



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA MARINA

PROFESOR PATROCINANTE
DR. STEFAN WOELFL
INSTITUTO DE ZOOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS

PROFESOR COPATROCINANTE
DR. PATRICIO TORRES
INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

“ACUMULACION DE METALES PESADOS EN *Limnoderetrema tolosai*
(TREMATODA, DIGENEA) EN *Basilichtys australis* (PISCES,
ATHERINIFORMES) EN EL SANTUARIO DE LA NATURALEZA Y
LAGO PANGUIPULLI, CHILE”

TESIS DE GRADO PRESENTADA COMO
PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR
AL TITULO DE BIOLOGO MARINO

ANA ESTER LORCA TORRES

VALDIVIA - CHILE

2010

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron con su esfuerzo, guía y compañía, en especial:

- A Dios por la fuerza y vida que infunde cada día en mí y en mi trabajo.
- Al Sr. Don Stefan Woelfl: Al científico y al maestro, expreso mi más profundo respeto y admiración. A la persona; mi afecto, lealtad y compromiso. Profesor... lo quiero mucho!
- A mis padres, artífices y raíces de lo que soy.
- A mis hermanas y hermano, eternos compañeros de mi vida.
- A mis sobrinas/os por alegrar mi corazónmis queridos mandriles!!
- A mis cuñados/a por hacer felices a los que amo.
- A mis amigos, hermanos elegidos, por la compañía, el amor, la paciencia, el apoyo, las alegrías, las esperas, las risas que a lo largo de este trabajo me han brindado....incluyo en este sentimiento a mis amigos y compañeros de trabajo.
- Finalmente doy las gracias al Dr. Patricio Torres y al Dr. Germán Pequeño por su orientación en este trabajo. También a Don Luis Vargas por aceptar ser mi profesor Informante.. .muchas gracias Dr. Vargas.

Dedico este trabajo a Cecilia Jara Toledo y a Carlos Lara Peña
"Los más ciertos de mis horas inciertas"

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

As	Arsénico
Cu	Cobre
Cr	Cromo
Fe	Hierro
Mn	Manganeso
Ni	Níquel
Pb	Plomo
Zn	Zinc
L	Litro
ml	Mililitros
Mg	Miligramos
μg	Microgramos
	Microlitros
μL	

INDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUCCION	7
3.1. Bioindicación de metales en cuerpos acuáticos	8
3.2. Parásitos de peces como indicadores de contaminación con metales: una nueva propuesta de indicación medio ambiental	10
3.3. Fauna Ictica y parásitos trematodos en peces continentales de Chile	11
3.4. Hipótesis	15
3.5. Objetivo (s) General (s)	15
3.6. Objetivo (s) Específico (s)	15
4. MATERIAL Y METODO	16
4.1. Área de Estudio	16
4.2. Estaciones y fechas de muestreo	16
4.3. Metales estudiados	17
4.4. Muestreo del Agua	17
4.5. Captura de peces	18
4.6. Obtención de tejidos de peces	19
4.7. Obtención de parásitos	20
4.8. Preparación y análisis de metales en parásitos	21
4.9. Instrumentos para el análisis de metales trazas con TXRF	25
4.10. Preparación y análisis de metales en tejidos	27

4.11. Material de Referencia	28
4.12. Factor de Bioacumulación	29
4.13. Análisis Estadístico	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Calidad de la digestión y análisis de metales en material de referencia	31
5.2. Concentración de metales en el agua	32
5.3. Número de peces y parásitos aislados	33
5.4. Relación entre el peso seco y concentración de metales en trematodos	35
5.5. Comparación de concentración de metales entre sitios a partir de concentraciones detectadas en trematodos su hospedador.	39
5.6. Comparación de las concentraciones de metales en parásitos versus tejidos del hospedador provenientes del Santuario de la Naturaleza y sitios control.	43
6 DISCUSION	55
6.1. Relación peso seco de trematodos y la concentración de metales Detectadas en sus organismos.	55
6.3. Concentración de metales detectadas en trematodos	56
6.4. Comparación de concentración de metales entre sitios a partir de concentraciones detectadas en trematodos y concentraciones detectadas en el hospedador.	58
7. CONCLUSIONES	62
8. BIBLIOGRAFIA	63
9. ANEXO	77

1 RESUMEN

Desde hace años se han venido desarrollando técnicas de evaluación de la calidad medio ambiental, a partir de la utilización de peces y más recientemente sus parásitos. En este trabajo de tesis se postula que el trematodo intestinal *Limnoderetrema tolosai*, concentra una mayor cantidad de metales que su hospedador *Basilichthys australis*. Se presentan los primeros reportes de acumulación de metales Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As y Pb en *L. tolosai* y en cortes de tejido muscular, hepático e intestinal de *B. australis*. Posteriormente, se pone a prueba la capacidad que presentan los trematodos para evidenciar diferencias de concentración, comparando entre dos sitios de muestreo y dos sitios control. La metodología utilizada contempló básicamente la selección de muestras bajo el criterio de cortes limpios y parásitos completos, utilizando pinzas y material de disección de porcelana, liofilización. Posteriormente el traslado al UFZ – Leipzig/Halle, Departamento de Inland Water Reserch, Magdeburg, Alemania, donde se determinaron los metales pesados, mediante el análisis de fluorescencia de reflexión total de rayos X (Total X-Ray Reflection Fluorescence Spectrometry, TXRF). Los resultados permiten concluir que el parásito intestinal *L. tolosai*, concentra significativamente una mayor cantidad de metales que los tejidos musculares e intestinales de *Basilichthys australis*, presentando diferencias no significativas con el tejido hepático en metales como el Fe. También, se encontró diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de metal en los parásitos según sitio de muestreo, aunque estas diferencias son muy discretas. Se concluye que *L. tolosai* es una especie susceptible de ser utilizada como bioindicador en la determinación del estado de contaminación de cuerpos de agua a partir de especies endémicas.

2 ABSTRACT

For years evaluation techniques on environmental quality have been developed from the use of fish and more recently from its parasites as well as indicators of the environmental qualities. In this thesis it is proposed that the intestinal trematode *Limnoderetrema tolosai* concentrates a greater amount of metals than its host *Basilichthys australis*. This is the first reports of metal accumulation Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As and Pb detected in isolated *L. tolosai* and cuts of muscular, hepatic and intestinal tissue of *B. australis*. Later the capacity that the trematodes present to demonstrate the differences of contamination between two sample sites and two control sites is tested. The methodology basically contemplates the selection of samples under the criterion of clean cuts and complete parasites using tweezers and porcelain dissection material, drying. Later there was a transfer to the UFZ - Leipzig/Finds, Department of Inland Water Research, Magdeburg, Germany, where the heavy metals were determined, by means of the Total analysis X - Ray Fluorescence Spectrometry (TXRF). The results allow to conclude that the intestinal parasite *Limnoderetrema tolosai*, concentrates a greater amount of metals than muscular and intestinal tissues of *Basilichthys australis* presenting non significant differences with the hepatic tissue in metals such as Fe.

Some significant differences in the concentration of the *L. tolosai* according to the sample sites were found. However, these differences are slight. This capacity makes these parasite species likely to be used as a bioindicator in the determination of the state of contamination of water bodies from endemic species.

3 INTRODUCCION

La evaluación de los cuerpos de agua se fundamenta en la capacidad natural de estos para responder a los efectos de perturbaciones eventuales o permanentes, así, es posible usar propiedades estructurales y funcionales de los diferentes niveles de organización biológica para interpretar el estado de condición de un cuerpo de agua (Connell, 1997; Bray y Weil, 2002). En dichas evaluaciones se ha considerado el monitoreo de la calidad del agua tomando en cuenta, aparte de los parámetros físico – químicos, las variables biológicas, por su gran valor al representar los efectos acumulativos de los ecosistemas fluviales, sometidos a estrés por contaminación antrópica en el tiempo (Norris y Hawkins, 2000). Entre las variables biológicas, se han considerado las especies cuyas poblaciones son disminuidas, o que por el contrario, se vuelven abundantes bajo los efectos de la contaminación, denominándolas especies indicadoras (p.e. macrozoobentos). Por otra parte, los procesos vitales de individuos que muestran alteraciones específicas ante tales efectos, han sido llamados procesos bioindicadores (Salanki, 1985). En este sentido, la capacidad de bioacumulación que poseen los organismos acuáticos está referida a la capacidad de concentrar contaminantes en sus tejidos respecto a los niveles existentes en el medio en que habitan (Riisgard *et al.*, 1985; Diaz *et al.*, 2001; Gray, 2002), lo que hace que estos organismos sean considerados como indicadores de la exposición en ecosistemas contaminados. De particular importancia resulta esta bioacumulación en el caso de la contaminación por metales, ya que estos elementos no son metabolizados por los organismos (Luoma y Rainbow, 2005).

3.1 BIOINDICACION DE METALES PESADOS EN CUERPOS ACUATICOS

Se define como metales pesados al grupo de metales y semimetales (metaloideos) que se han asociado a la potencial contaminación y toxicidad de un ecosistema (Connell, 1997; Bray y Weil, 2002; Duffus, 2002). Estos elementos son constituyentes naturales del agua, derivados de la erosión de las rocas, vulcanismo e hidrotermalismo principalmente, los cuales se interrelacionan con el medio ambiente mediante ciclos biogeoquímicos naturales (Lantzi y Mackenzie, 1979). Por otra parte, la actividad industrial ha generado una gran cantidad de metales, los cuales son descargados al medio ambiente, afectando los ciclos naturales de los elementos. El análisis de metales pesados en organismos de agua dulce es importante para investigar la toma, bioacumulación y transferencia de estas sustancias a través de la cadena trófica (Liu y Wang, 2002; Woelfl *et al.*, 2008) ya que son sustancias, con gran estabilidad química frente a los procesos de biodegradación. Por ello los seres vivos son incapaces de metabolizarlos, generándose una contaminación por bioacumulación y un efecto multiplicador en la concentración del contaminante en la cadena trófica, definida como biomagnificación; (Castañe *et al.*, 2003; Mancera-Rodríguez y Álvarez-León, 2006). De este modo, los organismos expuestos a estos contaminantes, pueden acumular los metales en sus tejidos en concentraciones más altas que las que normalmente se encuentran en el ambiente (Warren y Haak., 2001; Mountouris *et al.*, 2002; Dallinger *et al.*, 2004; Boada *et al.*, 2007). Así, los contaminantes resultan potencialmente dañinos para los organismos en concentraciones elevadas, causando efectos tóxicos ya que se absorben muy eficientemente a través de las membranas biológicas (Langston, 1990; Rainbow, 1997; Villalobos, 1997; Mann *et al.*, 2002; Gagneten y Vila, 2001); influyendo en todos los niveles de organización, desde un nivel molecular hasta un nivel de comunidad (Wolterbeek y Verburg, 2001; Mann *et al.*, 2002).

Los niveles de metales presentes en un organismo están relacionados con variables medio ambientales y biológicas relativas a la especie bioacumuladora. Dentro de las variables ambientales se pueden señalar: calidad del agua, temperatura, salinidad y pH del medio. En síntesis, estas variables van a determinar el estado de solubilidad y biodisponibilidad del elemento (Boyden, 1974,1977; Connell, 1997; Bray *et al.*, 2002; Medina y Encina 2003;). La biodisponibilidad, corresponde a la fracción de metal total que está disponible para ejercer acción y efecto en el organismo receptor, es decir es la fracción de metal pesado, que está disponible para ser absorbido y corresponde a formas solubles e intercambiables. (John y Leventhal, 1995; Backer *et al.*, 2003; Luoma y Rainbow, 2005). Como se señaló también, debe ser considerada la naturaleza biológica de las especies con especial énfasis en la talla, sexo y posición en la cadena trófica. (Borchardt *et al.*, 1988; Boyden, 1974,1977; Cossa *et al.*, 1980; Frazier *et al.*, 1985; Lares y Orians, 1997). Dichas especies son utilizadas, para determinar la calidad del agua; basándose en los resultados de la aplicación de pruebas de toxicidad en organismos descritos como bioindicadores y asumen que los valores determinados pueden ser extrapolados para describir el estado de contaminación del ambiente (Medina y Encina, 2003). También se ha definido la relevancia del estudio del zooplancton en la transferencia de elementos traza a través de la cadena trófica y en particular a micro crustáceos como *Daphnia* por su prevalencia en ecosistemas no contaminados (Mages *et al.*, 2001; Woelfl *et al.*, 2003, 2006; Tapia *et al.*, 2006).

En Chile, donde se desarrolla una intensa actividad minera se ha señalado un aumento de los niveles de contaminación por metales pesados en los cuerpos de agua como ríos y embalses, especialmente cobre, cadmio, zinc y mercurio. También se ha informado sobre elevados niveles de metales pesados, provenientes de la minería artesanal, desperdicios industriales y domésticos

donde los ambientes lacustres y humedales se encuentran altamente expuestos, debido a su baja tasa de renovación. (Schalscha y Ahumada, 1998; Gaete *et al.*, 2007). Un ejemplo concreto es el cambio en la química del humedal Carlos Andwanter, después de entrar en operación la planta de Celulosa Arauco y Constitución a 25 km río arriba del Río Cruces. Al respecto, en el estudio sobre el “origen de mortalidades y disminución poblacional de aves acuáticas en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwanter”, se menciona que durante el año 2004 se produjo una alteración significativa de la calidad de las aguas al interior de este humedal, que afectó los distintos procesos físico-químicos de este ambiente acuático (UACH, 2005).

3.2 PARÁSITOS DE PECES COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN CON METALES: UNA NUEVA PROPUESTA DE INDICACION MEDIOAMBIENTAL

En la última década se ha manifestado a nivel científico, una creciente preocupación y necesidad por contar con bioindicadores más eficientes para la determinación de metales biológicamente disponibles, sobre todo en casos donde existe el problema de que las concentraciones presentes, no son detectables con los métodos analíticos que tradicionalmente se utilizan para la cuantificación de las perturbaciones ocurridas por contaminación (Poulin, 1992; Bagge y Valtonen, 1996, Sidall *et al.*, 1997; Tenora *et al.*, 1997; Broeg *et al.*, 1999; Sures y Sidall, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999; Sures, 2000; Gefen *et al.*, 2003; Soliman *et al.*, 2004; Khan, 2006; Sures *et al.*, 1994, 1997, 2003; Woelfl *et al.*, 2008). En este sentido, se han desarrollado principalmente en Europa, técnicas de medición de calidad medio ambiental, a partir del uso de parásitos de peces, los cuales han evidenciado una gran sensibilidad para acumular metales existentes en el medio ambiente, lo que los convertiría en una poderosa herramienta de

monitoreo, sobre todo en ecosistemas acuáticos no contaminados (Riggs *et al.*, 1987; Sures *et al.*, 1994, 2003; Galli *et al.*, 1998; Sures y Sidall, 1999; Palikova y Barus, 2003; Schuldermann *et al.*, 2003; Thielen *et al.*, 2004; Selda e Ismail, 2005; Pascual y Abollo, 2005; Zimmermann *et al.*, 2005; Sures y Zimmermann, 2007). En dichos trabajos, se ha utilizado principalmente, especies de parásitos de amplia distribución mundial, estableciéndose que algunas poblaciones de endoparásitos helmintos, especialmente cestodos *Ligula intestinalis*, *Diphyllobothrium latum*, *Monobothrium wagneri* y acantocéfalos *Pomphorhynchus laevis*, *Aspersentis megarhynchus*, *Partenuisentis ambiguus*, *Polymorphus minutus*, *Acanthocephalus lucii*. Dichos parásitos, poseen una marcada capacidad de acumular metales pesados, por sobre los niveles encontrados comúnmente en los tejidos de sus hospedadores; capacidad que no se ha evidenciado en estudios realizados en poblaciones de nematodos *Philometra ovata*, *Contracaecum rudolphii*, *Anguillicola crassus*, presentes en animales acuáticos. Estos estudios a su vez, han entregado interesantes resultados sobre los efectos de los parásitos en la fisiología del hospedador, señalándose que estos helmintos, estarían induciendo a resultados falso – negativo o falso - positivo del estado de contaminación de un ambiente, en los procedimientos habituales de bioindicación, que no consideran la presencia de parásitos en los organismos centinelas; es decir, al determinar los niveles de concentración de metales pesados, en los organismos hospedadores, no se considera que dichas concentraciones pueden verse subestimadas por el efecto producido por los parásitos, que absorben metales de sus hospedadores (Sures y Siddall, 1999). También se ha señalado la importancia de los efectos de la polución sobre la abundancia y la alteración de poblaciones y comunidades parasitarias. Estas alteraciones se explican en función de que los cambios en los niveles de polución, afectan las comunidades parasitarias al producir efectos directamente en los hospederos intermediarios, paraténicos o finales. Al respecto, estadios

larvales de *Pomphorhynchus laevis* ven disminuidas sus poblaciones, cuando sus hospederos intermediarios *Gammarus pulex* están sometidos a ambientes con altas cargas de contaminación. Por otra parte, hospederos como *Pleuronectes americanus*, en ambientes de baja contaminación presentan una alta prevalencia de digeneos: *Steringophorus furciger* y *Macvicarius soleae* y del acantocéfalo *Echinorhynchus gadi*. Por otra parte, cuando los niveles de contaminación aumentan en el ambiente, son mayoritariamente parasitados por *Cryptocotile lingua*. También se ha reportado que *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) disminuye su prevalencia en ejemplares de salmón del atlántico (*Salmo salar*) cuando aumentan las concentraciones de metales Cu, Fe y Mn (Hoole, 1997; Lafferty, 1997; Overstreet, 1997; Pietrock y Mclauhun, 2002; Morley *et al.*, 2003; Schuldermann *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2003; Poléo *et al.*, 2004; Khan, 2007).

Otra línea investigativa, ha sido la comparación de los niveles de concentración de metales, mediante pruebas toxicológicas en estadios de vida libre en trematodos, como miracidios y cercarías. En *C. lingua* presente en *Littorina littorea*, se ha reportado que, disminuyen su longevidad, en ambientes sometidos a un aumento en los niveles de contaminación por metales pesados. También se ha señalado, que las mayores concentraciones de metales pesados, se encuentran en hospedadores definitivo y no en estadios larvales, como ocurre en ejemplares de del acantocéfalo, *Pomphorhynchus laevis* en el huésped intermediario, *Gammarus pulex*, donde no se encontraron diferencias entre parásito y hospedador intermediario en la concentración de metales, pero sí entre el parásito y el hospedero definitivo, *Leuciscus cephalus*, infectados experimentalmente; reportándose además, la dificultad de trabajar con estadios larvales de parásitos, por ser de corta vida y difíciles de monitorear en procesos permanentes de evaluación de calidad ambiental (Siddall y Sures, 1998; Cross *et al.*, 2001; Seth *et al.*, 2002; Sures, 2004).

Pese al avance de las investigaciones, en Latinoamérica se registra sólo un trabajo donde se estudió la relación de metales entre el parásito y su hospedador. En este trabajo, larvas plerocercoides de *D. latum* fueron aisladas en *Oncorhynchus mykiss* en el lago Riñihue, Chile; señalándose que *D. latum*, tiene una mayor capacidad de acumulación de metales que el hospedador con mayor sensibilidad en los parásitos de menor talla respecto de los parásitos más grandes, para concentrar más oligoelementos por unidad de peso seco (Woelfl *et al.*, 2008).

Sin embargo, estos trabajos no han puesto a prueba si los parásitos endémicos, al igual que los de distribución cosmopolita, junto con acumular más metal, pueden ser utilizados para comparar entre ambientes con distintos niveles de contaminación, especialmente en aquellos donde los métodos convencionales no pueden medir con certeza (Woelfl *et al.*, 2008).

3.3 FAUNA ÍCTICA Y PARÁSITOS TREMATODOS EN PECES CONTINENTALES DE CHILE

La fauna íctica de Chile se compone de un total de 11 familias, 17 géneros y alrededor de 44 especies nativas de peces, incluyendo dos especies de lampreas. Entre estas especies, uno de los grupos más relevantes corresponde al orden Atheriniformes, con 7 especies, entre ellas *Basilichthys australis* (Eigenmann, 1927), presente desde el Río Huasco (28° -29° S) hasta Isla la Grande de Chiloé (42°-43°S) (Dyer, 2000). Se ha señalado que esta especie está presente naturalmente en aguas continentales del sur de Chile y por tanto es un organismo representativo de estos ambientes.

En cuanto a la diversidad de trematodos presentes en especies de agua dulce en Chile, se ha identificado principalmente, estadios de metacercarias, de *Diplostomum mordax*, aisladas de cerebro, cavidades ventriculares y meninges de *B. australis* (Torres *et al.*, 1996); estadios adultos

y juveniles de *Deropegus patagonicus* en *Percichthys trucha* (Torres, et al., 1992). En la familia Zoogonidae, se identifico a la especie *Steganoderma oviformis* en su estado adulto, en el intestino de *Aplochiton zebra* (Szidat, 1962), al igual que *Steganoderma sp.*, presente en *Diplomystes nahuelbutaensis* (Olmos et al., 2003). Finalmente, en *B. australis*, se describió una nueva especie también perteneciente a la familia Zoogonidae, , *Limoderetrema tolosai*, (Torres y Neira, 1991), especifica de *B. australis*.

La especificidad del hospedador en *L. tolosai*, sumado a que su tamaño esta en el rango de milímetros, permiten una identificación rápida y fácil manipulación, sin que se afecte significativamente el ecosistema, generando una gran cantidad de información por unidad de pez sacrificado. Por lo tanto, el uso de este parásito como bioindicador sería un procedimiento económico y útil para la cuantificación de los niveles de concentración de metales presentes en el ambiente. Es así, que en este estudio se propone investigar la capacidad de *L. tolosai* para ser utilizado como bioindicador por metales pesados. Específicamente, se determinará la relación entre la concentración de metales pesados presentes en *L. tolosai* y su hospedador, y la concentración entre endoparásitos expuestos a ambientes con diferentes grados de contaminación.

3.4 HIPÓTESIS

Se postula que el trematodo intestinal *L. tolosai*, concentra una mayor cantidad de metales que el tejido muscular, intestinal y hepático de su hospedador, *B. australis*. Esta capacidad convierte a estos parásitos en una especie susceptible de ser utilizada como bioindicador en la determinación del estado de contaminación de cuerpos de agua a partir de especies endémicas.

