

## Efectos de las actividades antrópicas sobre parámetros metabólicos en un bivalvo invasor y otro nativo en el tramo inferior del río Paraná

TATIANA NOYA ABAD<sup>1,2,✉</sup>; JULIETA PELUSO<sup>3</sup>; YANINA S. MINABERRY<sup>4</sup>; DANTE E. ROJAS<sup>5</sup>; DIEGO CRISTOS<sup>6</sup>; HENRIQUE KNACK DE ALMEIDA<sup>1</sup>; MARÍA S. YUSSEPPONE<sup>6</sup>; CAROLINA M. ARONZON<sup>7</sup>; JAVIER Á. CALCAGNO<sup>2,8</sup> & SEBASTIÁN E. SABATINI<sup>1,7,8</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Enzimología, Estrés Oxidativo y Metabolismo (LEEM), Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <sup>2</sup>Centro de Ciencias Naturales, Ambientales y Antropológicas (CCNAA), Universidad Maimónides. <sup>3</sup>Instituto de Investigación Ingeniería Ambiental, IIIA, Universidad de San Martín (UNSAM), CONICET, 3iA, Campus Miguelete. <sup>4</sup>Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física (INQUIMAE), CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. <sup>5</sup>Instituto Tecnología de los Alimentos, Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). <sup>6</sup>Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), CONICET, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP). <sup>7</sup>Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

**RESUMEN.** La relación entre la contaminación antrópica, la geoquímica y la dinámica natural de los ecosistemas de agua dulce determinan patrones espaciales y temporales de calidad del agua. Las actividades humanas y la introducción de especies exóticas son causas principales de la disminución de la biodiversidad. La introducción y la dispersión del bivalvo invasor *Corbicula fluminea* pone en riesgo la presencia del bivalvo nativo *Diplodon delodontus*. Con indicadores de estrés oxidativo se puede cuantificar las respuestas de los organismos a cambios en las variables fisicoquímicas, naturales o de origen antrópico. Nuestro objetivo fue interpretar el efecto de cambios en las variables fisicoquímicas, contaminantes o xenobióticos sobre las respuestas metabólicas de *C. fluminea* y *D. delodontus* en el río Paraná de las Palmas. En septiembre 2018 se estableció al azar un punto de muestreo y recolección de individuos (60 del bivalvo invasor y 10 del nativo) para armar 10 jaulas por especie en el sitio de colocación. En junio y septiembre 2019 se extrajeron al azar cinco jaulas por especie. En el agua se determinaron parámetros fisicoquímicos y metales, y en los órganos de ambas especies, la concentración de proteínas, glucógeno, daño a lípidos, contenido de glutatión reducido, actividad enzimática de catalasa y glutatión-S-transferasa. En general, los parámetros fisicoquímicos y metales aumentaron significativamente de junio a septiembre. Los metales superaron los niveles guía de calidad de agua dulce para proteger la vida acuática. Con relación a los cambios en dichas variables, los parámetros metabólicos difirieron entre órganos y especies desde junio a septiembre. Las branquias y las glándulas digestivas de *C. fluminea* mostraron mayores respuestas metabólicas y en menos tiempo que *D. delodontus*. Estudiar una especie invasora y una nativa con mediciones de múltiples variables resulta útil para caracterizar el ambiente, en caso de monitoreos de calidad del agua y estudios de conservación.

[Palabras claves: Primera Sección de Islas del Delta Bonaerense, *Corbicula fluminea*, *Diplodon delodontus*, estrés oxidativo, parámetros fisicoquímicos, metales, pesticidas]

**ABSTRACT.** Effects of human activities on metabolic parameters in an invasive and a native bivalve in the lower section of Paraná river. The relationship between anthropogenic pollution, geochemistry and natural dynamics of freshwater ecosystems determine the spatial and temporal patterns of water quality. Human activities and the introduction of exotic species are the main causes of the decrease in biological diversity. The introduction and spread of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* endangers the presence of the native bivalve *Diplodon delodontus*. Through oxidative stress indicators, it is possible to quantify the response of organisms to changes in physical-chemical, natural and/or anthropogenic variables. Therefore, the objective was to interpret the effect of changes in physical-chemical variables, contaminants and/or xenobiotics on the metabolic responses of *C. fluminea* and *D. delodontus* on the Paraná de las Palmas river. Randomly, we established a sampling point to collect individuals (60 of invasive and 10 of native bivalve) for the assembly of 10 cages by species and placement site in September 2018. In June and September 2019, five cages of each species were extracted at random. In water, physical-chemical parameters and metals were measured, and in the organs of both species, protein concentration, glycogen, lipid damage, reduced glutathione content, enzymatic activity of catalase and glutathione-S-transferase. In general, the physical-chemical and metal parameters increased significantly from June to September. Metals exceeded freshwater quality guideline levels for the protection of aquatic life. In relation to the changes in these variables, the metabolic parameters differed between organs and species from June to September. The gills and digestive gland of *C. fluminea* showed higher metabolic responses and faster than *D. delodontus*. The study of invasive and native species through the measurement of multiple variables is a useful tool to characterize the environment, with application prospects in water quality monitoring and conservation studies.

[Keywords: First Section at Islands of the Delta Bonaerense, *Corbicula fluminea*, *Diplodon delodontus*, oxidative stress, physical-chemical parameters, metals, pesticides]

## INTRODUCCIÓN

La contaminación acuática es consecuencia directa o indirecta de las actividades antrópicas. El aumento significativo de la población mundial ha sido acompañado de una urbanización intensiva, mayor actividad industrial, deforestación y aumento de zonas agrícolas y ganaderas, lo cual provocó que aumente la concentración de contaminantes en el medio acuático (Sabatini et al. 2016). El incremento de las concentraciones de desechos derivados de las actividades antrópicas tiene consecuencias ambientales potencialmente negativas para los individuos, las poblaciones, las comunidades y los ecosistemas (Walker et al. 2006; Sabatini et al. 2011). A su vez, la relación entre los aportes antrópicos y la geoquímica natural de los ecosistemas de agua dulce determinan los patrones espaciales y temporales de la calidad del agua, que también se verán afectados por las variaciones climáticas e hidrológicas regionales (Lombardo et al. 2010).

