \text{ ng L}^{-1}$ (Table 4).

The levels of anti-inflammatory drugs found in this study are comparable with concentrations observed in other parts of the world. (Ternes 1998) evidenced concentration values between ranges of 800 - 2,100 ng L^{-1} . More recent investigations show a range between $<0.001 - 0.69 \mu\text{g L}^{-1}$ for countries like Greece, Korea, Spain, and China (Behera et al. 2011; Gracia-lor et al. 2012; Loos et al. 2013; Stamatis and Konstantinou 2013; Stamatis et al. 2010 and Zhou et al. 2010). Therefore the concentrations of these drugs in the effluents of Santa Barbara and Los Angeles are

found to be within these global margins, and especially Los Angeles (2013) is above the upper limit in a global scenario.

The three pharmaceutical drugs (diclofenac, ibuprofen and naxopren) high concentrations in the effluents of Los Angeles during 2010 and 2013 could be reflecting the size of the population, as Los Angeles has a population of approximately 180,000 inhabitants and Santa Barbara approximately 14,000 habitants.

Carbamazepine and its metabolite e-carbamazepine, were present higher concentrations in Los Angeles than Santa Barbara in 2010 and 2013 (Table 4). However the concentration in of the metabolite e-carbamazepine both cities increase in 2013 higher with values of $1,285 \pm 20.8$ and $1,345 \pm 52.6$ ng L⁻¹ (Santa Barbara and Los Angeles, respectively). These results are lower than those described by Jurado et al. (2014) who analysed effluents from the northeast of Spain (Part of Barcelona ~ 40,984 inhabitants), where the concentrations of carbamazepine and e-carbamazepine were from 13 - 426 ng L⁻¹ and 4 - 7,480 ng L⁻¹, respectively.

Fluoxetine was found both effluents Santa Barbara and Los Angeles with concentrations of 25.6 ± 2.0 ng L⁻¹ and $27.53 \pm 1.$ ng L⁻¹ in 2010 and 19.15 ± 5.5 ng L⁻¹ and 32.65 ± 14.7 ng L⁻¹ in 2013, for respectively. These concentrations are lower than those reported by Hedgespeth et al. (2012) ($56 - 60$ ng L⁻¹) for the city of Charleston, South Carolina, USA, with a populations similar to what we observed in Los Angeles city (~ 180,000 inhabitants) and with a WWTP similar to those studied for this investigation.

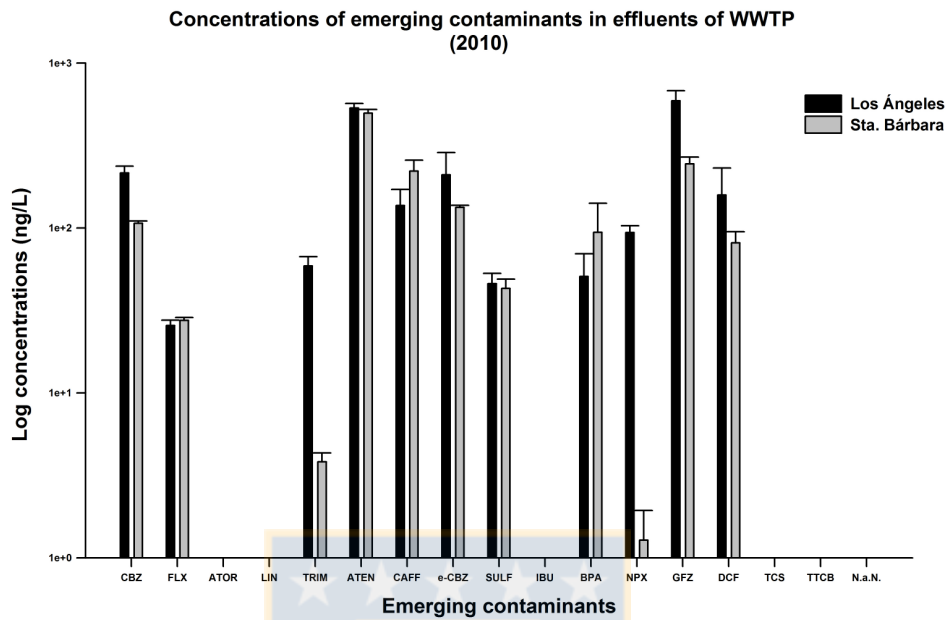
Gemfibrozil concentrations in effluents from WWTPs in Santa Barbara and Los Angeles were higher in 2013 ($1,056.7 \pm 39.1$ and $29,783.3 \pm 145.2$ ng L⁻¹) than 2010 (245 ± 24.1 and 591.3 ± 88.7 ng L⁻¹) (Table 4). Furthermore, the effluent from Los Angeles displayed higher concentrations in both years. The levels of gemfibrozil observed in effluents from WWTPs in Santa Barbara and Los Angeles are not far from the global scale because the range being handled is from 0.0025 to 5.24 µg L⁻¹ (Lou et al. 2014). Atorvastatin was only found in the effluents from Los Angeles city in 2013,

with levels as high as $518.5 \pm 22.2 \text{ ng L}^{-1}$ (Table 4). These results are higher than those described by Loos et al. (2013) ($1 - 72.9 \text{ ng L}^{-1}$) in the EU.

Trimethoprim, sulfamethoxazole and limcomycin (antibiotics) were found in both cities of Santa Barbara and Los Angeles WWTPs effluents (Table 4). The order of concentrations was sulfamethoxazole > limcomycin > trimethoprim. Limcomycin was only detected in 2013, in the effluent from the city of Los Angeles at a concentration of $464,8 \pm 13.9 \text{ ng L}^{-1}$. The highest concentration corresponds to the antibiotic sulfamethoxazole ($615 \pm 60.8 \text{ ng L}^{-1}$), present in the effluent of Los Angeles (Fig 2b) in 2013.



(a)



(b)

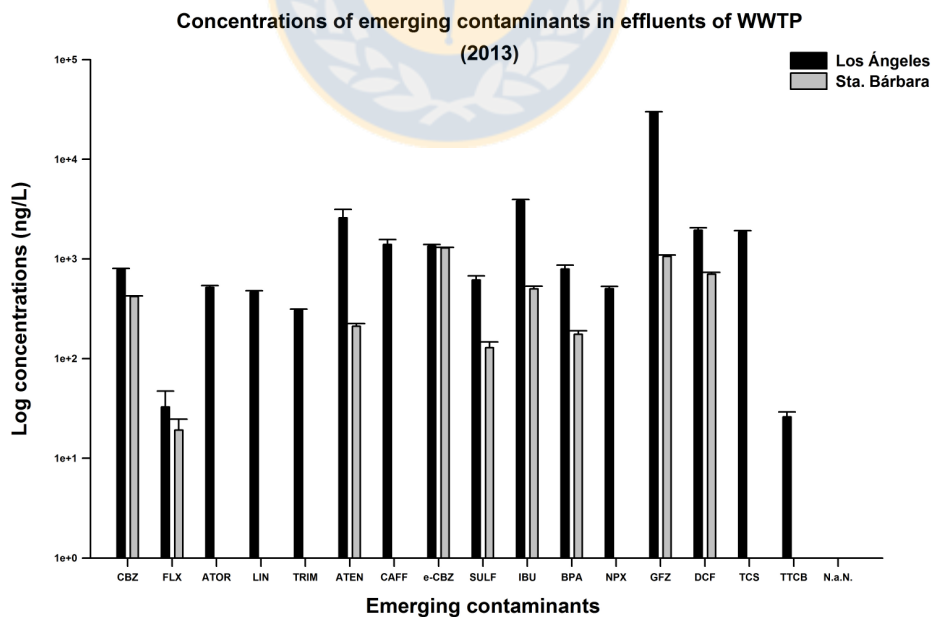


Figure 2. Log-transformed concentrations of emerging contaminants (ng L^{-1}) in effluents from the WWTPs in the cities of Los Angeles and Santa Barbara. (a) november, 2010 and (b) april, 2013.

β -blockers such as atenolol were been found in municipal wastewater effluent in a concentration range from $211.5 \pm 13.2 \text{ ng L}^{-1}$ to $2,590 \pm 550.1 \text{ ng L}^{-1}$ (Table 4). The highest concentrations were found in the effluent in Los Angeles in 2013 (Fig 2b). The concentrations found are consistent with those reported by Terzic et al. (2008) ($< \text{LOD} - 7,560 \text{ ng L}^{-1}$ in wester Balkan) and Alder et al. (2010) (range $360 - 1,330 \text{ ng L}^{-1}$ by three WWTP's effluents in Switzerland, with a range of population of 33,000 - 51,000 habitants).

During this study the antimicrobials, triclosan and triclocarban, were detected at concentrations of $1,856.7 \pm 71.8$ and $25.97 \pm 3.1 \text{ ng L}^{-1}$ respectively, in the effluent only from the WWTP located in Los Angeles city, 2013 (Fig 2b). The present study reports concentrations similar of triclosan and triclocarban to those observed by Kosma et al. (2014), for a Mediterranean climate zone city in Greece (Veria), with concentration of $1,742.5 \text{ ng L}^{-1}$ in the effluent, but only with third of the population (approximately 45,000 inhabitants) compared to Los Angeles City.

Caffeine levels in this study were between $137 \pm 34.4 - 221.17 \pm 36.5 \text{ ng L}^{-1}$ in 2010 (Los Angeles and Santa Barbara WWTP respectively). An increase in caffeine concentration was observed in Los Angeles WWTP effluents in 2013 with a concentration an order of magnitude higher ($1,395 \pm 167.8 \text{ ng L}^{-1}$), while levels of caffeine in Santa Barbara were below the detection limit (Fig 2b, Table 4). The observed levels of caffeine in this study are below these ranges of concentrations reported by Santos et al. (2009) with caffeine concentrations values up to $1,680 \text{ ng L}^{-1}$ for eastern Spain and $2,320 \text{ ng L}^{-1}$ for western Spain.

Table 4. Mean concentrations of the 16 emerging contaminant (ng L⁻¹ ± standard error) in effluents from wastewater treatment plants in the cities of Santa Barbara and Los Angeles, Biobio rive basin, Chile. Samples were collected in november, 2010 and april, 2013. WWTP effluent column represent references to worldwide reported levels. ND: Not detected.

	Los Angeles city		Santa Barbara city		WWTP effluent	References
	2010	2013	2010	2013		
Anti-inflammatories						
Ibuprofen	n.d	3,800 ± 148.4	n.d	500 ± 31.6	800 - 2,100 < 1 - 690	1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7
Naxopren	93.8 ± 9.4	503.7 ± 25.8	1.3 ± 0.6	n.d	< 2 - 5,090	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, & 12
Diclofenac	158 ± 72.6	1,945 ± 111.3	81.3 ± 13.5	701.7 ± 31.6	< 1 - 690	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 & 12
Anti-convulsants/antidepressants						
Carbamazepine	216 ± 21.4	778 ± 24.2	107 ± 3.3	420 ± 5.0	13 - 426	17
e-carbamazepine	210.5 ± 76.4	1,345 ± 52.6	133.3 ± 4.0	1,285 ± 20.8	4 - 7,480	17
Fluoxetine	25.6 ± 2.0	32.65 ± 14.7	27.53 ± 1.1	19.15 ± 5.5	56 - 60	18
Lipid regulator						
Gemfibrozil	591.3 ± 88.7	29,783.3 ± 145.2	245 ± 24.1	1,056.7 ± 39.1	2.5 - 5,240	19
Atorvastatin	n.d	518.5 ± 22.2	n.d	n.d	<1 - 72.9	4
Antibiotics						

Trimethoprim	58.92 ± 8.0	305.17 ± 8.1	3.8 ± 0.5	n.d	< 10 - 3,050	2, 3, 4, 7, 8, 11 & 13
Sulfamethoxazole	45.93 ± 7.1	615 ± 60.8	43.02 ± 6.0	128.7 ± 18.4	< 3 - 1,150	2, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 13 & 14
Lincomysin	n.d	464.8 ± 13.9	n.d	n.d	<1 - 317	4

β-blockers

Atenolol	534.5 ± 33.9	2,590 ± 550.1	497 ± 26.5	211.5 ± 13.2	130 - 7,600	3, 8, 9, 11 & 15
----------	--------------	---------------	------------	--------------	-------------	------------------

Disinfectant

Triclosan	n.d	1,856.7 ± 71.8	n.d	n.d	1,742.5	20
Triclocarban	n.d	25.97 ± 3.1	n.d	n.d	91.7 - 136	16

Stimulant drugs

Caffeine	137 ± 34.4	1,395 ± 167.8	221.17 ± 36.5	n.d	1,680 - 2,320	9
----------	------------	---------------	---------------	-----	---------------	---

Endocrine disruptor

Bisphenol A	50.8 ± 18.9	791.7 ± 73.8	94.2 ± 47.3	175.2 ± 15.3	6 - 4,090	21
-------------	-------------	--------------	-------------	--------------	-----------	----

1. Ternes 1998; 2. Behera et al. 2011; 3. Gracia-Lor et al. 2012; 4. Loos et al. 2013; 5. Stamatis and Konstantinou 2013; 6. Stamatis et al. 2010; 7. Zhou et al. 2010; 8. Kasprzyk-Hordern et al. 2009; 9. Santos et al. 2009; 10. Singer et al. 2010; 11. Terzic et al. 2008; 12. Zorita et al. 2009; 13. Choi et al. 2008a; 14. Martin et al. 2010; 15. Alder et al. 2010; 16. Zhao et al. 2013; 17. Jurado et al. 2014; 18. Hedgespeth et al. 2012; 19. Luo et al. 2014; 20. Kosma et al. 2014; 21. Deblonde et al. 2011.

As for many other emerging contaminants in this study, bisphenol A, showed a temporal and a spatial difference. In 2010, concentrations were higher in Santa Barbara than Los Angeles city (94.2 ± 47.3 ; 50.8 ± 18.9 ng L⁻¹ respectively). This changed during 2013, when effluents from Los Angeles showed 791.7 ± 73.8 ng L⁻¹ compared to 175.2 ± 15.3 ng L⁻¹ found in the effluents from Santa Barbara (Table 4). The levels found in this study, however, are in the low end range of the reported concentrations by Deblonde et al. (2011). They analysed 45 scientific published papers between 1997 and 2010, which concluded that the range of concentration of bisphenol A in effluents of wastewater treatment plants corresponded to 6 ng L⁻¹ - 4,900 ng L⁻¹.

The spatial difference found between Los Angeles and Santa Barbara could be due to the type of effluent that the WWTP receives. Los Angeles city wastewater is coming from paper recycling plants, or the plastics industry, so the concentrations are much higher than wastewater treatment plants receiving only inflowing wastewater from domestic origins, like Santa Barbara.

3.3 Toxicological effects of emerging contaminants (pharmaceuticals and personal care products, psycho-stimulating drugs and endocrine disruptors).

Gemfibrozil ($29,783$ ng L⁻¹), ibuprofen ($3,800$ ng L⁻¹), atenolol ($2,590$ ng L⁻¹), diclofenac ($1,945$ ng L⁻¹), triclosan ($1,856.7$ ng L⁻¹), caffeine ($1,395$ ng L⁻¹) and e-carbamazepine ($1,345$ ng L⁻¹) presented high concentrations in the effluent from the Los Angeles wastewater treatment plant in 2013. This trend is evident in most of the chemicals analysed, with the highest concentrations in effluents from the Los Angeles plant in 2013. This could be explained by the relative difference in the population served by the respective treatment plants, with the city of Los Angeles having a greater population (approximately 180,000 inhabitants). Additionally it must be considered that in Los Angeles, the origin of the effluents is both domestic and industrial, whereas for the city of Santa Barbara it is only domestic. Other concentrations of emerging contaminants were $< 1,0$ µg L⁻¹, therefore only the previous contaminants were considered as environmentally relevant (e.i. > 1 µg L⁻¹).

The gemfibrozil, the concentration found in our study (29,782 ng L⁻¹) was higher than previous published values by Galus et al. (2014). The authors demonstrated that chronic exposure of adult zebrafish to gemfibrozil (10,000 ng L⁻¹ for 6 weeks) is sufficient to reduce breeding success and fecundity, alter courtship behaviours and sperms morphology and velocity in offspring. This may lead to a potential risk of gemfibrozil over the aquatic biota in the Biobio river.

The ibuprofen concentration found in our study (3,800 ng L⁻¹) was lower than levels reported by Morthorst et al. (2013) and Kyunghhee et al. (2013). Morthorst et al. (2013) shown that ibuprofen (21, 201 or 506 µg L⁻¹ for 7 days) reduced prostaglandin E₂ (PG₂) levels in male and female zebrafish but had no consistent effects on other investigated reproductive parameters (e.g. vitellogenin levels, gonadosomatic index or cumulative egg production), whereas that Kyunghhee et al. (2013) demonstrated that ibuprofen (≥ 1 µg L⁻¹ by 21 days) caused adverse effects on reproduction and the development of offspring of zebrafish.

In this study atenolol, which concentration was of 2,590 ng L⁻¹. This concentration was lower than the level reported values by Steinbach et al. (2013). Atenolol (1 µg L⁻¹ - environmentally relevant concentration, 10 µg L⁻¹ and 1000 µg L⁻¹ by 21 and 42 days) did not cause mortality and significant differences in the studied morphological endpoints such as length, weight, condition factor, hepatosomatic, gonadosomatic and cardio-somatic index in the exposed fish compared to control.

The diclofenac, the concentration found (1,945 ng L⁻¹) was lower than levels reported by Stepanova et al. (2013) and Nassef et al. (2010). Stepanova et al. (2013) showed that the chronic exposure of embryos and larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) to diclofenac (3 mg L⁻¹ by 30 days) was associated with increased mortality, increased activity of glutathione S-transferase, and decreased activity of glutathione reductase,. Similarly, Nassef et al. (2010) demonstrated that diclofenac (1.0 mg L⁻¹ by 5-9 days) altered the feeding performance adults of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*).

The triclosan, the concentration found in our study ($1,857 \text{ ng L}^{-1}$) was lower than the values shown by Liang et al. (2013) and Nassef et al. (2010). Liang et al. (2013) found an acute toxicity ($\text{LC}_{50-96 \text{ hrs}}$) of 1.47 mg L^{-1} . The results showed that triclosan was a typical inducer to Phase I and Phase II metabolism enzymes and genes, suggesting it is a potential ecotoxicological risk to aquatic ecosystems, whereas than Nassef et al. (2010) demonstrated that triclosan (0.17 mg L^{-1} by 5-9 days) altered the feeding performance adults of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*).

The e-carbamazepine, wich concentration in this study was $1,345 \text{ ng L}^{-1}$, this contaminant showed lower level than Li et al. (2011). The authors demonstrated that carbamazepine ($\text{LC}_{50-96 \text{ hrs}}$ value of 19.9 mg L^{-1}) cause adverse effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD.

4. Conclusion

This investigation shows the presence of 16 emerging contaminants in WWTP effluents in two cities (Los Angeles and Santa Barbara) in the Biobío river basin of Chile. This is a pioneer research in Chile and it is an exploratory study in this type of research. For this reason it is important to take note of this study as it is a first attempt to approximate the composition of effluents in the wastewater treatment plants. A broad selection of chemicals were chosen to be studied for this project showing the wide range of possible contaminants expected to be found in WWTP effluent.