3.5 Objetivo General:

El objetivo general de este estudio es cuantificar el grado de bioacumulación de metales pesados en el endoparásito *L. tolosai* y comparar con las concentraciones de los tejidos del hospedador *B. australis*. Además, se compara la concentración de metales pesados de *L. tolosai* en peces de distintas localidades: Santuario de la Naturaleza, Pishuinco y Lago Panguipulli, estos dos últimos utilizados como control.

3.6 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Determinar diferencias de concentración de metales pesados entre el endoparásito *L. tolosai* y los tejidos de su hospedador *B. australis*.
2. Estimar el factor de bioconcentración de metales pesados presentes en el endoparásito *L. tolosai* respecto de las concentraciones presentes en aguas del Santuario de la Naturaleza y sitios control (Pishuinco y Lago Panguipulli).
3. Cuantificar el grado de acumulación de metales pesados en *L. tolosai* de *B. australis* provenientes del Santuario de la Naturaleza y compararlas con las concentraciones detectadas en muestras de parásitos de dos sitios control (Pishuinco y Lago Panguipulli).

4 MATERIAL Y METODO

4.1 AREA DE ESTUDIO

El área principal de estudio corresponde al Santuario de la Naturaleza el cual cubre una superficie de 4,877 ha. Está localizado, inmediatamente al norte de la ciudad de Valdivia en la XIV Región de los Ríos, Chile ($39^{\circ} 41'S$ $73^{\circ} 11'O$) (Fig. 1). El Santuario se designó bajo la Comisión Ramsar sobre Humedales con la adhesión de Chile el 27 de julio de 1981.

Los sitios control corresponden a el Lago Panguipulli ($39^{\circ} 47'S$ - $71^{\circ} 40'O$), de tipo oligotrófico y caracterizado como no contaminado y Pishuenco sitio considerado como poco intervenido por acción antrópica ($39^{\circ} 47' 57'' S$ - $73^{\circ} 40' 87'' O$).

4.2 ESTACIONES Y FECHAS DE MUESTREO

Se colectaron muestras de agua y ejemplares de *B. australis* en los sitios de San Luis, 100 metros aguas arriba del ducto Celco y Pishuenco; entre los días 9 y 28 de enero de 2006 (Fig.1). El lago Panguipulli fue muestreado entre los días 9 y 10 de marzo de 2006.



Fig. 1: Estaciones de muestreo. San Luis, 100 mt aguas arriba del ducto Celco y sitios control Pishuenco y Panguipulli.

4.3 METALES ESTUDIADOS

Los metales analizados corresponden a Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As y Pb, los cuales fueron medidos en *L. tolosai* aislados del hospedador y en cortes de tejido muscular, hepático e intestinal de *B. australis*. También se consideran los resultados obtenidos en muestras de agua tomadas en los sitios de captura de los peces.

4.4 MUESTREOS DE AGUA

Las muestras de agua se colectaron a nivel superficial con envases plásticos, posteriormente fueron filtradas empleando filtros de 0.2 μm contenidos en jeringas y traspasados a frascos Eppendorf (Fig 2), adicionándoles 60 μL de ácido nítrico (HNO_3 Suprapure, Merck Nr 1.00441.0250), el cual contiene un bajo contenido en metales, para la digestión de la materia orgánica y liberación de los metales pesados.



Fig. 2: Agua filtrada para análisis de metales en frascos Eppendorf, preparada para ser enviada a Alemania.

4.5 CAPTURA DE PECES

Se realizó mediante pesca de cerco, utilizando redes de apertura de malla de 32 mm. Preferentemente, se desarrollaron muestreos nocturnos debido a los hábitos alimenticios de los animales. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio en depósitos de plástico y mantenidas a no más de 4° C, evitando el contacto con elementos metálicos.

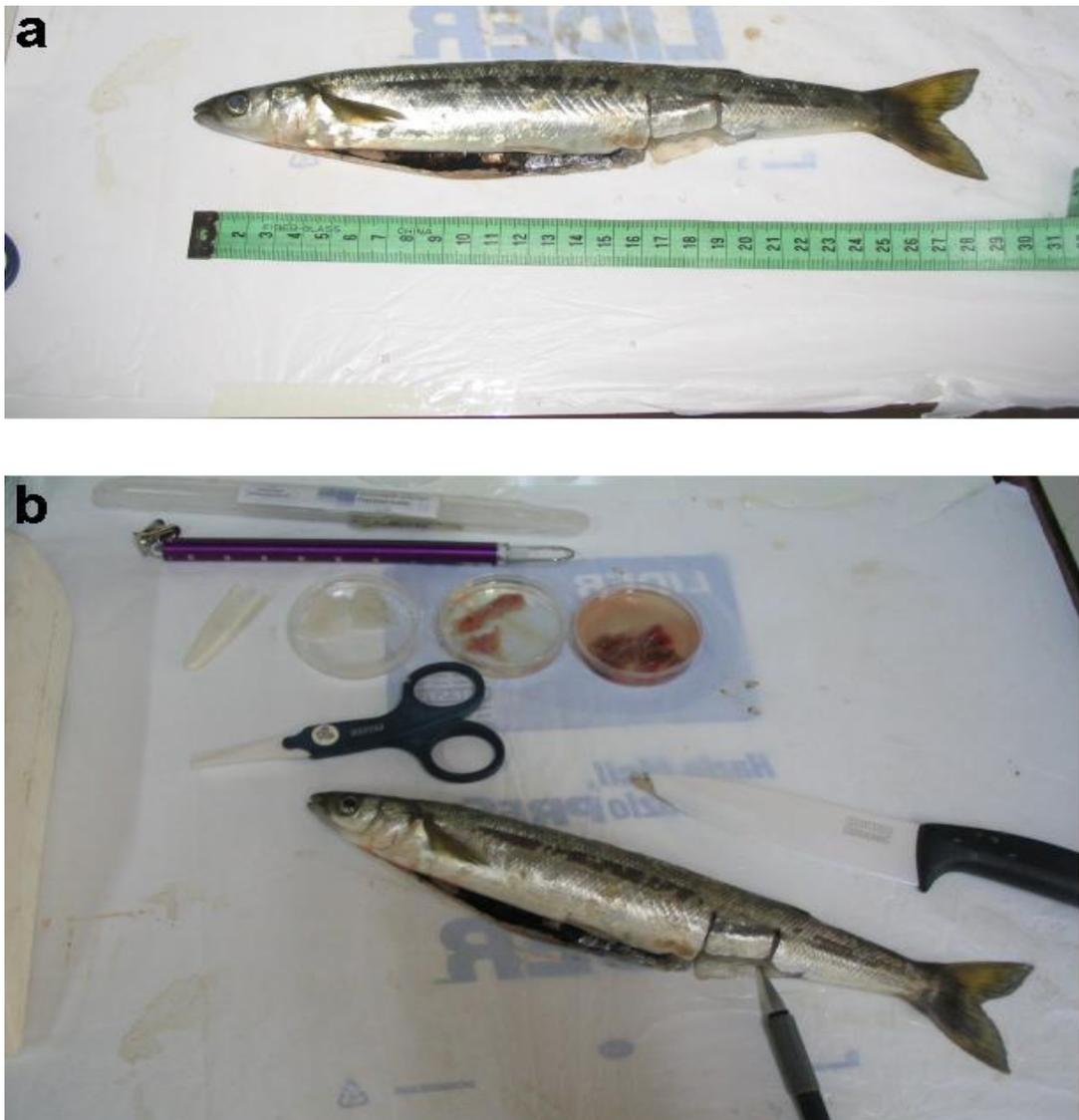


Fig. 3: a) Ejemplares de *B. australis* medidos pesados y sexados. b) Obtención de cortes de tejido de *B. australis* con instrumentos de porcelana para evitar contaminación por metales.

4.6 OBTENCIÓN DE TEJIDOS DE PECES

Los peces fueron eviscerados con cuchillo de porcelana previamente lavado con etanol al 96%. Las vísceras fueron depositadas en una placa de Petri de vidrio con agua destilada. Con la ayuda de pinzas y bisturí de cerámica, se obtuvieron cortes de hígado, intestino y músculo; los cuales fueron depositados en placas de Petri y lavados tres veces cada uno en agua destilada (Fig.3 b y 4).



Fig. 4: Placas de Petri con cortes de tejido muscular, intestinal y hepático de *B. australis*, luego del proceso de liofilización y previo a su envío a Alemania.

Los cortes fueron observados mediante Lupa Leica MZ6, GF 10 X y 40X. El criterio de selección fue el de cortes limpios, ausentes de signos evidentes de contaminación por residuos de sangre, mucosa, espinas u escamas presentes en las muestras que pudieran producir alteraciones en los resultados. Estos cortes fueron puestos en placas de Petri y mantenidos en freezer a -17° C (Fig. 4). Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas y enviadas a Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Magdeburg Alemania, para el análisis de metales trazas.

4.7 OBTENCIÓN DE PARÁSITOS

De *B. australis* se aislaron, con pipeta Pasteur, muestras de trematodos vivos (Fig. 5 a y b), que se depositaron en placas de Petri con agua destilada cuidando no producir shock osmótico en las muestras. Posteriormente, los parásitos fueron lavados tres veces en agua destilada y una vez en agua suprapura. La identificación de los parásitos fue realizada por el Dr. Patricio Torres.

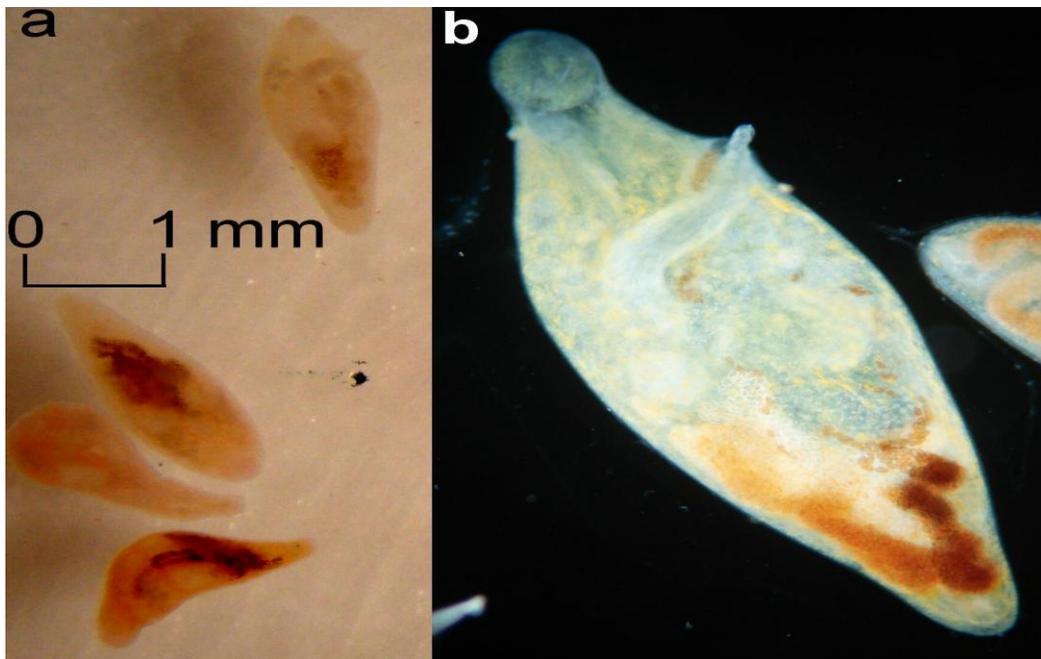


Fig. 5: *Limnoderetrema tolosai* aislado in vivo bajo lupa 40x (a) y con aumento 100x en campo oscuro microscopio estereoscópico (b)

Finalmente, los parásitos seleccionados fueron trasladados a frascos de teflón (volumen: 1,5 ml) para congelarlos en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas fueron mantenidas en un freezer a -17°C en el Laboratorio de Química de Aguas del Instituto de Zoología, hasta su posterior liofilización. Los parásitos aislados en cada pez, corresponden a un criterio arbitrario y no a la totalidad de parásitos presentes en cada ejemplar.

4.8 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE METALES EN PARÁSITOS

La preparación de los parásitos desde su colección hasta el análisis de metales trazas se representa en el esquema de la Fig. 6. Según este protocolo los parásitos son 1) congelados en nitrógeno líquido, 2) liofilizados y 3) pesados. La muestra se prepara directamente sobre un carrier de cuarzo, siendo digeridas con ácido nítrico y oxidadas en plasma fría, para finalmente ser medidos a través de TXRF. Los pasos detallados se presentan a continuación:

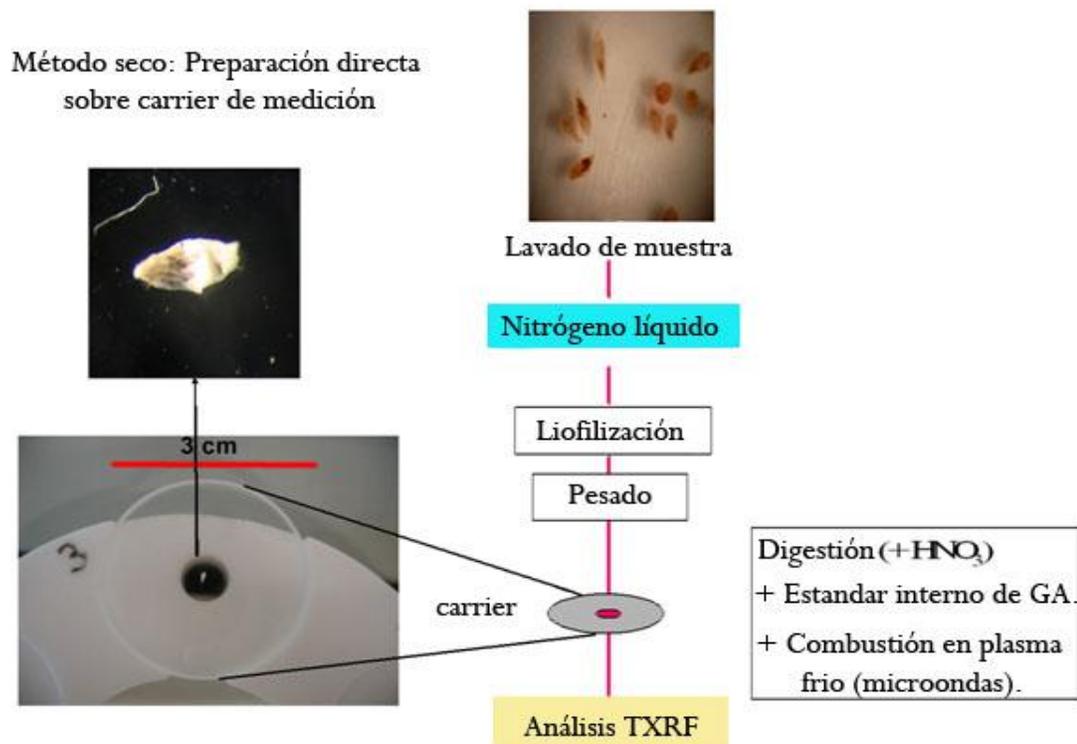


Fig. 6: Esquema de la técnica de preparación de parásitos para la medición de metales con TXRF.

4.8.1 LIOFILIZACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Las muestras congeladas de los parásitos fueron trasladadas al Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile, siendo liofilizadas durante 24 horas en un equipo Leybold – Heraeus. LIOVAC GT2. Este procedimiento involucra el congelamiento de la muestra, seguido de un secado al vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. Como resultado de la liofilización se obtuvo individuos secos (Fig. 7).

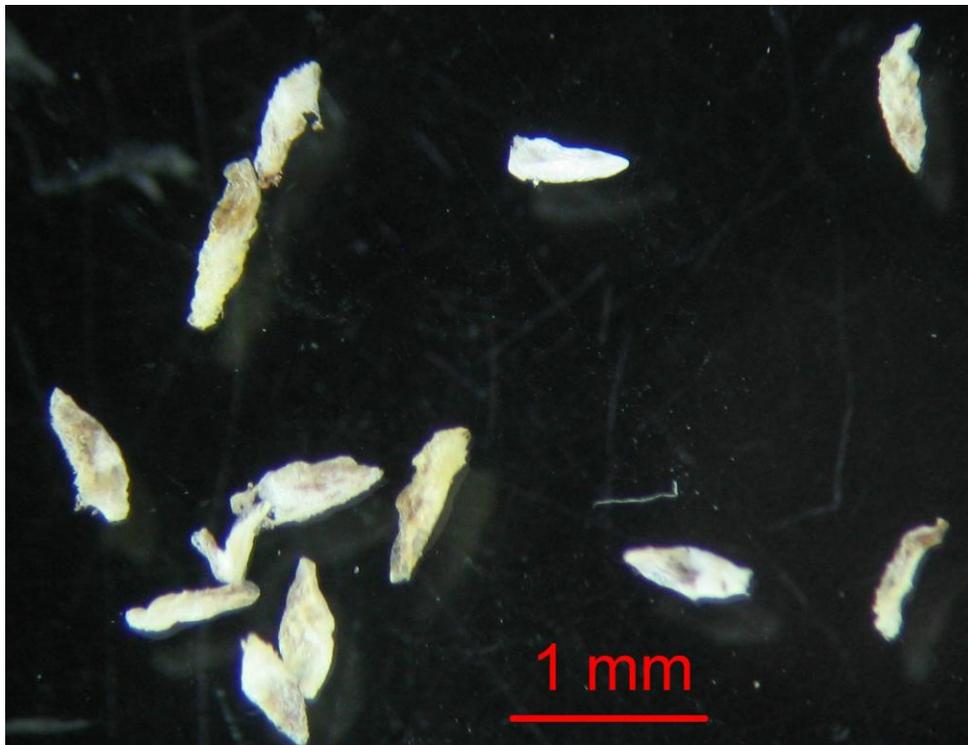


Fig. 7: Parásitos liofilizados

4.8.2 SELECCIÓN DE PARÁSITOS

Después de la liofilización se seleccionaron los parásitos aptos para ser analizados, es decir, aquellos que se presentaban intactos y sin alteraciones por shock osmótico. Los organismos se manipularon con pinzas de cerámica previamente lavadas con etanol al 96%, a fin de evitar

contaminación por metales pesados a través de pinzas convencionales. Los parásitos seleccionados se depositaron en Tubos Eppendorf de 1 ml de capacidad para ser pesados y preparados posteriormente sobre los carrier (Fig. 8).

Además, de cada muestra se tomaron fotografías con el objetivo de confrontar resultados “dudosos” como por ejemplo la verificación de algún tipo de contaminación durante la manipulación de los individuos con elementos metálicos o la existencia de tejidos sucios con mucosas u otro tipo de elementos. Finalmente, las muestras se trasladaron al UFZ – Leipzig/Halle, Departamento of Inland Water Research, Magdeburg, Alemania, donde se determinaron los metales pesados, mediante el análisis Total X – Ray Fluorescence Spectrometry (TXRF) (Mages *et al.*, 2001; Woelfl *et al.*, 2003). Esta parte del trabajo fue realizada por el Dr. S.Woelfl y la Dra. M. Mages durante julio 2006.

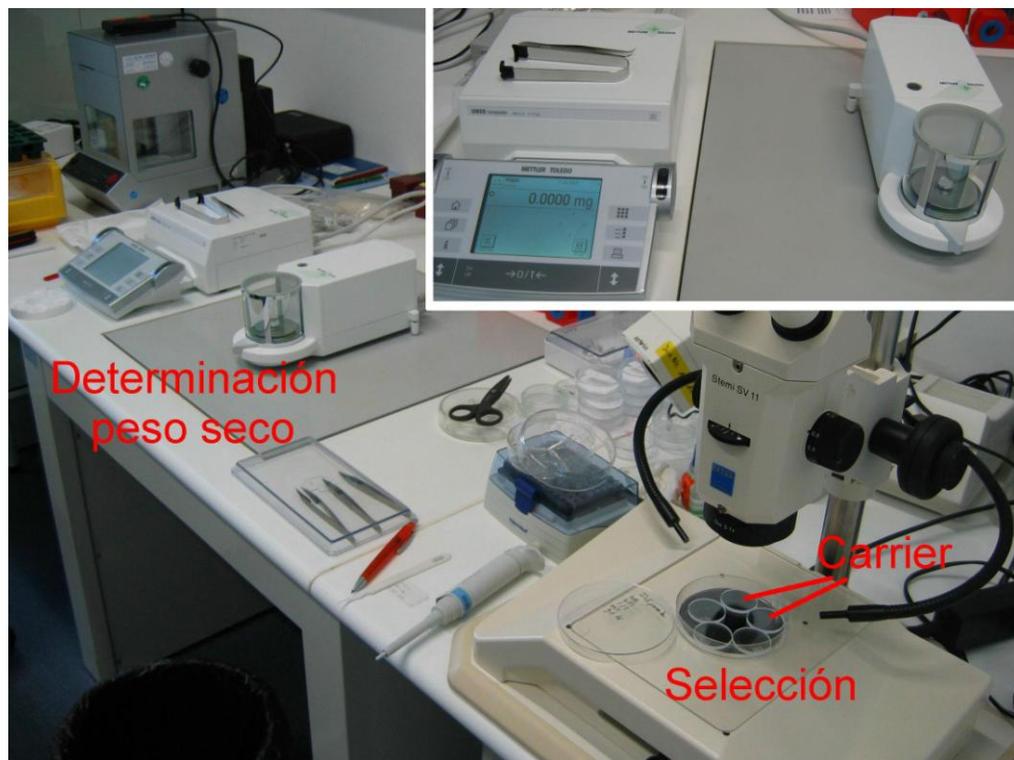


Fig. 8: Balanza ultrafina para determinación de peso seco y carriers para la selección de parásitos.

4.8.3 DETERMINACIÓN DEL PESO SECO Y PREPARACIÓN DE LOS PARÁSITOS SOBRE LOS CARRIER

Después de la selección de las muestras, se determinó el peso seco de cada parásito usando una balanza ultrafina (Sartorius Ultramicro S4, sensibilidad 0.1 µg) (Fig. 8). El peso seco fue posteriormente corregido considerando los efectos de la humedad ambiental de acuerdo a la siguiente ecuación (Mages *et al.*, 2001):

$$PS_0 = PS_x / (1 + HR_x * FC)$$

Donde PS_0 es el peso seco del parásito extrapolado al 0% de humedad ambiental; PS_x es el peso medido en la balanza, HR_x es la humedad relativa del aire al momento de pesar la muestra y FC es un factor de corrección empírico ($0,00293 \pm 0,00013$).