Por su extensión, tamaño de cuenca y caudal, el río Paraná de las Palmas es considerado el segundo en importancia de Sudamérica, el cuarto en el mundo y uno de los principales que conforman la Cuenca del Plata (Kandus et al. 2010). En su trayecto recibe de manera directa y a través de sus afluentes y tributarios la descarga de áreas agrícolas, ganaderas, forestales, como también el impacto generado por el tránsito continuo de buques mercantes (Kandus et al. 2010). Los últimos 300 km del río Paraná de las Palmas transcurren en el Delta, desde el sur de la ciudad de Diamante (Entre Ríos) hasta las cercanías de la ciudad de Buenos Aires, y constituyen el límite de la Primera Sección de Islas del Delta Bonaerense. En esta sección, el monitoreo de la calidad del agua resulta insuficiente; los programas analíticos que se utilizan son relativamente discretos, realizándose mediciones de las principales variables químicas y bacteriológicas incluidas en los índices de calidad del agua establecidos, aunque raramente se las monitorea en el tiempo (O'Farrell et al. 2002; Lombardo et al. 2010).

Entre la variedad de elementos químicos potencialmente contaminantes, los metales pueden alcanzar altas concentraciones en el agua, los sedimentos y los organismos acuáticos, y se transfieren y biomagnifican a través de la cadena alimenticia (Frías-Espéricueta et al. 2010; Amé and Carriquiriborde 2021). Si bien se encuentran en el ambiente a partir de

procesos naturales como la meteorización, el lixiviado de las rocas y suelos de la cuenca, la exposición de minerales, los incendios forestales o de pastizales extendidos y las emisiones volcánicas (Frías-Espéricueta et al. 2010), las actividades humanas incrementan las concentraciones o alteran sus ciclos naturales en los ecosistemas acuáticos (Tulonen et al. 2006) mediante descargas directas, precipitación húmeda o seca y erosión (Rizzo et al. 2010). Una vez que son incorporados y acumulados en los sedimentos, los metales pueden ser movilizados y liberados nuevamente a la columna de agua por medio de cambios fisicoquímicos (Harikumar et al. 2009; Rizzo et al. 2010). Es importante mencionar que los cambios en las propiedades fisicoquímicas del entorno pueden afectar tanto la disponibilidad de iones metálicos como su captación y excreción (Marigómez et al. 2002).

Debido a su alimentación activa con materia orgánica particulada mediante la filtración de grandes volúmenes de agua, los bivalvos tienen un papel muy importante en los ecosistemas acuáticos, en particular en los hábitats donde son muy abundantes; controlan la producción primaria, la transparencia del agua, el ciclo de nutrientes, las cadenas tróficas y las tasas de sedimentación de partículas (Ruesink et al. 2005). La absorción del alimento depende de la calidad de las partículas y de la capacidad enzimática para metabolizarlas. Ambos procesos —ingestión y absorción— determinan el costo energético y tienen efectos sobre la composición bioquímica de los bivalvos (Faría et al. 2010), principalmente sobre los lípidos de membrana y los de reserva, que influyen en su crecimiento, reproducción, sistemas de defensa, detoxificación y fisiología (Parrish et al. 2009). En la actualidad, la introducción de especies exóticas y las actividades humanas constituyen las causas principales de la disminución de la diversidad biológica. Por su parte, las especies exóticas tendrán un mayor éxito de adaptación si el nuevo ambiente se encuentra impactado, en comparación con un ambiente prístino. Este proceso adaptativo se explica porque las especies nativas utilizan sus recursos energéticos para enfrentar los cambios de las variables fisicoquímicas, en lugar de usarlos en la competencia con las especies invasoras por el nicho ecológico (Darrigan and Arcaria 2009). La introducción y posterior dispersión del bivalvo invasor *Corbicula fluminea* (Müller 1774) en el río Paraná de las Palmas pone en riesgo la

heterogeneidad del ecosistema acuático dado que al enterrarse en los sedimentos y producir bioturbación puede desplazar o reducir el hábitat o limitar la disponibilidad de alimento para los bivalvos nativos (Araujo et al. 1993). Por su parte, *C. fluminea* es una de las especies que más toleran las concentraciones elevadas de nutrientes y los contaminantes asociados con la urbanización; esto repercute en la riqueza de especies (Cataldo 2001).

Las especies nativas de bivalvos —en particular, de la familia Hyriidae, a la que pertenece el género *Diplodon*— son sensibles a la contaminación del medio y a la competencia con especies invasoras como *Corbicula fluminea* (Darrigran and Damborenea 2005; Clavijo 2009). Los representantes del género *Diplodon* son organismos exclusivamente dulceacuícolas, longevos (Rocchetta et al. 2014a) y de crecimiento lento (Valdovinos and Pedreros 2007), que presentan tasas de reproducción y metabólicas relativamente bajas comparadas con las de otros bivalvos (Aldridge 1999). Éstos constituyen un componente importante de la infauna de los cuerpos lóticos y lénticos, habitan en fondos limosos, limo-arenosos y excepcionalmente en tosca. No presentan dimorfismo sexual, son especies gonocóricas con un estadio larvario ectoparásito de peces (Aldridge 1999; Modesto et al. 2018). Torres et al. (2013) determinaron la presencia de *Diplodon delodontus* (Lamarck 1819) (Unionoidea, Hyriidae) en la provincia de Buenos Aires desde 1905, en los ríos Paraná y de la Plata de la Cuenca del Plata, diferenciando dos poblaciones: una, ubicada en el Paraná Medio; otra, distribuida en el Paraná Inferior y el Río de la Plata (Cao 2020). La distribución de *C. fluminea* coincide en varias zonas con la de *D. delodontus*, y puede provocar su desplazamiento (Cherry et al. 2005).