The highest observed concentrations correspond to gemfibrozil, ibuprofen, atenolol, diclofenac, triclosan, caffeine and e-carbamazepine in the effluent from the Los Angeles wastewater treatment plant in 2013. This trend is evident in most of the chemicals analysed, with the highest concentrations in effluents from the Los Angeles plant in 2013. Chile, specifically within the Biobio region, is no uncommon to observe emerging contaminants in the ecosystem. However it is also important to highlight that the observed concentrations from this investigation were founded to be similar or below those reported on a global scale. It is relevant to consider the gemfibrozil compound as it was found at a concentration ($29,782 \text{ ng L}^{-1}$) which can generate

reproductive effects in fish, it is interesting to investigate further. This opens an window of opportunity important for more research into the effluents from WWTPs in Chile.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Los Angeles and Santa Barbara (Essbio) treatment plants for their constant support and good disposition. Funding was provided by Becas for doctoral studies in Chile, 2009 (No. 21090501) and a support grant for carrying out the doctoral thesis, 2010 (No. 24100142). Funding support was also provided by the Financing Fund for Research Centres in Areas of Priority (FONDAP CONICYT) CRHIAM 150085.



References

- Alder, A.C., Schaffner, C., Majeswky, M., Klasmeier, J., & Fenner, K. (2010). Fate of β -blocker human pharmaceuticals in surface water: comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Water Research*; 44, 936-948.
- Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*; 22, 1015-1051.
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.E., & Park, H.S. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the Total Environment*; 409, 4351-4360.
- Brooks, B.W., Huggett, D.B., & Boxall, A.B.A. (2009). Pharmaceuticals and personal care products: research needs for the next decade. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 28, 2469–2472.
- Choi, K., Kim, Y., Park, J., Park, C.K., Kim, M., & Kim, H.S. (2008a). Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of the Total Environment*; 405, 120-8.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*; 214, 442-448.
- ESSBIO. (2014). Wastewater treatment. The Biobio Sanitary Services Company. Biobio region, Chile.
https://www.essbio.cl/nosotros/nosotros_tratamiento_de_aguas_servidas.php. Accessed 15 July 2014.
- Galus, M., Rangarajan, S., Lai, A., Shaya, L., Balshine, S., & Wilson, J. (2014). Effects of chronic, parental pharmaceutical exposure on zebrafish (*Danio rerio*) offspring. *Aquatic Toxicology*; 15, 124-134.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R. & Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*; 87, 452-462.

- Hedgespeth, M., Sapozhnikova, Y., Pennington, P., Clum, A., Fairey, A. & Wirth, E. (2012). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Science of the Total Environment*; 437, 1-9.
- Jurado, A., López-Serna, R., Vásquez-Suñé, E., Carrera, J., Pujades, E., Petrovic, M., & Barceló, D. (2014). Occurrence of carbamazepine and five metabolites in an urban aquifer, doi: 10.1016/j.chemosphere. 2014.01.014.
- Karrasch, B., Parra, O., Cid, H., Mehrens, M., Pacheco, P., Urrutia, R., Valdovinos, C., & Zaror, C. (2006). Effects of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. *Science of the Total Environment*; 359, 194-208.
- Kasprzyk- Hordern, B., Dinsdale, R.M., & Guwy, A.J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*; 43, 363-380.
- Kosma, C., Lambropoulou, D. & Albanis, T. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*; 466-467, 41-38.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J. & Barceló, D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*; 358, 112-123.
- Kyunghee J., Liu, X., Saeram, L., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J., & Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*; 254-255, 242-251.
- Lacey, C., Basha, S., Morrissey, A., & Tobin, J. (2012). Occurrence of pharmaceuticals compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. *Environmental Monitoring and Assessment*; 184, 1049-1062.
- Le Minh, N., Khan, S.J., Drewes, J.E., & Stuetz, R.M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*; 44, 4295–323.

- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Koavora, J., Li, P., & Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidants responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 74, 319-327.
- Liang, X., Nie, X., Ying, G., An, T., & Li, K. (2013). Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by multi-biomarkers approach. *Chemosphere*; 90, 1281-1288.
- Lishman, L., Smyth, S., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., & Seto, P. (2006). Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*; 367, 544-558.
- Loos, R., Carvalho, R., António, D.C., Comero, S., Locoro, G., & Tavazzi, S. (2013). E-U wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*; 47, 6475-6487.
- Lou, Y., Gwo, W., Ngo, H., Nghiem, L., Hai, F., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*; 473-474, 619-41.
- Ministry of the Secretary-General of the President. Supreme Decree N° 90. (2001). Emission rules for the regulation of contaminants associated with the discharge of residual liquids to marine and continental surface waters, Chile. <http://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=182637>. Accessed 15 July 2014.
- Martin, R.S., Esperanza, M., Choubert, J., Valor, I., Budzinski, H., & Coquery, M. (2010). On-site evaluation of the efficiency of conventional and advanced secondary processes of the removal of 60 organic micropollutants. *Water Research*; 62, 2970-2978.
- Morthorst, J., Lister, A., Bjerregaard P., & Van der Kraak, G. (2013). Ibuprofen reduces zebrafish PG₂ levels but steroid hormones levels and reproductive parameters are not affected. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*; 157, 251-257.
- Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Khalil, F., Kang, I. J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., & Honjo, T. (2010). Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on

- feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*; 80, 1095-1100.
- National Statistic Institute (INE). (2002). Population Census. Ministry of Economy, Chile. <http://www.ine.cl/cd2002/>. Accessed 15 July 2014.
- National Statistic Institute (INE). (2012). Population Census. Ministry of Economy, Chile. http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/familias/censos.php. Accessed 15 July 2014.
- Nuñez, E. (2010). Water pollution in the region of Maule and Biobío. *Interamerican Journal of Environment and Tourism*; 6, 61-68.
- Parra, O., & Faranda, F. (1993). Assessment of water quality, and riverine and limnetic system ecology of the Biobio river system. Concepcion, Chile: *University of Concepcion*.
- Parra, O., Valdovinos, C., Habit, E., & Figueroa, R. (2004). Water quality monitoring programme for the Biobio river system. Technical report, Eula-Chile Environmental Science Centre. Concepcion, Chile: *University of Concepcion*.
- Santos, J., Aparicio, I., Callejón, M., & Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of Hazardous Materials*; 164, 1509-1516.
- Singer, H., Jaus, S., Hanke, I., Luck, A., Hollender, J., & Alder, A.C. (2010). Determination of biocides and pesticides by online solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environmental Pollution*; 158, 3054-3064.
- Stamatis, N., Hela, D., & Konstantinou, I. (2010). Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*; 175, 829-835.
- Stamatis, N.K., & Konstantinou, I.K. (2013). Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant Western Greece. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*; 48, 800-813.
- Steinbach, C., Burkina, V., Federova, G., Grabicova, K., Velisek, J., Zlabek, V., Randak, T., Schmidt-Posthaus, H., Grabic, R., & Kroupova, H. (2013). The

sub-lethal toxic effects and bioconcentration of the human pharmaceutical atenolol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment*; 497-498, 209-218.

Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Plhalova, L., Prokes, M., Blahova, J., & Svobodova, Z. (2013). The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 35, 454-460.

Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*; 32, 3245–3260.

Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., & Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*; 225, 81-90.

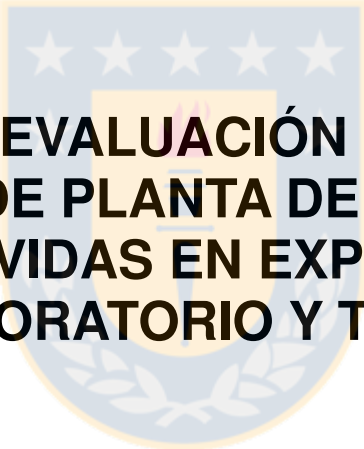
Terzic, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrovic, M., & Barcelo, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment*; 399, 217-223.

Zhao, J.L., Zhang, Q.Q., Chen, F., Wang, L., Ying, G.G., Liu, Y.S., Yang, B., Zhou, L.J., Su, H.C., & Zhang, R.Q. (2013). Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modelling tools: Implications for controlling of urban domestic sewage discharge. *Water Research*; 47, 395-405.

Zhou, X., & Oleszkiewicz, J.A. (2010). Biodegradation of oestrogens in nitrifying activated sludge. *Environmental Technology*; 31, 1263-1269.

Ziylan, A., & Ince, N.H. (2011). The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non conventional processes. *Journal of Hazardous Materials*; 187, 24–37.

Zorita, S., Martensson, L., & Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*; 407, 2760-2770.



**Capítulo IV: EVALUACIÓN DE EFECTOS DE
EFLUENTES DE PLANTA DE TRATAMIENTO DE
AGUA SERVIDAS EN EXPERIMENTOS DE
LABORATORIO Y TERRENO**

Respuestas bioquímicas y reproductivas en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* expuesto a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en condiciones de laboratorio y directamente en el ambiente en 2 localidades (ciudades de Los Angeles y Sta. Barbara) de la cuenca del río Biobio, Chile.

Maria F. Saavedra¹, Gustavo Chiang², Felipe Tucca¹, Gerald Tetreault³, Mauricio Díaz-Jaramillo⁴, Mark R. Servos³ & Ricardo Barra¹.

¹Aquatic Systems Department, Faculty of Environmental Sciences and EULA Chile Centre, University of Concepcion, Concepcion, Chile.

²Centro MERI. Lo Beltrán 2347, Vitacura, Santiago, Chile.

³Canada Rivers Institute and Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, ON Canada.

⁴Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Ambiental, IIMyC-CONICET-UNMdP, Argentina.

*Saavedra MF, Chiang G, Tucca F, Tetreault G, Díaz-Jaramillo M, Servos M, Barra R. (en preparación). Respuestas bioquímicas y reproductivas en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* expuesto a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en condiciones de laboratorio y directamente en el ambiente en 2 localidades (ciudades de Los Angeles y Sta. Barbara) de la cuenca del río Biobio, Chile. Environmental Toxicology and Chemistry (ET & C).*

Resumen

Para evaluar el efecto de efluente de planta de tratamiento de aguas servidas, se expusieron peces juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) por períodos de tiempos 7, 14 y 21 días a diferentes concentraciones de efluente (control, 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100%). Además se realizaron experimentos en terreno, seleccionando sitios de pre-impacto, impacto y post-impacto en el estero Quilque y río Biobio, respectivamente (considerando la descarga de efluente de aguas servidas con el cual se realizaron los experimentos de laboratorio), en cada sitio se expusieron

jaulas con truchas juveniles por períodos de 7, 14 y 21 días. Índices somáticos (hepatosomático, gonadosomático y factor de condición), inducción EROD, actividad glutathion-s-transferasa (GST), parámetros hematológicos, niveles hormonales circulantes (testosterona, 17 β -estradiol) y histología gonadal fueron evaluados. Los resultados mostraron para los experimentos en laboratorio valores mayores en todas las respuestas medidas para el experimento con el efluente Los Angeles. Se evidenció una tendencia de aumento de valores en inducción de EROD, GST niveles hormonales circulantes, hematocrito, recuento de eritrocitos a mayores concentraciones en los tiempos 7, 14 y 21 días, siendo la concentración 100%, los valores más altos. Esta misma tendencia se encontró para el experimento en terreno en el estero Quilque, con valores mayores que el experimento del río Biobío. Se evidenciaron efectos bioquímicos, alteraciones reproductivas e inmunes en todos los experimentos (laboratorio y terreno), siendo los resultados obtenidos a la concentración 100%, similares o mayores con lo obtenido en sitio de impacto y post-impacto de los experimentos de terreno.

Keywords: efluente, planta de tratamiento de aguas servidas, *O. mykiss*, respuestas inmunes, alteraciones reproductivas y estrés oxidativo.

1. Introducción

Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) son mezclas muy complejas, que liberan altos niveles de contaminantes al ambiente (Suntio et al. 1988 y Woodworth et al. 1999). Grandes cantidades de químicos provienen de fuentes como desechos domiciliarios, industriales y hospitalarios, convirtiendo al efluente en una mezcla de difícil degradación (Paxeus 2004, Paxeus y Schroder 1996). Variados estudios han demostrado que efluentes de plantas de tratamiento de agua servidas pueden afectar distintos niveles fisiológicos en organismos acuáticos (Svenson et al. 2002, Hoeger et al. 2004 y Sepulveda et al. 2004).

Existen evidencias de que los efluentes de PTAS causan estrés oxidativo en peces generando efectos subletales como daño oxidativo de proteínas y lípidos (Livingstone

2001 y Yeom et al. 2007). El uso de parámetros de estrés oxidativo en estudios de campo toxicológico esta asociado a defensas antioxidantes (Van Der Oost et al. 2003). Oakes et al. 2004 y Sturve et al. 2008, mencionan que los contaminantes encontrados en PTAS generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden significar una fuente de toxicidad para los organismos acuáticos que viven en ambientes influenciados con descargas de efluentes de PTAS causando disrupciones fisiológicas.

La exposición de peces a efluentes de PTAS ha demostrado diversos efectos adversos en la salud de ellos, incluyendo inmunosupresión (Hoeger et al. 2005), alteraciones en la actividad hepática fase I y enzimas de biotransformación fase II (Gagne et al. 2006 y Hoeger et al. 2005). La inmunosupresión puede llevar al aumento de la susceptibilidad a enfermedades y la alteración metabólica puede conducir a la acumulación de contaminantes tóxicos ó a la producción de metabolitos reactivos pudiendo llevar a la muerte de los organismos (Filby et al. 2007 y Liney et al. 2006). En peces como en otros vertebrados los sistemas inmune y endocrino están interrelacionados y los cambios endocrinológicos en peces pueden ser reflejados en cambios en el funcionamiento de las funciones del sistema inmune (Salo et al. 2007).

Estudios se han focalizado en los efectos de los efluentes de PTAS sobre el sistema inmune de peces tanto *in-vivo* como *in-vitro*; reducción de número de linfocitos circulantes en *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* (Narnaware y Baker 1996), decaimiento de producción de anticuerpos y células productoras de anticuerpos en *O. mykiss* (Anderson et al. 1982). El uso de parámetros hematológicos en teleósteos como indicadores de los cambios fisiológicos y bioquímicos producidos por distintos factores, se sustenta en su sensibilidad para determinar los efectos a exposiciones agudas y crónicas de distintos factores (contaminación, estrés, patógenos entre otros), evaluando la relación de los parámetros hematológicos con la función respiratoria a través de la serie roja (eritrocitos) y con los mecanismos defensivos por medio del estudio de la serie blanca (leucocitos) (Harder, 1975).

Se ha correlacionado la exposición a efluentes de PTAS con alteraciones en los niveles de hormonas esteroides en adultos y peces juveniles (Folmar et al. 1996 y Hecker et al. 2002), el desarrollo gonadal alterada en adultos y juveniles (Hemming et al. 2001 y Jobling et al. 2002) y la inducción de la proteína vitelogenina (VTG) en machos adultos y juveniles (Harries et al. 1999, Purdom et al. 1994 y Rodgers-Gray et al. 2001). Estos efectos se han asociado con la presencia de contaminantes químicos en los efluentes que actúan como agonistas del receptor de estrógeno, incluyendo los esteroides naturales y sintéticos (Desbrow et al. 1998 y Routledge et al. 1998), de alquilfenoles polietoxilados (Gimeno et al. 1997 y Gronen et al. 1999) y los ftalatos y pesticidas (Ankley et al. 2001 y Christiansen et al. 2000).

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas sobre juveniles de *Oncorhynchus mykiss*. Utilizando a esta especie como modelo biológico en condiciones de laboratorio con el fin de entender cómo los efluentes pueden afectar la fisiología de los peces, causando estrés oxidativo, alteraciones reproductivas e inmunes. Estas respuestas fueron comparadas con experiencias en terreno realizadas con la misma especie a modo de evidenciar los efectos en condiciones de tiempo y espacio reales.

2. Materiales y métodos

2.1 Bioensayos de laboratorio

Se realizaron bioensayos con ejemplares juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluente de plantas de tratamiento de aguas servidas de las ciudades de Los Angeles y Sta. Barbara, respectivamente (octubre y noviembre_2010, respectivamente). Las unidades experimentales utilizadas fueron de 60 L y las concentraciones de 0% (control), 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% efluente en ambos experimentos. La exposición fue crónica (21 días) realizándose muestreos al día 0, 7, 14 y 21. Los recambios de efluente fueron realizados cada 3 días y los parámetros ambientales (conductividad, pH y temperatura) fueron medidos diariamente.

Los ejemplares juveniles de *O. mykiss* fueron obtenidos de la piscicultura Salmones Antártica S.A. (Sta. Barbara, Chile). Los peces fueron aclimatados en el laboratorio durante 1 semana antes de comenzar los experimentos. Se utilizaron 30 peces por unidad experimental con un peso de 119.81 ± 1.37 gr y talla de 23.77 ± 0.13 cm para el bioensayo con el efluente de PTAS de la ciudad de Los Angeles, mientras que para el efluente de PTAS de la ciudad de Sta. Barbara un peso de 103.29 ± 1.31 gr y talla de 23.53 ± 0.10 cm. 10 individuos fueron muestreados antes de comenzar los experimentos a modo de control (T_0 , para evaluar su previo estado de salud), del mismo modo se muestrearon 10 peces a los tiempos de 0, 7, 14, y 21 días a las diferentes concentraciones de efluentes de PTAS, repectivamente. Se obtuvieron muestras de sangre, gónadas e hígado para posterior análisis bioquímicos, hematológicos e histológicos.

2. 2 Experimentos en terreno

Los experimentos en terreno fueron realizados seleccionando 3 lugares diferentes de muestreo, de acuerdo a la gradiente de descarga del efluente de PTAS. Estos lugares corresponden a sitios de pre-impacto (área de referencia, ubicada aguas arriba del área de impacto y libre de efluente de PTAS), impacto (área influenciada directamente por efluente de PTAS) y post-impacto (área ubicada aguas abajo del área de impacto y menos influenciada por el efluente de PTAS) para el estero Quilque (ciudad Los Angeles) y río Biobio (cuidad Sta. Barbara), repectivamente.

Sitios/coordenadas	Pre-impacto	Impacto	Post-impacto
Experimento estero Quilque (Los Ángeles)	37° 27'14.67'' S 72° 19'17.53'' O		37° 25'54.24'' S 72° 29'34.66'' O
Experimento río Biobio (Sta. Barbara)	37° 40'19.96'' S 72° 0'1.84'' O	37° 40'15.6'' S 72° 02'51.4'' O	37° 39'48.3'' S 72° 10'08.3'' O

Tabla 1. Coordenadas de ubicación para sitios de pre-impacto, impacto y post-impacto en estero Quilque (Los Angeles) y río Biobio (Sta. Barbara), respectivamente.

Los ejemplares juveniles de *O. mykiss* fueron obtenidos de la piscicultura Salmones Antártica S.A. (Sta. Barbara, Chile). Los peces fueron transportados en contenedores de polietileno de 250 L con constante oxigenación hacia las áreas experimentales. En cada jaula de 90 L, se colocaron 15 peces (2 jaulas por área) con un peso de 116.51 ± 1.12 gr y talla 22.02 ± 0.07 cm para el experimento en el río Biobio, mientras que para el experimento en el estero Quilque un peso de 111.49 ± 2.70 gr y talla 22.25 ± 0.07 cm. Las jaulas fueron sumergidas 3 a 4 metros durante 21 días de exposición (agosto-septiembre_2011). 10 individuos fueron muestreados antes de comenzar los experimentos a modo de control (T_0 , para evaluar su previo estado de salud), así mismo se muestrearon 10 individuos para los tiempos 7, 14 y 21 días en las diferentes áreas (pre-impacto, impacto y post-impacto) en el estero Quilque y río Biobio, respectivamente. Se obtuvieron muestras de sangre, gónadas e hígado para posterior análisis bioquímicos, hematológicos e histológicos.

2.3 Indices fisiológicos

Los índices fisiológicos de condición fueron calculados basándose en información morfométrica, como el factor de condición K ($100 * (\text{peso}/\text{talla}^3)$), índice gonadosomático ($100 * (\text{peso gónada}/\text{peso total})$) e índice hepatosomático ($100 * (\text{peso hígado}/\text{peso total})$).