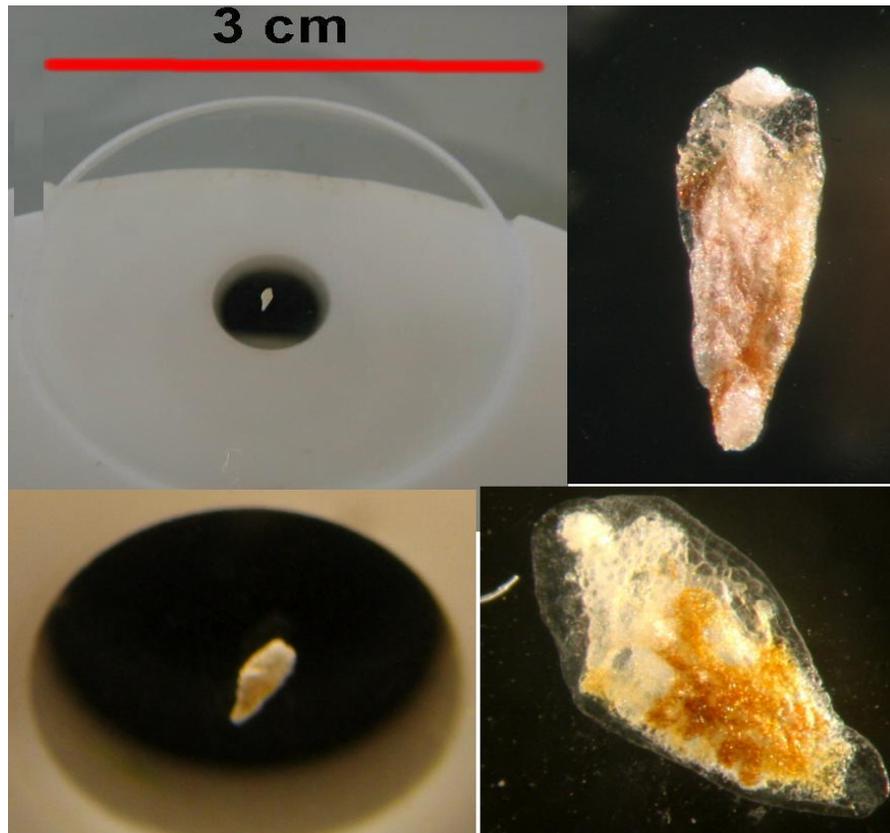


Fig. 9 Ejemplares de *Limnoderetrema tolosai* liofilizado y preparado sobre el carrier.

La humedad relativa fluctuó entre un 35 y 80 % durante el tratamiento de las muestras. Después de ser pesados los individuos fueron puestos en carriers de cuarzo (Fig. 9), fijándolos con aproximadamente 5 μ L de agua destilada y secándose después con aire. Posteriormente, se adiciono un estándar interno de Galio y finalmente se realizó una digestión con HNO₃ (Suprapuro, Merck) poniendo el carrier durante aproximadamente 10 minutos sobre una placa calefactor a 60°C.

4.8.4 ELIMINACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA POR CPA (COLD PLAMA ASHING)

En una segunda fase, las especies fueron incineradas en un plasma frío de ceniza (plasma – System 100, Technics Plasma GMBH, Kirchheim, Alemania). Esta técnica se utiliza para rastrear elementos de material biológico diminuto (rango - μ g), debido a la heterogeneidad que éstos presentan sobre el cuarzo. Lo anterior permite la oxidación de materia orgánica, principalmente del carbono, el cual corresponde al 50% del peso seco de los individuos, mejorando así la detección de metales pesados (Woelfl *et al.*, 2003).

La incineración se realizó en las siguientes condiciones: Presión de oxígeno: 1mbar; oxígeno de alta pureza factor 4.5 (99,995% concentración oxígeno); potencia del microonda: 300 W; temperatura: 180° Celsius, tiempo de la reacción: dos horas.

Para evitar contaminación se suministro oxígeno separado con tubos de plástico y un filtro con 0.2 μ m de tamaño de abertura.

4.9 INSTRUMENTOS PARA ANÁLISIS DE METALES TRAZAS CON TXRF

La técnica de Fluorescencia de Rayos X por reflexión Total (TXRF) se basa en el estudio de las emisiones de fluorescencia de rayos X generados después de la excitación de una muestra

mediante una fuente de rayos X (Fig. 10). Los átomos presentes en la muestra analizada son excitados de modo que los electrones de las capas internas son movidos a niveles de energía superiores. Los electrones de otras capas minimizan su energía ocupando los huecos electrónicos que quedan libres, de modo que la energía asociada a dichas transiciones se re-emiten en forma de fotones. A estas emisiones se las conoce como emisiones de fluorescencia o radiación secundaria y presentan energías características del átomo que las genera y una intensidad que depende directamente de la concentración de dicho átomo en la muestra. El resultado es un espectro de dispersión de energía, donde aparecen simultáneamente todas las líneas asociadas a los elementos químicos presentes. Analizando la posición de los máximos de intensidad, se identifican los elementos presentes. Integrando cada uno de los perfiles elementales se obtienen sus proporciones másicas y añadiendo un elemento patrón de concentración conocida se obtiene la cuantificación de dichos elementos. En la presente investigación, el instrumento utilizado en el análisis de TXRF corresponde a un espectrómetro provisto con un 80-mm^2 Si (Li) con resolución de 158 eV, donde operan finos focos a 50 kV y 55 mA unido a un computador con un sistema de análisis de multicanales, combinado con un programa de espectro (FEI Company Munich, Alemania). El tiempo de medición de metales fue de 1000s. (Fig. 10) Esta técnica es de alta sensibilidad y permite la detección simultanea de múltiples metales traza presentes en una muestra individual con un rango de detección limite del orden de pico gramos (Mages *et al.*, 2001).

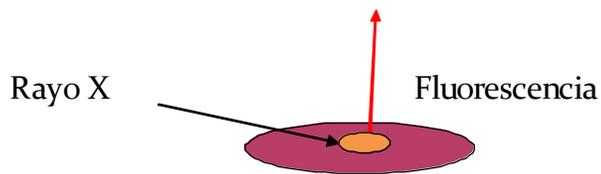
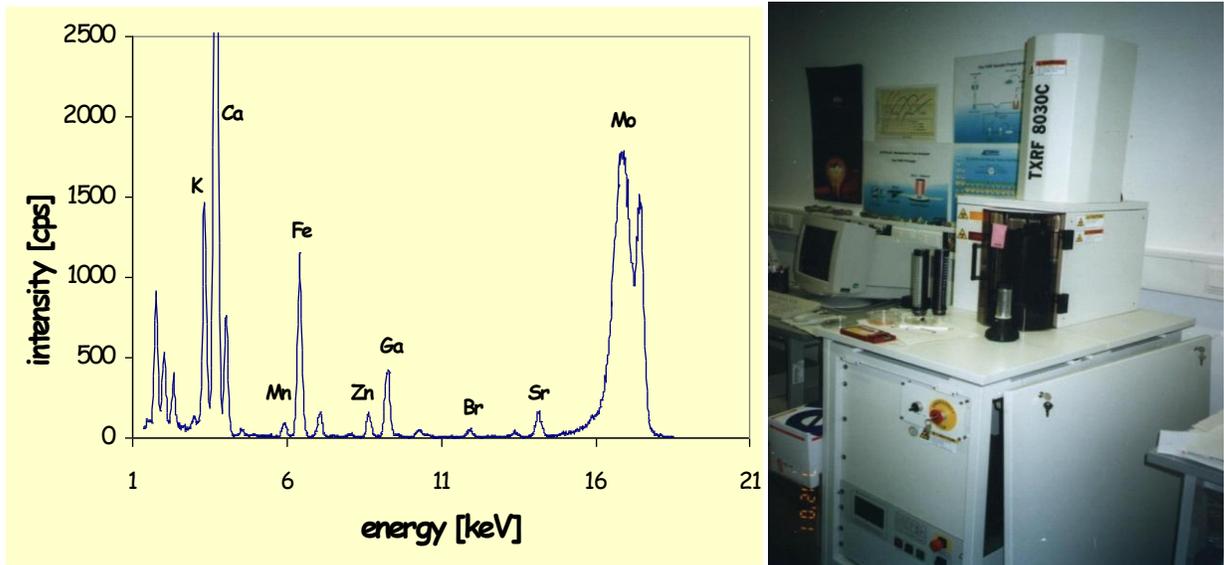


Fig. 10: Espectro energético e identificación de metales (arriba izquierda) e instrumento utilizado (TXRF 8030C) en el análisis de Fluorescencia de Reflexión Total de Rayos X (arriba derecho)

4.10 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE METALES EN TEJIDOS

En el caso de los cortes de intestino y de músculo del pez luego de ser liofilizados resultaron ser muy difíciles de macerar en un mortero para analizarlos directamente sobre los carrier. Por ello, fue necesario tomar sub muestras de cada tejido y digerirlos en frascos de teflón con HNO_3 , durante aproximadamente 10 minutos sobre una placa calefactor a 60°C (Fig. 11). Luego se depositaron muestras de 5 a 10 μl en el carrier, para continuar con el protocolo de TXRF de la misma forma en que se realizó el protocolo de los trematodos señalado precedentemente.

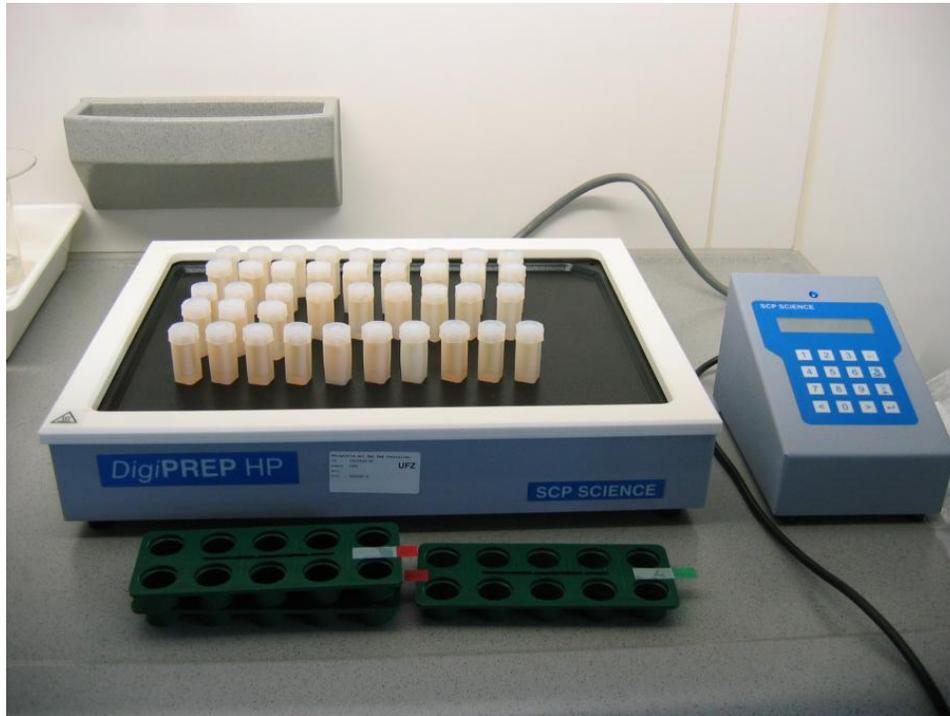


Fig. 11: Muestras de tejidos de peces en frascos de teflón durante la digestión

4.11 MATERIAL DE REFERENCIA

Para asegurar la calidad del análisis se usó material de referencia (SRM) de músculo (DORM-1) e hígado (DOLT-2) de dogfish (material de referencia para metales trazas de National Research Council, Canadá). Se usó aproximadamente 20 mg del material de referencia (5 réplicas) que fueron tratados igual a las muestras de tejido.

4.12 FACTOR DE BIOACUMULACIÓN

Para calcular el factor de acumulación de los parásitos se utilizó el factor de bioacumulación (FB), el cual fue calculado como el cociente de la concentración de metal en el parásito del pez y la concentración disuelta del elemento en el tejido del hospedador (Woelfl *et al.*, 2008).

$$\mathbf{FB} = C_{\text{parásito}} / C_{\text{tejido del hospedador}}$$

Donde $C_{\text{parásito}}$ es la fracción de metal presente en el parásito medida en ($\mu\text{g g}^{-1}$ Peso Seco) y $C_{\text{tejido del hospedador}}$ corresponde a la concentración del elemento presente en los tejidos de *B. australis* ($\mu\text{g g}^{-1}$ Peso Seco). Específicamente son calculados usando los valores mínimos y máximos de las concentraciones de metal del parásito y de los valores promedios encontrados en los tejidos del hospedador.

4.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En una primera fase se realizó el estudio preliminar de los datos crudos, con el objetivo de identificar datos dudosos o erróneos; procediéndose a contrastar con las fotografías y comentarios de protocolo de trabajo, buscando indicios de posibles causas de contaminación de las muestras, ya sea por elementos metálicos, restos de mucosas o sangre que pudieran haber alterado el resultado. Según esta base de análisis se procedió a eliminar datos, los cuales se presentan en tabla anexo 1.

Para determinar la relación entre el peso seco y la concentración de los metales de los trematodos, se realizaron regresiones simples de ajuste exponencial, estableciéndose niveles de significación ($P < 0,05$). En todos los análisis estadísticos las normalidades fueron puestas a prueba, con el test de Kolmogorov-Smirnov y en los casos en que no se cumplió con los

supuestos de esta prueba; se realizó la normalización de los datos de concentración de metales en base a $\log(x)$. Posteriormente, se realizó pruebas de Anova a una vía; las cuales permiten establecer la existencia de diferencias significativas entre sitios a partir de los niveles de metales determinados en los parásitos. Los valores se expresan en $\mu\text{g g}^{-1}$. Diferencias significativas ($P < 0.05$). Las evaluaciones se hicieron en base al software estadístico Statgraphic Plus 5.1 y para la elaboración de los gráficos se usó el programa Sigmaplot 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 CALIDAD DE LA DIGESTION Y ANALISIS DE METALES EN MATERIAL DE REFERENCIA

Las tasas de recuperación del material de referencia fluctuaron entre el 81 y 101% de los valores certificados para DOLT-2 y entre 83 y 111% para DORM-1 (Fe, Cu, Zn, As) (Tab.1). La concentración de elementos de Cr, Ni, Mn y Pb estuvieron bajo de los límites de detección por TXRF (< 3-8 $\mu\text{g g}^{-1}$ Peso Seco).

Tabla 1: Concentraciones de metales del material de referencia DOLT-2 (dogfish hígado) y DORM-1 (dogfish músculo), National Research Council (NRC), Canadá.
 R_r tasa de recuperación = relación entre valor medido y concentración certificada

Metal	DOLT-2					DORM-1				
	Valor de Referencia		TXRF n=10		R_r [%]	Valor de Referencia		TXRF n=10		R_r [%]
	Prom. conc.	desvest.	Prom. Conc.	desvest.		desvest.	desvest	Prom conc.	desvest.	
	[$\mu\text{g g}^{-1}$]									
Cr	0,37	0,08	<4		-	3,6	0,4	<5		-
Mn	6,88	0,56	<8		-	1,32	0,26	<3		-
Fe	1103	47	1017	18	92,2	63,6	5,3	70,5	8	111
Ni	0,2	0,02	<3		-	1,2	0,3	<3		-
Cu	25,8	1,1	25,9	2,1	101	5,22	0,33	4,34	0,53	83,2
Zn	85,8	2,5	83,7	3,1	97,6	21,3	1	17,8	1,15	83,7
As	16,6	1,1	13,5	3,7	81,3	17,7	2,1	15,6	0,41	88,3
Pb	0,22	0,02	<3		-	0,4	0,12	<3		-

5.2 CONCENTRACION DE METALES EN EL AGUA

Las concentraciones de la fracción disuelta de los metales en el agua de los sitios de muestreo y sitios control no presentan grandes diferencias (Tabla 2), excepto en San Luis donde las concentraciones de Mn ($17,5 \mu\text{g/L}$) son el doble que lo registrado en los otros sitios, presentando también niveles levemente más altos de Fe ($15,8 \mu\text{g/L}$). En general, todos los elementos (Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn y Pb) fueron muy bajos con rangos inferiores a 5 -10 $\mu\text{g/L}$.

Tabla 2: Concentración de metales en el agua de los sitios de muestreo y sitios control

(prom. \pm d.e). Los resultados son expresados como $\mu\text{g/L}$ del metal.

Metal	Sitios de muestreo / Número de muestras			
	S.Luis N = 2	Celco N = 2	Panguipulli N = 2	Pishuenco N = 2
Cr	<2	<1	<1	< 3
Mn	$17,5 \pm 6,9$	$1,5 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,3$	$2,0 \pm 2,4$
Fe	$15,8 \pm 4,7$	$6,2 \pm 5,8$	$3,2 \pm 2,7$	$9,5 \pm 7,2$
Ni	$3,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,6 \pm 1,9$
Cu	$7,8 \pm 4,2$	$1,7 \pm 1,0$	$1,9 \pm 1,4$	$3,6 \pm 3,3$
Zn	$7,3 \pm 4,7$	$2,3 \pm 0,6$	$2,7 \pm 2,5$	$7,8 \pm 1,3$
Pb	<3	< 1	< 1	< 2

5.3 NÚMERO DE PECES Y PARÁSITOS AISLADOS

En la Tabla 3 se señalan las características de los 227 parásitos aislados en 18 ejemplares hembras y 7 machos de *B. australis*. Los pesos secos de los trematodos presentan diferencias significativas entre sitios (ANOVA $p < 0,01$) comportándose jerárquicamente como se indica a continuación:

SAN LUIS = PISHUINCO > PANGUIPULLI > CELCO

La mayor variabilidad de los pesos secos fue en San Luis (4,2 μg – 35,2 μg) y la menor amplitud fue en Celco con un rango de 2,5 μg y 20,9 μg .

De acuerdo a la tabla 3, también se observaron diferencias significativas en los pesos húmedos de los peces (ANOVA $p = 0,006$) donde los mayores pesos corresponden a Celco, mientras que San Luis y Panguipulli presentaron ejemplares de pesos similares, la estación Pishuenco presentó los ejemplares de peces más pequeños.

Tabla 3: Mediciones morfométricas de los peces colectados en los sitios muestreados, peso (gr), longitud (cm), sexo. Promedios y desviación estándar de los pesos secos (PS) (μg) de parásitos aislados por pez.

Sitio (n = parásitos asilados)	Sexo pez	Peso húmedo pez (gr)	Longitud pez (cm)	Parásitos aislados por pez	PS parásitos (prom. \pm D.S) por pez	PS parásitos (mín - máx)	PS parásitos (prom. \pm D.S; mín - máx) por sitio
San Luis n = 97	H	450	33,5	15	11,9 \pm 3,8	4,2 - 20,0	20,0 \pm 6,6
	H	290	30	12	13 \pm 3,9	8,9 - 21,4	(4,2 - 35,2)
	H	290	31	6	16,5 \pm 7	9,2 - 27,9	
	M	166	25,5	8	22,2 \pm 4,2	15,7 - 30,4	
	H	430	34,4	17	24,6 \pm 3,6	16,2 - 31,4	
	H	305	32,5	5	22,9 \pm 1,8	21,2 - 26,1	
	M	261	32,8	16	25,4 \pm 3,5	20,4 - 32,2	
	M	370	34,2	3	22,4 \pm 4,2	18,4 - 26,9	
	H	390	34	5	26,5 \pm 6,2	18,3 - 35,2	
	M	260	29,5	2	23,1 \pm 1,7	21,9 - 24,3	
H	385	35	8	16,9 \pm 3,2	10,6 - 21,8		
Pishuinco n = 37	M	170	26	16	16,9 \pm 3,8	12,2 - 25,3	20,9 \pm 5,6
	H	220	28,5	6	23,2 \pm 4,7	17,8 - 30,2	(12,2 - 31,7)
	H	210	27	13	25,4 \pm 4,2	20,0 - 31,7	
	H	310	31	1	-	19,6	
	H	215	29	1	-	12,2	
Celco n = 43	H	465	34	16	8,4 \pm 3,3	2,5 - 14,7	9,8 \pm 3,7
	H	325	31,3	12	10,7 \pm 3,3	5,5 - 18,5	(2,5 - 20,9)
	H	510	35,4	1	-	9,2	
	H	350	31,7	2	15 \pm 2,6	13,2 - 16,9	
	H	360	33,4	12	10,3 \pm 3,8	4,9 - 20,9	
Panguipulli n = 50	H	286	33,5	15	19,4 \pm 6,4	8,7 - 36,4	15,1 \pm 3,7
	H	269	29,5	6	9,6 \pm 1,2	8,1 - 11,2	(7,6 - 36,4)
	M	301	29	23	13,2 \pm 3,3	7,6 - 17,9	
	M	264	23,5	6	16,3 \pm 5,0	11,8 - 21,9	

5.4 RELACIÓN ENTRE EL PESO SECO Y CONCENTRACION DE METALES EN TREMATODOS

Las figuras 12, 13 y 14 muestran las relaciones entre las concentraciones de metal y la masa de los parásitos con sus respectivos valores significativos. De acuerdo al resultado de las regresiones con ajuste exponencial, no existe un patrón único de relación entre la concentración de metales versus el peso seco de los individuos. En metales como el Cr, Ni, Zn y Pb los parásitos muestran una relación inversa donde los individuos de mayores pesos tienden a acumular menos metal; lo que significa que el peso de los parásitos es una co variable que estaría afectando las concentraciones de metal presentes en los trematodos. Contrariamente, en los metales Fe, Cu y As no hay relaciones significativas entre las variables, es decir los parásitos acumulan estos metales con independencia de su peso. En el Mn, no se puede establecer un criterio único, pues las relaciones entre el peso y la concentración de metal mostraron tendencias diferentes según el sitio estudiado. En San Luis, Pishuinco y Panguipulli no hubo una relación significativa, mientras que en Celco, las concentraciones decrecen con el aumento de peso de los individuos.