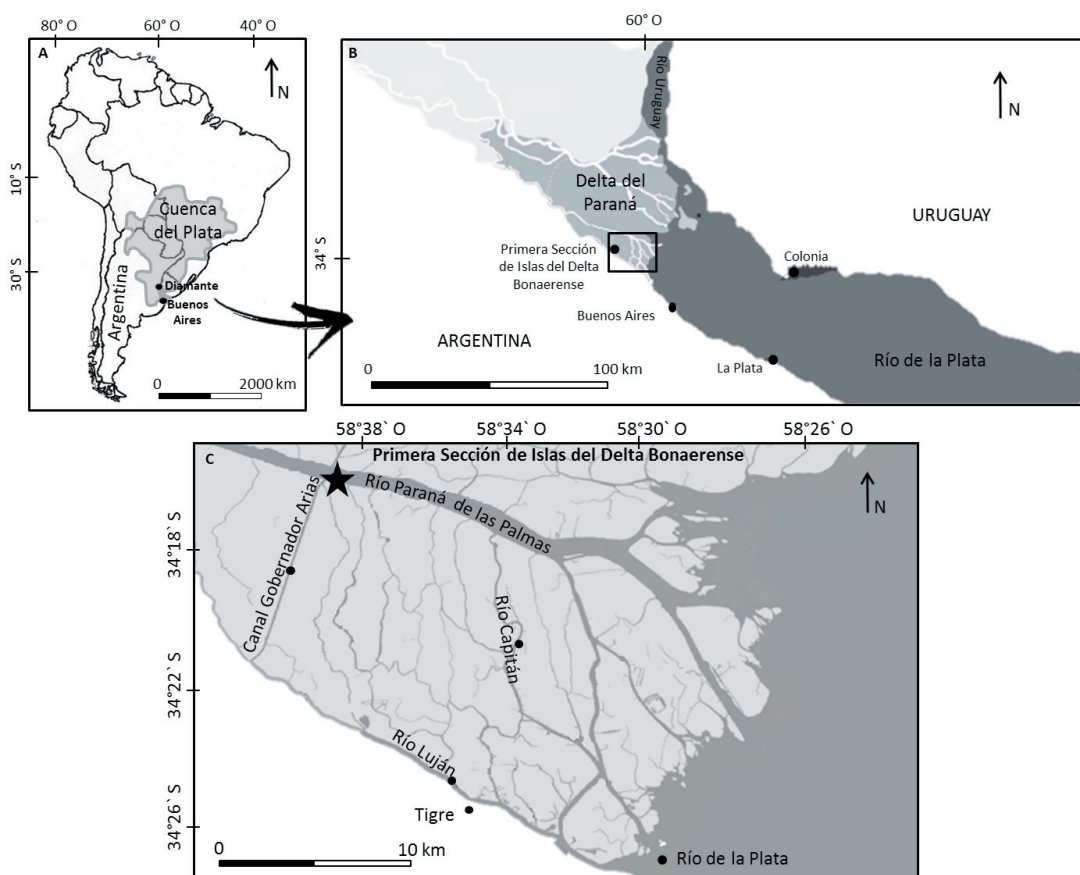
Los cambios en las variables fisicoquímicas del medio acuático, sean naturales o de origen antrópico, afectan el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la supervivencia de los organismos (Parrish et al. 1986). A través de indicadores de estrés oxidativo es posible cuantificar la respuesta de los organismos a dichos cambios (Oropesa et al. 2017). Este tipo de evaluaciones constituye un método validado y sirve como alerta temprana de los efectos adversos y los daños que resultan de la exposición a sustancias químicas o de la alteración de parámetros fisicoquímicos ambientales (Van der Oost

et al. 2003; Oropesa et al. 2017). En nuestro país son escasos los trabajos científicos que comparan especies nativas e invasoras, por lo cual, nuestro objetivo fue analizar y comparar los cambios en las distintas variables fisicoquímicas, presencia de contaminantes o xenobióticos en el medio acuático, sobre las respuestas metabólicas de *Corbicula fluminea* y *Diplodon delodontus*, a fin de ser utilizadas para explicar la dispersión y la colonización de esta especie invasora en detrimento de la nativa en el río Paraná de las Palmas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio y diseño experimental

Durante el año 2017 y parte del 2018 se realizaron muestreos pilotos en los cuales se evidenció la presencia, en forma de parches, de *Corbicula fluminea* y *Diplodon delodontus* en el área de estudio, estableciendo el punto de muestreo en el último tramo del río Paraná de las Palmas, en el inicio de la Primera Sección de Islas del Delta Bonaerense (34°16'3.6" S - 58°39'9.8" O) (Figura 1). Dado que en este sitio ambas especies se encontraron en bajas densidades en comparación con otros sitios cercanos al punto de estudio y que para realizar las mediciones utilizamos individuos adultos (a partir de 1 cm de longitud valvar en el caso de *C. fluminea* y de 7 cm para *D. delodontus*), en septiembre 2018 se extrajeron 60 individuos de *Corbicula fluminea* y 10 de *Diplodon delodontus*. Se confeccionaron 10 jaulas conteniendo 6 individuos de *Corbicula fluminea* por jaula y 10 conteniendo un individuo de *Diplodon delodontus* por jaula. Debido a la pequeña talla registrada en *Corbicula fluminea*, se agruparon individuos de esta especie en una misma jaula para asegurarnos la masa necesaria para poder llevar a cabo todas las mediciones planteadas en los diferentes órganos; esto no fue necesario para *Diplodon delodontus*. Una vez confeccionadas *in situ*, las jaulas se amarraron con tanza y sogas a un muelle, asegurando que los animales estén sobre el sedimento del fondo del río y tengan las condiciones propicias para las especies. En junio 2019 se extrajeron 5 jaulas de cada especie, y 5 en septiembre 2019. Los individuos de *C. fluminea* de una misma jaula se tuvieron en cuenta como pseudorepeticiones, teniendo tres pseudorepeticiones por unidad experimental, ya que se realizaron tres homogenatos por jaula (cada uno con dos individuos). Por el contrario, *D. delodontus* no presentó pseudorepeticiones. Cada jaula



**Figura 1.** Ubicación del sitio de estudio (marcado con una estrella) en el río Paraná de las Palmas. A) Cuenca del Plata en gris, e inicio (Diamante) y final (Buenos Aires) del Delta del Paraná. B) Primera Sección de Islas del Delta Bonaerense. C) Río Paraná de las Palmas (Quesada 2019 modificado).