2.4 Hormonas circulantes en plasma

La muestra de sangre (3 mL) de cada pez fue obtenida por punción caudal con jeringas plásticas humedecidas con heparina (5000 U/mL) en su interior y recibidas en tubos eppendorf con heparina. Estas muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante almacenado a -20°C para su posterior análisis. Los esteroides (testosterona para ambos sexos, 17-β estradiol para hembras y 11-ketotestosterona para machos) fueron cuantificados en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigación del agua (Burlington, ON, Canada), usando un protocolo de radio-inmunoensayo de acuerdo a Van Der Kraak et al. (1984), Wade and Van Der Kraak (1991), Van Der Kraak et al. (1990) y Van Der Kraak et al. (1989).

2.5 Histología de gónadas

Después de obtener la submuestra para producción de esteroides sexuales, el resto de gónada fue fijada en solución de bouins (48h), luego fueron lavadas en 70% de alcohol 3 veces for 15 min. Posteriormente el tejido fue deshidratado con una serie de soluciones de etanol (70-99%) y cloroformo, 2 veces infiltrado con parafina líquida a 58°C for 2 horas y empapado en parafina a temperatura ambiente (16°C) por 24h. El tejido empapado fue cortado en laminas (7 mm de grosor) y teñido con una solución de hematoxilina y eosin (0.5%).

Un total de 28,820 células gonadales fueron contadas (120 células por pez), utilizando un microscopio Zeiss Axioplan acoplado con una cámara digital Nikon DXM 1200. La proporción de células en los distintos estados de maduración para experimentos de bioensayos y terreno fueron asignados de acuerdo a lo publicado por Orrego et al. (2006).

2.6 Parámetros hematológicos

La muestra de sangre de cada pez se obtuvo por punción caudal, siguiendo los procedimientos sugeridos por Campbell and Murru (1990); las muestras se obtuvieron con jeringas plásticas humedecidas con heparina (5000 U/mL) en su interior y recibidas en tubos eppendorf con EDTA al 10% . Las extensiones sanguíneas se realizaron por duplicado inmediatamente después de obtener la muestra de sangre, dejándolas secar a temperatura ambiente. Se fijaron con metanol, se guardaron protegidas de la luz y humedad. Posteriormente se tiñeron con May-Gründwal-Giemsa.

El hematocrito se determinó por el micrometodo centrifugando la sangre a 12.000 rpm por 5 minutos. El conteo de células se realizó en sangre diluida 1:100 con la solución de Rees-Ecker en cámara de Neubauer (Campbell 1988; Campbell and Murru 1990). Los parámetros analizados fueron: hematocrito, leucocitos, eritrocitos y linfocitos.

2.7 Análisis bioquímicos

2.7.1. Actividad EROD (7-etoxyresorufina-O-deetilasa)

La actividad EROD fue analizada de acuerdo al protocolo propuesto por Lubert et al. (1985). Se obtuvieron sobrenadantes postmitocondriales (fracción S9) de hígados homogenizados en buffer hepes grinding (pH 7.5) y centrifugados a 9,000g por 20 min a 4°C. Los análisis fluorométricos fueron llevados a cabo usando un lector de microplacas Synergy HT (Biotek® instruments) por 5 min a 25°C, usando NADPH como dador de electrones. El análisis de proteínas fue realizado en un lector de microplacas Synergy HT (Biotek® instruments), usando el método de lectura en microplacas Biuret, con albúmina de bovino como material referencial. La actividad EROD fue expresada como pmol/min/mg proteína.

2.7.2 Actividad GST (glutation-S-transferasa)

Para determinar la actividad GST, se obtuvieron sobrenadantes postmitocondriales (fracción S9) de hígados homogenizados en buffer sacarosa (Tris-base 20mM, pH 7.6) y centrifugados a 10,000 rpm por 30 min a 4°C. La actividad GST fue determinada midiendo el cougado de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con glutationa reducida (GSH) a 340 nm, según metodología descrita por Habig et al. (1974). Los análisis espectrofotometricos fueron llevados a cabo usando un lector de microplacas Synergy HT (Biotek® instruments) por 5 min a 25°C. El análisis de proteínas fue realizado en un lector de microplacas Synergy HT (Biotek® instruments), usando el método de lectura en microplacas Biuret, con albúmina de bovino como material referencial. La actividad GST fue expresada como nmol/min/mg proteína.

2.8 Análisis estadístico

Se analizó las normalidad de los datos para todas las variables testeadas con la prueba Shapiro-Wilks ($p < 0.05$). Los datos no presentaron distribución normal, por lo que las diferencias en las variables de *Oncorhynchus mykiss* en los experimentos de bioensayos y terrenos fueron analizadas utilizando el test no-paramétrico

Kruskall-Wallis. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software INFOSTAT (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2011).

3. Resultados

3.1 Bioensayos de laboratorio

Tanto para el efluente de Los Angeles (LA) como para el efluente de Sta. Barbara (StB), los parámetros utilizados fueron analizados entre las distintas concentraciones (control, 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100%) a los 7, 14 y 21 días de exposición, respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis entre los tiempos de exposición a las distintas concentraciones. Y finalmente se compararon ambos efluentes en ambas situaciones mencionadas anteriormente.

3.1.1 Índices fisiológicos

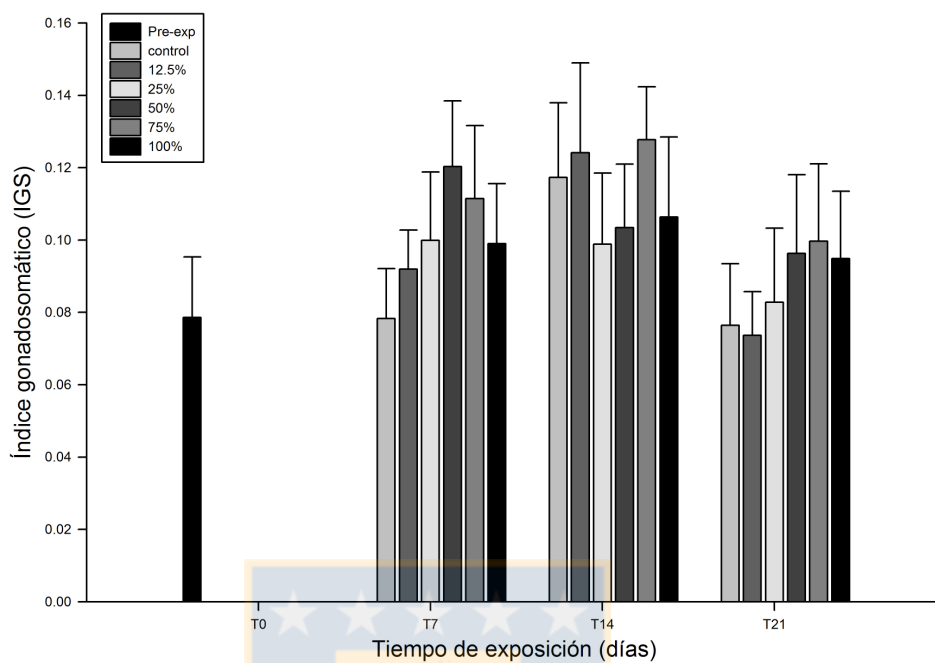
El análisis temporal del índice hepatosomático (IHS) en los peces expuestos al efluente_LA, evidenció una tendencia dosis-respuesta sólo a los 21 días de exposición, considerando un aumento en el IHS a mayores concentraciones de efluente, estas diferencias fueron significativas ($p = 0.0001$). La comparación de las concentraciones entre los distintos tiempos de exposición (7, 14 y 21 días), muestra valores similares de IHS a los 7 y 14 días, sin embargo estos valores aumentan a los 21 días (Fig. 1b), mostrando diferencias significativas al 25% ($p = 0.0331$), 50% ($p = 0.0002$) y 100% ($p = 0.0032$). Para el experimento con el efluente_StB, se muestra una tendencia similar a lo sucedido con el efluente_LA, pero no hubo diferencias significativas en el análisis temporal, sin embargo al analizar las concentraciones entre los tiempos de exposición, sólo hubo diferencias al 100% ($p = 0.0032$). La comparación entre efluente_LA y efluente_StB, mostró mayores valores del IHS para el efluente_LA, encontrando diferencias significativas a los 21 días ($p < 0.0001$) y las concentraciones 50% ($p = 0.0002$) y 100% ($p = 0.0008$).

El índice gonadosomático (IGS) de los peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días mostró una tendencia al aumento de éste a mayores concentraciones,

no encontrando diferencias significativas. Al comparar las concentraciones entre los tiempos de exposición, los menores valores fueron encontrados a los 21 días, sin diferencias significativas (Fig. 1a). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB. Al comparar ambos efluentes, se muestran valores mayores del IGS para el efluente_LA, con diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0031$), 14 ($p < 0.0001$) y 21 días ($p = 0.0343$) y a las concentraciones control ($p = 0.0010$), 12.5% ($p = 0.0004$), 75% ($p = 0.0018$) y 100% ($p = 0.0406$).

El factor de condición (k) en los peces expuestos al efluente_LA, evidenció una tendencia a disminuir los valores a los 21 días de exposición, sin encontrar diferencias significativas. Las concentraciones que mostraron diferencias significativas fueron control ($p = 0.0130$), 25% ($p = 0.0041$) y 50% ($p = 0.0058$). Para el efluente_StB el patrón fue similar al experimento con el efluente_LA, sin encontrar diferencias significativas a los distintos tiempos de exposición, como tampoco en las concentraciones. Al comparar ambos efluentes, los mayores valores de k , fue para los peces expuestos al efluente_LA, con diferencias significativas sólo a los 7 días ($p = 0.0230$). Las concentraciones 25% ($p = 0.0105$) y 50% ($p = 0.0030$) mostraron diferencias significativas al ser comparadas entre los distintos tiempos de exposición.

(a)



(b)

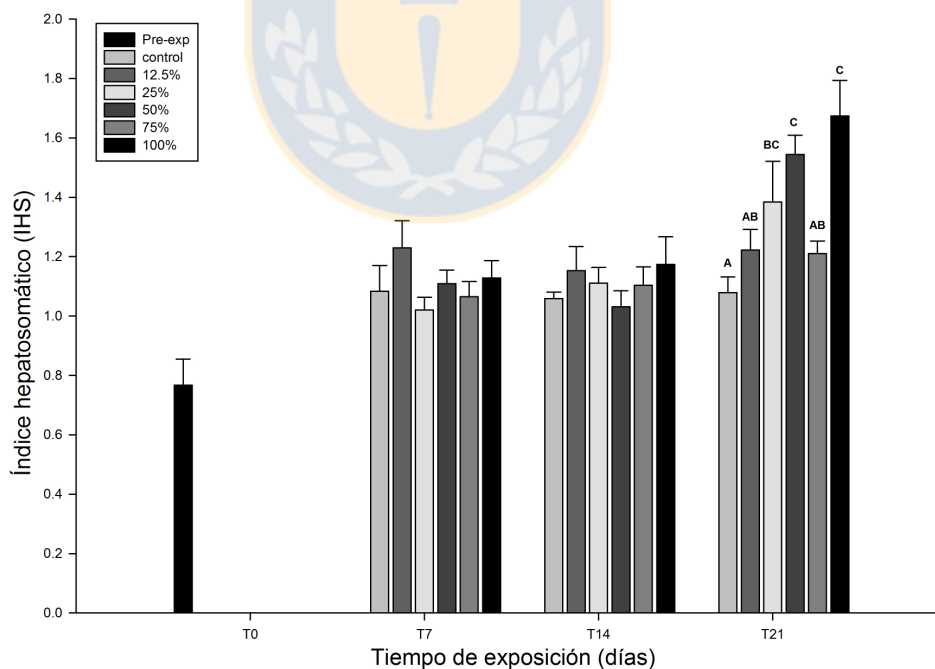


Figura 1. Índice gonadosomático (a) e índice hepatosomático (b) en individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos (media \pm error estándar).

3.1.2 Hormonas circulantes en plasma

3.1.2.1 Testosterona

La hormona testosterona en peces machos expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostró una tendencia a la disminución de ésta a mayores concentraciones, mientras que las concentraciones entre los tiempos de exposición, mostró valores similares a los 7, 14 y 21 días (Fig. 2a). Se encontraron diferencias significativas a los 7 días de exposición ($p = 0.0043$) y a las concentraciones 12.5% ($p = 0.0167$), 50% ($p = 0.0057$) y 100% ($p = 0.0036$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, no encontrando diferencias significativas a los tiempos de exposición y tampoco a las concentraciones. Al comparar ambos efluentes, se muestran valores mayores de la hormona testosterona para el efluente_LA, con diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0077$) y 21 días ($p = 0.0173$) y a la concentración 100% ($p = 0.0349$).

La hormona testosterona en peces hembras expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostró una tendencia de menores valores a mayores concentraciones y menores valores a los 21 días (Fig. 2b). Se encontraron diferencias significativas a los 21 días ($p = 0.00227$) y a las concentraciones control ($p = 0.0184$), 50% ($p = 0.0086$), 75% ($p = 0.0110$) y 100% ($p = 0.0472$). Para el efluente_StB se evidenció una tendencia opuesta a lo encontrado para el efluente_LA, con mayores valores de testosterona a los 21 días. No se encontró diferencias significativas a los tiempos de exposición, pero si a las concentraciones 25% ($p = 0.0083$) y 50% ($p = 0.0046$). Al comparar ambos efluentes, se muestran valores mayores de la hormona testosterona para el efluente_LA a los 7 y 14 días, mientras que a los 21 días la tendencia es todo lo contrario. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0634$) y 21 días ($p = 0.0011$) y a las concentraciones 50% ($p = 0.0022$) y 75% ($p = 0.0105$).

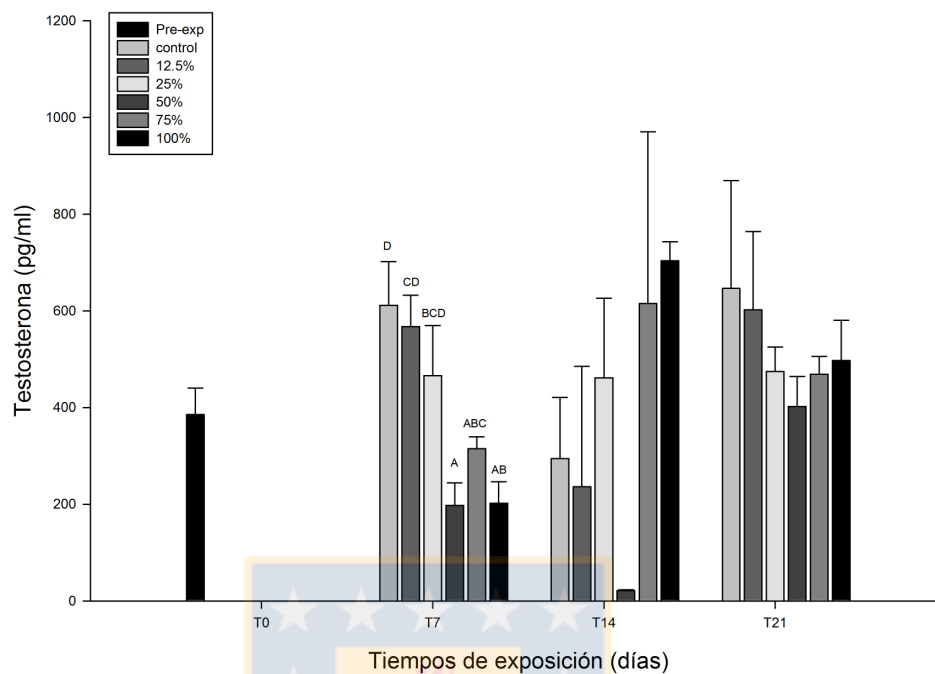
3.1.2.2 11-ketotestosterona

La hormona 11-kestotestosterona en peces machos expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostró una tendencia a la disminución de ésta a mayores

concentraciones, mientras que las concentraciones entre los tiempos de exposición, mostró menores valores a los 21 días (Fig. 3a). Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0003$) y 21 días ($p = 0.0081$) y a las concentraciones control ($p = 0.0088$), 12.5% ($p = 0.0377$), 25% ($p = 0.0042$), 50% ($p = 0.0019$) y 75% ($p = 0.0118$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, no encontrando diferencias significativas a los tiempos de exposición y tampoco en las concentraciones. Al comparar ambos efluentes, se muestran valores mayores de la hormona 11-ketotestosterona para el efluente_LA, con diferencias significativas a los 7 ($p < 0.0001$), 14 ($p = 0.0391$) y 21 días ($p = 0.0066$) y a las concentraciones control ($p = 0.0025$), 12.5% ($p = 0.0075$), 25% ($p = 0.0075$), 50% ($p = 0.0236$) y 75% ($p = 0.0278$).



(a)



(b)

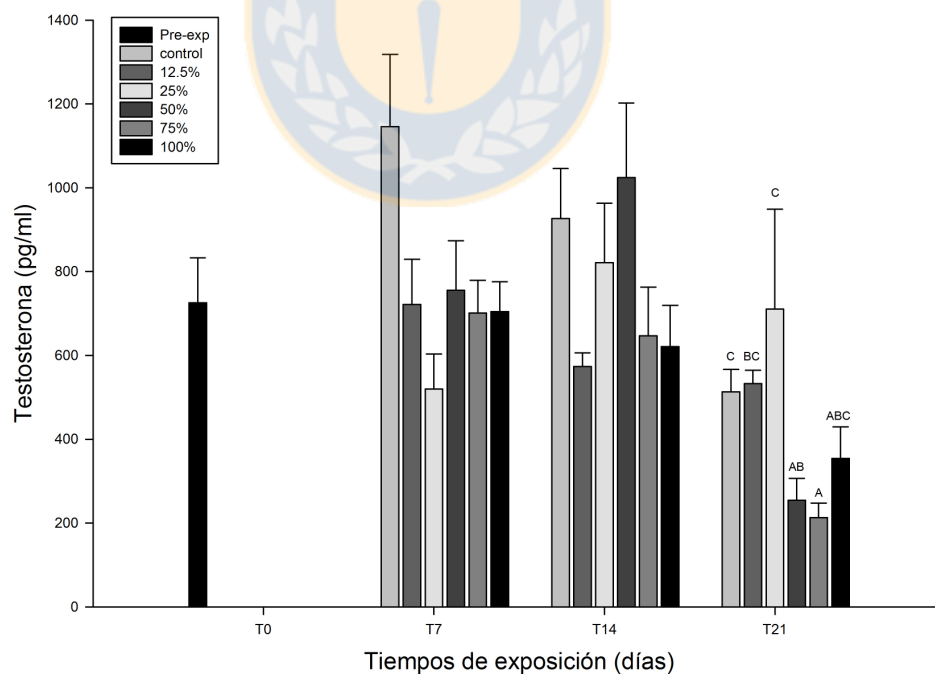
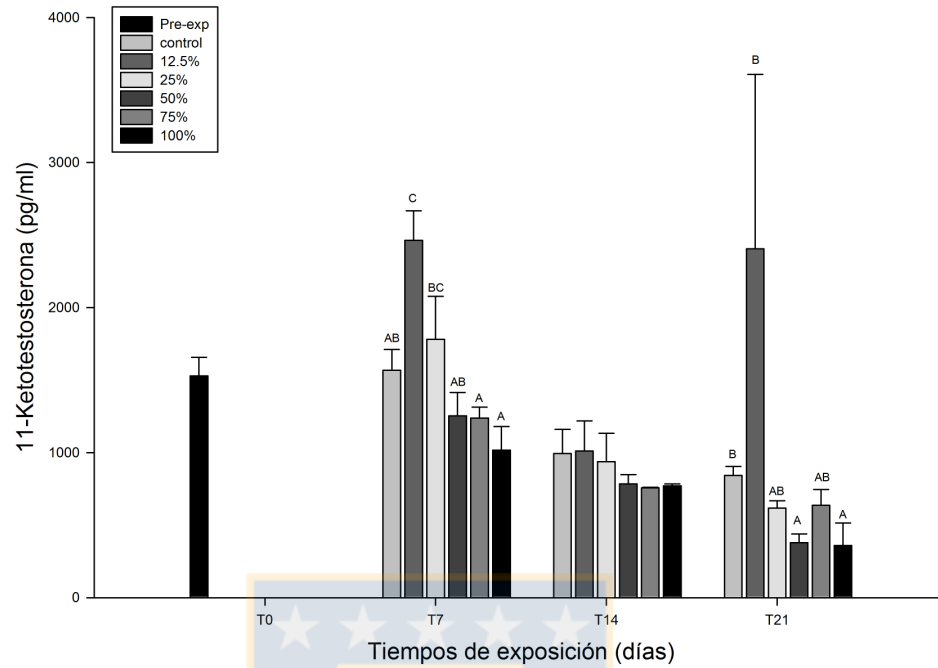