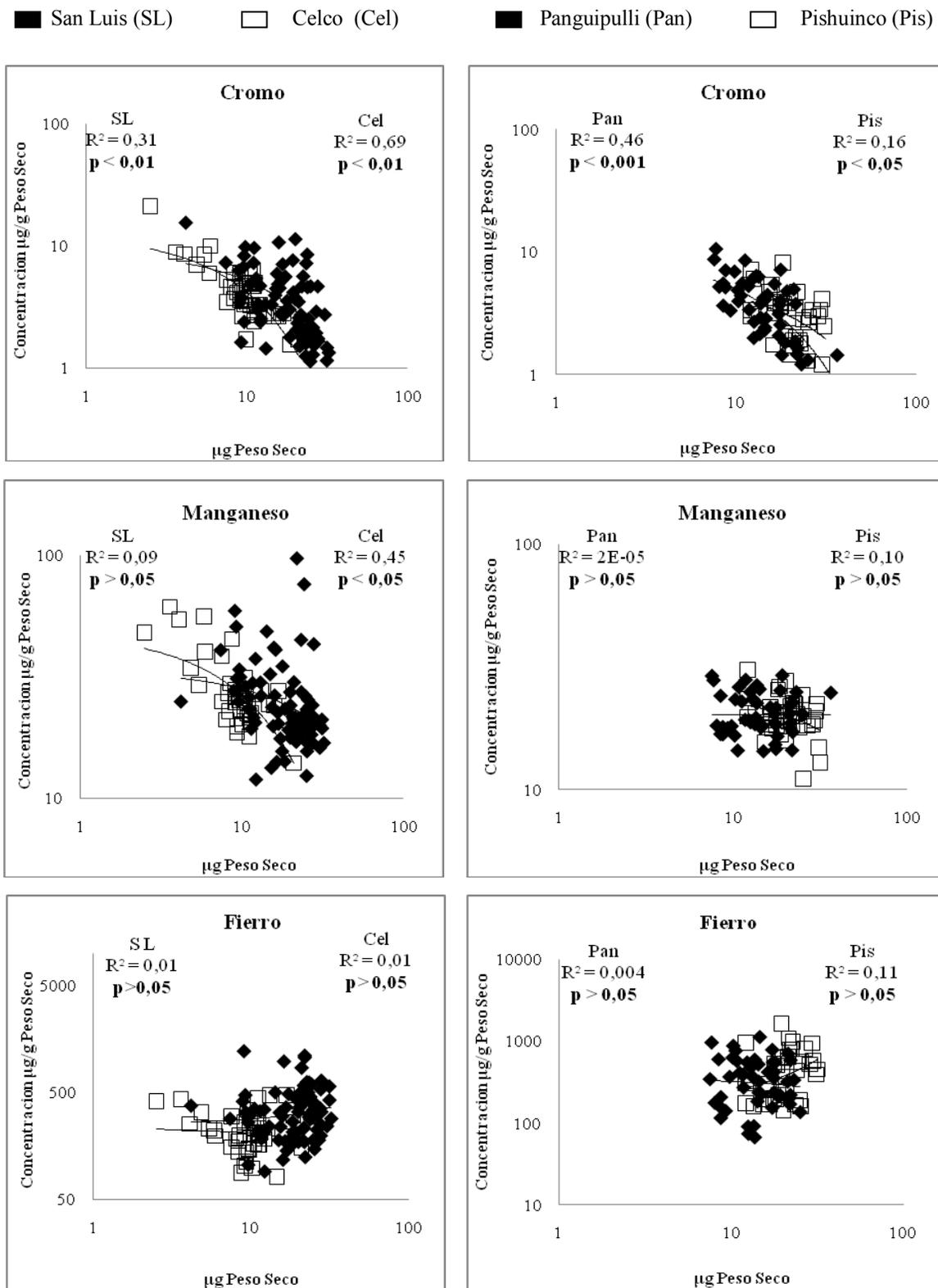


Fig. 12: Relación de concentración de metales Cr, Mn y Fe µg/g versus peso seco (gr) de *L. tolosai* por sitios de muestreo y sitios control.

San Luis (SL)
 Celco (Cel)
 Panguipulli (Pan)
 Pishuinco (Pis)

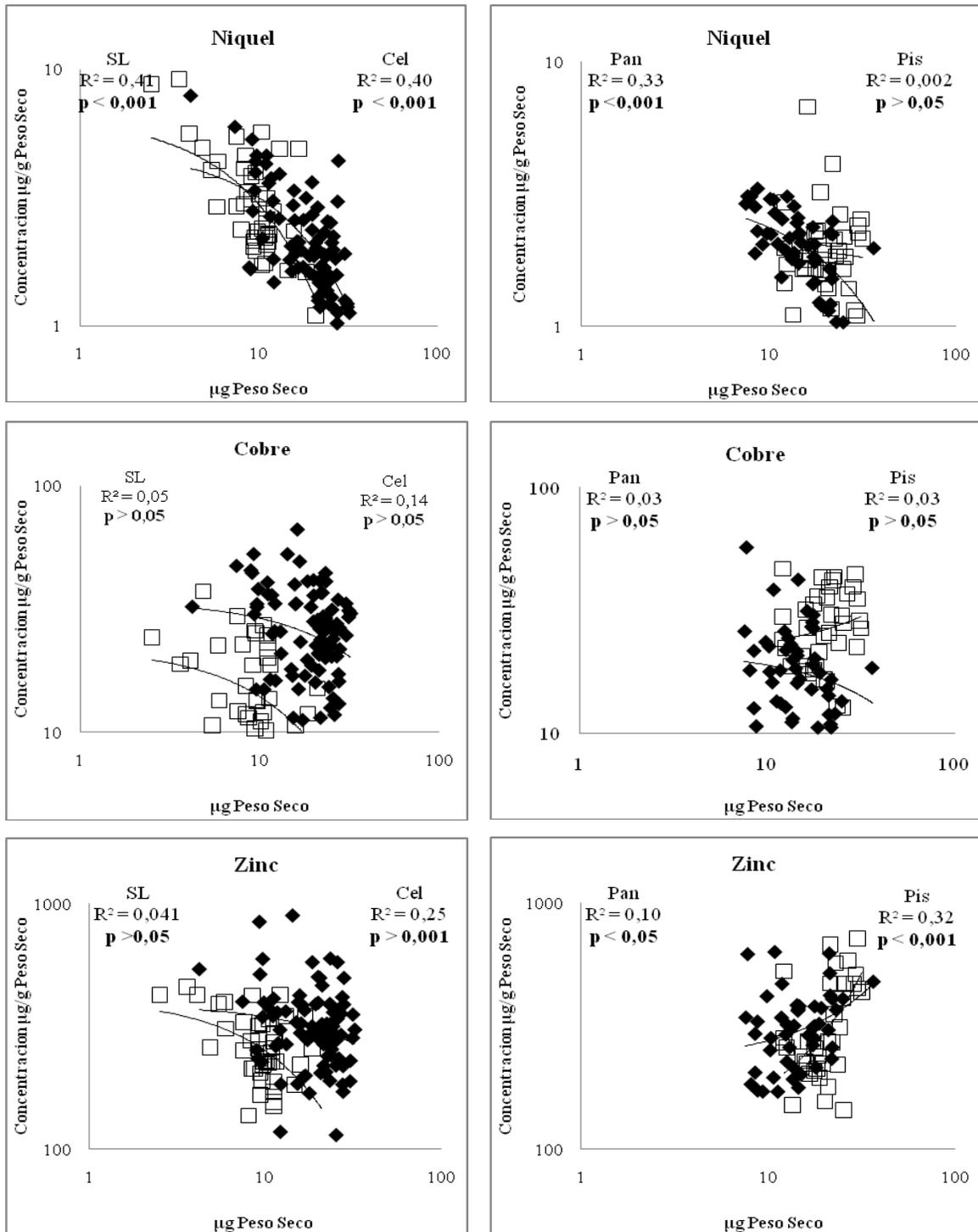


Fig. 13: Relación de concentración de metales Ni, Cu y Zn µg/g versus peso seco (gr) en *L. tolosai* por sitios de muestreo y sitios control.

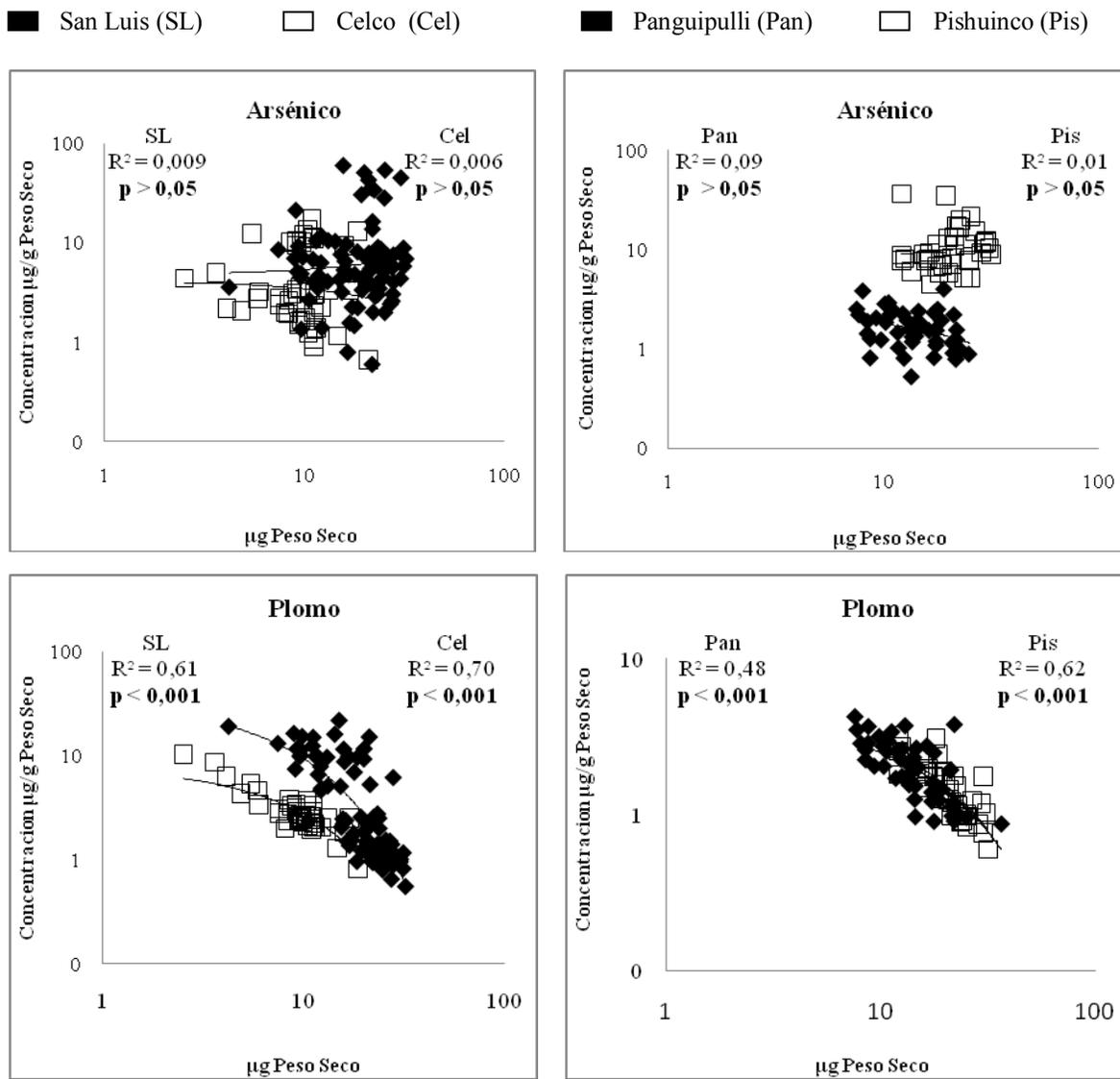


Fig. 14: Relación de concentración de metales As y Pb µg/g versus peso seco (gr) en *L. tolosai* por sitios de muestreo y sitios control.

5.5 COMPARACION DE CONCENTRACION DE METALES ENTRE SITIOS A PARTIR DE CONCENTRACIONES DETECTADAS EN TREMATODOS Y SU HOSPEDADOR.

En la Tabla 4 se presentan las concentraciones de metales en trematodos para cada sitio y metal, indicando las diferencias significativas presentes entre sitios. De acuerdo a la comparación de las concentraciones de metales entre sitios, las pruebas ANOVA indicaron diferencias significativas para todos los metales Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As y Pb (Tabla 4).

En todos los sitios, los trematodos evidenciaron una fuerte tendencia en acumular preferentemente Fe ($81 \mu\text{g g}^{-1}$ y $1636 \mu\text{g g}^{-1}$) y Zn ($78 \mu\text{g g}^{-1}$ y $1013 \mu\text{g g}^{-1}$) siendo el Ni, el metal que presentó los menores rangos de concentración entre $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ y $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$. En los metales Fe, Cu, Zn y As las concentraciones de metal fueron más altas en la estación control Pishuinco, respecto de las concentraciones comprobadas en los dos sitios al interior del Santuario (Tabla 4).

En el Cr las concentraciones fueron de $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$ a $21 \mu\text{g g}^{-1}$, las más altas se detectaron en Celco $4,8 \pm 3,2 \mu\text{g g}^{-1}$ que fue 1,5 más que lo registrado en los trematodos de los sitios San Luis con $3,8 \pm 2,7 \mu\text{g g}^{-1}$ y Pishuinco $3,2 \pm 1,6 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

En el Mn el rango de las concentraciones fue entre $11 \mu\text{g g}^{-1}$ y $97 \mu\text{g g}^{-1}$. Las más altas concentraciones corresponden a los trematodos de Celco y San Luis con $28 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$ y $25 \pm 13 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, estas fueron estadísticamente diferentes a las concentraciones de Pishuinco $20,1 \pm 3,9 \mu\text{g g}^{-1}$ y Panguipulli $20 \pm 4,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

Tabla 4: Concentraciones promedio, desviación estándar y rango de metales (Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As y Pb) en trematodos por sitios de estudio y control. Los valores se expresan en $\mu\text{g g}^{-1}$. Diferencias significativas a un nivel de 95% ($P < 0.05$)

Metal		San Luis N = 97	Celco N = 43	Pishuenco N = 37	Panguipulli N = 50	Diferencias significativas
Cr	Promedio	3,8	4,8	3,2	4,0	Celco-San Luis
	Des. Est.	2,7	3,2	1,6	2,1	Celco-Pishuenco
	Min-máx.	0,8 -15,5	1,5 - 21	0,9 – 8,1	1,2 – 10,6	
Mn	Promedio	25	28	20,1	20	Celco_ -Panguipulli
	Des. Est.	13	10	3,9	4,1	Celco -Pishuenco
	Min-máx.	11,9 - 97	13,9 - 61	11,0 -30,7	14,3 -29	San Luis - Panguipulli San Luis - Pishuenco
Fe	Promedio	359,5	226,8	479,6	381,0	Celco-San Luis
	Des. Est.	214,4	102,8	335,6	248,6	Celco-Pishuenco
	Min-máx.	90,1 – 1206,7	80,9 – 468,1	142,6 – 1636,4	66,1 -1127,4	Celco- Panguipulli
Ni	Promedio	2,2	3,3	2,0	2,1	Celco – Pishuino
	Des. Est.	1,2	1,7	1,0	0,5	Celco_ Panguipulli
	Min-máx.	0,6 – 7,8	1,0 – 9,1	0,9 – 6,7	1,0 – 3,3	Celco-San Luis
Cu	Promedio	27,1	15,4	28,1	19,3	Celco- Panguipulli
	Des. Est.	11,3	7,1	9,4	9,1	Celco-Pishuenco
	Min-máx.	6,6 – 66,5	7,5 – 37,2	12,7 – 46,7	6,6 – 56,8	Celco-San Luis San Luis - Panguipulli San Luis – Pishuenco
Zn	Promedio	331,3	267,8	361,9	324,1	Celco –Panguipulli
	Des. Est.	132,3	90,1	197,4	114,8	Celco-Pishuenco
	Min-máx.	114,4 – 894,4	77,5 – 458,3	144,3 – 1013,4	171,5 – 632,4	Celco- San Luis San Luis - Panguipulli San Luis - Pishuenco
As	Promedio	9,4	4,9	11,3	1,6	Celco-Pishuenco
	Des. Est.	11,8	4,4	7,1	0,7	Celco- San Luis
	Min-máx.	0,59 – 59,9	0,6 – 17,4	4,4 -36,2	0,5 – 4,0	San Luis - Panguipulli San Luis - Pishuenco
Pb	Promedio	4,9	3,0	1,5	2,0	Celco- Panguipulli
	Des. Est.	5,1	1,7	0,6	0,8	Celco-Pishuenco
	Min-máx.	0,5 -22	0,8 -10,3	0,5 – 3,2	0,8 – 4,2	San Luis - Panguipulli San Luis - Pishuenco

En el Fe la estación Celco presentó $226,8 \pm 102 \mu\text{g g}^{-1}$, que es hasta 2 veces más bajo que las concentraciones detectadas en Pishuenco $479,6 \pm 335,6 \mu\text{g g}^{-1}$, Panguipulli $381 \pm 248,6 \mu\text{g g}^{-1}$ y San Luis con $359,5 \pm 214,4 \mu\text{g g}^{-1}$. Estos últimos sitios no presentaron diferencias estadísticas de

concentración de Fe en sus parásitos (Tabla 4).

El Ni presentó las mayores concentraciones en Celco con $3,3 \pm 1,7 \mu\text{g g}^{-1}$, con pocas diferencias; aunque significativas, con los trematodos de Pishuinco, Panguipulli y San Luis que presentaron no más de $2,2 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

El Cu presentó un rango de concentración de metales que va entre $6,6 \mu\text{g g}^{-1}$ y $67 \mu\text{g g}^{-1}$. La concentración más baja corresponde a los parásitos de Celco $15,4 \pm 7,1 \mu\text{g g}^{-1}$ respecto de San Luis, Panguipulli y Pishuinco, este último con $28,1 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

En el Zn las mayores concentraciones correspondieron al sitio control Pishuinco, $361,9 \pm 197 \mu\text{g g}^{-1}$ que representa 1,3 veces más metal que el sitio con menor concentración, Celco con $267,8 \pm 90 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

En el As las concentraciones más altas corresponden a Pishuinco $11,3 \pm 7,1 \mu\text{g g}^{-1}$, 7 veces más altas que las concentraciones observadas en Panguipulli $1,6 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$, y de 2 veces más altas que las encontradas en Celco $4,9 \pm 4,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

En el caso del Pb, los parásitos de San Luis con $4,9 \pm 5,1 \mu\text{g g}^{-1}$, presentaron una concentración aproximada de 3 veces más metal que las estaciones control Pishuinco $1,5 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ y Panguipulli $2,0 \pm 0,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 4).

Se preparó un resumen de las concentraciones de los tejidos de *B.australis* (Tabla 5). Al contrario de lo que ocurrió en los trematodos, donde hubo diferencias en la acumulación de metales; en los órganos del hospedador no se presentaron diferencias significativas en la concentración de metal por sitio de muestreo. Según estos datos las concentraciones de Cr y As fueron bajo del límite de detección en todos los órganos, salvo en pocos tejidos en la estación Celco (Cr) y San Luis (Cr). Lo mismo se observó para Pb en el tejido muscular, en las estaciones control Pishuinco y Panguipulli, donde no se registró el metal.

Tabla 5: Concentración de metales of Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As y Pb en diferentes tejidos (intestino, hígado y músculo) de *B.australis*. Los valores están expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ de Peso Seco.

Metal	Tejido	San Luis N= 11	Celco N=5	Pishuinco N=5	Panguipulli N=4
Cr	Músculo	2,7 ± 0	4,5 ± 0	n.d	n.d
	Intestino	2,5 ± 0	3,4 ± 1	4,2 ± 0	n.d
	Hígado	7,2 ± 13	0,5 ± 0	n.d	n.d
Mn	Músculo	1,9 ± 0,6	n.d	n.d	n.d
	Intestino	42 ± 63	7,8 ± 6,9	19,5 ± 10,5	4,6 ± 0,5
	Hígado	8,4 ± 3,1	7,6 ± 2,1	4,8 ± 0,9	4,9 ± 2,4
Fe	Músculo	30 ± 8,5	19 ± 7,5	17,6 ± 3,4	16 ± 3,2
	Intestino	129 ± 58	115 ± 73	188 ± 180	92 ± 26
	Hígado	375 ± 123	259 ± 85	206,5 ± 58	371 ± 176
Ni	Músculo	2,2 ± 1,4	2,1 ± 0,7	2,3 ± 0,9	2,0 ± 0,5
	Intestino	2,0 ± 1,5	3,3 ± 1,3	3,9 ± 1,4	2,9 ± 1,3
	Hígado	2,3 ± 3,6	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5
Cu	Músculo	2,7 ± 1,4	3,8 ± 2,8	2,3 ± 0,7	2,0 ± 0,5
	Intestino	7,6 ± 1,3	12 ± 12	8,0 ± 3,0	5,8 ± 1,3
	Hígado	26 ± 24	28 ± 30	22,2 ± 21	20 ± 20
Zn	Músculo	20 ± 1,6	16 ± 5,1	13,7 ± 3,4	15 ± 3,5
	Intestino	68 ± 15	69 ± 20	77 ± 33	69 ± 12
	Hígado	76 ± 28	71 ± 12	63 ± 20,2	77 ± 45
As	Músculo	n.d	n.d	n.d	n.d
	Intestino	n.d	n.d	n.d	n.d
	Hígado	n.d	n.d	n.d	n.d
Pb	Músculo	2,4 ± 1	2,3 ± 1,3	n.d	n.d
	Intestino	2,9 ± 1,9	4,4 ± 1,5	3,6 ± 1,2	2,6 ± 0,7
	Hígado	1,5 ± 1,5	0,9 ± 0,02	0,8 ± 0,2	2,6 ± 0

n.d= no detectado

5.6 COMPARACION DE LAS CONCENTRACIONES DE METALES EN PARÁSITOS VERSUS TEJIDOS DEL HOSPEDADOR PROVENIENTES DEL SANTUARIO DE LA NATURALEZA Y SITIOS CONTROL

En este ítem, se presentan los resultados del cálculo de los factores de bioconcentración de los metales en trematodos, respecto de las concentraciones presentes en los tejidos del hospedador. También se incluyen datos de concentración promedio y desviación estándar tanto de parásitos como hospederos para todos los sitios de muestreo y cada metal, comparándose las respectivas concentraciones (Tabla 6).