**Figure 1.** Location of the study site (marked with a star) in the Paraná de las Palmas river. A) Cuenca del Plata in grey, and beginning (Diamante) and end (Buenos Aires) of the Delta del Paraná. B) First Section at Islands of Delta Bonaerense. C) Paraná de las Palmas river (Quesada 2019 modified).

fue tomada en cuenta como una unidad experimental, obteniendo así un  $n=5$  en cada muestreo para ambas especies.

#### *Parámetros físicos y químicos del agua*

Se midió *in situ* temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad con un electrodo multiparamétrico (Lutron DO-5510). Para el análisis en laboratorio se colectaron muestras de agua sub-superficial según Alberro et al. (2011), utilizando recipientes plásticos previamente lavados con  $\text{HNO}_3$  al 5%, manteniéndolos en frío hasta llegar al laboratorio, donde se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis (Peluso 2020).

Los sólidos suspendidos totales (SST) y la materia orgánica (MO) se determinaron filtrando las muestras de agua con filtros Millipore APFF (diámetro de poro 0.7  $\mu\text{m}$ ), que fueron pesados antes de filtrar y luego

del secado con estufa a 103-105 °C hasta peso constante (mínimo una hora) (APHA 2005). Los SST, el material particulado inorgánico (MPI) y el orgánico (MPO) se determinaron mediante el método de gravimetría. Se filtró un volumen variable de agua (hasta colmatar) a través de filtros de fibra de vidrio Millipore APFF (diámetro de poro 0.7  $\mu\text{m}$ ) previamente pesados. Una vez filtradas las muestras, los filtros se secaron en estufa a 75 °C durante 24 horas y se pesaron nuevamente en la misma balanza de precisión antes usada. Por diferencia en el peso de los filtros antes ( $\text{PF}_1$ ) y después del filtrado ( $\text{PF}_2$ ), y conociendo el volumen filtrado ( $V$ ), se calculó la concentración de SST (en mg/L):

$$\text{SST} = (\text{PF}_2 - \text{PF}_1) / V \quad \text{Ecuación 1}$$

Posteriormente, los filtros se combustionaron a 500 °C en una mufla durante 6 horas a fin de eliminar la materia orgánica, y se pesaron

nuevamente ( $PF_3$ ). Por diferencia se obtuvo la concentración de MPI y MPO en mg/L (APHA 2005):

$$MPI = (PF_3 - PF_1) / V \quad \text{Ecuación 2}$$

$$MPO = SST - MPI \quad \text{Ecuación 3}$$

Para medir los solutos se utilizó un espectrofotómetro HACH DR-1900 (HACH Company, EEUU) siguiendo los métodos del manual de procedimientos de espectrofotómetro HACH DR-1900 para cada determinación en particular. En el caso de los solutos disueltos, se filtraron las muestras con filtros Millipore APFF (diámetro de poro 0.7  $\mu\text{m}$ ), midiendo el amonio ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) inmediatamente después de la filtración (método N° 8155). Para determinar nitratos ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) disueltos, las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis, según los métodos N° 8192 y 8048, respectivamente. Los cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) se midieron a partir de muestras de agua sin filtrar previamente, utilizando los métodos N° 8113 y 8507, respectivamente. Para determinar el carbono orgánico disuelto (COD) se utilizaron muestras de agua previamente acidificadas con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , que se filtraron con un filtro de fibra de vidrio calcinado (tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , Whatman GF/F), siguiendo las recomendaciones de Sharp et al. (1993) y según el método de oxidación del catalizador Pt a alta temperatura (analizador Shimadzu TOC-5000A, técnica SM 5310B) (Peluso 2020). La demanda biológica de oxígeno ( $\text{DBO}_5$ ) fue analizada siguiendo los métodos propuestos por los métodos estándar para el análisis de agua y aguas residuales, APHA (Clesceri et al. 1986).

#### *Concentración de metales y pesticidas en agua*

La determinación de la presencia y la concentración de metales se realizó con la técnica de espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS) (Shimadzu 6700, Kyoto, Japón) en el caso del hierro (Fe), del zinc (Zn), y por medio de espectrofotometría con absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) (Shimadzu 6800, Kyoto, Japón) en el caso del cadmio (Cd), del cobre (Cu), del cromo (Cr), del níquel (Ni) y del plomo (Pb). Los parámetros instrumentales y los programas de horno de grafito fueron proporcionados por el fabricante (Conti et al. 2011). Estas técnicas cuantifican la totalidad de la concentración de metal sin discriminar las formas químicas (i.e., iones, complejos inorgánicos, compuestos

orgánicos) ni las distintas especies de un mismo elemento (número de oxidación). La trazabilidad de los resultados se obtuvo del análisis del material de referencia certificado Krill antártico MURSTISS-A2 (programa de investigación italiano en la Antártida). Los porcentajes de recuperación promedio (cinco repeticiones) fueron de  $101.3 \pm 2.3\%$  para hierro,  $102.1 \pm 2.9\%$  para zinc,  $93.4 \pm 2.7\%$  para cadmio,  $98.1 \pm 1.0\%$  para cromo,  $101.1 \pm 1.3\%$  para cobre,  $98.5 \pm 2.5\%$  para níquel y  $96.5 \pm 0.6\%$  para plomo. Los límites de detección utilizados se definieron como  $\text{LOD} = 3 \text{ Sb}/m$ , donde Sb es la desviación estándar de diez repeticiones del blanco y m es la pendiente de la curva de calibración ( $3\text{Sb}$ ,  $n=10$ ), teniendo en cuenta el nivel de concentración más bajo que se puede determinar, estadísticamente diferente al blanco, con un 99% de confianza. Los límites de detección (LODs) ( $3 \text{ Sb}$ ,  $n=10$ ) fueron 0.030 mg/L para hierro, 0.010 mg/L para zinc, 0.0001 mg/L para cadmio, 0.0002 mg/L para cromo, 0.020 mg/L para cobre, 0.006 mg/L para níquel y 0.002 mg/L para plomo. Todos los productos químicos utilizados a lo largo de estos experimentos fueron de grado ultra puro. Previo a ello se realizó la digestión ácida de las muestras modificando el protocolo de Di Salvatore et al. (2013). La concentración de cada metal se expresa como mg de metal/L de agua.