Figura 2. Hormona testosterona (media \pm error estándar) en individuos juveniles de *O. mykiss* machos (a) y hembras (b) expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.

a)



(b)

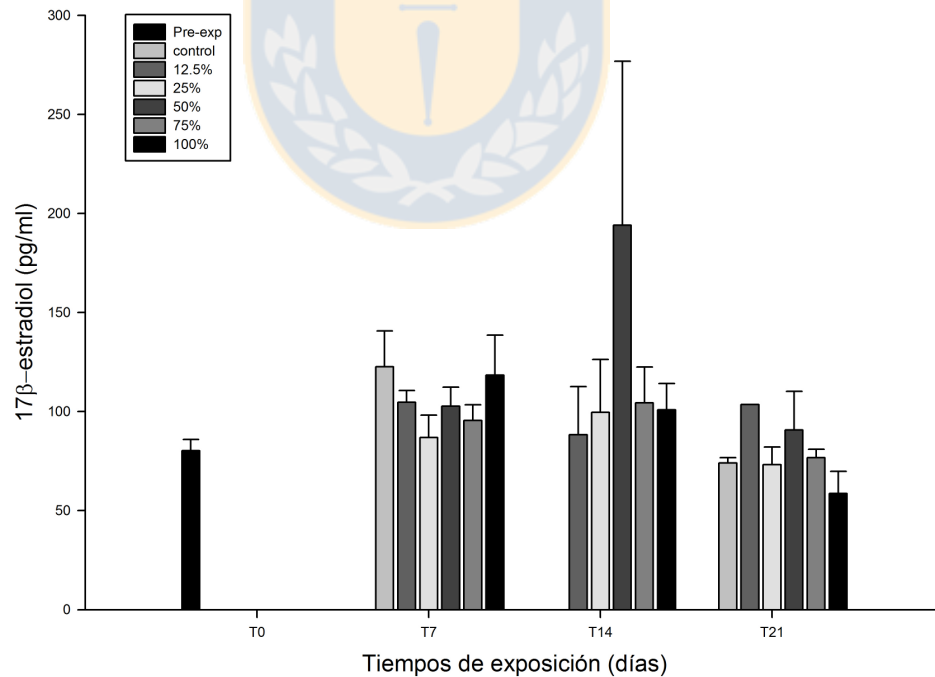


Figura 3. Hormona 11-ketotestosterona (media \pm error estándar) y hormona 17 β -estradiol (media \pm error estándar) en individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.

3.1.2.3 17β -estradiol

La hormona 17β -estradiol en peces hembras expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, no muestra una tendencia clara de comportamiento a las distintas concentraciones. No hubo diferencias significativas a los tiempos de exposición, ni tampoco a la concentraciones (Fig. 3b). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, no encontrando diferencias significativas a los tiempos de exposición, pero si a la concentración 75% ($p = 0.0216$). Al comparar ambos efluentes, se encontró una tendencia de mayores de valores de hormonas para el experimento con el efluente_StB. Se encontraron diferencias significativas a los 7 días de exposición ($p = 0.0163$) y a las concentraciones 25% ($p = 0.0110$), 75% ($p = 0.0116$) y 100% ($p = 0.0331$).

3.1.3 Histología de gonadas femeninas

3.1.3.1 Estado de maduración I y II

Los estados de maduración I y II de gónadas femeninas de peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostraron una tendencia de valores similares a los 7 días, sin embargo a los 14 y 21 días se evidenció una disminución de los estados I y II a mayores concentraciones. Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0002$) y sólo a la concentración control ($p = 0.0048$). Para el efluente_StB se encontraron valores similares entre las concentraciones en cada tiempo de exposición así como también comparando las concentraciones entre los 7, 14 y 21 días. No hubo diferencias significativas para los tiempos y concentraciones. Al comparar ambos efluentes, se muestran menores valores de los estados I y II para el efluente_LA a los 7, 14 y 21. Con diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0002$), 14 ($p = 0.0116$) y 21 días ($p = 0.0006$) y a las concentraciones control ($p = 0.0092$), 12.5% ($p = 0.0044$), 25% ($p = 0.0046$), 50 % ($p = 0.0123$) y 75% ($p = 0.0220$).

3.1.3.2 Estado de maduración III

El estado de maduración III de gónadas femeninas de peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostró una tendencia a aumentar los valores a las concentraciones más altas en los todos los tiempos de exposición (Fig. 4). Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0002$) y sólo a la concentración control ($p = 0.0048$). Para el efluente_StB se encontró la misma tendencia que para el efluente_LA, no hubo diferencias significativas para los tiempos y concentraciones. Al comparar ambos efluentes, se muestran mayores valores del estados III para el efluente_LA a los 7, 14 y 21. Con diferencias significativas a los 7 ($p < 0.0001$), 14 ($p < 0.0001$) y 21 días ($p < 0.0001$) y a las concentraciones control ($p = 0.0058$), 12.5% ($p = 0.0008$), 25% ($p = 0.0005$), 50% ($p < 0.0001$), 75% ($p = 0.0002$) y 100% ($p = 0.0001$).

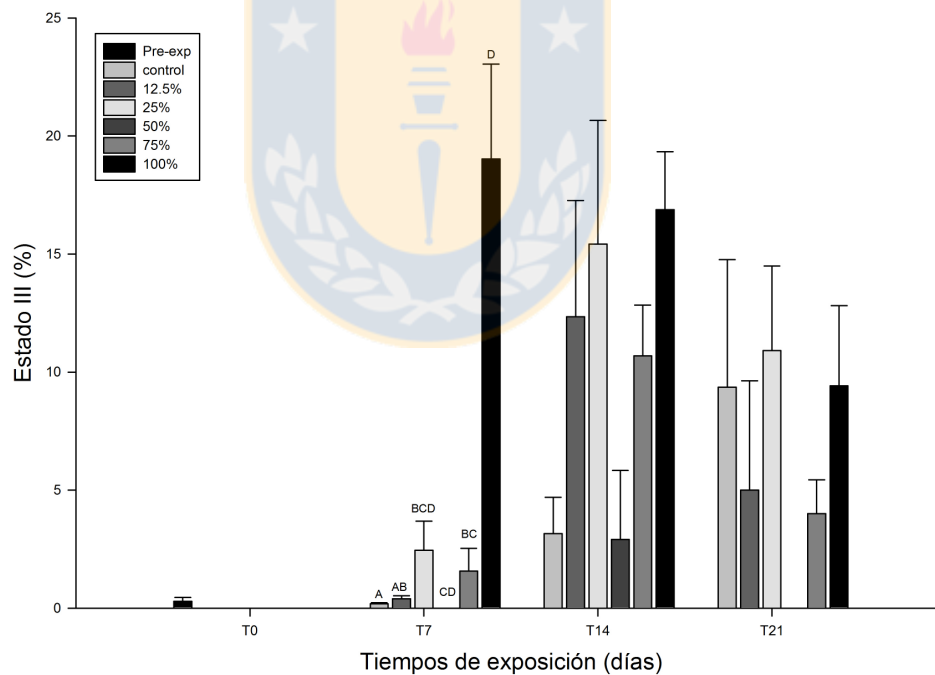


Figura 4. Estado de maduración III (media \pm error estándar) en gónadas femeninas de individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.

3.1.4 Parámetros hematológicos

3.1.4.1 Hematocrito

Los valores de hematocrito en peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostraron una tendencia de valores similares, sin embargo tienden a aumentar hacia la concentración 100% (Fig. 5a). Se encontraron diferencias significativas a los 14 días ($p = 0.0004$) y a las concentraciones 25% ($p = 0.0021$), 50% ($p = 0.0006$) y 75% ($p = 0.0065$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, mostrando mayores valores a los 21 días. No se encontraron diferencias significativas a los tiempos de exposición, pero si a las concentraciones 25% ($p = 0.0063$), 50% ($p = 0.0080$), 75% ($p = 0.0117$) y 100% ($p = 0.0009$). Al comparar ambos efluentes, se muestran valores similares del hematocrito, con diferencias significativas a los 14 días ($p = 0.0003$) y a las concentraciones 25% ($p = 0.0001$), 50% ($p = 0.0001$), 75% ($p = 0.0009$) y 100% ($p = 0.0022$).

3.1.4.2 Eritrocitos

Los valores del conteo de eritrocitos en peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostraron una tendencia al aumento a mayores concentraciones, los mayores valores se encuentran a los 21 días de exposición. Se encontraron diferencias significativas a los 14 días ($p = 0.0164$) y a la concentración 75% ($p = 0.0299$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, no se encontraron diferencias significativas a los tiempos de exposición, ni tampoco en las concentraciones. Al comparar ambos efluentes, se muestran valores mayores de conteo de eritrocitos para el efluente_LA, con diferencias significativas a los 14 ($p = 0.0162$) y 21 días ($p = 0.0101$) y a las concentraciones 25% ($p = 0.0014$) y 75% ($p = 0.0074$).

3.1.4.3 Leucocitos

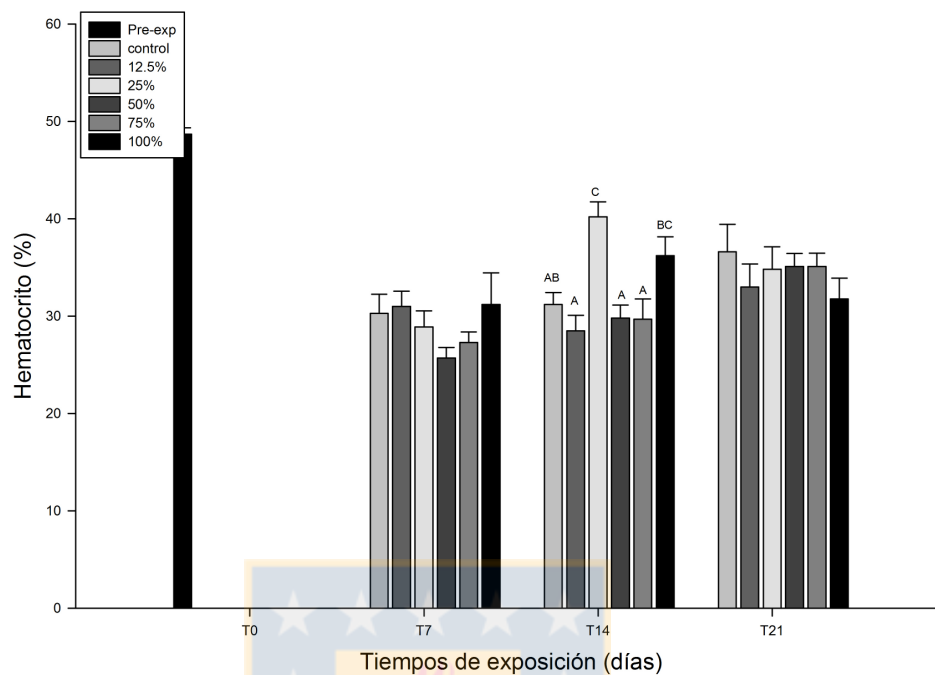
Los valores del conteo de leucocitos en peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostraron una tendencia a la disminución a mayores concentraciones,

sin embargo cabe destacar que a los 14 días se evidencian los valores más altos de conteo de leucocitos. No se encontraron diferencias significativas a los distintos tiempos, pero si las concentraciones control ($p = 0.0007$), 12.5% ($p = 0.0027$), 25% ($p = 0.0001$), 50% ($p = 0.0001$) y 75% ($p < 0.0001$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, se encontraron diferencias significativas a los 21 días ($p = 0.0406$) y a la concentración 75% ($p = 0.0016$). Al comparar ambos efluentes, se muestran valores menores de conteo de eritrocitos para el efluente_StB, con diferencias significativas a los 7 ($p < 0.0001$), 14 ($p < 0.0001$) y 21 días ($p < 0.0001$) y a las concentraciones control ($p < 0.0001$), 12.5% ($p < 0.0001$), 25% ($p < 0.0001$), 50% ($p < 0.0001$), 75% ($p < 0.0001$) y 100% ($p < 0.0001$).

3.1.4.3.1 Linfocitos

Los valores del conteo de linfocitos en peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostraron una tendencia a la disminución a mayores concentraciones, sin embargo entre los tiempos los valores fueron similares (Fig. 5b). Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0270$) y 14 días ($p = 0.0130$) y a las concentraciones 75% ($p = 0.0013$) y 100% ($p = 0.0040$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, encontrándose los menores valores a los 7 días. No hubo diferencias significativas a los tiempos de exposición, pero si a las concentraciones control ($p = 0.0009$), 12.5% ($p = 0.0052$), 25% ($p = 0.0002$), 50% ($p = 0.0008$), 75% ($p = 0.0004$) y 100% ($p = 0.0008$). Al comparar ambos efluentes, se muestran valores menores de conteo de linfocitos para el efluente_LA, con diferencias significativas a los 7 ($p < 0.0001$), 14 ($p < 0.0001$) y 21 días ($p < 0.0001$) y a las concentraciones control ($p < 0.0001$), 12.5% ($p < 0.0001$), 25% ($p < 0.0001$), 50% ($p < 0.0001$), 75% ($p < 0.0001$) y 100% ($p < 0.0001$).

(a)



(b)

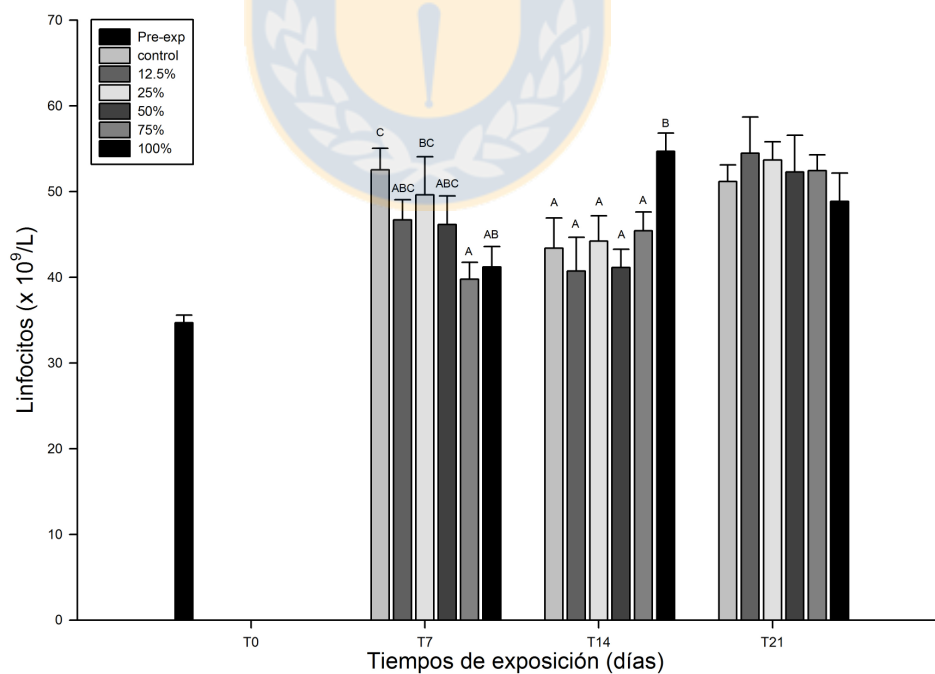


Figura 5. Hematocrito (media \pm error estándar) y recuento de linfocitos (media \pm error estándar) en sangre de individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.

3.1.5 Análisis bioquímicos

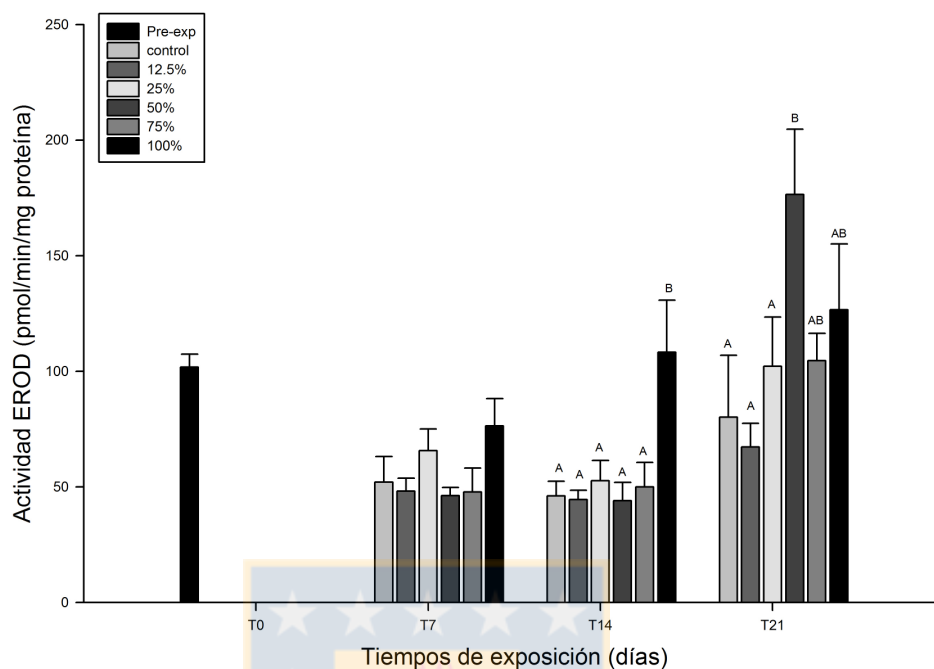
3.1.5.1 Actividad EROD (7-etoxyresorufina-O-deetilasa)

La actividad EROD en peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostró una tendencia al aumento a mayores concentraciones, siendo a los 21 días los valores más altos (Fig. 6a). Se encontraron diferencias significativas a los 14 ($p = 0.0240$) y 21 días ($p = 0.0324$) y a las concentraciones 50% ($p = 0.0002$) y 75% ($p = 0.0050$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, no se encontraron diferencias significativas a los tiempos de exposición, ni tampoco en las concentraciones. Al comparar ambos efluentes, se muestran valores mayores de la actividad EROD para el efluente_LA, con diferencias significativas a los 14 ($p = 0.0429$) y 21 días ($p = 0.0021$) y a las concentraciones 50% ($p = 0.0009$), 75% ($p = 0.0409$) y 100% ($p = 0.0191$).

3.1.5.2 Actividad GST (glutation-S-transferasa)

La actividad GST en peces expuestos al efluente_LA a los tiempos 7, 14 y 21 días, mostró una tendencia al aumento a mayores concentraciones, sin embargo ninguno de los tiempos obtuvo valores altos, no se encontraron diferencias significativas en los tiempos, ni en las concentraciones (Fig. 6b). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el efluente_StB, se encontraron diferencias significativas a los 21 días ($p = 0.0333$) y a la concentración control ($p = 0.0465$). Al comparar ambos efluentes, no se evidencia una tendencia clara de aumento o disminución de valores de actividad GST para uno u otro efluente, no se encontraron diferencias significativas a los tiempos de exposición, si a la concentración control ($p = 0.0092$).