En metales como el Cr y As no fue posible calcular un factor pues se presentaron bajo los límites de detección en los tejidos del pez, siendo sólo detectados en los trematodos; similar situación se presentó para Mn y Pb en el tejido muscular de los peces de Panguipulli.

La tendencia general encontrada fue que los parásitos acumulan más metal que el tejido muscular del hospedador y sólo en algunos metales como el Fe y Cu fue el tejido hepático del hospedador, el que acumuló más metal que los parásitos. En el caso del Pb hubo pocas diferencias con el tejido intestinal.

Tabla 6: Factor de Bioconcentración^a calculado para los metales Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As y Pb en *L. tolosai* respecto de su hospedador *B. australis* con valores mínimos y máximos.

Metal	Sitio	Factor de Bioconcentración		
		Intestino	Hígado	Músculo
Cr	Celco	0,4 – 6,1	2,7 -38	0,3 – 4,7
	San Luis	0,8 -15,5	0,7 – 13,5	0,3 -5,6
	Pishuinco	0,2 – 1,9	N.C ^b	N.C ^b
	L.Panguipulli	N.C ^b	N.C ^b	N.C ^b
Mn	Celco	3,5 -15,1	1,7 – 7,4	N.C ^b
	San Luis	1,0 -7,8	1,2 – 9,5	7,2 -58
	Pishuinco	0,7 -1,9	2,5 – 7,1	N.C ^b
	L.Panguipulli	5,5 – 11,2	4,3 – 8,6	N.C ^b
Fe	Celco	0,9 - 5	0,3 – 1,8	4,6 - 27
	San Luis	0,8 – 11,1	0,2 – 3,1	3 – 41,4
	Pishuinco	1,1 -13,2	0,8 – 9,2	7,9 – 91
	L.Panguipulli	0,8 – 12,8	0,2 – 4,1	4,5 - 77
Ni	Celco	0,4 – 3,2	1,2 – 10,2	0,6 - 5
	San Luis	0,3 – 3,5	0,6 – 7,1	0,4 - 5
	Pishuinco	0,2 -0,8	1,5 – 5,0	0,5 – 1,5
	L.Panguipulli	0,4 - 1,3	0,6 – 1,9	0,5 - 1,7
Cu	Celco	0,9 – 4,1	0,2 - 1,1	2,3 - 11
	San Luis	1,2 – 11,6	0,4 – 4,5	2,7 - 27
	Pishuinco	1,8 – 6,6	0,8 – 2,8	4,9 – 18,1
	L.Panguipulli	1,3 – 10,7	0,2 – 1,9	3,6 - 31
Zn	Celco	1,2 - 7	1,1 – 6,3	4,3 - 26
	San Luis	1,8 – 13,8	1,6 – 12	7 - 57
	Pishuinco	14,3 – 23,0	2,6 - 18	9,8 - 69
	L.Panguipulli	2,4 – 9,0	2,7 - 10	12 - 46
As	Celco	N.C ^b	N.C ^b	N.C ^b
	San Luis	N.C ^b	N.C ^b	N.C ^b
	Pishuinco	N.C ^b	N.C ^b	N.C ^b
	L.Panguipulli	N.C ^b	N.C ^b	N.C ^b
Pb	Celco	0,3 – 3,5	1,1 - 14	0,4 - 6
	San Luis	0,2 – 8,6	0,5 - 20	0,3 - 10
	Pishuinco	0,1 – 1,0	0,6 - 4,0	N.C ^b
	L.Panguipulli	0,3 - 1,3	1,2 - 6	N.C ^b

a Factor de bioconcentración calculado como: (Concentración_{parásito}/Concentración_{tejido hospedador}) b No calculado.

Cr

La Fig. 15 muestra las concentraciones promedio y desviación estándar del Cr en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo. El Cr fue detectado en los trematodos de todos los sitios de muestreo a diferencia de los tejidos de los peces. En Panguipulli sólo se detectó el metal en los trematodos, estando ausente además en el tejido hepático y muscular de los peces de Pishuinco.

Al comparar las concentraciones de Cr detectadas en parásitos que variaron entre $3,2 \mu\text{g g}^{-1}$ y $4,8 \mu\text{g g}^{-1}$, con las detectadas en el tejido muscular de los peces de San Luis ($2,7 \mu\text{g g}^{-1}$) y Celco ($4,5 \mu\text{g g}^{-1}$); el factor de bioconcentración fue de 0,3 a 5,6 veces más concentrado en el trematodo que en el tejido del hospedador (Tabla 6).

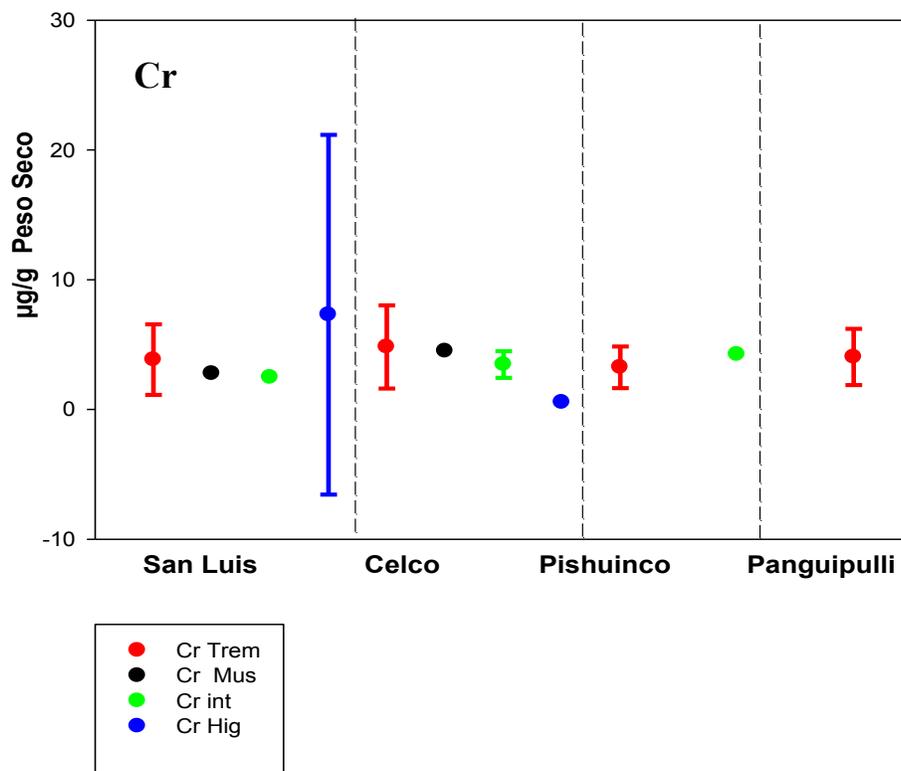


Fig. 15: Concentraciones promedio y desviación estándar de Cr en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

Los parásitos concentraron más Cr que el tejido intestinal de los peces; en San Luis el intestino presentó en promedio $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ y el factor de bioconcentración de 0,8 a 15,5 veces más concentrado en los trematodos. En el hígado, el Cr sólo fue detectado en los peces de San Luis ($7,2 \pm 13 \mu\text{g g}^{-1}$) y Celco ($0,5 \mu\text{g g}^{-1}$); en este último sitio las concentraciones fueron entre 2,2 – 37,7 mayores en el parásito que en el tejido del pez (Tabla 6).

Mn

El Mn fue detectado en todos los trematodos de los sitios estudiados, siendo San Luis y Celco los sitios que presentaron las más altas concentraciones (Fig. 16).

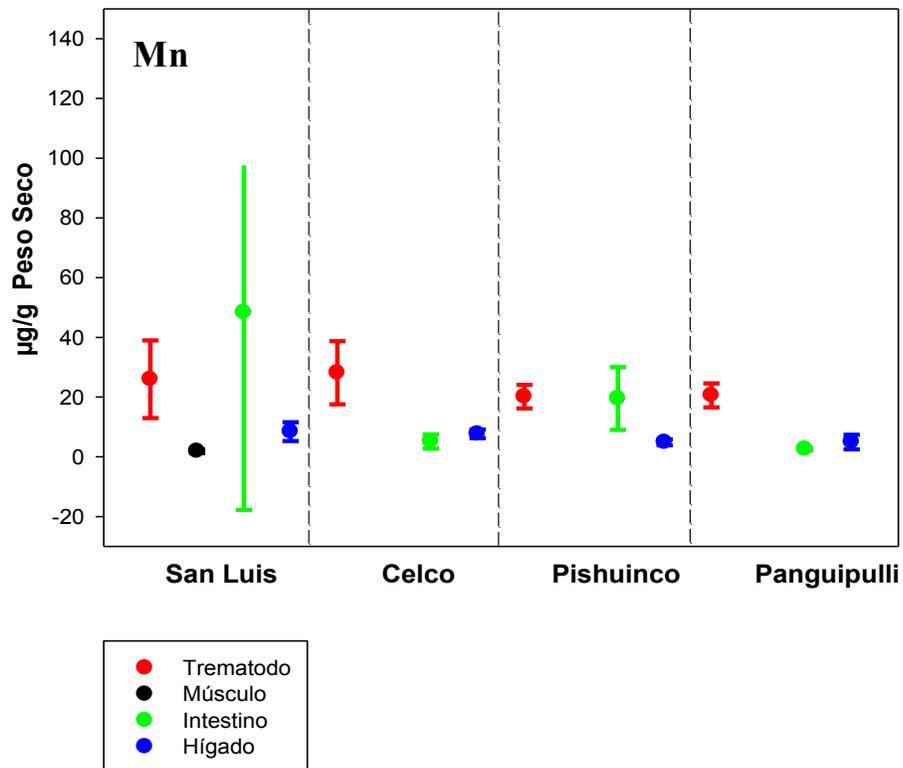


Fig. 16: Concentraciones promedio y desviación estándar de Mn en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

En el tejido muscular el Mn fue comprobado sólo en los peces de San Luis ($1,9 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$), estando bajo el límite de detección en el resto de los sitios. El factor de bioconcentración fue entre 7 - 58 veces más concentrado en los parásitos que en el hospedador. Si se compara con el tejido intestinal, los trematodos concentran hasta 15 veces más metal que los peces (Tabla 6). En San Luis se encontró la mayor variabilidad de las concentraciones de Mn comprobadas en los intestinos $42 \pm 63 \mu\text{g g}^{-1}$.

En el tejido hepático no se observaron diferencias entre sitios y en todos los casos los trematodos concentran más Mn que el tejido del pez, como sucede en San Luis donde el factor de bioconcentración de los trematodos alcanza 1,2 a 9,5 veces más que en el tejido del pez (Tabla 6).

Fe

En el Fe, los parásitos bioacumulan más metal que el tejido muscular e intestinal de los peces y presentan niveles similares del metal que el detectado en el tejido hepático (Fig. 17).

Los trematodos bioconcentran más Fe que el tejido muscular de los peces en todos los sitios. En Celco los parásitos bioconcentran un factor de 4,6 a 27 veces más metal respecto del tejido muscular que en promedio presentó $19 \pm 7,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Las mayores diferencias se establecen con el tejido muscular de los peces de Pishuenco, donde los trematodos bioconcentran entre 8 y 91 veces más metal que el tejido muscular (Tabla 6), que presentó $17,6 \pm 3,4 \mu\text{g g}^{-1}$ en promedio.

Cuando comparamos las concentraciones de los trematodos con el tejido intestinal, los parásitos acumulan más metal que el hospedador. En Celco los trematodos bioconcentran hasta 5 veces más metal que el intestino del pez con $115 \pm 73 \mu\text{g g}^{-1}$. En el resto de los sitios los trematodos llegan a bioconcentrar hasta 13 veces más que el intestino de los peces. (Tabla 6). En comparación con el tejido hepático las diferencias son discretas. En San Luis los trematodos

bioconcentran entre 0,8-9,2 veces más Fe que el hígado de los peces que en promedio presentaron $375 \pm 123 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 6).

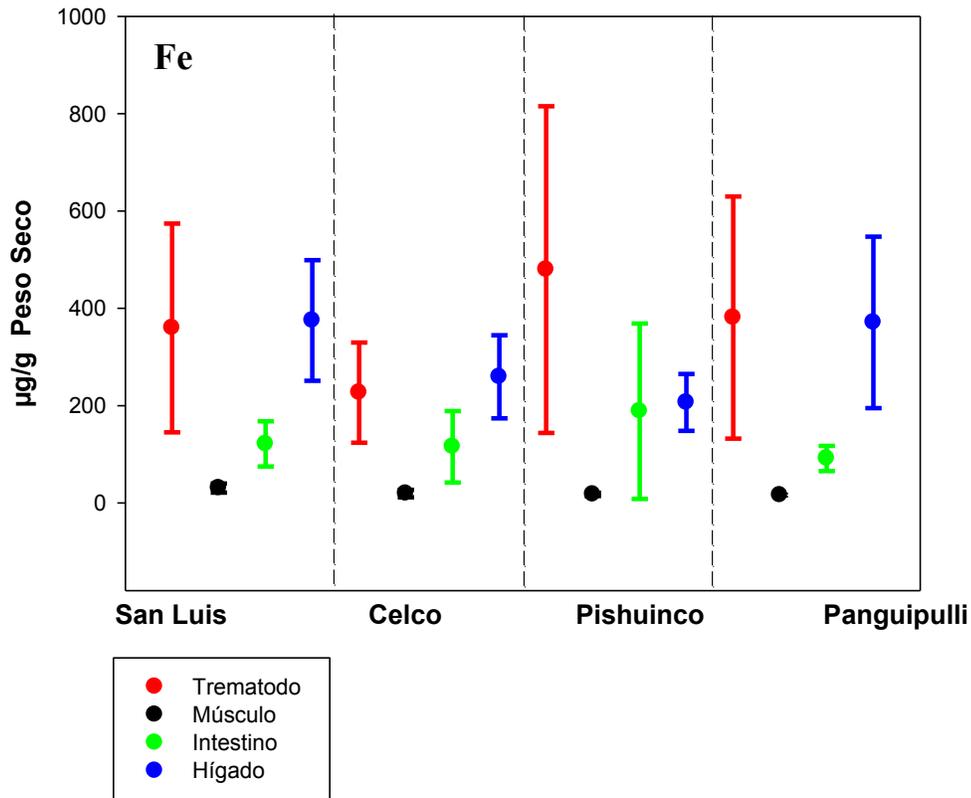


Fig. 17: Concentraciones promedio y desviación estándar de Fe en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

Cu

La Fig. 18 muestra las concentraciones promedio y desviación estándar de Cu en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai*. Los parásitos concentraron más Cu que el tejido muscular de los peces en todos los sitios. Las mayores diferencias las encontramos en Panguipulli y Pishuinco donde los trematodos bioconcentraron entre 18 a 31 veces más metal que los tejidos musculares del hospedador (Tabla 6).

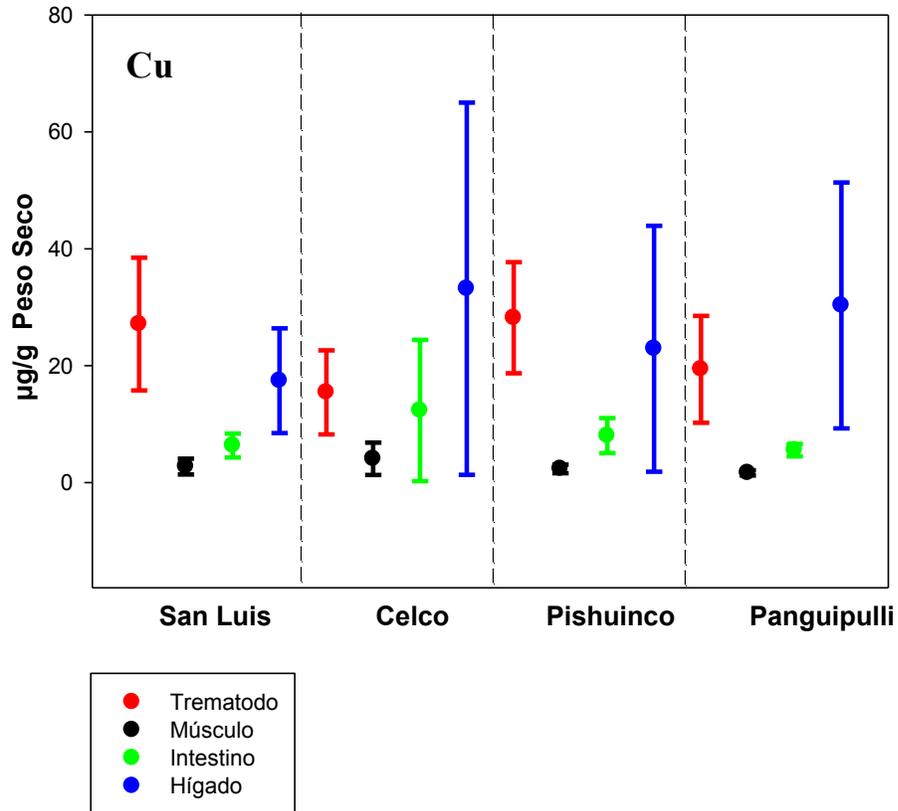


Fig. 18: Concentraciones promedio y desviación estándar de Cu en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

En comparación con el tejido intestinal los trematodos bioconcentraron más Cu que los peces. En Celco los parásitos presentaron un factor entre 0,9 - 4,1 más que el hospedador con $12 \pm 12 \mu\text{g g}^{-1}$ y de 1,2 – 11,6 más concentrado en los parásitos de San Luis, donde los intestinos de los peces presentaron $7,1 \pm 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 6).

Las menores diferencias se presentan al comparar las concentraciones detectadas en los trematodos con el tejido hepático del pez. En San Luis se presentan las mayores diferencias con

un factor de 0,4 – 4,5 más concentrado en los parásitos que en el hígado de los peces que presentaron en promedio $76 \pm 28 \mu\text{g g}^{-1}$ en San Luis (Tabla 6).

Ni

La Fig. 19 muestra las concentraciones promedio y desviación estándar de Ni en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai*. En este metal los trematodos presentaron niveles similares a lo detectado en los tejidos del hospedador, presentándose diferencias muy discretas. Respecto al tejido muscular, las mayores diferencias se dan en Celco, donde los trematodos bioconcentraron entre 0,6 y 5 veces más que el pez que en promedio presentó $2,1 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla 6).

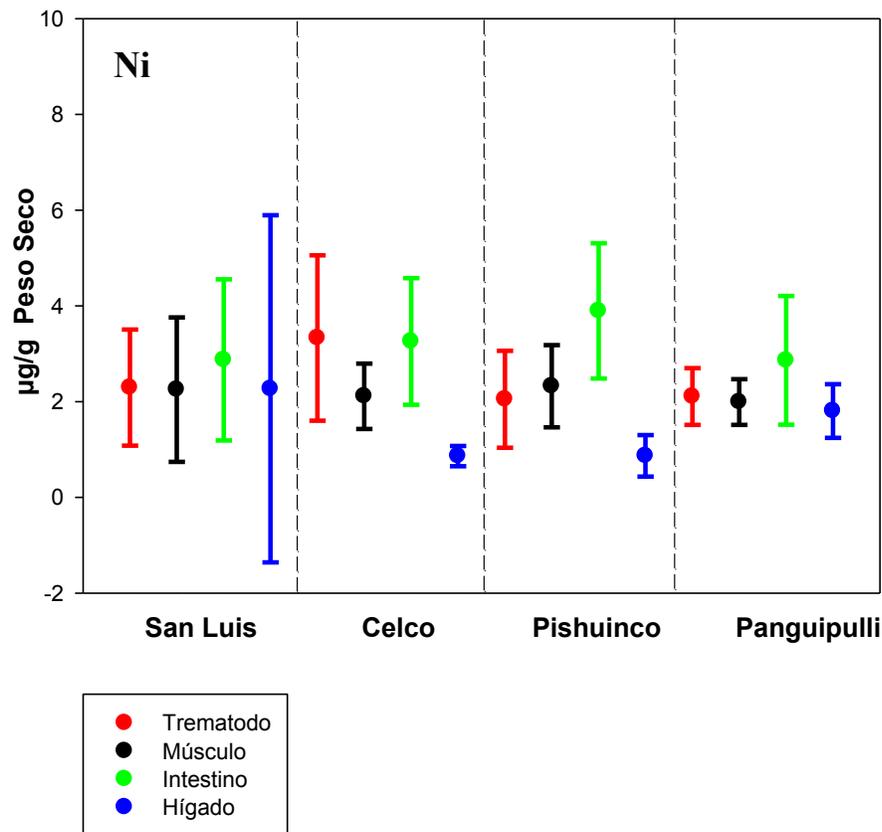


Fig. 19: Concentraciones promedio y desviación estándar de Ni en tejidos de *B. australis* y *L.*

tolosai por sitios de muestreo.

Al comparar con el tejido intestinal, los trematodos concentraron niveles de Ni muy similares al hospedador, incluso en Pishuenco fueron mayores en el tejido del pez que en el parásito, lo cual explica el factor de bioconcentración presentado por los parásitos con rangos que van entre 0,2 - 0,8 para este sitio (Tabla 6).

Al comparar con el tejido hepático, las mayores diferencias se encuentran en Celco y Pishuenco donde el tejido del pez concentró no más de $0,9 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$, y el trematodo hasta 10 veces más que el hospedador (Tabla 6).

Zn

Respecto al Zn, los parásitos concentraron más metal que todos los tejidos del hospedador, en todos los sitios de muestreo (Fig. 20). Las menores concentraciones de Zn fueron en Celco.

Entre el tejido intestinal y hepático del hospedador no hubo diferencias significativas de concentración.

Respecto del tejido muscular, los trematodos bioconcentraron entre 9,8 y 69 veces más que los peces en Pishuenco, en este sitio la concentraciones del hospedador en el tejido muscular fueron de $13,7 \pm 3,4 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que el trematodo concentró $362 \pm 197 \mu\text{g g}^{-1}$.

En Pishuenco se detectó el mayor factor de bioconcentración respecto al tejido intestinal de los peces, entre 14- 23 veces más que el pez que en promedio presentó $77 \pm 33 \mu\text{g g}^{-1}$.

A nivel del tejido hepático, las mayores diferencias también se dieron en Pishuenco donde los trematodos concentraron entre 2,6 y 18 veces más metal que los peces.