Se realizó un *screening* de los posibles pesticidas presentes en las muestras de agua. Se buscó protioconazol, metalaxil, 2,4-D, 2,4-DB, abamectina, acetoclor, alacloro, aldicarb, aldrin, atrazina, azoxistrobina, bifentrina, captan, carbaril, carbendazim, carbofurano, carboxina, chlorpirifos-metilo, ciflutrina, ciproconazol, deltametrina, diazinón, dicamba, dieldrín, difenoconazol, dimetoato, endosulfán, sulfato de endosulfán, endrina, endrina aldehído, epoxiconazol, fenvalerato, fludioxonil, fomesafen, gamma-cihalotrina, HCB, heptacloro, epóxido de heptacloro, imazalil, imazapir, imazethapir, imidacloprid, lindano, malaoxón, malatión, methoxiclolo, metilsulfurón-m, monocrotofos, op-DDE, op-DDT, oxicarboxina, paratión, picoxistrobina, pp-DDD, pp-DDT, prosulfocarb, s-metolacloro, tebuconazol, tiofanato-metilo, triasulfurón, trifloxistrobina, triflumurón, glifosato y su metabolito AMPA, clorpirifos, cletodim, cipermetrina, diclorvos, cetona endrina, fenitrotión, flurocloridona, yodosulfurón-metil, kresoxim-metil, lambdacialotrina, metamidofos, metil paratión, permetrina, pirimifos-metil, piraclostrobina,  $\alpha$ -BHC,  $\alpha$ -

clordano,  $\alpha$ -endosulfán,  $\beta$ -BHC,  $\beta$ -endosulfán,  $\gamma$ -clordano,  $\delta$ -BHC y prosulfurón. El análisis se realizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Perkin Elmer Clarus 600) y cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC-MS) (Waters Acquity UPLC-SQD) para glifosato y AMPA. En la GC-MS se utiliza una columna capilar DB-5MS (Agilent Technologies), mientras que en la UPLC-MS, una columna XBridge BEH C18. Los límites de corte fueron de 1  $\mu$ g/L en la detección y 4  $\mu$ g/L en la cuantificación.

#### *Preparación de homogenatos*

Las determinaciones de los parámetros relacionados con el balance oxidativo se realizaron sobre las fracciones solubles (sobrenadante a 11000 rpm por 20 minutos a 4 °C) de los homogenatos de branquias, glándula digestiva y manto de las dos especies (en una relación peso:volumen de 1:5), utilizando buffer fosfato 0.154 M (pH 7) con inhibidores de proteasas (benzamidina 10 mM y PMSF 0.5 mM). Para *D. delodontus* se utilizaron los órganos de un único individuo por cada determinación, mientras que para *C. fluminea* se homogenizaron juntos los órganos de dos animales.

#### *Concentración de proteínas solubles*

La concentración de proteínas solubles totales en los diferentes órganos se determinó por el método de Bradford (1976). Para ello, se utilizó una concentración de 0.1 mg/mL de albúmina sérica bovina como estándar. Los resultados se expresan como miligramos de proteína/g de tejido húmedo.

#### *Defensas enzimáticas*

Las defensas antioxidantes enzimáticas se analizaron mediante la actividad catalasa (CAT) (Aebi 1984) y glutatión-S-transferasa (GST) (Habig et al. 1974). La CAT se midió mediante la técnica de Aebi (1984). Esta enzima promueve la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Dado que el peróxido de hidrógeno en solución presenta un máximo de absorbancia entre 230 y 250 nm, es posible medir su descomposición por acción de esta enzima como la disminución de absorbancia en el intervalo experimental. Para ello se colocó buffer fosfato de potasio a pH 7, peróxido de hidrógeno, alícuota de muestra, y cada 5 segundos se monitoreó la actividad a 240 nm, durante 40 segundos. La disminución de la absorbancia a 240 nm es proporcional a

la cantidad de CAT presente en la muestra. Los resultados se expresan como unidades de CAT/g de tejido húmedo. La actividad GST se midió acorde a la técnica de Habig et al. (1974). Se mezcló buffer fosfato 100 mM a pH 6.5 con GSH y una alícuota de muestra. La reacción se inició agregando 1 cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM diluido en etanol, y se monitorearon los cambios en la absorbancia a 340 nm durante 60 segundos. Los resultados se expresan como unidades de GST/g de tejido húmedo, donde una unidad GST se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1  $\mu$ mol de GS-DNB por minuto a 25 °C.

#### *Defensa no enzimática*

Se analizó el contenido de glutatión reducido (GSH) (Anderson 1985) como defensa antioxidante no enzimática. El contenido de glutatión reducido se determinó mediante el método de Anderson (1985), en presencia de 5.5-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), el DTNB oxida al GSH generando un compuesto coloreado, el ácido TNB (5 tio-2-nitrobenzoico), que se monitorea por medio de espectrofotometría a 412 nm. Para ello, una alícuota del sobrenadante se acidificó con ácido sulfosalicílico al 10% y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante ácido se mezcló con el ácido 5.5-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) 6 mM diluido en buffer sulfato de sodio 0.143 M (con 6.3 mM EDTA) a pH 7.5. La absorbancia a 412 nm se midió luego de pasados los 30 minutos a temperatura ambiente. El contenido de GSH se determinó usando una curva de calibración generada con una solución estándar de GSH, y los resultados se expresaron como nanomoles de GSH/g de tejido húmedo.

#### *Daño oxidativo a lípidos*

Como indicador del daño oxidativo, y para verificar la participación del estrés oxidativo en la toxicidad ambiental, se midió el daño a lípidos (TBARS) (Vavilin et al. 1998). Los productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (peróxidos lipídicos, entre los que se encuentra el malondialdehído) reaccionan con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido, a alta temperatura, para dar un compuesto coloreado (rosado) que se puede medir con espectrofotometría por su pico de absorción a 532 nm (Janero 1990). Para ello, se realizó la técnica modificada de Beuge y Aust (1978). Una alícuota del sobrenadante obtenido se incubó con un reactivo realizado con TCA

50%, ácido clorhídrico, ácido tiobarbitúrico, agua destilada y butilhidroxitolueno diluido en etanol, a 100 °C durante 45 minutos. Después de enfriar, se centrifugó la mezcla de reacción (8000 rpm 4 °C por 10 minutos) y se determinó la absorbancia a 535 nm. La concentración de TBARS se estimó mediante el coeficiente de extinción del complejo MDA-ácido tiobarbitúrico ( $156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y los resultados se expresan como nanomoles de MDA/g de tejido húmedo.