(a)



(b)

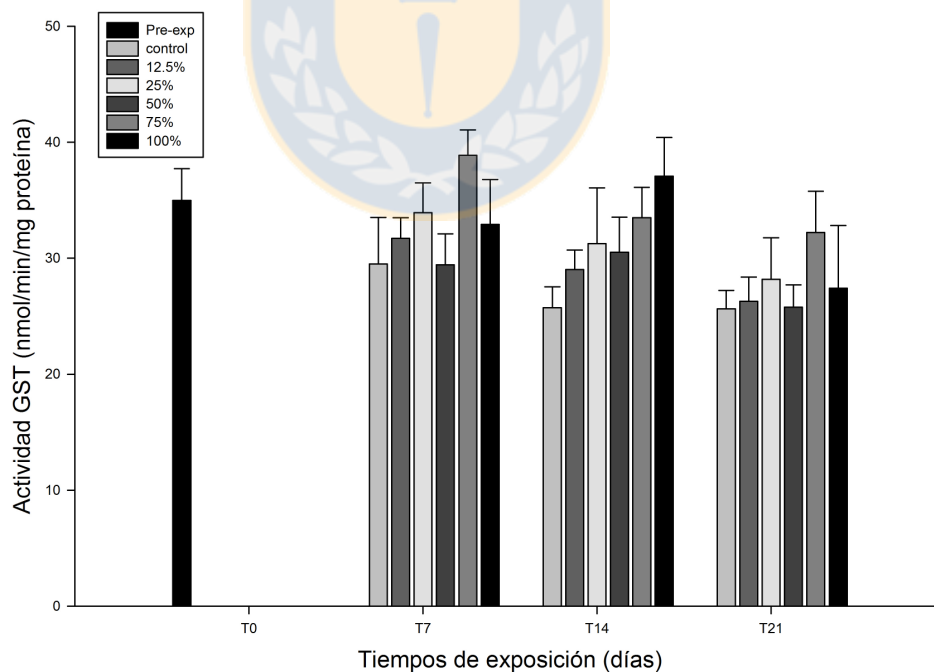


Figura 6. Actividad EROD (media \pm error estándar) y Actividad GST (media \pm error estándar) en hígados de individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de la ciudad Los Angeles en bioensayos crónicos.

3.2 Experimentos en terreno

Tanto para experimento en el río Biobio (exp_RB) como para experimento en el estero Quilque (exp_EQ), los parámetros utilizados fueron analizados entre los distintos sitios de muestreo (pre-impacto, impacto y post-impacto) a los 7, 14 y 21 días de exposición, respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis entre los tiempos de exposición en los distintos sitios de muestreo. Y finalmente se compararon ambos experimentos de terreno en ambas situaciones mencionadas anteriormente.

3.2.1 Índices fisiológicos

El índice hepatosomático (IHS) medido en los peces del exp_RB, no muestra una tendencia clara entre los sitios de muestreo (pre-impacto, impacto y post-impacto) para cada tiempo de exposición (7 y 14 días), sin embargo cabe mencionar que a los 14 días, los valores de IHS son mayores. Se encontraron diferencias significativas a los 14 días ($p < 0.0001$) y en los sitios pre-impacto ($p = 0.0019$) y post-impacto ($p < 0.0001$). El exp_EQ, muestra una tendencia al aumento del IHS en el sitio de impacto, esta tendencia se repite en los 7, 14 y 21 días, con los mayores valores en éste último (Fig. 7b). Hubo diferencias significativas a los 14 días ($p = 0.0031$) y en el sitio impacto ($p = 0.0042$). Al comparar ambos experimentos (exp_RB y exp_EQ), se evidencia mayores valores del IHS en el exp_EQ a los 7 y 14 días para los sitios pre-impacto e impacto. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0189$) y 14 días ($p = 0.0001$) y en los sitios pre-impacto ($p = 0.0018$) e impacto ($p = 0.0001$).

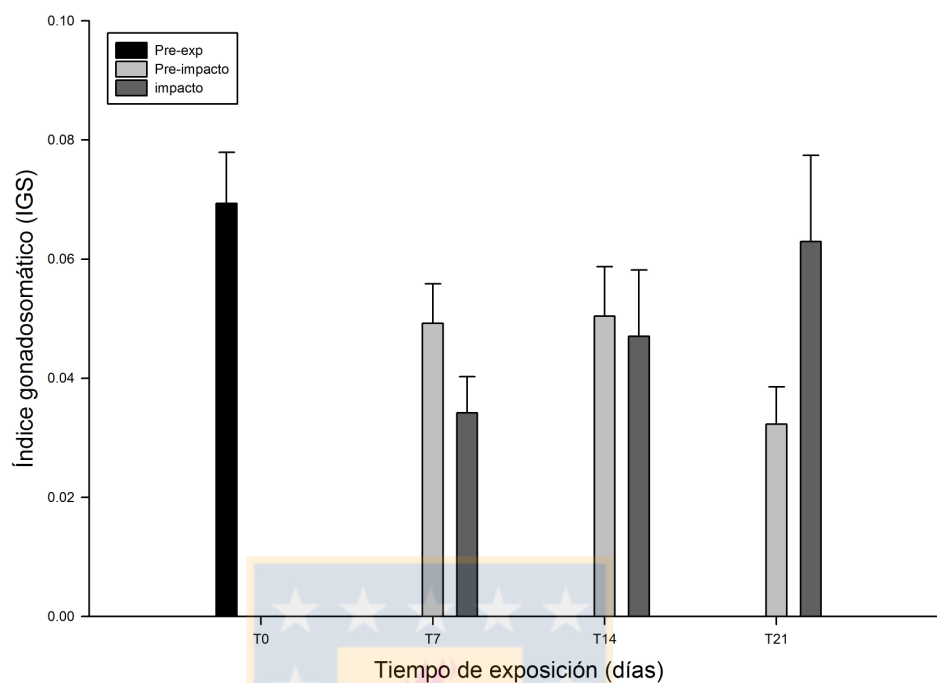
El índice gonadosomático (IGS) medido en los peces del exp_RB, muestra una tendencia al aumento de valores en los sitios impacto y post-impacto a los 7 y 14 días, siendo mayores valores a los 14 días. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0490$) y 14 días ($p = 0.0385$) y en el sitio pre-impacto ($p = 0.0090$). El exp_EQ, muestra una tendencia a disminuir del IGS en el sitio de impacto a los 7 y 14 días, mientras que a los 21 días hubo una tendencia contraria (Fig. 7a). No hubo diferencias significativas en los tiempos, pero si en sitio pre-impacto ($p = 0.0010$). Al

comparar ambos experimentos (ep_RB y exp_EQ), se evidencia mayores valores del IHS en el exp_EQ a los 7 y 14 días para los sitios pre-impacto e impacto. Se encontraron diferencias significativas a los 14 días ($p = 0.0200$) y en sitio pre-impacto ($p = 0.0010$).

El factor de condición (k) en los peces expuestos al exp_RB, muestra valores similares entre los sitio y los tiempos, no se hubo diferencias significativas a los 7, 14 y 21 días, pero si en el sitio impacto ($p = 0.0261$). Para el exp_EQ, el patrón fue similar al exp_RB, sin encontrar diferencias significativas a los distintos tiempos de exposición, pero si en el sitio impacto ($p = 0.0281$). Al comparar ambos experimentos, los menores valores de k , fue para los peces del exp_EQ, con diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0273$) y 14 días ($p = 0.0399$) y el sitio impacto ($p = 0.0009$).



(a)



(b)

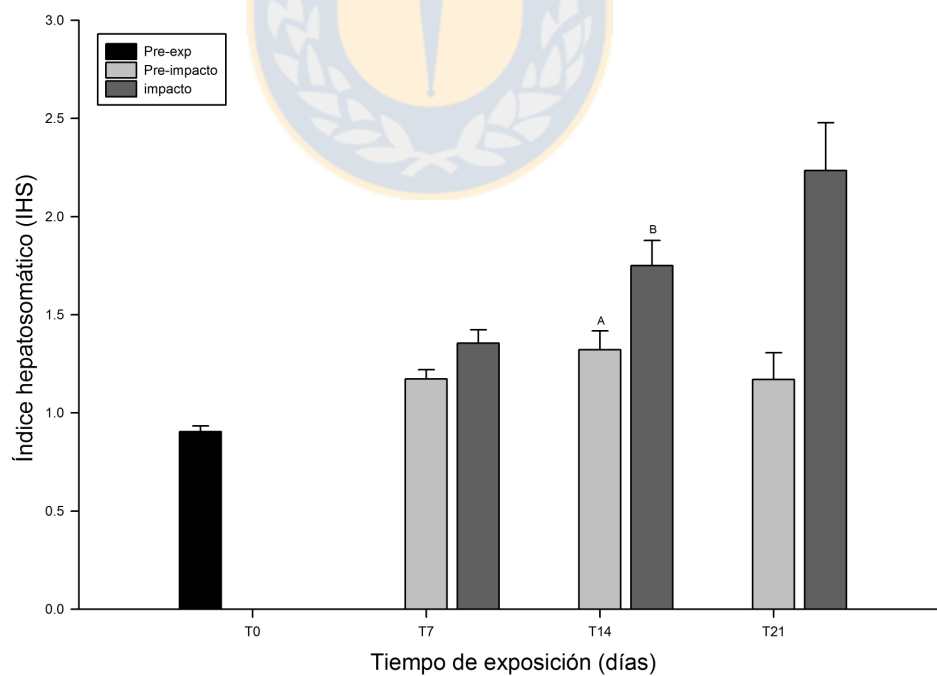


Figura 7. Índice gonadosomático (a) e índice hepatosomático (b) en individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).

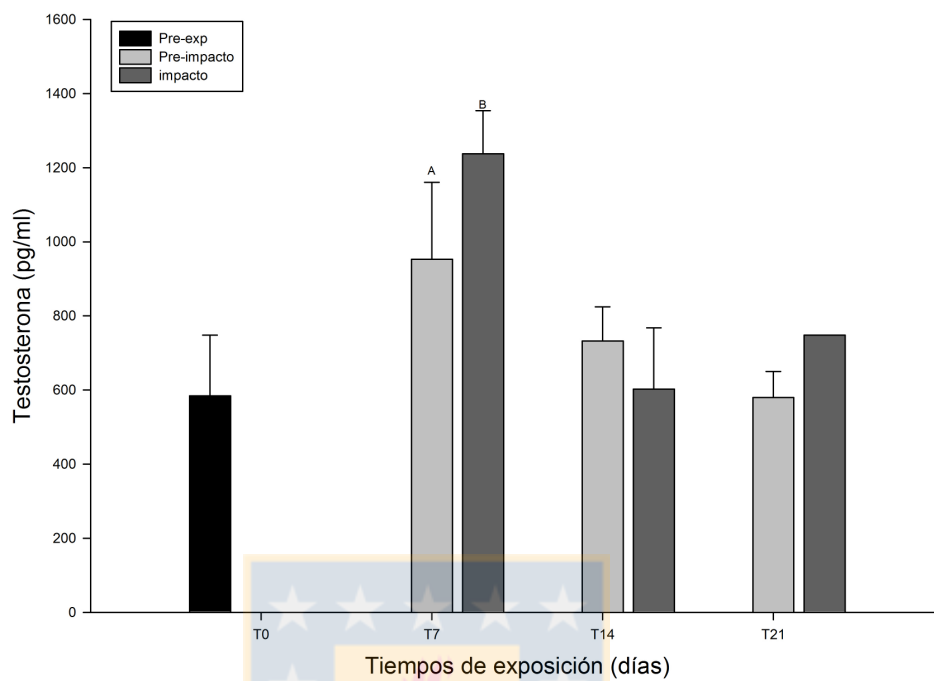
3.2.2 Hormonas circulantes en plasma

3.2.2.1 Testosterona

La hormona testosterona en peces machos expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tiende a aumentar en el sitio impacto a los 7 días, sin embargo a los 14 días la tendencia es a disminuir en el gradiente de los sitios (pre-impacto, impacto y post-impacto), con menores valores a los 14 días. Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0901$), pero no en los sitios. Este mismo patrón se repitió para el exp_EQ, sin encontrar diferencias significativas en los tiempos, ni en los sitios (Fig. 8a). Al comparar ambos experimentos, se muestran valores mayores de la hormona testosterona para el exp_EQ, sin diferencias significativas en los tiempos y sitios.

La hormona testosterona en peces hembras expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tiende a aumentar en el sitio impacto a los 7 días, sin embargo a los 14 días la tendencia es a disminuir en el gradiente de los sitios (pre-impacto, impacto y post-impacto), con menores valores a los 14 días. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos, ni en los sitios. Para el exp_EQ, se evidenció una tendencia a disminuir la hormona en el sitio impacto, con menores valores a los 21 días, no se encontraron diferencias significativas en los tiempos, pero sí en el sitio pre-impacto ($p = 0.0257$) (Fig. 8b). Al comparar ambos experimentos, se muestran valores mayores de la hormona testosterona para el exp_EQ en el sitio pre-impacto (7 días) e impacto (14 días), sin encontrar diferencias significativas en los tiempos, ni en los sitios.

(a)



(b)

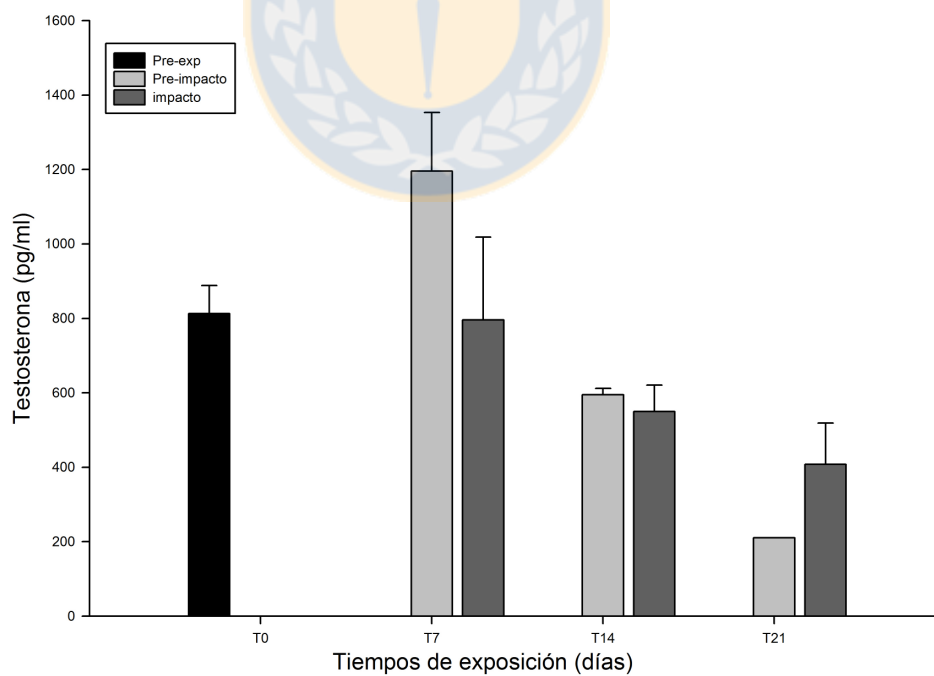


Figura 8. Hormona testosterona (media \pm error estándar) en individuos juveniles de *O. mykiss* machos (a) y hembras (b) expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).

3.2.3 Histología de gonadas femeninas

3.2.3.1 Estado de maduración I y II

Los estados de maduración I y II de gónadas femeninas de peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, mostraron una tendencia de valores similares, sin encontrar diferencias significativas en los tiempos, ni en los sitios. Para el exp_EQ, mostró simiar tendencia que el exp_R, sin diferencias significativas en los tiempos, ni en los sitios. Al comparar ambos efluentes, la tendencia se mantiene, sin diferencias significativas.

3.2.3.2 Estado de maduración III

El estado de maduración III de gónadas femeninas de peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14, mostró una tendencia a disminuir los valores en la gradiente de los sitios (pre-impacto, impacto y post-impacto), con valores mayores a los 7 días. No se encontraron diferencias significativas para los tiempos, ni en los sitios. Para el exp_EQ se encontró una tendencia contraria que para el exp_RB, no hubo diferencias significativas para los tiempos y sitios (Fig. 9). Al comparar ambos experimentos, se muestran mayores valores del estados III para exp_RB. Con diferencias significativas sólo a los 14 días ($p = 0.0296$).

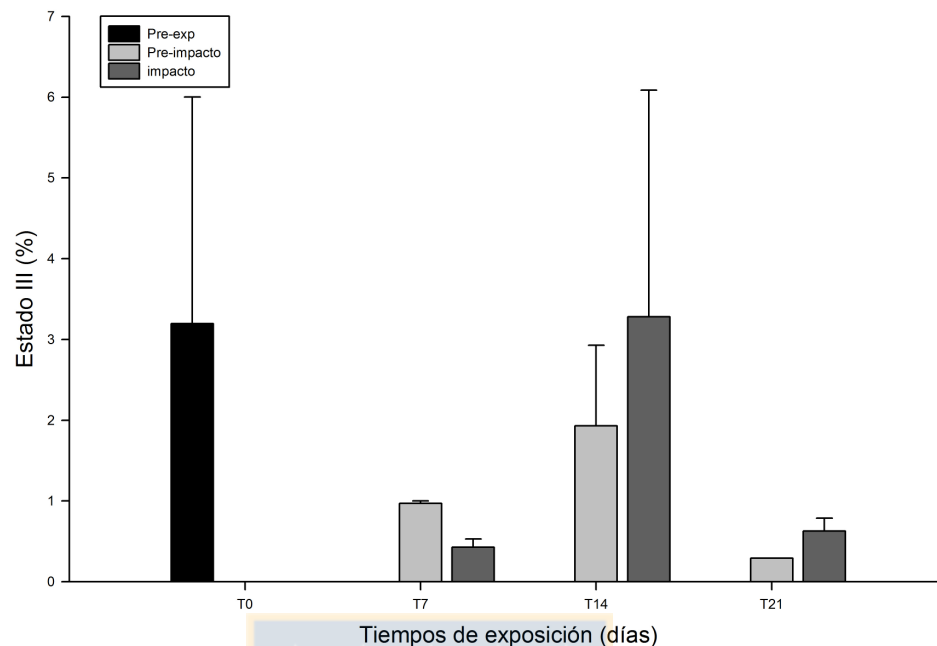


Figura 9. Estado de maduración III (media \pm error estándar) en gónadas femeninas de individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).

3.2.4 Parámetros hematológicos

3.2.4.1 Hematocrito

Los valores de hematocrito en peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tienden a aumentar en el sitio impacto, con mayores valores a los 7 días. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0165$) y 14 días ($p = 0.0306$) y en los sitios pre-impacto ($p = 0.0008$) e impacto ($p = 0.0006$). En el exp_EQ, se tiende a mantener valores similares en la gradiente de sitios (pre-impacto, impacto y post-impacto). Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0002$), pero no en los sitios (Fig. 10a). Al comparar ambos experimentos, se muestran valores menores del hematocrito para el exp_EQ, con diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0001$) y 14 días ($p = 0.0274$) y los sitios pre-impacto ($p < 0.0001$) e impacto ($p = 0.0002$).