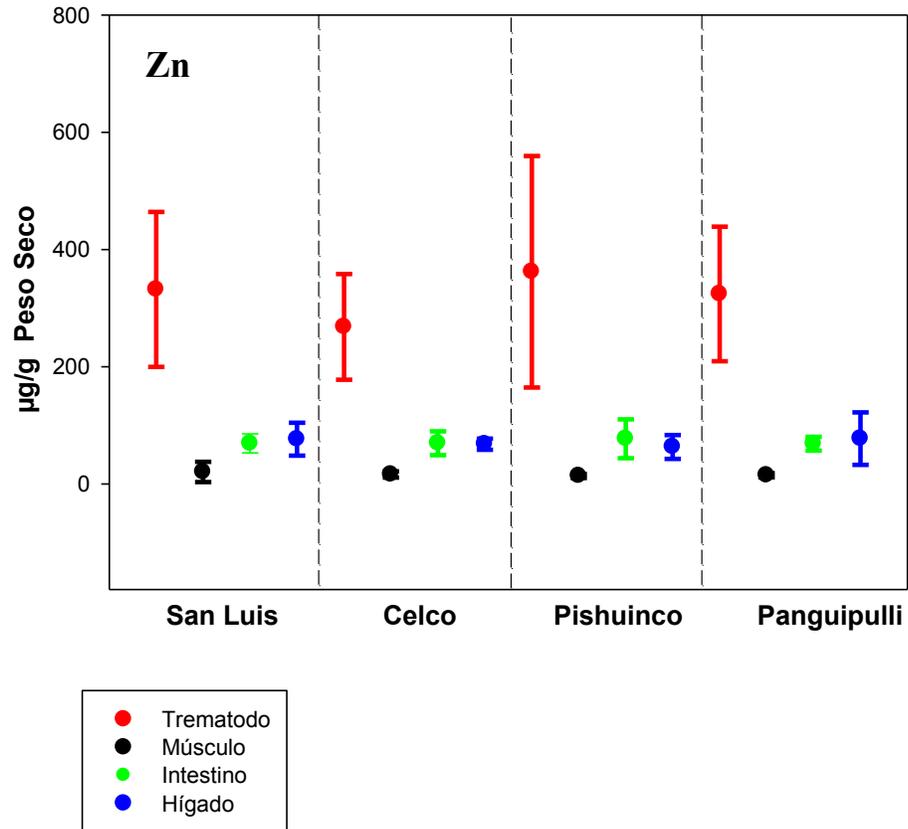


Fig. 20: Concentraciones promedio y desviación estándar de Zn en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

Pb

La Fig. 21 muestra las distribuciones de Pb en los parásitos y tejidos de *B. australis*. A nivel muscular el Pb fue detectado solo en los peces de San Luis y Celco. En San Luis las diferencias entre el trematodo y el tejido muscular del hospedador fueron de hasta 10 veces más concentradas en el trematodo.

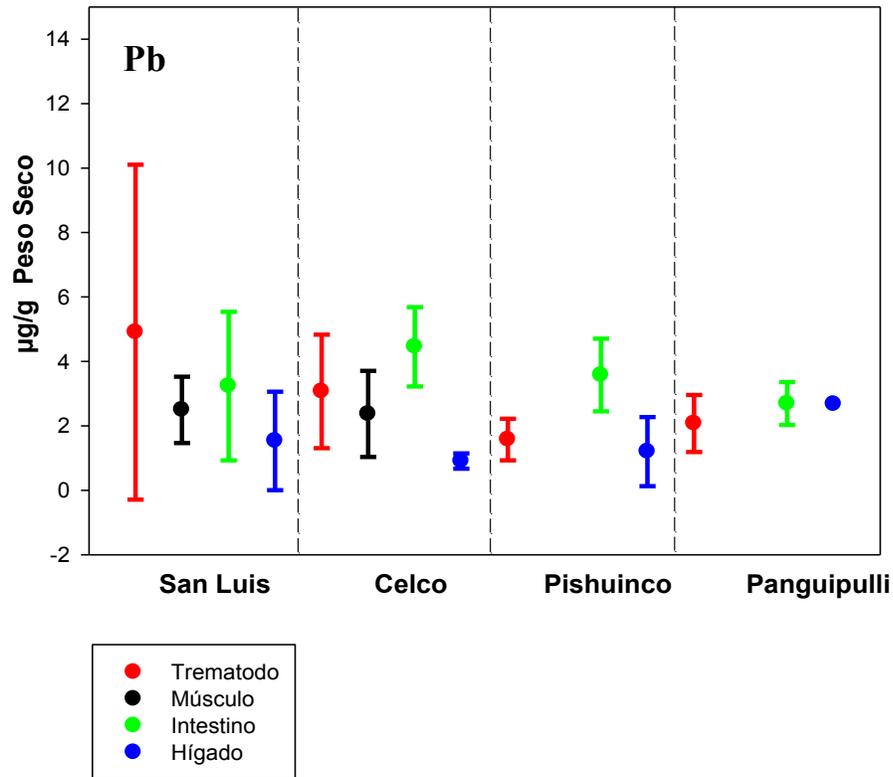


Fig. 21: Concentraciones promedio y desviación estándar de Pb en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

En comparación con el tejido intestinal, en todos los sitios las concentraciones fueron similares a las comprobadas en los trematodos, lo cual explica los discretos factores de bioconcentración presentados por los trematodos respecto del tejido intestinal del pez. Las mayores diferencias se presentan en San Luis donde los trematodos registran entre 0,2 a 8,6 veces más metal que el intestino del pez ($2,9 \pm 1,9 \mu\text{g g}^{-1}$).

Respecto del hígado las mayores diferencias de concentración también están en San Luis donde los trematodos concentraron hasta 20 veces más Pb que el tejido hepático del pez con un promedio de $1,5 \pm 1,5 \mu\text{g g}^{-1}$.

As

Las concentraciones de este metal fueron bajo los límites de detección para TXRF en todos los tejidos de los peces (Fig. 22). En los trematodos las menores concentraciones se presentaron en Panguipulli, seguido de Celco donde fueron significativamente más bajos que San Luis y Pishuenco.

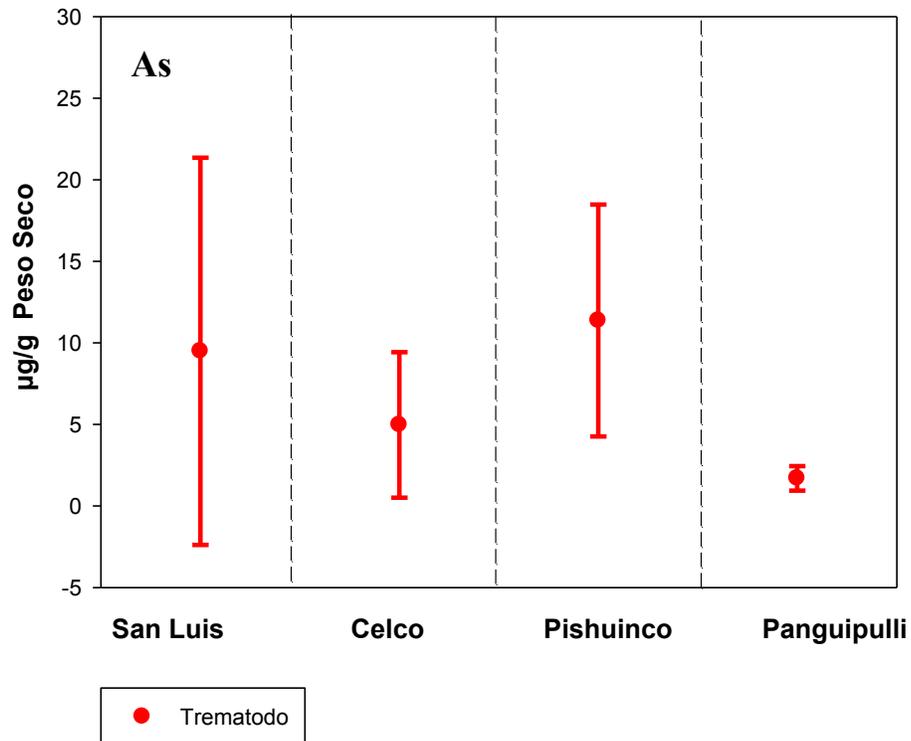


Fig. 22: Concentraciones promedio y desviación estándar de As en tejidos de *B. australis* y *L. tolosai* por sitios de muestreo.

6 DISCUSIÓN

6.1 RELACION ENTRE PESO SECO DE TREMATODOS Y LA CONCENTRACION DE METALES DETECTADAS EN SUS ORGANISMOS

En el presente estudio se observó en general, una asociación entre el aumento de la masa corporal de *L. tolosai* y la disminución de la concentración de metales como el Cr, Ni, Zn y Pb. Sin embargo, esta relación no fue evidente para el Fe, Cu y As donde no hubo un patrón que relacionara el peso del animal con las concentraciones de metales.

Existen pocos estudios que proporcionen información sobre la relación tamaño – concentración de metales en endoparásitos de peces. En Latinoamérica, un trabajo sobre el cestodo *D. latum* en el Lago Ríñihue, Chile (Woelfl *et al.*, 2008), constató, que las concentraciones de Mn, Fe, Ni Cu y Pb disminuían significativamente a medida que aumentaba la masa corporal del parásito. En el cestodo *Bothriocephalus acheilognathi*, en un estudio realizado en 12 ejemplares de la especie, se determinó que los niveles de Selenio en proglotidas grávidas contenía mayor concentración de metal que los segmentos no grávidos, los cuales son de menor tamaño (Riggs *et al.*, 1987). Estableciendo una asociación entre tamaño del segmento y concentración de selenio.

A nivel de trematodos, *Fasciola hepatica* presente en bovinos, se estableció una relación hiperbólica entre los niveles de Pb y el peso del parásito, encontrándose que las mayores concentraciones de este metal estaban en los parásitos de mayor peso (Sures *et al.*, 1998).

En los estudios mencionados precedentemente, la mayor aptitud de concentrar metales se relaciona tanto con el tiempo de exposición de los parásitos, como con la mayor superficie expuesta que ofrecen los individuos adultos y grávidos, caracterizados por la presencia de

huevos en sus úteros. Sin embargo, esto no explicaría las tendencias seguidas por los trematodos estudiados en el presente trabajo, donde la concentración de metales como el Cr y Pb tienden a ser acumulados significativamente por individuos de menor peso seco. Sin que existan planteamientos previos que expliquen las razones de dicho comportamiento en parásitos.

6.2 CONCENTRACION DE METALES DETECTADOS EN TREMATODOS

Los metales que presentaron mayores concentraciones en *L. tolosai* fueron Fe, Zn, Mn y Cu; y los que estaban representados en más baja proporción fueron el As, Cr, Pb y Ni. Este patrón es similar a lo mencionado en otros endoparásitos como plerocercoides de *D. latum* con mayores concentraciones de Zn; Fe; Ni y Mn (Woelfl *et al.*, 2008). De igual modo en un trabajo realizado en plerocercoides de *Ligula intestinalis*, endoparásito del pez *Tinca tinca* en el Lago Kovada en Turquía; se presentó una relación de abundancia de metales similar al descrito precedentemente: Fe; Cu; Zn y Mn (Selda e Ismael, 2005). Thielen *et al.*, en 2004, reportó en el acantocéfalo *Pomphorhynchus laevis* en el Río Danubio un interesante patrón de acumulación el Pb > Cu > Zn > Mn > Fe donde destacan los niveles de Pb por sobre los metales de reconocida importancia biológica. La capacidad de acumular Pb en *Pomphorhynchus laevis* (hasta 2700 veces más que el hospedador) ha sido ampliamente descrita (Sures *et al.*, 1994; Siddall y Sures, 1998; Sures y Siddall, 1999). De igual forma, se determinaron concentraciones en µg/g de Pb en el acantocéfalo *Acanthocephalus anguillae* que resultaron 200 veces más altas que las del hígado del hospedador *Leuciscus cephalus* (Galli *et al.*, 1998).

A diferencia de estos reportes, en el presente trabajo, las concentraciones de Pb, fueron muy bajas, como así también las determinadas en el Cr y As. Sin embargo, debe destacarse que los trematodos acumularon más metales, que los detectados en el ambiente y en el hospedador, evidenciando así, su mayor sensibilidad.

Por otra parte, en cuanto a los altos niveles de oligoelementos como Fe, Cu y Mn detectados en los trematodos, podrían explicarse en función de la oferta existente en el hospedador, puesto que existe una prevalencia en la acumulación de metales como el Fe en peces, la cual ha sido explicada por el rol fisiológico como metal traza a nivel del retículo endoplasmático de células para la elaboración de ferritinina y su importancia en la composición de hemoglobina y mioglobina de peces (Sures y Siddall, 1999). También se sabe que metales como el Zn y el Cu son esenciales, y requeridos por los sistemas biológicos como componentes estructurales y catalíticos de proteínas y enzimas; así como, cofactores esenciales para el crecimiento y el desarrollo normal de los organismos, cuya asimilación implica la formación de complejos con sustancias orgánicas las cuales no son fácilmente excretadas (Scelzo, 1997).

6.3 COMPARACION DE CONCENTRACION DE METALES ENTRE SITIOS A PARTIR DE CONCENTRACIONES DETECTADAS EN TREMATODOS Y CONCENTRACIONES DETECTADAS EN EL HOSPEDADOR.

Este es el primer trabajo con trematodos endémicos en el que se pone a prueba el supuesto de que los parásitos son capaces de evidenciar diferencias de concentración en sitios con diferentes grados de contaminación.

Si solamente se consideran las concentraciones encontradas en los tejidos de *B australis*, destaca la inexistencia de diferencias de concentración entre los sitios estudiados; sin embargo, si se atiende a los niveles de metal registrados en los trematodos existirían diferencias significativas en todos los metales entre sitios de estudio. Aún cuando estas diferencias son discretas, resultaron estadísticamente significativas.

Panguipulli, resultó con las menores concentraciones de metales lo que no sorprende por su

condición de ambiente oligotrófico y poco expuesto a contaminación industrial. Pishuenco en varios casos presentó las mismas concentraciones que San Luis y más altas que las presentadas por Celco, aún cuando tradicionalmente es considerado como un lugar poco intervenido. Sin embargo, lo importante es que en este sitio los trematodos fueron más sensibles en la acumulación de metales respecto del hospedador y el ambiente; independiente a que Pishuenco no haya sido un buen control, el parásito se mantendría como un potencial bioindicador.

Respecto a los sitios de estudio, se esperaba que los parásitos de los peces del sector Celco presentaran concentraciones mayores a los sitios control y San Luis; sin embargo, en la mayoría de los casos son los trematodos de San Luis los que presentan las mayores concentraciones. Para la mayoría de los metales de relevancia biológica, las concentraciones de Celco son más cercanas a Panguipulli, incluso en el Fe las concentraciones de metal son más bajas en Celco que en este sitio control.

Una posible causa para entender las diferencias en las concentraciones detectadas en los trematodos de Celco podría relacionarse con el sexo de los hospederos, que en este sitio fueron en su totalidad hembras. En peces, las diferencias de concentración de metales a partir del sexo, se explican por las diferencias en el tamaño de los ejemplares macho y hembra, diferencias en el tipo de dieta y la estación de captura de los individuos (Kargin, 1996; Yilmaz, 2003). Sin embargo, en este trabajo, a nivel de los peces no se encontraron diferencias de concentraciones de metal y respecto a la alimentación, debemos precisar que en estadios adultos *B. australis* es omnívoro, eminentemente filtrador basando su alimentación, en estadios larvales de insectos y detritus orgánico (Úrzua *et al.*, 1977); no hay evidencia de migraciones tróficas diferenciales de *B. australis* como tampoco que las hembras preden sobre ítems alimentarios distintos a los desarrollados por los machos. De este modo, el sexo del hospedador o la dieta no

constituirían una explicación determinante, de las diferencias de concentración de metales en los trematodos de estos sitios.

Otra razón que podría explicar las diferencias de concentración entre sitios sería el tamaño de los parásitos, pues los trematodos de Celco son los más pequeños en este estudio, lo que podría incidir en los montos detectados en el sitio ya que uno de los resultados de esta investigación fue que las tallas inferiores bioacumulan más Cr, Ni Zn y Pb, los dos primeros con concentraciones significativamente mayores en Celco que el resto de los sitios. Sin embargo, no hay elementos que permitan ser concluyentes en este sentido.

Finalmente, estos resultados podrían atribuirse al hecho que San Luis está ubicado en la zona de Humedal Carlos Anwandter y constituye un ambiente de depositación de materiales lo que podría redundar en una mayor biodisponibilidad de los metales. Según los resultados del estudio del año 2005, el impacto provocado por Celco se produce aguas abajo del emisario de la planta, y el sitio de muestreo de nuestro trabajo fue 100 mt. arriba del emisario lo cual podría explicar las concentraciones promedio de Fe, Cu y Zn que fueron significativamente más bajas en Celco que en San Luis, aún cuando estas diferencias no sobrepasan el factor de 3 veces más concentrado. A la luz de estos antecedentes, sería comprensible que los parásitos aislados en Celco presenten menos concentración que los parásitos de San Luis.

Por otra parte la mayor dificultad en la discusión de estos datos es que el hospedador es un organismo móvil; *B. australis* ha sido descrito como un pez Epihidrociclo, por tener áreas de reproducción y tróficas en el río, con migraciones al mar (Úrzua *et al.*, 1977). En este sentido, podría objetarse que las mayores o menores concentraciones de metal, sean el resultado de la exposición a un sitio puntual. Este puede mencionarse como una falencia en el uso de estos bioindicadores al interior de una misma cuenca, planteando la inquietud de realizar futuras

investigaciones que comparen sitios poco contaminados propios de ambientes de la zona sur de Chile, con otros fuertemente impactados de la zona Central como el embalse Rapel caracterizado por tener una fuerte eutrofización (Woelfl *et al.*, 2003).

6.4 CONCENTRACION PARÁSITO/ TEJIDOS PEZ

Si comparamos los resultados presentados en esta tesis, con estudios realizados en parásitos acantocéfalos y cestodos, las diferencias en la acumulación de metales entre el parásito y su hospedador son más bien discretas aunque significativas. En el cestodo *Ligula intestinalis*, se ha reportado una gran eficiencia en la concentración de metales respecto del hospedador, acumulando 243 veces más Fe; 46 veces más Cu, 248 veces más Zn, que el hígado del pez (Selda, 2005), mientras que en nuestro estudio los intervalos antes mencionados no sobrepasan en los casos extremos del factor de 69 veces más Zn y 58 veces más Mn que el hígado del hospedador. De igual modo, en *Pomphorhynchus laevis* se han informado concentraciones de Pb entre 2700 - 280 veces más que el hospedero (Sures *et al.*, 2003). La concentración media de Pb en *Monobothrium wagneri* fue 75 veces mayor que las encontradas en el músculo del hospedador *Tinca tinca* (Sures *et al.*, 1997).

Comparativamente estas cifras están muy por encima de los resultados de la presente investigación, de lo anterior surge la interrogante, de que si las discretas diferencias encontradas en este estudio se relacionan con diferencias en la sensibilidad de bioacumulación del trematodo respecto de otros parásitos como acantocéfalos y cestodos; o estos valores se relacionan más bien con la condición de poco contaminada que poseen nuestros sitios de estudio. Al respecto, en el Lago Riñihue, (Woelfl *et al.*, 2008) las concentraciones de metales fueron muy similares a las detectadas en nuestra investigación, de igual forma las concentraciones detectadas en el cestodo

D. latum versus las concentraciones detectadas en el intestino de su hospedador concuerdan con las magnitudes encontradas en nuestro estudio. Incluso en casos como en Zn; *L. tolosai* concentró entre 2 a 23 veces más metal que el intestino del hospedador. En este mismo estudio las concentraciones de Pb detectadas en el agua fueron del orden de 2,5 µg/L, muy similares al promedio de las estaciones de nuestra investigación con 3 µg/L; bajo estas condiciones, el parásito *D. latum* acumuló en promedio 19 ± 3 µg/g, mientras que *L. tolosai* concentró $4,9 \pm 5,1$ µg/g de Pb en el sitio que presentó las mayores concentraciones, San Luis. De este modo los valores obtenidos, podrían sugerir que las concentraciones detectadas en trematodos son el producto de las bajas concentraciones presentes en los sitios de muestreo, sin embargo, también es relevante considerar las diferencias que presentan cestodos, acantocéfalos y trematodos respecto de sus sistemas digestivos. En los dos primeros grupos absorben los nutrientes ya digeridos por el hospedador a través del tegumento corporal, muy fino, lo cual les confiere una especialización de absorción por todo el cuerpo lo que podría explicar la mayor capacidad de incorporar una mayor cantidad de metales; mientras que los trematodos poseen un sistema digestivo habitualmente incompleto, ingiriendo nutrientes, principalmente por la boca y en menor grado por el tegumento. De este modo, se hace necesario contar con mayores antecedentes sobre la fisiología del parásito y de las relaciones hospedero – ambiente –parásito para dar una respuesta cabal sobre las razones que explican las diferencias de concentración de metales entre sitios de muestreo.

7 CONCLUSIONES

- Se acepta la hipótesis que el parásito intestinal *L. tolosai*, concentra una mayor cantidad de metales que los tejidos muscular e intestinal de *B. australis* excepto para el Fe, que a nivel de los tejidos hepáticos no presenta diferencias significativas con el parásito. Sin embargo, los factores de bioconcentración respecto de los tejidos del hospedador fueron discretos en comparación a lo observado en cestodos y acantocéfalos.
- Existe una relación entre la masa corporal de los trematodos y los niveles de metales que son capaces de bioconcentrar, especialmente Cr, Ni, Zn y Pb.
- Existen diferencias en la concentración de metales entre parásitos aislados en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter y los Sitios Control aún cuando estas diferencias son muy discretas. Por esta razón, es de importancia realizar estudios en ambientes severamente contaminados con metales y sitios no expuestos, para evaluar la existencia de diferencias más reveladoras.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Backer, S., Hund – Rinke, K., Kördel, W. (2003) Underlynd issues information needs in risk assessment. *Ecotoxicol. Environ.*, 56, 6 -19.
- Bagge, A., Valtonen, T. (1996) Experimental study on the influence of paper and pulp mill effluent on the gill parasite communities of roach (*Rutilus rutilus*). *Parásitology.*, 112, 499-508.
- Barus, V., Tenora, F., Kráčmar S., ProKeš, M. (2001) Cadmium and lead concentration in *Contracaecum rudolphii* (Nematoda) and its host, the cormorant, *Phalacrocorax carbo* (Aves) *Folia Parásitol.*, 48,77 -78.
- Boada, M., Moreno, M. A., Gil, H., Marcano, J. and Maza, J. (2007) Heavy metals (Cu^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2}) in muscle and cephalothorax of wild shrimp (*Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. notialis* and *F. brasiliensis*) from the Eastern region of Venezuela. *Rev. Cient. (Maracaibo).*, 17, 186-192.
- Borchardt, T., Burchert, S., Hablitzel, H., Karbe, L. and Zeitner, R. (1988) Trace metal concentration in mussels: Comparison between estuarine, coastal and offshore regions in the southeastern North Sea from 1983 to 1986. *Mar. Ecol.*, 42, 17-31.
- Boyden, C.R. (1974) Trace elements contents and body size in molluscs. *Nature.*, 251, 311-314.
- Boyden, C.R. (1977) Effect of size upon metal content of schellfish. *J. Mar. Biol. Assoc.*, 57,675 – 714.
- Bray, N.C., Weil, R. (2002) The nature and properties of soils. Thirteenth Edition. Prentice Hall, New Jersey, USA. 960 pp.