#### *Sustancia de reserva*

El contenido de glucógeno (mayoritario y principal carbohidrato de reserva) se determinó según lo descrito por Van Handel (1965) mediante la utilización de antrona. Una alícuota del homogenato total de glándula digestiva se incubó con hidróxido de potasio 33% a 100 °C durante 20 minutos. Después de enfriar, la mezcla de reacción se incubó a 40 °C durante 5 minutos con una solución saturada de sulfato de sodio y etanol absoluto. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en agua destilada con antrona al 0.2% diluida en ácido sulfúrico. Se incubó a 100 °C durante 10 minutos y se determinó la absorbancia a 620 nm. La concentración de glucógeno se determina mediante la utilización de una curva de calibración generada con una solución estándar de glucógeno y los resultados se expresan como miligramos de glucógeno/g de tejido húmedo.

#### *Análisis estadísticos*

El análisis de las variables físicas y químicas medidas en el agua, se realizó mediante la prueba de comparación de medias de Student (Student 1908) y pruebas de Tukey *a posteriori*, utilizando el programa InfoStat. Las comparaciones entre especies y tiempos para cada una de las variables analizadas en cada uno de los tres órganos estudiados se llevaron a cabo mediante análisis de varianza de dos factores, seguidos por pruebas de Tukey (Sokal and Rohlf 1999) utilizando el programa GraphPad Prism 6.

## RESULTADOS

#### *Parámetros físicos y químicos del agua*

En la Tabla 1 se muestran los valores registrados a partir de las mediciones de los parámetros fisicoquímicos, metales y

pesticidas obtenidos en el sitio de estudio para dos muestreos distintos (junio y septiembre 2019). En el río Paraná de las Palmas, la temperatura del agua registró un aumento promedio de 4.2 °C de junio a septiembre, mientras que el porcentaje promedio de la concentración de oxígeno permaneció prácticamente constante (aumento menor a 1%). El pH mostró valores de 6 y 6.5 en cada uno de los tiempos analizados. Los valores de conductividad registraron un drástico aumento en septiembre, alcanzando un valor 6 veces mayor que en junio (de 160 a 941  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Los valores correspondientes a la dureza del agua mostraron un comportamiento similar entre junio y septiembre (4 y 26  $\text{mg}/\text{L CaCO}_3$ , respectivamente). Los sólidos suspendidos totales, la materia inorgánica y la orgánica también mostraron el mismo comportamiento, aumentando 5 veces más en el caso de la última (17.60 y 43.33  $\text{mg}/\text{L}$ , 12.40 y 18.75  $\text{mg}/\text{L}$ , 5.2 y 25.58  $\text{mg}/\text{L}$  de junio a septiembre, respectivamente). Por su parte, el valor de la demanda biológica de oxígeno fue 4 veces mayor en septiembre (3.37  $\text{mg}/\text{L}$ ) que en junio (0.85  $\text{mg}/\text{L}$ ). Los valores de nitritos, sulfatos, fosfatos disueltos y nitratos totales también alcanzaron sus máximos en septiembre comparados con los de junio (0.003 y 0.001  $\text{mg}/\text{L}$ , 31 y 25  $\text{mg}/\text{L}$ , 0.62 y 0.40  $\text{mg}/\text{L}$ , 1.90 y 0.10  $\text{mg}/\text{L}$ , respectivamente). Por el contrario, los valores correspondientes a carbono orgánico disuelto, amonio, cloruros, nitratos disueltos y fosfatos totales mostraron los valores más altos en junio con relación a septiembre (7.10 y 4.12  $\text{mg}/\text{L}$ , 0.19 y 0.05  $\text{mg}/\text{L}$ , 28 y 12.80  $\text{mg}/\text{L}$ , 0.70 y 0.62  $\text{mg}/\text{L}$ , 1.50 y 0.49  $\text{mg}/\text{L}$ , respectivamente). Las diferencias en el aumento de la temperatura, conductividad, dureza, sólidos suspendidos totales, materia inorgánica y orgánica, demanda biológica de oxígeno, nitritos y fosfatos disueltos, de junio a septiembre, fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). Por su parte, la disminución del carbono orgánico disuelto, amonio, cloruros y fosfatos totales de junio a septiembre también presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

#### *Concentración de metales y pesticidas en agua*

En cuanto a los metales, tanto en junio como septiembre, las concentraciones de cadmio, cromo, níquel, plomo, zinc y cobre superan ampliamente los niveles guía de calidad de agua dulce superficial para la protección de la vida acuática (Ley 24051, decreto 831/93; Cd: 0.0002  $\text{mg}/\text{L}$ , Cr: 0.002  $\text{mg}/\text{L}$ , Ni: 0.025  $\text{mg}/\text{L}$ , Pb: 0.001  $\text{mg}/\text{L}$ , Zn: 0.03  $\text{mg}/\text{L}$ , Cu: 0.002  $\text{mg}/\text{L}$ ).

**Tabla 1.** Promedios  $\pm$  desvío estándar (n=3) obtenidos de los parámetros fisicoquímicos, metales y pesticidas del agua superficial del río Paraná de las Palmas en junio y septiembre 2019. SST: sólidos suspendidos totales; MPI: material particulado inorgánico; MPO: material particulado orgánico; DBO<sub>5</sub>: demanda biológica de oxígeno a los 5 días; COD: carbono orgánico disuelto; nd: no detectado o por debajo del rango de medición; mlc: entre el límite de detección (1  $\mu$ g/L) y el de cuantificación (4  $\mu$ g/L). El asterisco (\*) indica diferencia significativa (P<0.05).