3.2.4.2 Eritrocitos

Los valores del conteo de eritrocitos en peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tienden a aumentar en el sitio impacto, con mayores valores a los 7 días. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p < 0.0001$) y 14 días ($p = 0.0387$) y en los sitios pre-impacto ($p = 0.0004$), impacto ($p < 0.0001$) y post-impacto ($p = 0.0489$). En el exp_EQ, se tiende a mantener valores similares en la gradiente de sitios (pre-impacto, impacto y post-impacto). Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0006$) y en el sitio pre-impacto ($p = 0.0039$). Al comparar ambos experimentos, se muestran valores menores del hematrocito para el exp_EQ, con diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0001$) y en los sitios pre-impacto ($p = 0.0005$) e impacto ($p = 0.0001$).

3.2.4.3 Leucocitos

Los valores del conteo de leucocitos en peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tienden a aumentar en el sitio impacto, con valores similares en ambos tiempos. No se encontraron diferencias significativas en los sitios, pero si a los 14 días ($p = 0.0194$). En el exp_EQ, se tiende a la disminución de los valores en el sitio impacto para todos los tiempos. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0001$) y 14 días ($p = 0.0005$), pero no en los sitios. Al comparar ambos experimentos, se muestra una tendencia en el sitio pre-impacto al aumento del conteo de leucocitos a los 7 y 14 días para el exp_EQ, mientras que en el sitio impacto, la tendencia es a la disminución en los mismos tiempos. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0018$) y 14 días ($p = 0.0002$) y en el sitio pre-impacto ($p < 0.0001$).

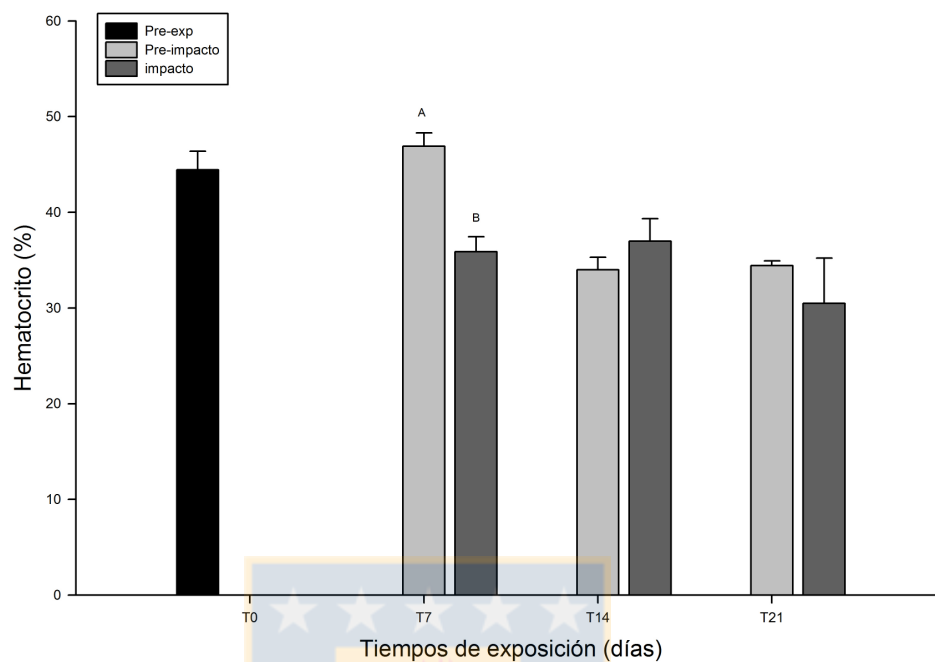
3.2.4.4 Linfocitos

Los valores del conteo de linfocitos en peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tienden a aumentar en el sitio impacto a los 7 días, pero a disminuir a los 14 días. Se encontraron diferencias significativas en los sitios pre-impacto ($p = 0.0010$) e

impacto ($p = 0.0346$) y a los 7 ($p = 0.0363$) y 14 días ($p = 0.0160$). En el exp_EQ, se tiende a la disminución de los valores en el sitio impacto para todos los tiempos. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos, ni en los sitios (Fig. 10b). Al comparar ambos experimentos, se muestra una tendencia en el sitio pre-impacto e impacto al aumento del conteo de linfocitos a los 7 días para el exp_EQ, mientras que en el sitio impacto a los 14 días tiende a disminuir. Se encontraron diferencias significativas a los 7 ($p = 0.0002$) y 14 días ($p = 0.0429$) y en el sitio pre-impacto ($p < 0.0001$).



(a)



(b)

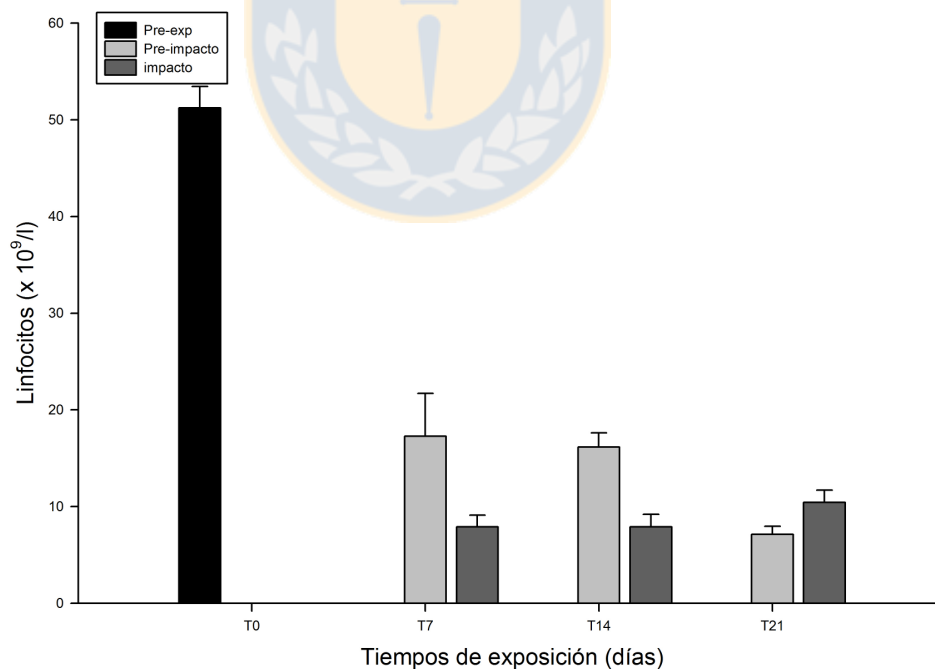


Figura 10. Hematocrito (media \pm error estándar) y recuento de linfocitos (media \pm error estándar) en sangre de individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).

3.2.5 Análisis bioquímicos

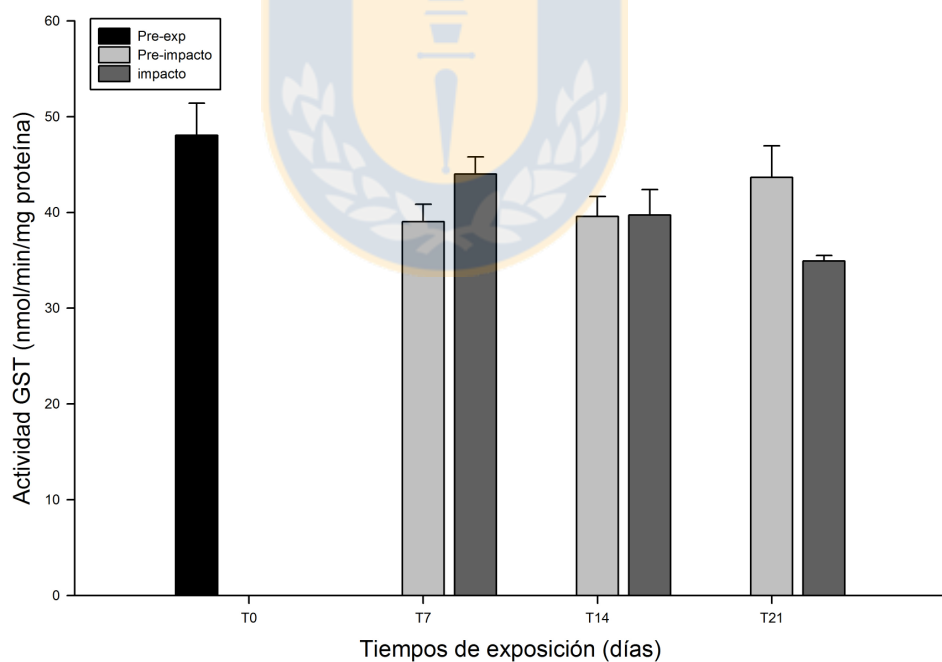
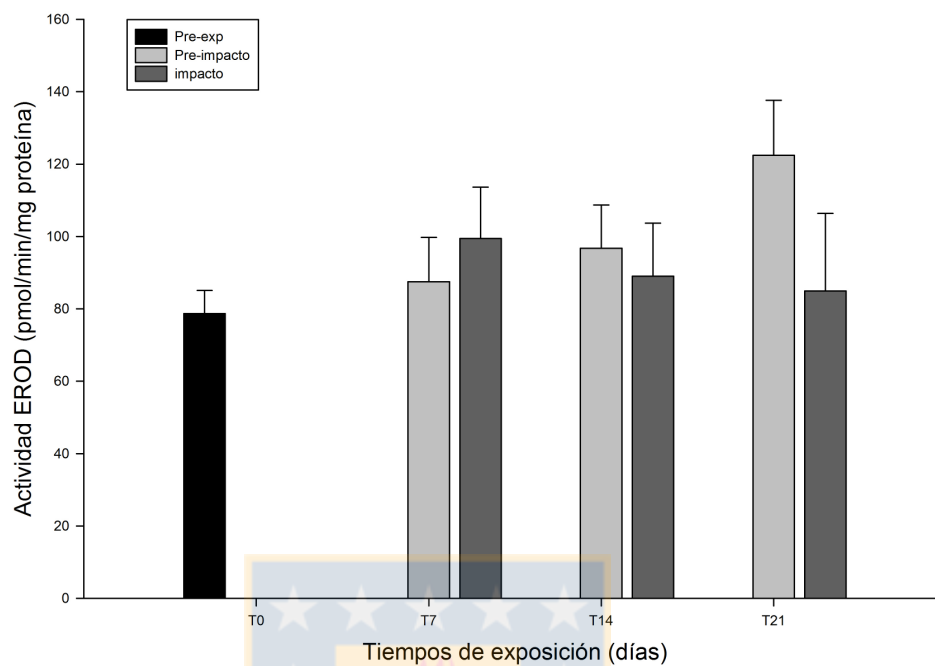
3.2.5.1 Actividad EROD (7-etoxyresorufina-O-deetilasa)

La actividad EROD en peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14 días, tiende a aumentar en el sitio impacto a los 14 días. Se encontraron diferencias significativas a los 14 ($p = 0.0377$) y en los sitios impacto ($p = 0.0082$) y post-impacto ($p = 0.0418$). En el exp_EQ, la actividad EROD tiende a disminuir a los 14 y 21 días en el sitio impacto, no se encontraron diferencias significativas a los tiempos de exposición, ni tampoco en las concentraciones (Fig. 11a). Al comparar ambos experimentos, se muestran valores mayores en los sitios pre-impacto e impacto a los 7 días y menores valores a los 14 días para el exp_EQ. Sin diferencias significativas en los sitios, ni en los tiempos.

3.2.5.2 Actividad GST (glutation-S-transferasa)

La actividad GST en peces expuestos al exp_RB a los tiempos 7 y 14, tiende a mantener valores similares o a aumentar en el sitio de impacto en todos los tiempos. Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0131$). Este mismo patrón se repitió para el experimento con el exp_EQ (Fig. 11b), se encontraron diferencias significativas en el sitio impacto ($p = 0.0462$) y no en los tiempos. Al comparar ambos experimentos, se evidencia mayores valores para el exp_RB en todos los tiempos de exposición. Se encontraron diferencias significativas a los 7 días ($p = 0.0190$) y en el sitio impacto ($p = 0.0093$).

(a)



(b)

Figura 11. Actividad EROD (media \pm error estándar) y Actividad GST (media \pm error estándar) en hígados de individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en el estero Quilque (ciudad Los Angeles).

4. Discusión

4.1 Bioensayos de laboratorio

4.1.1. Actividad EROD e índice hepatosomático (IHS)

El IHS de los peces expuestos al efluente Los Angeles presenta mayores valores a medida que aumentan las concentraciones de exposición sólo a los 21 días, siendo a la concentración 100% los valores más altos. Esta tendencia es similar a lo encontrado para el efluente de Sta. Barbara. Cabe mencionar que el efluente_LA tuvo valores más altos del IHS que el efluente_StB. Esto es concordante con lo mencionado por Grizzle et al. (1988) y Mukherjee et al. (1991), quienes afirman que la exposición a efluentes de plantas de tratamiento generan un aumento en el tamaño del hígado y con esto una inducción o estimulación de las actividades enzimáticas.

La inducción de la actividad EROD de los peces expuestos al efluente Los Angeles, posee la misma tendencia que los peces expuestos al efluente Sta. Barbara, un aumento de la inducción de la actividad enzimática a mayores concentraciones de exposición para todos los tiempos analizados (7, 14 y 21 días), mostrando los valores más altos a la concentración 100% y a los 21 días. Esta tendencia dosis-dependencia también es descrita por Sturve et al. (2008), quien midió la inducción de la actividad EROD en *Oncorhynchus mykiss* expuestos a efluente de planta de tratamiento de aguas servidas por un período de 2 a 10 semanas, encontrando un incremento de los valores a mayores concentraciones (50%) y tiempos (10 semanas). Sin embargo en el experimento con el efluente de Sta. Barbara, existen algunas fluctuaciones en los valores, esto se puede explicar por lo mencionado por Melancon et al. (1987), ya que la inducción de la actividad EROD depende de la disponibilidad del agente inductor y de como el pez responde a la actividad enzimática. Además, el daño hepático muchas veces puede inhibir la habilidad de las células hepáticas para producir enzimas (Adams et al. 1992). Kosmala et al. (1998), en experimentos de exposición a un 100% de efluente de plantas de tratamiento de aguas servidas en truchas por un período de 16 días, menciona que la inducción de la actividad EROD, está determinada por una continua descarga de compuestos perteneciente al efluente.

4.1.2. Actividad GST (glutation-S-transferasa)

Pocos estudios describen los efectos de los químicos presentes en efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas sobre parámetros de estrés oxidativo en especies acuáticas (Oakes et al. 2004, Avery et al. 1996 y Isamah et al. 2000). A pesar que muchos de estos químicos encontrados en los efluentes ejercen su toxicidad a través de su naturaleza prooxidante (Paxeus 1996 y Livingstone 2001). En este estudio encontramos que la actividad GST en los peces expuestos al efluente de Los Angeles aumenta a medida que aumentan las concentraciones de exposición a los 7, 14 y 21 días, no siendo significativas estas diferencias. Mientras que para el experimento con el efluente de Sta. Barbara, se presentan fluctuaciones de aumento y disminución de la actividad GST entre las diferentes concentraciones a los 7, 14 y 21 días, encontrando menores valores significativos al 100% comparado con el control. Este comportamiento es similar a lo reportado por Sturve et al. (2008), quien después de exponer truchas a efluente al 50% por un período de 2 semanas encuentra actividad GST significativamente más baja en comparación con las actividades GST en peces expuestos por un período de 5 días a la misma concentración. Esta respuesta aguda de la actividad GST sugiere la presencia de prooxidantes en el efluente, y de una rápida capacidad de adaptación en el pez.

4.1.3. Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos pueden entregar información importante acerca del ambiente interno de los organismos (Li et al. 2011). El hematocrito y eritrocitos en peces expuestos al efluente Los Angeles, mostraron valores similares en la gradiente de concentraciones del efluente (control, 12.5%, 25%, 50% y 75%) para los distintos tiempos de exposición (7, 14 y 21 días), a excepción de la concentración 100% ya que esta fue significativamente mayor comparada con el control. Para el caso del efluente Sta. Barbara, se evidenció la misma tendencia que el efluente Los Angeles para todas las concentraciones y todos los tiempos. Los valores de hematocrito entre efluentes se mantuvieron similares, no así los eritrocitos en que los valores fueron mayores en los peces expuestos al efluente Los Angeles. Los efluentes de plantas de

tratamiento de aguas servidas generan estrés crónico en el peces sometidos a este escenario, por lo que se tiende a producir aumento en el hematocrito y recuento de eritrocitos (Wedemeyer et al. 1990, Wojtaszek et al. 2002 y Pierson et al. 2004).

El efecto a la exposición a efluentes de planta de tratamiento de aguas servidas sobre la diferenciación de células de la sangre en peces salmónidos ha sido previamente observado (Hitzfeld et al. 2000 y Prietz et al. 2000). El recuento de leucocitos, tanto en el experimento con el efluente Los Angeles como el efluente Sta. Barbara, muestran la misma tendencia a valores similares a las distintas concentraciones o leve disminución a medida que aumentan las concentraciones, siendo a los 21 días los menores valores de recuento de leucocitos. Esta similitud es descrita por Prietz et al. (2000), quien expuso a trucha café (*Salmo trutta f. fario*) a diferentes concentraciones de efluente, encontrando una disminución en el recuento de leucocitos comparados con los controles. Para el caso del recuento de linfocitos no se observa una tendencia clara en los experimentos con los efluentes de Los Angeles y Sta. Barbara, respectivamente. Se puede mencionar una leve disminución en el recuento de linfocitos a mayores concentraciones de exposición al efluente a los 7 y 21 días, sin embargo a los 14 días no se evidencia con claridad la tendencia. Kakuta (1997) y Hoeger et al. (2005) también encontraron una disminución en el recuento de linfocitos en experimentos con efluentes de planta de tratamiento de aguas servidas. Kakuta (1997) encontró un bajo número de linfocitos en goldfish (*C. auratus*) expuestos a 10% y 20% de efluente de planta de tratamiento de aguas servidas mientras que Hoeger et al. (2005) evidenció la misma tendencia en *Oncorhynchus mykiss* en experimento de exposición de larga duración.

4.1.4 Respuestas reproductivas

El índice gonadosomático (IGS), tanto en el experimento con el efluente Los Angeles como el efluente Sta. Barbara, muestran la misma tendencia al aumento de valores a medida que aumentan las concentraciones (control, 12.5%, 25% y 50%), para después disminuir a las concentraciones más altas (75% y 100%), llegando a valores similares o mayores que los controles. Los valores IGS en los peces expuestos al

efluente Los Angeles y Sta. Barbara, respectivamente presentaron valores similares a los distintos tiempos de exposición. Lo evidenciado en este estudio es concordante con lo reportado por Diniz et al. (2005), quien encontró valores altos de IGS en carpas (*Carassius carassius*) expuestas a una concentración de 100% efluente de planta de tratamiento de aguas servidas.

La hormona plasmática (testosterona) analizada para peces machos expuestos a efluentes Los Angeles y Sta. Barbara respectivamente, presentan la misma tendencia de comportamiento. A los 7 días de exposición, se evidencia una disminución de la hormona a mayores concentraciones, sin embargo esto es revertido a los tiempos 14 y 21 días, encontrando que la concentración 100%, posee valores similares o mayores significativos que el control. En el caso de las hembras para la misma hormona, sólo es comparable la tendencia con el efluente de Sta. Barbara, ya que en el caso del efluente de Los Angeles, existe una tendencia a la disminución de la hormona a mayores concentraciones, encontrando al 100% valores más bajos que el control. Estas variaciones hormonales son descritas por Hoger et al. (2006), quien encontró para hembras (*Oncorhynchus mykiss*) un aumento de niveles de testosterona significativos a una exposición de 1.5% de efluente por un período de 26 semanas comparado con los controles. Y para machos (*Oncorhynchus mykiss*) no encontró diferencias significativas en los niveles de testosterona medidos. Björkblom et al. (2009), también describe una situación similar a lo mencionado anteriormente, encontrando valores de testosterona similares a los controles en hembras (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a una concentración de 80% por un período de 7 días, mientras que para machos encontró valores similares o menores.