- Broeg, K., Zander, S., Diamant, A., Körting, W., Krüner G., Paperna, I., Westernhagen, H. (1999) The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. I. North Sea. *Helgol. Mar. Res.*, 53, 171–194.
- Castañe, P., Topalián, M., Cordero, R., Salibián, A. (2003) Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev. Toxicol.*, 20, 13-18.
- Connell, D. (1997) Basic concepts in environmental chemistry. Lewis Publishers, NY, USA. 506 p.
- Cossa, D., Bourget, E., Pouliot, D., Piuze, J. & Chanut, J. (1980) Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 58, 7-14.
- Cross, M., Irwin, S.W. B. and Fitzpatrick, S. M. (2001) Effects of heavy metal pollution on swimming and longevity in cercariae of *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae) *Parasitology.*, 123, 499–507.
- Dallinger, R., Bernhard, L., Margit, E., Schipflinger, R., Chabicovsky, M. (2004) Cd accumulation and Cd- metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal – polluted habitats. *Ecotoxicol.*, 13, 757-772.
- Díaz, O., Encina, F., Chuecas, L., Becerra, J., Cabello, J., Figueroa, A., Muñoz, F. (2001) Influencia de variables estacionales, espaciales, biológicas y ambientales en la bioacumulación de mercurio total y metilmercurio en *Tagelus dombeii*. *Rev. biol. mar. oceanogr.*, 36, 15 – 29.
- Duffus, J. (2002) “Heavy metals” a meaningless term? (Iupac technical report). *Pure*

Appl. Chem., 74, 793–807.

Dyer, B. (2000) Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile.

Estud. Oceanol., 19, 77-98.

Frazier, J.M, George, S.G., Overnell, J., Combs, T.L., Kagi, J. (1985) Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80C, 257 -262.

Gaete, H., Aranguiz, F., Cienfuegos, G., Tejos, M., (2007) Toxicidad y metales pesados en el rio Aconcagua, *Quím. Nova.*, 30, 885-891.

Gagneten, A. and Vila, I. (2001) Effects of Cu⁺² on the Fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladóceras) in Microcosm Experiments. *Environ. Toxicol.*, 16, 428-438.

Galli, P., Crosa, G., Occhipinti, A. (1998) Heavy metals concentrations in acanthocephalans parasites compared their fish host. *Chemosphere.*, Vol 37, 2983 – 2988.

Gefen, E., Stone, L., Rosenfeld, M., Von Westernhagen, H. (2003) Biological indicators in marine and coastal waters: a statistical and modelling analysis of the MARS campaign. *Helgol. Mar Res.*, 57, 272–284.

Gray, J.S. (2002) Biomagnification in marine system: The perspective of an ecologist. *Mar. Poll. Bull.*, 45, 46 -52.

Hoole, D. (1997) The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. *Parassitologi.*, 39, 219–225.

John, D.A., Leventhal, J.S., (1995) Bioavailability of metals, in duBray, E.A., ed., Preliminary compilation of descriptive geoenvironmental mineral deposit models: U.S. Geological Survey Open-File Report 95-831.

- Khan, R. (2006) Assessment of stress-related bioindicators in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to discharges from a pulp and paper mill in Newfoundland: a 5-year field study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51,103–110.
- Khan, R. (2007) Parasites of Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) as an Additional Bioindicator of Stress-Related Exposure to Untreated Pulp and Paper Mill Effluent: A 5-Year Field Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 52, 243-250.
- Kargin, F. (1996) Seasonal changes in levels of heavy metals in tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* collected from Iskenderun Gulf (Turkey). *Water, Air, Soil Poll.*, 90, 557–562.
- Lafferty, K. (1997) Environmental parasitology: what can parasites tell us about human impacts on the environment?. *Parasitol. Today.*, 13, 251-255.
- Langston, W. (1990) Toxic Effects of Metal and the Incidence of Metal Pollution in Marine Ecosystems. In: R. W. Furnes & P. S. Rainbow (Eds.), *Heavy Metals in the Marine Environment*. 256pp.
- Lantzy, R., Mackenzie, F. (1979) Atmospheric trace metals: global cycles. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 43, 425 – 511.
- Lares, M.L., Orians, K.S. (1997) Natural Cd and Pb variations in *Mytilus californianus* during the up welling season. *Sci. Total Environ.*, 197, 177 -195.
- Liu, X.-J. and Wang, W.-X. (2002) Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio rerio*. *Water.Res.* 36, 4563-4569.

- Luoma, S.N., Rainbow, P., (2005) Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as unifying concept. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1921 -1931.
- Mages, M., Woelfl, S. and Tuempling, W. (2001) A method for trace element determination of single *Daphnia* specimen using total X-ray fluorescence spectrometry-*Spectrochim. Acta B.*, 56, 2209-2217.
- Mancera -Rodríguez, N., Álvarez –León, E. (2006) Current state of knowledge of the concentration of mercury and other heavy metals in fresh water fish in Colombia. *Acta Biol. Colombiana*, 11, 3 – 23.
- Mann, E., Ahlgren, N. & Chisholm, S. (2002) Copper toxicity and cyanobacteria ecology in the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 47, 976-988.
- Medina, M., and Encina, F.(2003) Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico (ERE) en el sistema de evaluación de Impacto Ambiental (SEIA) para ecosistemas acuáticos n Chile. *Rev. Amb. y Desarrollo del CIMPA*, Vol. XIX/Nº3 y 4/2004.
- Morley, N., Irwin, S.W.B., Lewis, J.W. (2003) Pollution toxicity to the transmission of larval digeneans through their molluscan hosts. *Parasitolog.*, 126, 5–26.
- Mountouris, A., Voutsas, E., Tassios, D. (2002) Bioconcentration of heavy metal in aquatic environments: the importance of bioavailability . *Mar. Poll. Bull.*, 44, 1136 -1141.
- Norris, H.N., Hawkins, C.P. (2000) Monitoring river health. *Hydrobiol.*, 43, 5-17.
- Olmos, V; Victoriano, P; Habit, E; Valdovinos, C (2003) Parásitos de peces nativos de la cuenca del rio Laja (Chile central) y alcances sobre sus ciclos de vida. *Arch. Med. Vet.*, 35, 195 – 203.

- Overstreet, R. (1997) Parasitological data as monitors of environmental health. *Parassitologia*, 39,169–175.
- Palikova, M., Barus, V. (2003) Mercury Content in *Anguillicola crassus* (Nematoda) and its Host *Anguilla anguilla*. *Acta Vet. Brno.*, 72, 289–294.
- Pascual, S., Abollo, E. (2005) Whaleworms as a tag to map zones of heavy metal pollution. *Trends in Parasitol.*, 21, 204 – 206.
- Pietroock, M., Mclauhun, D. (2002) Effect of cadmium upon longevity of *Diplostomum sp.* (Trematoda: Diplostomidae) cercariae. *Chemosphere*, 47, 29 -33.
- Poulin, R. (1992) Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. *Parasitol. Today.*, 8, 58–61.
- Poléo, B., Schjolden, J., Hansen, H., Bakke, T., Rosseland, O., Lydersen, E. (2004) The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Parasitology.*, 128, 169-177.
- Rainbow, P. (1997) Ecophysiology of Trace Metal Uptake in Crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf. Science.*, 44, 169-175.
- Riggs, M., Lemly, A., Esch, G. (1987) The growth, biomasa and fecundity of *Bothriocephalus acheilognathi* in a North Carolina reservoir. *J. Paraitol.*, 73, 893 -900.
- Riisgard, H., Kiorbe, T., Mohlenberg, F., Draback, I. and Pheiffer, P. (1985) Accumulation, elimination and chemical spetiation of mercury in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balhhica*. *Mar. Biol.*, 86, 55 -62.
- Schalscha, E. y Ahumada, I. (1998) Heavy metals in Rivers and soils of central Chile. *Water Sci. Technol.*, 37 (8), 251-255
- Schmidt V., Zander, S., Körting, W., Broeg, K., Von Westernhagen, H., Dizer H., , Hansen,

- P., Skouras , A., Steinhagen, D. (2003) Parasites of flounder (*Platichthys flesus L.*) from the German Bight, North Sea, and their potential use in biological effects monitoring. C. Pollution effects on the parasitecommunity and a comparison to biomarker responses *Helgol. Mar. Res.*, 57,262 - 271.
- Scelzo, M. (1997) Toxicidad del cobre en larvas nauplio del camarón comercial *Artemisa longinaria* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Invest. Mar. Valparaíso*, 25, 177-185.
- Selda, T., Ismail, K. (2005) Comparative study on the accumulation of heavy metals in different organs of tench (*Tinca tinca L.* 1758) and plerocercoids of its endoparasite *Ligula intestinalis*. *Parasitol. Res.*, 97, 156 -159.
- Seth, W., Kaufer, A., Chejlaca, M., Fried, B., Sherma, J. (2002) Effect of *Euhaplorchis californiensis* (Trematoda) infection metallic ions in the host snail *Cerithidea californica* (Gastropoda) *Parasitol. Res.*, 88, 1080 -1082.
- Siddall, R., Koskivaara, M., Valtonen, E.T. (1997) Dactylogyrus (Monogenea) infections on the gills of roach (*Rutilus rutilus*) experimentally exposed to pulp and paper mill effluent. *Parásitology*, 114, 439–446.
- Siddall, R. and Sures, B. (1998) Uptake of lead by *Pomphorhynchus laevis* cystacanths in *Gammarus pulex* and immature worms in chub (*Leuciscus cephalus*). *Parasitology, Res.*, 84, 573–577.
- Sures, B., Taraschewski, H. and Jackwerth, E. (1994) Lead accumulation in *Pomphorhynchus laevis* and its host. *J. Parasitol.*, 80, 355–357.
- Sures, B., Taraschewski, H., Rydlo, M. (1997) Intestinal fish parasites as heavy metal bioindicators: a comparison between *Acanthocephalus lucii* (Palaeacanthocephala)

- and zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59, 14–21.
- Sures, B., Jrges, G., Taraschewski, H. (1998) Relative concentrations of heavy metals in the parasites *Ascaris suum* (Nematoda) and *Fasciola hepatica* (Digenea) and their respective porcine and bovine definitive hosts. *Int. J. Parasitol.*, 28, 1173.
- Sures, B. and Siddall, R. (1999) *Pomphorhynchus laevis*: The Intestinal acanthocephalan as a Lead Sink for its Fish Host, Chub (*Leuciscus cephalus*). *Exp. Parasitol.*, 93, 66–72.
- Sures, B. (2000) Element concentrations in the archiacanthocephalan *Macracanthorhynchus hirudinaceus* compared with those in the porcine host from a slaughterhouse in La Paz, Bolivia. *Int. J. Parasitol.*, 30, 1071–1076.
- Sures, B., Zimmermann, S., Sonntag, C., Stüben, D., Taraschewski, H. (2003) The acanthocephalan *Paratenuisentis ambiguus* as a sensitive indicator of the precious metals Pt and Rh from automobile catalytic converters. *Environ. Pollut.*, 122, 401–405.
- Sures, B. (2004) Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends Parasitol.*, 20, 170–177.
- Sures, B. (2006) How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. *J. Helminthol.*, 80, 151–157.
- Sures, B. y Zimmermann, S. (2007) Impact of humic substances on the aqueous solubility, uptake and bioaccumulation of platinum, palladium and rhodium in exposure studies with *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.*, 146, 444–451.
- Soliman, M., El-Shenawy, N., Ghobashy, M.A. (2004) Parasitological aspects and biochemical changes of infected cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Acta Ichthyol.*

Psicat., 34, 21 -32.

Schuldermann, C. , Konecny, R., Laimgruber,S., Lewis,J., Schiemer, F.,Chovanec,A.,

Sures,B. (2003) Fish macroparasites as indicators of heavy metal pollution in river sites in Austria. *Parásitolog.*, 126, 61– 69.

Szidat, L (1962) *Steganoderma oviformis* sp. (Trematoda) del intestino de *Aplochiton zebra*

Jenyns. *Neotropica.*, 8, 67-72.

Tapia, J., Durán, E., Peña-Cortez, F., Hauenstein, E., Bertrán, C., Schlatter, R., Vargas, L.,

Jimenez, C. (2006) *Micropongias Manni* as a bioindicator for copper in lake Budi (IX Region, Chile) *J. Chil. Chem. Soc.*, 2, 901-904.

Tenora, F., Kracmar, S., Barus, V. and Dvoracek, J. (1997) Some inorganic substances in

plerocercoids of *Ligula intestinalis* (Pseudophyllidea). *Acta Univ.*

Agric. Silv. Mendel. Brun., 45,23–30.

Thielen, S., Zimmermann, S., Baskab, F., Taraschewski, H., B. Sures, B. (2004) The intestinal

parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator

for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. *Environ.*

Pollut., 129, 421 – 429.

Torres, P., Neira, A. (1991) A new species of *Limnoderetrema* (trematoda, Digenea) from the

freshwater atherinid fish *Basilichthys australis* (Eigenmann, 1927) from the south

of Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*, 86,433-436 Oct/Dec.

Torres, P; Contreras, A; Cubillos, V; Gesche, C; X Montefusco,V; Rebolledo, C; Mira, A;

Arenas, A; Miranda, J; Asenjo, S; Schlatter, R (1992) Parasitismo en peces, aves

piscívoras y comunidades humanas rivereñas de los lagos Yelcho y Tagua Tagua, X

región de Chile. *Arch. Med. Vet.*, 24, 77-93.

- Torres, P; Franjola, R; Montefusco, A (1996) Infección estacional por metacercarias de *Diplostomum (Austrodiplostomum) mordax* (Szidat y Nani, 1951) y *Tylodelphys destructor* Szidat y Nani, 1951 en el pejerrey chileno, *Basilichthys australis* Eigenmann, 1927 (Pisces: Atherinidae) en el lago Riñihue, Chile. Bol. Chil.Parasitol., 51, 15-19.
- UACH (2005) "Estudio sobre origen de mortalidades y disminución poblacional de aves acuáticas en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, en la provincia de Valdivia". Convenio CONAMA Xª Región de Los Lagos.
- Úrzua, R., Diaz, C., Karmy, E. and Moreno, C. (1977) Alimentación natural de *Basilichthys australis* (Eigenmann, 1927) en Tejas Verdes, Chile (Atheriniformes, Atherinidae). *Biol. Pesq.*, (Chile), 9, 45 - 61.
- Villalobos, S. (1997) Distribución espacial y temporal de metales traza en los sedimentos del sistema estuarial Valdivia. Tesis Escuela de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile. 46 pp.
- Warren, L.A., Haack, E.A. (2001) Biogeochemical controls on metal behaviour in aquatic environments. *Earth Sci. Rev.*, 54/4, 261-320.
- Woelfl, S., Mages, M. and Encina, F. (2003) Cold plasma ashing improves the trace element detection of single *Daphnia* specimens by Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry. - *Spectrochim. Acta B.*, 58B, 2157- 2168.
- Woelfl, S., Mages, M., Mercado, S., Villalobos, L., Óvari, M., Encina, F. (2003) Determination of trace elements in planktonic microcrustaceans using total reflection X-ray fluorescence (TXRF): First results from two Chilean lakes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 1088-1094.

- Woelfl, S., Mages, M., Óvári, M., Geller, W. (2006) Determination of heavy metals in macrozoobenthos from the rivers Tisza and Szamos by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta B.*, 6, 1153–1157.
- Woelfl, S., Mages, M., Torres, P. (2008) Trace metal concentrations in single specimens of the intestinal broad flatworm (*Diphyllbothrium latum*), compared to their fish host (*Oncorhynchus mykiss*) measured by total reflection X-ray fluorescence spectrometry *Spectrochim. Acta B.*, 63, 1450–1454.
- Wolterbeek, H. and Verburg, T. (2001) Predicting metal toxicity revisited: general properties vs. specific effects. *The Sci. Total Environ.*, 279, 87-115.
- Yılmaz, A. B. (2003) Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. *Environ. Res.*, 92, 277– 281.
- Zimmermann, S., Sures, B. and Taraschewski, H. (1999) Experimental studies on lead accumulation in the el specific endoparasites *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala) as compared with their host, *Anguilla anguilla*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37, 190–195.
- Zimmermann, S., Von Bohlen, A., Messerschmidt, J., Sures, B. (2005) Accumulation of the Precious metals platinum, palladium and rhodium from automobile catalytic converters in *Paratenuisentis ambiguus* as compared with its fish host, *Anguilla Anguilla*. *J. Helminthol.*, 79, 85-89.

9 ANEXOS

Tabla anexo 1: Carrier de muestras con datos de concentración de metales en trematodos no considerados en las evaluaciones estadísticas

Muestra	Sitio	Carrier	Metal eliminado
3A	San Luis	144	Cr
		420	Ni
4A	San Luis	264	Fe
		441	Fe
		490	Fe
		318	Fe
5A	San Luis	297	Cr
6A	San Luis	271	Cr, Mn, Ni
		281	Mn
		439	Mn
		426	Mn
		614	Mn
7A	San Luis	300	Cr, Ni
		15	Cr
8A	San Luis	382	Ni
9A	San Luis	200	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As,
		290	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As,
		374	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As,
		780	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As,
		32	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As,
10 A	San Luis	80	Cr

Tabla anexo 2: Concentraciones de Metales Pesados As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en ($\mu\text{g/g}$) por estaciones de muestreo en tejidos de *Basilichthys australis*.
n.d : No detectado

Site	Peso (gr)	Lon g. (cn.)	s e x o	As			Cr			Cu			Fe			Mn			Ni			Pb			Zn		
				I	M	H	I	M	H	I	M	H	I	M	H	I	M	H	I	M	H	I	M	H	I	M	H
Celco	465	34	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	10	3,27	34,7	89,5 9	24,3 4	22 1	4,28	n.d	6,31	4,2	1,8 4	0,86	3,5 8	n.d	0,7 6	64,6 3	14,5 5	59,4 2
Celco	325	31,3	H	n.d	n.d	n.d	n.d	4,50	n.d	8,4	4,19	8,7	110, 3	28,9 2	17 4	4,00	n.d	6,66	5	1,6 2	0,58	n.d	4,3 5	0,7 2	103	22,1 1	60,6 5
Celco	510	35,4	H	n.d	n.d	n.d	4,19	n.d	n.d	2,5	1,26	11,6	56,1 7	9,25 9	37 4	4,07	n.d	9,42	2,8	1,6 0	1,09	n.d	1,6 6	0,8 9	49,9 8	8,39 4	78,9 6
Celco	350	31,7	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,55	7,4	8,62	77,6	79,2 4	16,9	26 6	3,93	n.d	8,33	1,8	3,2 4	0,89	n.d	1,9 4	0,6 5	71,0 7	18,2 8	72,4 1
Celco	360	33,4	H	n.d	n.d	n.d	2,73	n.d	n.d	33	2,91	102,5	241	17,4 9	41 5	9,35	n.d	11,7 3	2,5	2,2 3	0,90	2,3 6	1,5 1	n.d	58,7 1	17,8 9	87,1 3
S.Luis	450	33,5	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,15	7,7	2,27	6,65	139	39,6 4	38 2	21,2 9	n.d	5,57	6,7	3,3 4	1,23	7,2 9	n.d	0,8 1	58,2 4	17,2 5	68,7 1
S.Luis	290	30	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,65	4,7	3,38	13,31	104	41,2 3	42 4	12,4 3	n.d	10,6 7	n.d	3,2 2	2,03 5	n.d	n.d	1,0 7	65,0 4	72,0 9	94,2 2
S.Luis	290	31	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	7,6	n.d	13,51	138	25,8 3	14 6	5,66	1,3 6	6,23	1,4	1,0 0	0,55	n.d	n.d	0,4 5	110	15,8 1	55,1 8
S.Luis	166	25,5	M	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	32,0 8	4,9	1,35	31,95	133	16,4 4	53 4	6,52	2,4 6	10,7 5	4	1,3 8	13,1 2	n.d	n.d	5,7 5	73,6 7	13,1 4	128
S.Luis	430	34,4	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,54	11	5,89	19,84	90	28,5 2	36 4	66,5 8	n.d	4,13	2,2	1,5 9	0,96	n.d	n.d	1,1 6	63,2 2	14,5 6	44,4 8
S.Luis	305	32,5	H	n.d	n.d	n.d	n.d	2,77	1,07	6,9	3,40	14,91	108	45,4 7	48 8	59,9 8	1,2 5	10,2 4	2,3	1,4 2	1,66	1,6 7	n.d	0,9 1	56,2 1	19,8 5	80,1 9
S.Luis	261	32,8	M	n.d	n.d	n.d	2,48	n.d	n.d	4,6	2,91	21,60	87,9 5	38,3 9	38 6	3,42	n.d	11,7 2	1,9	5,9 4	0,89	n.d	1,6 5	1,4 4	80,3 0	16,2 1	97,5 1
S.Luis	370	34,2	M	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4	2,23	32,48	226	24,5 5	49 2	3,34	n.d	11,4 3	1,6	1,7 6	1,60	2,3 2	n.d	0,9 7	74,4 8	13,7	1038
S.Luis	390	34	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	7,9	2,11	11,25	165	30,0 5	43 1	2,5 9	8,69	2,2	2,9 4	0,83	2,0 9	3,6 4	0,9 3	48,5 0	12,2 4	61,3 4	
S.Luis	260	29,5	M	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,8	1,01	20,51	65,0 5	19,2 9	29 0	165	1,6 6	10,2 0	n.d	1,2 4	0,92	2,7 8	2,1 9	1,7 9	67,3 9	13,0 3	73,0 1
S.Luis	385	35	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4,9	2,65	5,58	74,5 2	29,1 7	18 4	4,55	n.d	2,85	3,5	0,8 9	1,10	5,0 5	n.d	3,1 1	64,0 0	17,7 1	33,2 7
Pis	170	26	M	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	13	2,58	59,14	140	17,9 5	30 2	33,7 6	n.d	6,50	5,5	1,6 1	1,59	3,8 4	n.d	0,6 3	127	17,5 6	97,4 5
Pis	220	28,5	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	7,1	2,67	10,10	76,7 8	18,3 3	17 7	8,30	n.d	4,34	4	3,3 5	0,54	2,5 7	n.d	0,7 9	88,6 1	15,9 6	50,4 1
Pis	210	27	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,1	1,56	7,00	92,9 2	14,0 3	17 7	12,7 6	n.d	4,19	2,9	n.d	0,65	n.d	n.d	0,8 7	70,6 2	14,7 4	56,4 1
Pis	310	31	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	6,1	3,26	21,65	124	22,6 5	21 9	15,8 2	n.d	4,19	5	2,6 9	0,93	2,8 3	n.d	0,5 9	60,1 5	9,49 5	47,1 5
Pis	215	29	H	n.d	n.d	n.d	4,25	n.d	n.d	9,1	1,62	16,50	507	14,9 1	15 5	26,8 7	n.d	5,09	2,1	1,6 2	0,59	5,3 2	n.d	1,2 4	39,2 0	10,7 4	64,3 3
Pan	286	33,5	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,3	1,94	54,00	70,9 1	20,8 3	26 6	n.d	n.d	4,71	2,6	2,6 0	2,25	n.d	n.d	2,6 7	75,2 7	15	59,0 3
Pan	269	29,5	H	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	5,3	n.d	21,36	69,2	14,1 9	19 1	2,26	n.d	3,13	1,5	1,6 8	2,30	3,1 6	n.d	n.d	53,7 4	11,9	41,1 1
Pan	301	29	M	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4,5	1,15	5,94	104	15	44 3	2,93	n.d	3,37	4,7	2,1 2	1,20	n.d	n.d	0,7 0	80,3 1	12,7 1	66,7 7