**Table 1.** Average  $\pm$  standard deviation (n=3) obtained from the physical-chemical parameters, metals and pesticides of the surface water of the Paraná of the Palmas river in June and September 2019. TSS: total suspended solids; IPM: inorganic particulate material; OPM: organic particulate material; BOD<sub>5</sub>: biological oxygen demand at 5 days; DOC: dissolved organic carbon; nd: not detected or below measurement range; mlc: between detection limit (1  $\mu$ g/L) and quantification limit (4  $\mu$ g/L). The asterisk (\*) indicates significant differences (P<0.05).

Parámetros/Muestras	Junio 2019	Septiembre 2019
Temperatura (°C)	16.30 $\pm$ 1.63	20.50 $\pm$ 2.05 *
O <sub>2</sub> (%)	21.70 $\pm$ 2.17	22.40 $\pm$ 2.24
pH	6 $\pm$ 0.6	6.50 $\pm$ 0.65
Conductividad ( $\mu$ s/cm)	160 $\pm$ 16	941 $\pm$ 94.1 *
Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	4 $\pm$ 0.4	26 $\pm$ 2.6 *
SST (mg/L)	17.60 $\pm$ 1.76	43.33 $\pm$ 4.33 *
MPI (mg/L)	12.40 $\pm$ 1.24	18.75 $\pm$ 1.87 *
MPO (mg/L)	5.2 $\pm$ 0.52	25.58 $\pm$ 2.56 *
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	0.85 $\pm$ 0.08	3.37 $\pm$ 0.34 *
COD (mg/L)	7.10 $\pm$ 0.71	4.12 $\pm$ 0.41 *
Amonio (mg/L)	0.19 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01 *
Cloruros (mg/L)	28 $\pm$ 2.8	12.80 $\pm$ 1.28 *
Nitritos (mg/L)	0.001 $\pm$ 0.0001	0.003 $\pm$ 0.0003 *
Sulfatos (mg/L)	25 $\pm$ 2.5	31 $\pm$ 3.1
Nitratos disueltos (mg/L)	0.70 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.06
Fosfatos disueltos (mg/L)	0.40 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.06 *
Nitratos totales (mg/L)	0.10 $\pm$ 0.01	1.90 $\pm$ 0.19 *
Fosfatos totales (mg/L)	1.50 $\pm$ 0.15	0.49 $\pm$ 0.05 *
Cromo (mg/L)	15.15 $\pm$ 0.75	28.95 $\pm$ 1.50 *
Níquel (mg/L)	37.70 $\pm$ 2.70	66 $\pm$ 1.20 *
Cadmio (mg/L)	0.62 $\pm$ 0.01	2.52 $\pm$ 0.03 *
Plomo (mg/L)	37.20 $\pm$ 1.05	40.05 $\pm$ 2.25
Hierro (mg/L)	2.93 $\pm$ 0.06	3.56 $\pm$ 0.08 *
Zinc (mg/L)	1.97 $\pm$ 0.09	2.40 $\pm$ 0.09 *
Cobre (mg/L)	0.01 $\pm$ 0.0003	0.01 $\pm$ 0.0003
Acetoclor ( $\mu$ g/L)	7.85 $\pm$ 0.78	nd
Azoxistrobina ( $\mu$ g/L)	nd	5.07 $\pm$ 0.51
Ciflutrina ( $\mu$ g/L)	nd	mlc

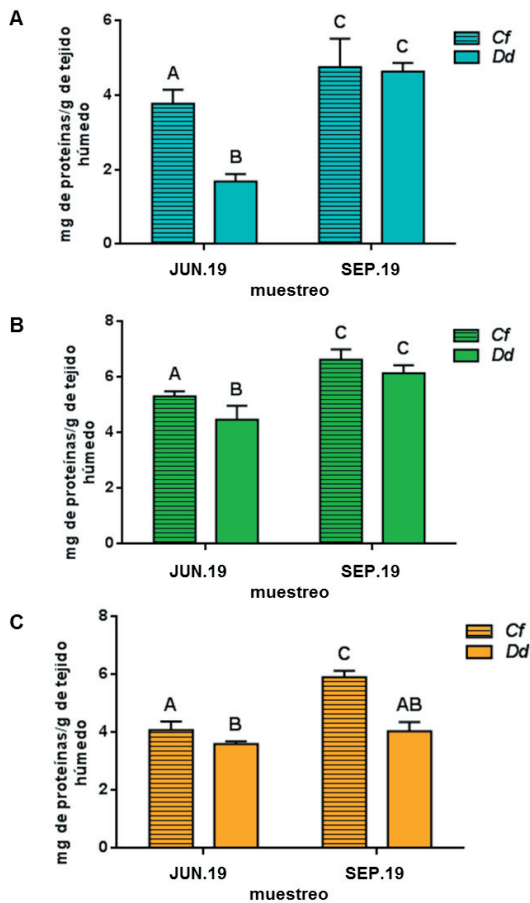
En el caso del agua dulce superficial, para el hierro no hay valores guías de referencia en la legislación argentina (Ley 24051, decreto 831/93). Por otro lado, todos los metales medidos, a excepción del cobre, aumentaron significativamente en septiembre (P<0.05). De igual manera, las concentraciones de los pesticidas acetoclor, azoxistrobina y ciflutrina no se encuentran reguladas en la mencionada Ley. El acetoclor fue detectable sólo en junio, mientras que la azoxistrobina y ciflutrina lo fueron exclusivamente en septiembre (Tabla 1).

#### Concentración de proteínas solubles

Dado que la concentración de proteínas en los tres órganos analizados difirió significativamente (P<0.05) entre los tiempos

analizados (Figura 2), los valores de los parámetros medidos fueron estandarizados por los pesos de los órganos correspondientes. En branquias, la concentración de proteínas aumentó significativamente (P<0.05) en el mes de septiembre en ambas especies, sin observarse diferencias entre ellas (P>0.05). Por su parte, en el mes de junio se registraron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre especies (P<0.05), siendo ésta mayor en *C. fluminea* (Figura 2 A). En glándula digestiva, la concentración de proteínas fue significativamente mayor en septiembre que en junio, tanto para *Cobicala fluminea* como para *Diplodon delodontus* (P<0.05), observándose sólo diferencias significativas entre especies en el primer tiempo analizado (P<0.05) (Figura 2 B). En manto, la concentración de proteínas en ambas especies mostró un aumento desde





**Figura 2.** Concentración de proteínas (mg de proteínas/g de tejido húmedo) en branquias (A), glándula digestiva (B), manto (C), entre especies y fechas de muestreo en el río Paraná de las Palmas. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar ( $n=5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

**Figure 2.** Protein concentration (mg protein/g wet tissue) in gills (A), digestive gland (B), mantle (C), between species and sampling dates in the Paraná de las Palmas river. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ). Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

junio a septiembre siendo esta estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ) para *C. fluminea*, pero no para *D. delodontus* ( $P>0.05$ ) (Figura 2 C).