La hormona plasmática (17β -estradiol) analizada para peces hembras expuestos a efluentes Los Angeles y Sta. Barbara respectivamente, presentan la misma tendencia de comportamiento. A medida que aumentan las concentraciones de exposición al efluente, los niveles de 17β -estradiol se mantienen similares o aumentan, principalmente comparando con la concentración 100% con el control y si analizamos entre los tiempos de exposición (7, 14 y 21 días) los valores se mantienen parejos. Estos resultados son coincidentes con lo encontrado por Hoger et al. (2006) quien

evidenció un aumento de niveles de 17 β -estradiol significativos a una exposición de 1.5% de efluente por un período de 26 semanas comparado con los controles en *Oncorhynchus mykiss*. Y Björkblom et al. (2009), estudiando la misma especie de pez encontró valores de 17 β -estradiol mayores a una concentración de 80% que los controles por un período de 7 días.

Esta investigación muestra una temprana maduración gonadal femenina, encontrando oocitos en estado III (oocitos en estado vitelogénico). Esto no es considerado normal en truchas juveniles, ya que en esta etapa los peces gastan la mayoría de su energía en crecimiento y no en desarrollo gonadal (Liley et al. 2002). Las hembras expuestas al efluente Los Angeles, mostraron un aumento en la presencia de oocitos III a medida que aumentaban las concentraciones, esta tendencia es más predominante a los 7 y 14 días. La situación con el experimento del efluente Sta. Barbara, no muestra una tendencia clara.

4.2 Experimentos en terreno

4.2.1. Actividad EROD e índice hepatosomático (IHS)

El IHS de los peces en el exp_EQ, presenta mayores valores en el sitio impacto para todos los tiempos de exposición, mientras que exp_RB la zona de impacto presenta valores similares o menores que el sitio pre-impacto. Cabe mencionar que el exp_EQ tuvo valores más altos del IHS que el exp_RB.

La inducción de la actividad EROD de los peces del sitio impacto del exp_EQ, posee la misma tendencia que los peces del exp_RB, esto es valores similares o mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto para los 7 y 14 días. Esta tendencia es similar a lo encontrado por Solé et al. (2002) quien mostro valores altos de inducción de actividad EROD (~ 200 pmol/min/mg proteína) en carpas (*Cyprinus carpio*) capturadas en sitio ubicado a 23 km de la descarga de aguas servidas en el río Anoia, Barcelona.

4.2.2. Actividad GST (*glutation-S-transferasa*)

En este estudio encontramos que la actividad GST en los peces del exp_EQ, posee la misma tendencia que los peces del exp_RB, con valores similares a mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto a los 7 y 14 días. Este comportamiento es similar a lo reportado por Almroth et al. (2008), quien realizó experimentos de jaulas con *Oncorhynchus mykiss* en el río Viskan (Suecia) por un período de 14 días, encontrando valores similares de la actividad GST entre el sitio impacto (Gässlösa) y pre-impacto.

4.2.3. Parámetros hematológicos

El hematocrito y eritrocitos en peces del exp-EQ, mostraron valores similares o menores en el sitio impacto comparado con en sitio pre-impacto en los todos los tiempos de exposición. Para el caso del exp_RB, se evidenció valores similares o mayores en el sitio impacto comparado con en sitio pre-impacto en todos los tiempos de exposición. Los valores de hematocrito y eritrocitos fueron menores en el exp_EQ en comparación con el exp_RB. En experiencias realizadas en ríos mediterráneos de España (río Ripoll), el comportamiento del hematocrito en *Barbus meridionales*, tiende a disminuir en sitios expuestos a efluente de aguas servidas (aprox. 2 a 3 kms aguas abajo de la planta de tratamiento), siendo la tendencia por literatura a aumentar, sin embargo los autores Maceda-Viega et al. (2010), concluyen que la poca oxigenación de los ríos y la presencia de metales pesados pueden ocasionar estos efectos.

El conteo de leucocitos para el exp_RB, presenta valores mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto en todos los tiempos de exposición, sin embargo para el exp-EQ, la tendencia es a menores valores en la sitio impacto comparada con el sitio pre-impacto. Para el caso del recuento de linfocitos se observa la misma tendencia tanto para el exp_RB, como exp_EQ, con valores similares o menores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto en los distintos tiempos de exposición. Los peces expuestos a estres crónico (contaminación, agentes

infectantes, predación, entre otros) manifiestan neutrofilia, linfopenia y en algunos casos monocitosis (Davis et al. 2008 y Cazenave et al. 2009). Maceda-Viega et al. (2010) en experimentos realizados en ríos mediterráneos de España (río Ripoll), reporta resultados similares a lo registrado por este estudio y la literatura, encontrando menores valores en el recuento de linfocitos en sitios expuestos a efluente de aguas servidas (aprox. 2 a 3 kms aguas abajo de la planta de tratamiento) en comparación con sitios pre-impacto.

4.2.4 Respuestas reproductivas

El índice gonadosomático (IGS), tanto en el exp-EQ (7 y 14 días) como el exp_RB (14 y 21 días), evidencian valores similares o mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto. La literatura ha reportado la disminución del índice gonadosomático (IGS) en peces que viven en ríos expuestos a efluentes de aguas servidas (Harries et al. 1997 y Hassanin et al. 2002), concluyendo que la disminución del IGS es a causa mayoritariamente a la combinación de diferentes químicos estrogénicos descargados en los ríos provenientes de plantas de tratamiento de aguas servidas.

La hormona plasmática (testosterona) analizada para peces machos del exp_EQ y exp_RB respectivamente, presentan la misma tendencia de comportamiento. A los 7, 14 y 21 días en ambos experimentos los valores de niveles de testosterona fueron similares o mayores en el sitio de impacto comparado con el sitio pre-impacto. En el caso de las hembras para la misma hormona, existe una variabilidad en los niveles de testosterona en el exp_EQ, existe valores menores a los 7 días, valores similares a los 14 días y valores mayores a los 21 días, comparando los sitios de impacto con los sitios pre-impacto. En el exp_RB los tiempos de exposición 7 y 14 muestran tendencias opuestas, el primero presenta valores mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto, mientras que a las 14 días se evidenció menores valores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto. Las concentraciones de testosterona en peces expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en experimentos de terreno, presenta una cierta controversia ya que en

algunos estudios se evidencia un aumento de niveles de testosterona o disminución de niveles de testosterona. Lavado et al. (2004), presenta niveles bajos de testosterona en machos (*Cyprinus carpio*) en el sitio de impacto (río Ebro, España), mientras que las hembras presenta valores similares son diferencias significativas. Un factor a considerar es la cantidad de muestras, ya que muchas veces según el sitio de experimentación los resultados son bastantes variables (Folmar et al. 2001).

La histología de gónadas femeninas muestra para el exp_EQ y ex_RB, porcentajes bajos de oocitos en estado III (oocitos en estado vitelogénico) en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto a los 7 y 21 días, mientras que a los 14 días para el exp_EQ, muestra valores altos para el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto.

5. Conclusión

El presente estudio presenta evidencia de que los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas de las ciudades Los Angeles y Sta. Barbara son potencialmente responsables en los efectos observados en peces en los experimentos en laboratorio, como inducción de la actividad EROD, incremento en el índice hepatosomático (IHS), inducción de estrés oxidativo (aumento de la actividad GST), alteraciones inmunes (aumento de hematocrito, eritrocitos y disminución de linfocitos) y alteraciones reproductivas (aumento de niveles hormonales circulantes y aparición de oocitos en estado III). Los experimentos en terreno (exp_EQ y exp_RB) presentaron los mismos efectos adversos, al comparar los resultados del efluente_LA con la experiencia en terreno en el estero Quilque refleja que la información obtenida para la concentración 100% de efluente es similar o menor a lo obtenido en los sitios impacto y post-impacto del exp_EQ. Esta tendencia es similar en la comparación entre efluente_StB y efluente_RB.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Beca para estudios de Doctorado en Chile, 2009 (n° 21090501) y Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral, 2010 (n° 24100142). Además de agradecer al personal de las plantas de tratamiento de las ciudades de Los Angeles y Sta. Barbara (Essbio), por su buena disposición y ayuda constante. Así como también al Fondo de financiamiento de Centros de investigación en Áreas prioritarias (FONDAP) CRHIAM 150085 y al Laboratorio de Bionsayos-Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.



Referencias

- Adams, S.M., Crumby, W.D., Greeley, M.S., Ryon, M.G. & Schilling. (1992). Relationship between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environm. Toxicol. Chem.* 11, 1549-1557.
- Almroth, B.C., Albertsson, E., Sturve, J. & Förlin, J. (2008). Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 370–378.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J. & Makynen EA. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20,1276–1290.
- Björkblom, C., Högfors, E., Salste, L., Bergelin, E., Olsson, P., Katsiadaki, I. & Wiklund, T. (2009). Estrogenic and androgenic affects of municipal wastewater effluent on reproductive endpoint biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 , 1063-1071.
- Campbell, T.W. & F. Murru. (1990). An introduction to fish hematology. *Compendium of Continuing Education in Veterinary Science* 12, 525-533.
- Campbell, T.W. (1988). Fish cytology and hematology. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 18, 349-364.
- Cazanave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A. & Wunderlin, D.A. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado river basin (Santa Fe, Argentina). *Environm. Pollut.* 157, 3025-3033.
- Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. (2000). In vivo comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ Toxicol Chem* 19, 1867–1874.
- Davis, A. K., Maney, D.L. & Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J,P, & Waldock, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32,1549–1558.

- Diniz, M.S., Peres, I., Magalhaes-Antoine, J., Fall, J. & Pihan, J.C. (2005). Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 427-435.
- Filby, A. L., Neuparth, T., Thorpe, K. L., Owen, R., Galloway, T. S. & Tyler, C. R. (2007). Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. *Environmental Health Perspectives* 115, 1704-1710.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., et al. (1996). Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104, 1096–1101.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Marcino J., Metcalfe, C. & Guillete, L.J. (2001). Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion citreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 40, 392-398.
- Gagne, F., Blaise, C. & Andre, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 329-336.
- Gimeno, S., Komen, H., Venderbosch, P.W.M. & Bowmer, T. (1997). Disruption of sexual differentiation in genetic male common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to an alkylphenol during different life stages. *Environ Sci Technol* 31, 2884–2890.
- Grizzle, J.M., Horowitz, S.A. & Strength, P.R. (1988). Caged fish as monitors of pollution: Effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Water Resource Bull.* 24, 951-959.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D. & Brouwer, M. (1999). Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ Health Perspect* 107, 385–390.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B., (1974). Glutathione-s-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Harries, J.E., Janbakhsh, A., Jobling, S., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R. (1999). Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem.* 18, 932–937.

- Harries, J.E., Shehan, D.A., Jobling, S., Mathiessen, P., Neall, P. & Sumpter, J.P. (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environm. Toxicol. Chem.* 16, 534-542.
- Hassanin, A., Kuwahara, S., Nurhidaya, T., Tsukamoto, Y., Ogawa, K & Hiramatsu, K. (2002). Gonadosomatic Index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals. *J. Vet Med Sci.* 64, 921-926.
- Hecker, M., Tyler, C.R., Hoffmann, M., Maddix, S. & Karbe, L. (2002). Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environ Sci Technol* 36, 2311–2321.
- Hemming, J.M., Waller, W.T., Chow, M.C., Denslow, N.D. & Venables, B. (2001). Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas rafinesque*, 1820). *Environ Toxicol Chem* 20, 2268–2275.
- Hitzfeld, B.C., Prietz, A. & Dietrich, D.R. (2000). Gesundheitszustand der fische im Rheintal, Expositionsversuche 1999. Untersuchungen zum Immunstatus. *Department Environmental Protection, Canton St. Gallen, Switzerland, p.87.*
- Hoeger, B., Hitzfeld, B., Kollner, B. & Dietrich, D.R., Vanden-Heuvel M.R. (2005). Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquat. Toxicol.* 73, 79–90.
- Hoger, B., Taylor, S., Hitzfeld, D., Dietrich, R. & Van Den Heuvel, M. (2006). Stimulation of reproductive growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following exposure to treated sewage effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2753-2759.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., et al. (2002). Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod.* 66, 272–281.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P. & Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic

- effluent. *Aquatic Toxicology* 65, 205-220.
- Kakuta, I. & Murachi, S. (1997). Physiological response of carp, *Cyprinus carpio*, exposed to raw sewage containing fish processing wastewater. *Environ Toxicol Water Qual* 12, 1–9.
- Kosmala, A., Migeon, B., Flammarion, P. & Garric, J. (1998). Impact assessment of wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker ethoxyresorufin-o-deethylase: Field and on site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 19-28.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldúa, D., Martín, R. & Porte, C. (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro river. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 247-257.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Koavora, J., Li, P., & Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 319-327.
- Liley, N., Tamkee, P., Tsai, R. & Hoysak, D. (2002). Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. *Can J Fish Aquat Sci* 59, 144–152.
- Liney, K. E., Hagger, J. A., Tyler, C. R., Depledge, M. H., Galloway, T. S. & Jobling, S. (2006). Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives* 114,81-89.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656-666.
- Lubert, R.A., Nims, R.W., Mayer, R.T., Cameron, J.W. & Schechtman, L.M. (1985). Measurement of cytochrome P450 dependent dealkylation of alkoxypheoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: *Effects of dicumarol*. *Mutat Res* 142, 127–131.
- Maceda-Veiga, A., Monroy, M., Viscor, G. & Sostoa, A. (2010). Changes in non-specific biomarkers in the mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) exposed to sewage effluent in a mediterranean stream (Catalonia, NE Spain). *Aquatic Toxicology* 100, 229-237.

- McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Jardine, J.J., Robinson, R.D. & Van Der Kraak G.J. (1995). Protocol for measuring in vitro steroid production by fish gonadal tissue. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci 1961*, 1–78.
- Melancon, M.J., Yeo, S.E. & Lech, J.J. (1987). Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in fish by exposure to river water. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 127-135.
- Mukherjee, D., Guha, D., Kumar, V. & Chakrabarty, S. (1991). Impairment of steroidogenesis and reproduction in sexually mature *Cyprinus carpio* by phenol and sulfide under laboratory conditions. *Aquatic Toxicol.* 21, 29-40.
- Narnaware, Y. K. & Baker, B. I. (1996). Evidence that cortisol may protect against the immediate effects of stress on circulating leukocytes in the trout. *General and Comparative Endocrinology* 103, 359-366.
- Oakes, K. D., McMaster, M. E. & Van Der Kraak, G. J. (2004). Oxidative stress responses in longnose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. *Aquatic Toxicology* 67, 255-271.
- Orrego, R., Burgos, A., Moraga-Cid, G., Inzunza, B., Gonzalez, M., Valenzuela, A., Barra, R. & Gavilan J.F. (2006). Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio river, Chile. *Environ Toxicol Chem* 25, 2280–2287.
- Paxeus, N. & Schroder, H.F. (1996). Screening for non-regulated organic compounds in municipal wastewater in Goteborg, Sweden. *Water Sci. Technol.* 33, 9-15.
- Paxéus, N. (2004). Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, B-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Sci. Technol.* 50, 253-260.
- Pierson, P. M., Lamers, A., Flik, G. & Mayer-Gostan, N. (2004). The stress axis, stannioacin, and ion balance in rainbow trout. *General Comparative Endocrinology* 137, 263-271.
- Prietz, A., Fleischhaver, V., Hitzfeld, B. & Dietrich, D. R. (2000). Effects of stream water on immune parameters of brown trout (*Salmo trutta f fario*). In: Proceedings of the third SETAC (Society of Environmental Toxicology Chemistry), *World Conference Poster Presentation, May 2000*.

- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol.* 8, 275–285.
- Rodgers-Gray, T. P., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldock, M. J., Sumpter, J. P. & Tyler, C. R. 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science & Technology* 35, 462-470.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. & Sumpter J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 32, 1559–1565.
- Salo, H. M., Hébert, N., Dautremepuits, C., Cejka, P., Cyr, D. G. & Fournier, M. (2007). Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 84, 406-414.
- Sepulveda, M.S, Gallagher, E.P, Wieser, C.M. & Gross, T.S. (2004). Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 431-440.
- Slooff, W., Van Kreil, C. & Baars, A.J. (1983). Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface water in the Netherlands. *Aquatic Toxicol.* 4,1-14.
- Solé, M., Barceló, D. & Porte, C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology* 60, 233–248.
- Sturve, J., Almroth, B.C. & Forlin, L. (2008). Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 70, 446-452.
- Suntio, L.R., Shiu, W.Y. & Mackay, D. (1988). A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere* 17, 1249-1290.
- Svenson, A., Orn, S., Allard, A.S., Viktor, T., Parkkonen, J., Olsson, P.E., Forlin, L. & Norregren, L. (2002). Estrogenicity of domestic and industrial effluents in Sweden. *Aquatic. Ecosyst. Health Manage* 5, 423-434.
- Van Der Kraak, G., Dye, H.M. & Donaldson, E.M. (1984). Effects of LHRH and Des Gly¹⁰O (D-Ala⁶) LHRH-ethylamide on plasma sex steroid profiles in adult female

- coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 55 : 35-45.
- Van Der Kraak, G. Rosenblum, P.M. & Peter, R.E. (1990). Growth hormone-dependent potentiation of gonadotropin-stimulated steroid production by ovarian follicles of the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 233-239.
- Van Der Kraak, G., Sorensen, P.W. , Stacey, N.E. & Dulks, J.G. (1989). Periovulatory female goldfish release three potential pheromones; 17 α , 20 β -dihydroxyprogesterone, 17 α ,20 β -dihydroxyprogesterone glucuronide and 17 α -hydroxyprogesterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 452-457.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Yeom, D. H., Lee, S. A., Kang, G. S., Seo, J. & Lee, S. K. (2007). Stressor identification and health assessment of fish exposed to wastewater effluents in Miho Stream, South Korea. *Chemosphere* 67, 2282-2292.
- Wade, M.G. & G. Van Der Kraak. (1991). The control of testicular steroidogenesis in the goldfish: effects of activators of different intracellular signalling pathways. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 337-344.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B..A. & Mcleay, D..J. (1990). Stress and acclimation.. in: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. Am. *Fischeries Soc.* 56, 215-219
- Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-gabska, M., Adamowicz, A. & Dzugaj A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Ciprinus carpio L.*): Cortisol effects on the Carp Blood. *General Comparative Endocrinology.* 125, 176-183.
- Woodworth, G., King, C., Miskiewicz, AG., Laginestra, E. & Simon, J. (1999). Assessment of the comparative toxicity of sewage effluent from 10 sewage treatment plants in the area of Sydney, Australia using an amphipod and two sea urchin bioassays. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 174-178.

Capítulo V: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio mediante el uso de bioindicadores (*O. mykiss*) y biomarcadores se pudo evidenciar estrés oxidativo, alteraciones reproductivas e inmunes en individuos juveniles de *O. mykiss* expuestos crónicamente a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas en experimentos de laboratorio y terreno. Si consideramos que el río Biobio es receptor de múltiples descargas de efluentes (planta de celulosa, planta de tratamiento de aguas servidas, entre otras) es importante analizar los efectos que estos estarían causando en el ambiente y sus organismos.

La descarga de efluentes de celulosa ha sido un tema relevante de investigación en estos últimos 10 años en la región del Biobio, especialmente río Biobio e Itata, encontrando efectos de disrupción endocrina en peces nativos (capítulo II) como en experimentos con *O. mykiss* (Orrego et al. 2005, 2006, 2009). Se evidenció una sobreestimulación del sistema reproductivo, observado como un aumento de la producción de 17β -estradiol y un consecuente aumento del tamaño de gónada como abundancia de oocitos en estados avanzados de madurez en hembras presentes aguas abajo de la descarga del efluente de plantas de celulosa. La actividad EROD al actuar como elemento detoxificador, corresponde a un biomarcador de exposición que al ser medido para evaluar efecto del efluente de planta de celulosa evidenció un aumento en la actividad aguas abajo de la descarga.