Tabla anexo 3: Concentraciones de Metales Pesados As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb en ($\mu\text{g/g}$ P.S.) por estaciones de muestreo en trematodo. (P.S.: Peso Seco)

n.d: No detectado

State	N° muestra									Zn
	Pez	P.S. (μg)	As	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	
Celco	17	8,71	n.d	n.d	11,45	88	45,12	3,33	n.d	213
	17	7,54	n.d	3,44	12,20	154	38,31	2,92	2,78	330
	17	2,51	n.d	21,07	24,26	412	48,12	8,75	10,34	424
	17	11,15	n.d	4,66	20,09	198	21,44	2,24	2,42	150
	17	8,30	n.d	6,02	9,64	138	27,00	4,10	2,77	277
	17	12,15	2,22	3,29	9,38	183	26,74	2,80	2,05	426
	17	5,95	n.d	9,91	13,44	196	39,99	4,37	3,36	310
	17	5,87	n.d	5,96	22,50	221	55,90	2,90	4,60	397
	17	3,60	4,99	8,87	18,87	431	61,32	9,16	n.d	458
	17	10,14	1,77	4,93	11,04	98	20,11	3,25	2,66	229
	17	14,67	n.d	2,65	8,32	81	24,41	1,64	1,29	183
	17	4,11	n.d	8,52	19,48	253	54,30	5,60	6,33	425
	17	9,64	n.d	4,25	13,49	148	26,14	3,94	2,69	321
	17	11,32	3,09	4,94	13,70	162	20,68	2,12	2,20	296
	17	9,39	n.d	4,68	10,33	112	18,54	2,02	n.d	204
	17	10,48	3,14	5,82	12,03	207	31,40	1,72	2,09	339
	18	9,14	10,39	5,91	18,72	189	25,94	3,83	3,17	319
	18	18,52	13,11	1,56	11,88	300	20,78	1,62	n.d	257
18	10,90	11,38	4,86	10,19	282	22,39	2,20	1,92	249	

18	5,45	12,29	8,44	10,65	231	29,18	4,04	5,32	390
18	10,39	13,56	5,00	9,81	233	28,29	5,68	n.d	224
18	9,16	9,46	n.d	7,56	103	24,87	3,11	n.d	257
18	15,84	9,27	2,65	10,67	196	23,99	2,34	n.d	222
18	8,47	10,04	n.d	11,81	197	29,65	4,61	3,78	424
18	10,90	17,43	6,24	8,08	741	24,50	1,74	2,56	227
18	9,89	12,03	n.d	9,10	256	22,95	2,33	n.d	228
18	9,72	10,07	3,29	13,37	145	25,20	1,95	n.d	221
18	11,15	10,94	n.d	8,34	293	21,98	2,60	2,87	188
19	9,16	3,39	3,58	8,81	262	27,98	2,98	n.d	283
20	16,87	3,28	n.d	7,61	468	27,57	4,88	n.d	348
20	13,15	3,28	n.d	7,61	468	27,57	4,88	n.d	348
21	7,53	2,77	5,23	29,63	298	24,96	5,45	n.d	253
21	9,56	3,55	n.d	25,22	343	26,48	2,20	2,51	191
21	4,86	n.d	6,99	37,23	327	34,35	4,94	4,31	260
21	9,39	n.d	n.d	25,78	137	19,71	2,13	n.d	166
21	11,15	2,33	2,96	21,89	443	22,07	2,06	3,31	274
21	8,38	2,62	3,69	15,39	175	22,79	2,98	n.d	213
21	11,15	n.d	2,42	66,83	163	17,94	2,51	n.d	156
21	20,95	n.d	1,71	15,03	151	13,94	1,10	1,19	78

Continuación Tabla anexo 3

State	N° muestra									Zn
	Pez	P.S. (µg)	As	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	
San Luis	21	10,48	n.d	n.d	27,20	165	23,96	2,39	2,09	227
	21	11,48	n.d	n.d	18,72	208	22,38	2,26	n.d	227
	21	11,15	1,97	n.d	24,67	229	17,85	3,14	n.d	171
	21	8,05	n.d	4,59	22,74	183	21,00	2,36	1,98	137
	1	11,03	6,80	7,25	40,62	219	23,30	4,26	12,51	348
	1	11,44	10,49	5,42	16,43	330	19,32	3,58	9,97	263
	1	20,00	4,15	11,35	35,95	171	24,15	2,70	11,75	282
	1	12,10	6,28	4,71	25,79	206	20,50	3,06	7,94	306
	1	11,11	4,05	9,63	36,36	209	26,01	4,59	15,12	411
	1	9,79	7,15	9,80	38,19	297	31,55	4,59	15,42	396
	1	15,23	7,62	4,47	17,01	321	13,33	2,04	5,12	185
	1	4,20	3,57	15,49	32,40	373	25,02	7,86	19,30	541
	1	9,63	4,88	8,31	32,30	259	28,35	3,95	11,42	345
	1	7,41	8,51	7,29	47,39	281	40,77	5,94	13,23	399
	1	15,80	5,32	10,70	33,16	298	41,70	3,35	11,64	298
1	15,97	6,51	4,51	33,38	116	26,49	2,57	8,83	325	
1	13,15	10,49	n.d	20,93	338	26,43	3,89	5,16	268	

1	11,79	4,65	n.d	25,10	152	21,44	3,75	6,65	270
2	17,86	4,82	3,08	17,02	156	34,94	2,58	7,00	294
2	13,04	4,06	n.d	25,68	239	29,98	2,61	9,74	365
2	9,55	4,50	6,70	14,98	294	25,03	3,35	9,95	227
2	14,99	4,27	3,94	18,08	177	32,43	1,80	22,02	329
2	11,67	3,51	3,00	36,09	183	29,83	2,66	9,94	361
2	9,32	9,23	3,76	30,16	324	31,13	2,79	11,81	516
2	9,06	21,20	3,42	44,39	1207	59,19	1,66	7,51	234
2	16,69	4,79	7,07	49,38	360	22,53	1,68	9,89	368
2	12,23	1,39	2,53	16,27	90	11,94	1,47	4,90	184
2	8,91	6,96	6,28	45,45	409	27,72	n.d	16,50	254
2	12,15	11,69	2,39	33,33	342	37,53	1,81	4,69	118
2	21,40	5,49	n.d	17,90	176	20,30	2,89	5,33	268
3	9,64	1,35	2,39	33,19	104	33,92	4,36	10,17	596
3	18,47	2,22	1,79	41,04	211	23,33	3,14	9,69	578
3	14,26	10,31	3,30	52,88	497	48,67	307,76	16,20	894
3	9,24	5,09	n.d	52,95	468	50,89	5,31	11,69	843
3	19,93	4,62	3,76	41,50	327	27,35	3,61	9,38	503
3	27,94	4,03	n.d	21,81	326	20,35	4,38	6,22	499
4	30,38	45,10	2,73	24,79	1838	16,13	1,25	n.d	230

Continuación Tabla anexo 3

State	N° muestra									Zn
	Pez	P.S. (µg)	As	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	
San Luis	4	15,65	59,95	4,86	39,88	2495	19,81	2,94	2,49	219
	4	25,16	28,21	0,79	20,35	372	12,36	0,68	1,23	395
	4	19,95	50,88	3,66	28,22	1623	17,74	2,36	1,85	314
	4	21,61	35,69	2,18	26,34	232	18,93	1,25	1,20	324
	4	20,94	42,83	3,49	27,22	845	21,20	2,10	2,15	278
	4	25,30	53,88	n.d	31,49	2926	15,60	2,51	n.d	325
	4	22,35	34,00	5,64	36,87	470	21,21	1,70	2,60	389
	4	19,29	30,49	7,62	32,30	431	23,33	1,87	2,59	189
	5	30,29	4,36	n.d	33,34	240	19,99	1,90	n.d	280
	5	23,26	3,01	2,06	44,37	293	44,92	1,89	1,42	219
	5	21,44	3,87	2,01	20,71	227	21,55	1,54	1,17	204
	5	20,61	7,03	2,33	22,56	495	21,69	1,55	1,99	324
	5	23,34	9,00	7,20	28,53	615	27,37	1,37	2,78	294
	5	24,83	5,72	4,67	12,60	341	17,15	1,21	1,25	184
	5	27,48	2,58	4,66	17,28	251	16,88	1,02	1,42	255
	5	23,76	6,61	4,59	21,68	451	19,11	1,52	2,02	241
	5	23,67	3,46	8,49	20,78	278	21,42	1,48	2,53	218
	5	27,65	3,04	1,74	13,09	196	19,82	3,04	1,05	387

5	16,19	9,64	2,78	66,53	967	40,89	1,91	2,41	114
5	25,24	1,98	1,94	6,66	146	23,22	1,51	0,99	317
5	24,16	8,61	2,52	9,60	591	20,16	1,37	n.d	190
5	23,25	7,66	1,59	20,09	450	19,79	1,42	n.d	354
5	31,38	5,80	n.d	31,23	421	19,41	1,18	n.d	340
5	25,65	7,56	2,14	13,80	385	20,93	1,29	n.d	172
5	27,65	5,68	1,66	16,13	530	21,70	1,12	n.d	287
6	21,90	13,74	1,78	36,84	1056	70,26	2,19	1,32	235
6	26,12	7,29	n.d	11,82	305	53,28	1,97	n.d	288
6	23,02	6,08	n.d	25,81	495	66,56	0,96	n.d	240
6	22,59	2,88	44,27	29,62	620	141,89	21,34	1,33	300
6	21,22	5,18	n.d	20,97	387	95,43	1,98	15,27	284
7	31,32	8,85	1,15	29,38	565	21,08	1,21	0,83	578
7	25,69	5,61	n.d	23,98	332	25,42	2,10	1,56	385
7	23,75	6,06	n.d	27,24	290	21,35	1,85	1,18	389
7	27,88	7,53	81,16	26,57	640	43,14	35,54	0,90	417
7	27,36	5,67		34,58	353	24,16	1,57	n.d	275
7	24,72	4,49	n.d	22,74	177	26,34	1,58	n.d	317
7	21,64	7,72	2,73	41,13	576	17,10	1,29	1,25	499

Continuación tabla anexo 2.

State	N° muestra									Zn
	Pez	P.S. (µg)	As	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	
San Luis	7	20,41	7,01	n.d	15,97	363	20,34	1,86	1,52	356
	7	26,92	6,17	1,93	27,60	325	19,58	1,82	n.d	390
	7	23,22	8,53	n.d	29,15	448	21,14	1,68	n.d	390
	7	23,22	8,53	n.d	29,15	448	21,14	1,68	n.d	464
	7	21,02	7,85	2,57	28,68	510	30,06	2,00	1,52	598
	7	23,40	5,77	n.d	40,99	309	21,58	2,31	1,28	307
	7	32,19	6,90	1,34	30,41	282	16,90	1,12	n.d	364
	7	26,21	5,77	n.d	25,58	222	23,94	2,22	n.d	207
	8	22,08	1,99	2,63	21,92	123	17,98	1,18	0,95	293
	8	26,92	2,41	2,90	20,40	178	18,28	1,15	1,52	317
	8	18,41	8,12	3,01	19,71	264	14,17	19,29	n.d	358
	9	18,30	2,51	2,57	42,08	1284	311,32	1,80	1,64	223
	9	25,60	2,30	2,46	21,25	759	224,05	1,33	0,70	301
	9	35,27	1,90	2,30	14,74	684	232,95	1,45	n.d	177
	9	29,03	1,96	1,83	11,99	940	326,10	1,52	0,59	232
	9	24,40	2,76	3,14	41,95	946	478,99	2,51	n.d	291
	10	21,90	16,34	4,66	23,83	1098	97,38	1,55	1,19	361
	10	24,31	4,26	n.d	15,32	286	76,18	2,54	n.d	397

11	15,39	3,18	5,91	11,50	237	23,71	1,62	2,08	197
11	16,45	0,79	5,23	15,02	173	14,10	2,13	1,52	205
11	21,82	0,60	2,52	11,51	171	17,14	1,47	1,05	169
11	17,77	1,46	3,55	7,88	182	15,59	1,69	1,80	302
11	19,44	3,34	4,17	18,72	209	19,08	1,59	n.d	373
11	10,56	2,65	4,83	14,97	349	28,80	2,18	2,37	279
11	17,33	2,25	5,60	11,25	480	17,60	1,96	1,56	223
11	16,87	1,56	n.d	23,33	141	20,26	2,11	n.d	200
12	12,15	8,72	7,16	29,79	301	30,77	3,21	3,21	283
12	18,86	6,84	n.d	21,42	218	16,70	2,28	n.d	195
12	17,69	6,73	3,90	18,15	201	19,17	1,64	1,75	208
12	15,34	8,87	4,69	20,67	167	15,65	1,89	1,83	239
12	16,68	4,44	3,78	17,51	171	17,81	2,16	1,98	203
12	16,09	8,08	1,74	31,88	262	18,46	2,17	1,49	222
12	25,31	5,21	2,65	12,76	159	11,06	1,11	0,83	144
12	13,49	5,93	3,11	18,75	161	20,53	1,78	2,37	151
12	16,43	9,31	3,17	26,84	298	21,73	1,64	n.d	274
12	20,87	7,04	1,92	16,39	282	18,93	1,39	n.d	179
12	12,15	7,67	n.d	24,13	175	23,49	2,66	n.d	270

Continuación tabla 2 anexo

State	N° muestra		As	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
	Pez	P.S. (µg)								
Pishuinco	12	23,55	5,18	2,80	12,91	167	20,38	1,66	0,89	221
	12	15,76	7,74	5,39	18,85	193	17,96	1,71	n.d	228
	12	12,57	8,03	6,04	22,19	321	90,36	2,31	2,70	258
	12	18,19	5,83	8,14	18,86	195	25,57	1,59	3,08	212
	12	20,12	5,82	4,18	16,60	143	15,76	1,39	1,44	156
	13	30,17	12,13	4,11	35,16	579	22,40	2,95	1,76	449
	13	18,52	7,88	3,78	36,12	501	26,29	6,75	2,43	239
	13	17,77	11,31	3,60	33,49	529	18,29	1,63	1,74	257
	13	26,74	15,37	3,33	36,84	798	18,18	4,11	1,23	582
	13	21,96	17,12	4,69	30,37	793	22,13	1,46	1,78	271
	13	24,13	11,15	n.d	23,26	438	17,96	2,14	n.d	312
	14	31,65	8,86	n.d	26,70	451	12,86	1,94	n.d	435
	14	31,10	10,23	2,48	28,69	390	14,83	1,83	1,03	1013
	14	25,56	21,51	2,93	28,01	560	19,87	1,10	0,98	471
	14	29,50	11,56	3,39	44,37	943	19,12	1,15	n.d	514
	14	28,67	9,31	3,00	39,39	517	18,49	0,98	0,87	470
	14	21,46	13,38	3,50	25,63	644	19,85	1,17	0,98	678
	14	21,54	10,91	2,00	39,46	1086	21,82	2,14	n.d	471

	14	22,46	16,69	n.d	41,85	789	22,53	1,65	n.d	354
	14	24,98	7,69	n.d	30,15	189	24,26	1,84	n.d	409
	14	22,88	19,71	1,79	43,22	977	22,24	2,40	n.d	570
	14	30,01	11,80	n.d	22,46	573	20,86	1,93	n.d	718
	14	20,87	8,29	n.d	35,70	368	20,80	1,44	n.d	273
	14	20,03	13,08	n.d	24,86	624	27,66	2,15	n.d	712
	15	19,59	34,84	n.d	43,00	1636	20,77	1,97	n.d	222
	16	12,15	36,27	n.d	46,70	950	19,79	2,54	n.d	529
Panguipulli	23	36,46	12,98	n.d	18,43	1365	24,78	1,98	n.d	479
	23	21,17	n.d	1,748	9,49	319	21,96	1,65	1,94	624
	23	25,07	0,88	1,316	13,48	135	20,34	1,04	0,96	409
	23	12,54	n.d	1,994	12,76	90	24,97	1,91	n.d	227
	23	14,20	1,34	4,226	18,31	183	25,64	2,47	2,32	385
	23	20,92	1,15	4,971	15,15	202	20,27	1,15	1,91	305
	23	17,68	1,19	4,015	18,94	236	18,49	1,75	0,90	380
	23	21,42	1,17	3,782	11,91	196	18,67	1,21	0,98	422
	23	8,72	n.d	5,162	10,67	114	18,01	2,29	2,87	330
	23	19,18	4,02	4,797	17,57	217	29,15	1,20	n.d	375
	23	23,08	0,95	n.d	12,00	335	24,96	1,04	n.d	368

Continuación tabla anexo 2.

State	N° muestra									Zn
	Pez	P.S. (µg)	As	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	
Panguipulli	23	18,68	1,93	1,820	10,55	210	25,32	1,23	n.d	324
	23	13,53	n.d	2,143	11,08	91	19,66	1,85	n.d	193
	23	17,27	n.d	n.d	15,06	153	20,38	2,37	n.d	312
	23	21,34	2,20	n.d	14,20	707	17,81	2,25	n.d	519
	24	8,05	3,85	5,215	18,01	175	18,25	3,10	2,86	184
	24	8,47	1,89	3,661	21,61	601	24,09	2,83	2,60	295
	24	9,30	2,04	3,334	6,67	139	17,85	2,04	2,04	172
	24	10,63	2,92	4,423	16,09	766	14,49	3,01	2,54	196
	24	11,21	2,41	8,565	13,47	411	22,84	2,05	3,39	172
	24	10,21	2,84	4,896	22,52	629	16,65	3,04	2,74	253
	25	7,72	2,20	10,620	56,86	966	27,85	3,11	3,50	620
	25	16,36	1,53	5,503	31,37	419	21,64	2,02	2,75	290
	25	7,55	2,51	8,736	25,94	343	28,99	2,91	4,24	343
	25	12,95	1,93	6,409	24,32	474	23,40	2,16	3,71	259
	25	12,37	2,26	6,063	25,95	550	19,16	1,94	2,26	292
	25	14,94	1,81	4,483	16,60	225	14,39	2,07	2,01	201
	25	8,47	1,42	5,550	12,64	163	16,89	1,89	n.d	205
	25	17,68	1,53	7,182	26,64	421	21,55	1,47	2,49	317
	25	9,80	1,22	6,941	23,48	366	18,17	2,25	3,16	418
	25	10,79	2,22	5,559	38,27	575	26,13	2,69	2,96	632

25	17,45	1,55	3,724	28,25	553	15,30	1,83	1,60	314
25	13,35	1,57	6,293	22,93	364	18,51	1,80	1,65	312
25	17,28	2,31	3,124	27,08	786	18,63	1,45	1,22	265
25	11,72	1,45	5,289	18,00	388	19,28	1,54	1,71	343
25	8,73	n.d	7,104	9,97	206	16,84	3,32	3,67	173
25	10,29	1,85	3,983	17,78	880	23,31	2,23	2,04	283
25	17,97	2,50	n.d	20,15	551	16,53	1,78	1,39	215
25	16,36	1,81	2,553	30,24	354	14,69	2,04	1,36	282
25	17,63	1,08	2,421	20,68	320	18,12	1,73	n.d	178
25	14,46	1,73	3,798	19,87	594	26,59	1,90	1,83	214
25	13,69	1,31	4,084	15,99	235	17,93	2,22	1,52	371
25	14,45	1,52	2,298	21,51	521	18,03	2,58	1,25	366
25	14,36	1,88	2,871	42,03	1127	18,32	2,26	2,67	381
26	14,63	2,39	1,455	16,51	585	22,65	2,50	3,77	408
26	21,99	1,55	2,703	21,79	73	18,84	3,10	2,62	320
26	21,99	1,23	1,637	10,55	220	17,19	2,23	n.d	259
26	21,82	0,78	1,467	10,86	169	14,53	1,51	1,19	233
26	13,69	n.d	n.d	11,47	66	22,50	2,85	n.d	318
26	11,81	n.d	n.d	13,21	270	27,95	2,54	2,54	470