Tomado en cuenta estos años de investigación acerca de descarga de efluentes de planta de celulosa y los efectos que causan en los peces ya sean nativos como introducidos, es que se crea la interrogante acerca de evaluar los efectos de efluentes de planta de tratamiento de aguas servidas, considerando que es una descarga de interés mundial científicamente por corresponder a una mezcla compleja de compuestos.

La región del Biobio presenta 23 plantas que vierten sus efluentes a la cuenca río Biobio, de las cuales 4 lo hacen directamente al río. Los efluentes de las ciudades Se identificaron 16 compuestos emergentes en efluentes de Los Angeles y Sta. Barbara,

mostrando altas concentraciones en el efluente de Los Angeles (capítulo III).

Gemfibrozilo (29.783 ng L^{-1}), ibuprofeno (3.800 ng L^{-1}), atenolol (2.590 ng L^{-1}), diclofenaco (1.945 ng L^{-1}), triclosan ($1.856,7 \text{ ng L}^{-1}$), cafeína (1.395 ng L^{-1}) y e-carbamazepina (1.345 ng L^{-1}) presenta altas concentraciones en el efluente de la planta de tratamiento de aguas servidas de Los Angeles en el año 2013. Esta tendencia es evidente en la mayoría de los productos químicos analizados, con las concentraciones más altas en los efluentes de la planta de Los Angeles en 2013. Esto podría explicarse por la diferencia de población servida por las plantas de tratamiento, teniendo la ciudad de los Angeles una población mayor (aproximadamente 180.000 habitantes) que Sta. Barbara. Además hay que considerar que el efluente de Los Angeles, es de origen tanto doméstico como industrial, mientras que para la ciudad de Santa Barbara es sólo doméstico. Otras concentraciones de contaminantes emergentes fueron $<1.0 \mu\text{g L}^{-1}$, por lo tanto, sólo los contaminantes anteriores fueron considerados como relevantes para el medio ambiente ($e_i > 1 \mu\text{g L}^{-1}$).

Gemfibrozilo (29.782 ng L^{-1}) e ibuprofeno (3.800 ng L^{-1}) a estas concentraciones pueden ocasionar efectos a nivel reproductivo. Esto fue reportado por Galus et al. (2014), quién evidenció que 10.000 ng L^{-1} de gemfibrozilo puede reducir la fecundidad en adultos de zebrafish, mientras que Kyunghee et al. (2013), reporta que a una concentración ($\geq 1 \mu\text{g L}^{-1}$ por 21 días) causa efectos sobre la descendencia en zebrafish.

Los experimentos en laboratorio con juveniles de *O. mykiss*, muestran alteraciones reproductivas en índice gonadosomático (IGS), niveles hormonales plasmáticos (testosterona y 17β -estradiol) y desarrollo gonadal en hembras. El IGS es mayor en la concentración de 100% de efluente de ambas ciudades, esto se concordante con lo reportado por Diniz et al. (2005). En los experimentos en terreno tanto en el exp-EQ (7 y 14 días) como el exp_RB (14 y 21 días), evidencian valores similares o mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto. La literatura ha reportado la disminución del índice gonadosomático (IGS) en peces que viven en rios expuestos a efluentes de aguas servidas (Harries et al. 1997 y Hassanin et al. 2002).

La hormona testosterona en machos poseen la misma tendencia que el IGS para el experimento con el efluente Los Angeles y Sta. Barbara, mientras que en hembras esta tendencia sólo es para el efluente de Sta. Barbara. Estas variaciones hormonales son descritas por Hoger et al. (2006) y Björkblom et al. (2009). En experimentos en terreno la hormona testosterona analizada para peces machos del exp_EQ y exp_RB respectivamente, presentan la misma tendencia de comportamiento. A los 7, 14 y 21 días en ambos experimentos los valores de niveles de testosterona fueron similares o mayores en el sitio de impacto comparado con el sitio pre-impacto. En el caso de las hembras para la misma hormona, existe una variabilidad en los niveles de testosterona en el exp_EQ y exp_RB. Un factor a considerar es la cantidad de muestras, ya que muchas veces según el sitio de experimentación los resultados son bastantes variables (Folmar et al. 2001).

El desarrollo gonadal muestra una temprana maduración gonadal femenina, encontrando oocitos en estado III (oocitos en estado vitelogénico). Esto no es considerado normal en truchas juveniles, ya que en esta etapa los peces gastan la mayoría de su energía en crecimiento y no en desarrollo gonadal (Liley et al. 2002). Las hembras expuestas al efluente Los Angeles, mostraron un aumento en la presencia de oocitos III a medida que aumentaban las concentraciones. La histología de gónadas femeninas muestra para el exp_EQ y ex_RB, porcentajes bajos de oocitos en estado III (oocitos en estado vitelogénico) en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto a los 7 y 21 días, mientras que a los 14 días para el exp_EQ, muestra valores altos para el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto.

La concentración de atenolol (2.590 ng L^{-1}) es considerada baja en relación a lo reportado por Steinbach et al. (2013), quién reporta que estas concentraciones ($1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ - concentración ambientalmente relevante, $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ por 21 y 42 días) no producen mortalidad, pero si alteraciones en respuestas como peso, tamaño, factor de condición, índice hepatosomático, gonadosomático en peces expuestos comparados con el control. Triclosan (1.857 ng L^{-1}), muestra una concentración menor que lo reportado por Liang et al. (2013) quién reporta una toxicidad aguda ($\text{LC}_{50-96 \text{ hrs}}$) de $1,47 \text{ mg L}^{-1}$. Estos resultados muestran que triclosan induce la actividad

de enzimas de metabolismo fase I y II. Li et al. (2011), demostraron que carbamazepina ($LC_{50-96 \text{ hrs}} \text{ value of } 19,9 \text{ mg L}^{-1}$) causa efectos en respuestas antioxidantes parámetros hematológicos y actividad EROD. La concentración encontrada en este estudio para e-carbamazepina (1.345 ng L^{-1}), es considerada baja en relación a lo mencionado anteriormente. Igualmente la concentración de diclofenaco (1.945 ng L^{-1}) es considerado bajo en comparación con lo reportado por la literatura, ya que Stepanova et al. (2013) muestra que una exposición crónica (3 mg L^{-1} por 30 días) incrementa la actividad glutathion-s-transferasa así como también la mortalidad.

El IHS de los peces expuestos al efluente Los Angeles y Sta. Barbara presenta mayores valores a medida que aumentan las concentraciones de exposición sólo a los 21 días, siendo a la concentración 100% los valores más altos. Esto es concordante con lo mencionado por Grizzle et al. (1988) y Mukherjee et al. (1991), quienes afirman que la exposición a efluentes de plantas de tratamiento generan un aumento en el tamaño del hígado y con esto una inducción o estimulación de las actividades enzimáticas. En los experimentos en terreno el IHS de los peces en el exp_EQ, presenta mayores valores en el sitio impacto para todos los tiempos de exposición, mientras que exp_RB la zona de impacto presenta valores similares o menores que el sitio pre-impacto.

La inducción de la actividad EROD de los peces expuestos al efluente Los Angeles, posee la misma tendencia que los peces expuestos al efluente Sta. Barbara, un aumento de la inducción de la actividad enzimática a mayores concentraciones de exposición para todos los tiempos analizados (7, 14 y 21 días), mostrando los valores más altos a la concentración 100% y a los 21 días. Esta tendencia dosis-dependencia también es descrita por Sturve et al. (2008) y Melancon et al. (1987). La inducción de la actividad EROD de los peces del sitio impacto del exp_EQ, posee la misma tendencia que los peces del exp_RB, esto es valores similares o mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto para los 7 y 14 días. Esta tendencia es similar a lo encontrado por Solé et al. (2002).

En este estudio encontramos que la actividad GST en los peces expuestos al efluente de Los Angeles aumenta a medida que aumentan las concentraciones de exposición a los 7, 14 y 21 días, no siendo significativas estas diferencias. Mientras que para el experimento con el efluente de Sta. Barbara, se presentan fluctuaciones de aumento y disminución de la actividad GST entre las diferentes concentraciones a los 7, 14 y 21 días, encontrando menores valores significativos al 100% comparado con el control. Este comportamiento es similar a lo reportado por Sturve et al. (2008). En este estudio encontramos que la actividad GST en los peces del exp_EQ, posee la misma tendencia que los peces del exp_RB, con valores similares a mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto a los 7 y 14 días. Este comportamiento es similar a lo reportado por Almroth et al. (2008).

Los parámetros hematológicos pueden entregar información importante acerca del ambiente interno de los organismos (Li et al. 2011). El hematocrito y eritrocitos en peces expuestos al efluente Los Angeles, mostraron valores similares en la gradiente de concentraciones del efluente (control, 12.5%, 25%, 50% y 75%) para los distintos tiempos de exposición (7, 14 y 21 días), a excepción de la concentración 100% ya que esta fue significativamente mayor comparada con el control. Para el caso del efluente Sta. Barbara, se evidenció la misma tendencia que el efluente Los Angeles para todas las concentraciones y todos los tiempos. Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas generan estrés crónico en los peces sometidos a este escenario, por lo que se tiende a producir aumento en el hematocrito y recuento de eritrocitos (Wedemeyer et al. 1990, Wojtaszek et al. 2002 y Pierson et al. 2004). El hematocrito y recuento de eritrocitos en peces del exp-EQ, mostraron valores similares o menores en el sitio impacto comparado con en sitio pre-impacto en los todos los tiempos de exposición. Para el caso del exp_RB, se evidenció valores similares o mayores en el sitio impacto comparado con en sitio pre-impacto en todos los tiempos de exposición. En experiencias realizadas en ríos mediterráneos de España (río Ripoll), el comportamiento del hematocrito en *Barbus meridionales*, tiende a disminuir en sitios expuestos a efluente de aguas servidas (aprox. 2 a 3 kms aguas abajo de la planta de tratamiento), siendo la tendencia por literatura a aumentar, sin embargo los autores Maceda-Viega et al. (2010), concluyen que la

poca oxigenación de los ríos y la presencia de metales pesados pueden ocasionar estos efectos.

El recuento de leucocitos, tanto en el experimento con el efluente Los Angeles como el efluente Sta. Barbara, muestran la misma tendencia a valores similares a las distintas concentraciones o leve disminución a medida que aumentan las concentraciones, siendo a los 21 días los menores valores de recuento de leucocitos. Esta similitud es descrita por Prietz et al. (2000). Para el caso del recuento de linfocitos no se observa una tendencia clara en los experimentos con los efluentes de Los Angeles y Sta. Barbara, respectivamente. Se puede mencionar una leve disminución en el recuento de linfocitos a mayores concentraciones de exposición al efluente a los 7 y 21 días, sin embargo a los 14 días no se evidencia con claridad la tendencia. El conteo de leucocitos para el exp_RB, presenta valores mayores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto en todos los tiempos de exposición, sin embargo para el exp-EQ, la tendencia es a menores valores en la sitio impacto comparada con el sitio pre-impacto. Para el caso del recuento de linfocitos se observa la misma tendencia tanto para el exp_RB, como exp_EQ, con valores similares o menores en el sitio impacto comparado con el sitio pre-impacto en los distintos tiempos de exposición. Los peces expuestos a estres crónico (contaminación, agentes infectantes, predación, entre otros) manifiestan neutrofilia, linfopenia y en algunos casos monocitosis (Davis et al. 2008 y Cazenave et al. 2009).

CONCLUSIONES

De acuerdo a las hipótesis de trabajo planteadas:

Hipótesis Específica 1: *La exposición crónica a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas induce la actividad de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa (GST) y la actividad EROD en tejido hepático de individuos juveniles de O. mykiss.*

La actividad de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa (GST) se ve aumentada o con valores similares a mayores concentraciones en experimentos en bioensayos y en los sitios de impacto comparados con los sitios pre-impacto en experimentos de terreno. La actividad EROD presenta la misma tendencia. Siendo triclosan y diclofenaco los potenciales causantes de estos efectos.

Hipótesis Específica 2: *La exposición crónica a efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas disminuye la concentración de linfocitos y aumenta el hematocrito en sangre de individuos juveniles de O. mykiss.*

El hematocrito y el recuento de eritrocitos presentan valores mayores a la concentración 100% de efluente en experimentos de bioensayos y en el sitio de impacto comparado con el control en experimentos en terreno (sólo río Biobio). El recuento de leucocitos presenta valores similares o menores a mayores concentraciones de efluente en experimentos de bioensayos y en en sitio de impacto comparado con el sitio pre-impacto en experimentos en terreno (sólo estero Quilque). El recuento de Linfocitos no manifiesta tendencia clara en experimentos de bioensayos, mientras que los sitios de impacto presentan valores menores en comparación con los sitios pre-impacto en experimentos en terreno. Siendo triclosan el potencial causante de estos efectos.

Hipótesis Específica 3: *Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas alteran la fisiología reproductiva en individuos juveniles de O. mykiss, inhibiendo el crecimiento gonadal, produciendo alteraciones en el grado de desarrollo gonádico y*

disminuyendo las concentraciones de hormonas esteroideas circulantes.

El índice gonadosomático (IGS) presenta valores mayores a concentración de 100% efluente comparado con el control en bioensayos para ambos efluentes. Los sitios de impacto (río Biobio y estero Quilque) también registran valores mayores en comparación con los sitios pre-impacto.

La hormona testosterona en machos presenta valores mayores a mayores concentraciones de efluente comparado con el control en bioensayos para ambos efluentes y ambos sitios de impacto (río Biobio y estero Quilque) muestra la misma tendencia. Para el caso de las hembras sólo el experimento con el efluente de Santa Barbara muestra la misma tendencia.

El desarrollo gonadal muestra una temprana maduración gonadal femenina, encontrando oocitos en estado III (oocitos en estado vitelogénico) para el experimento con el efluente de Los Angeles (a mayores concentraciones), mientras que para los experimentos en terreno esta tendencia sólo se evidenció a los 14 días.

Siendo gemfibrozilo e ibuprofeno los potenciales causantes de estos efectos.

Hipótesis Específica 4: *Respuestas medidas en individuos juveniles de *O. mykiss* para el efluente de la ciudad Los Angeles presenta valores mayores que lo evidenciado para la ciudad Sta. Barbara.*

Los experimentos en terreno (exp_EQ y exp_RB) presentaron los mismos efectos adversos, al comparar los resultados del efluente_LA con la experiencia en terreno en el estero Quilque refleja que la información obtenida para la concentración 100% de efluente es similar o menor a lo obtenido en los sitios impacto y post-impacto del exp_EQ. Esta tendencia es similar en la comparación entre efluente_StB y efluente_RB.

REFERENCIAS

- Almroth, B.C., Albertsson, E., Sturve, J. & Förlin, J. (2008). Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 370–378.
- Björkblom, C., Högfors, E., Salste, L., Bergelin, E., Olsson, P., Katsiadaki, I. & Wiklund, T. (2009). Estrogenic and androgenic affects of municipal wastewater effluent on reproductive endpoint biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 , 1063-1071.
- Cazanave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A. & Wunderlin, D.A. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado river basin (Santa Fe, Argentina). *Environm. Pollut.* 157, 3025-3033.
- Davis, A. K., Maney, D.L. & Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Diniz, M.S., Peres, I., Magalhaes-Antoine, J., Fall, J. & Pihan, J.C. (2005). Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 427-435.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Marcino J., Metcalfe, C. & Guillete, L.J. (2001). Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion citreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 40, 392-398.
- Grizzle, J.M., Horowitz, S.A. & Strength, P.R. (1988). Caged fish as monitors of pollution: Effects of chlorinated effluent from a wastewater treatment plant. *Water Resource Bull.* 24, 951-959.
- Harries, J.E., Shehan, D.A., Jobling, S., Mathiessen, P., Neall, P. & Sumpter, J.P. (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environm. Toxicol. Chem.* 16, 534-542.
- Hassanin, A., Kuwahara, S., Nurhidaya, T., Tsukamoto, Y., Ogawa, K & Hiramatsu, K. (2002). Gonadosomatic Index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals. *J. Vet Med Sci.* 64, 921-926.

- Hoger, B., Taylor, S., Hitzfeld, D., Dietrich, R. & Van Den Heuvel, M. (2006). Stimulation of reproductive growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following exposure to treated sewage effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2753-2759.
- Kyunghee J., Liu, X., Saeram, L., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J., & Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*; 254-255, 242-251.
- Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Koavora, J., Li, P., & Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidants responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 74, 319-327.
- Liley, N., Tamkee, P., Tsai, R. & Hoysak, D. (2002). Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. *Can J Fish Aquat Sci* 59, 144–152.
- Maceda-Veiga, A., Monroy, M., Viscor, G. & Sostoa, A. (2010). Changes in non-specific biomarkers in the mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) exposed to sewage effluent in a mediterranean stream (Catalonia, NE Spain). *Aquatic Toxicology* 100, 229-237.
- Melancon, M.J., Yeo, S.E. & Lech, J.J. (1987). Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in fish by exposure to river water. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 127-135.
- Mukherjee, D., Guha, D., Kumar, V. & Chakrabarty, S. (1991). Impairment of steroidogenesis and reproduction in sexually mature *Cyprinus carpio* by phenol and sulfide under laboratory conditions. *Aquatic Toxicol.* 21, 29-40.
- Orrego, R., Moraga-Cid, G., González, M., Barra, R., Valenzuela, A., Burgos, A. & Gavilán, J.F. (2005). Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environ Toxicol Chem* 24, 935–1943.
- Orrego, R., Burgos, A., Moraga-Cid, G., Inzunza, B., González, M., Valenzuela, A., Barra, R. & Gavilán, J.F. (2006). Effects of pulp and paper mill discharges on caged

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Biomarker responses along a pollution gradient in the Biobío river, Chile. *Environ Toxicol Chem* 25, 2280–2287.
- Orrego, R., Guchardi, J., Hernández, V., Krausse, R., Roti, L., Armour, J., Ganeshakumar, M & Holdway, D. (2009). Pulp and paper mill effluent treatments have differential endocrine disrupting effects on rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 28, 181–188.
- Pierson, P. M., Lamers, A., Flik, G. & Mayer-Gostan, N. (2004). The stress axis, stannioacin, and and ion balance in rainbow trout. *General Comparative Endocrinology* 137, 263-271.
- Prietz, A., Fleischhaver, V., Hitzfeld, B. & Dietrich, D. R. (2000). Effects of stream water on immune parameters of brown trout (*Salmo trutta f fario*). In: Proceedings of the third SETAC (Society of Environmental Toxicology Chemistry), *World Conference Poster Presentation, May 2000*.
- Solé, M., Barceló, D. & Porte, C. (2002). Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology* 60, 233–248.
- Steinbach, C., Burkina, V., Federova, G., Grabicova, K., Velisek, J., Zlabek, V., Randak, T., Schmidt-Posthaus, H., Grabic, R., & Kroupova, H. (2013). The sub-lethal toxic effects and bioconcentration of the human pharmaceutical atenolol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environmental*; 497-498, 209-218.
- Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Plhalova, L., Prokes, M., Blahova, J., & Svobodova, Z. (2013). The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 35, 454-460.
- Sturve, J., Almroth, B.C. & Forlin, L. (2008). Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 70, 446-452.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. & Mcleay, D..J. (1990). Stress and acclimation.. in: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. Am. *Fischeries Soc.* 56, 215-219
- Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-gabska, M., Adamowicz, A. & Dzugaj A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp

(*Ciprinus carpio L.*): Cortisol effects on the Carp Blood. *General Comparative Endocrinology*. 125, 176-183.