#### Defensas enzimáticas

En cuanto a las defensas antioxidantes enzimáticas, en branquias, la CAT aumentó significativamente ( $P<0.05$ ) en las dos especies en septiembre, mostrando diferencias entre ellas sólo en junio ( $P<0.05$ ) (Figura 3 A1), siendo *D. delodontus* quién registró las mayores concentraciones. Por su parte, los valores obtenidos en la actividad glutatió-

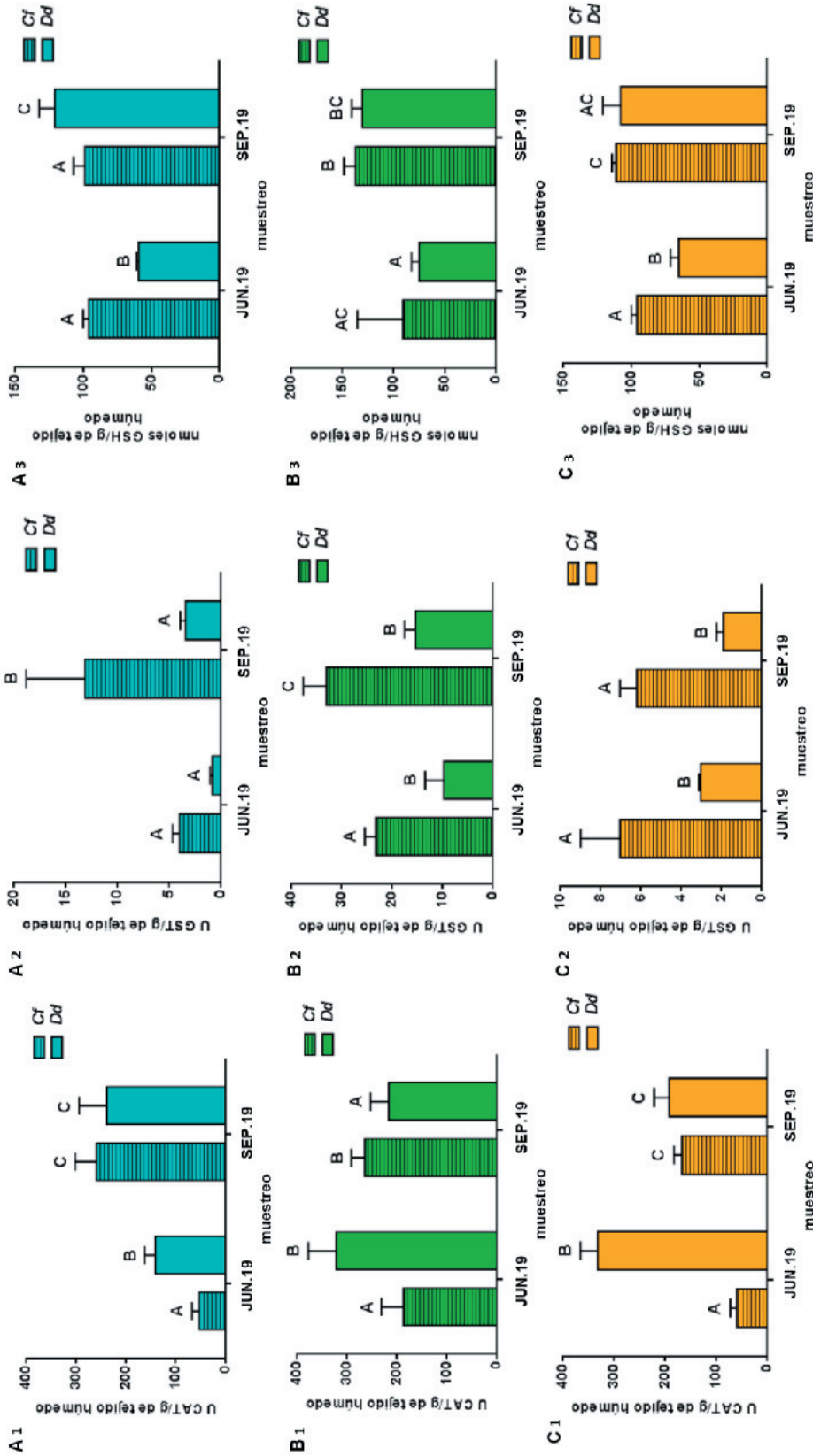
S-transferasa (GST) en junio para ambas especies, y en septiembre para *D. delodontus*, no difirieron significativamente ( $P>0.05$ ). Por otro lado, en septiembre, *C. fluminea* registró valores significativamente mayores ( $P<0.05$ ) (Figura 3 A2). En glándula digestiva, la CAT mostró un patrón diferente entre especies en los dos tiempos analizados, mientras que en la invasora se registró un aumento entre tiempos, los valores en la especie nativa disminuyeron de manera significativa ( $P<0.05$ ) (Figura 3 B1). En contraste, la actividad GST, aumentó significativamente de junio a septiembre para *C. fluminea*, pero no así para *D. delodontus*, registrando los mayores valores en ambos tiempos en la especie invasora ( $P<0.05$ ) (Figura 3 B2). En manto, la actividad de CAT aumentó significativamente en *C. fluminea* de junio a septiembre; por el contrario, en *D. delodontus* se observó una disminución relevante ( $P<0.05$ ), difiriendo significativamente entre especies en el primer tiempo de muestreo ( $P<0.05$ ), pero no el segundo ( $P>0.05$ ) (Figura 3 C1). La actividad GST no mostró diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre fechas de muestreo, pero sí entre especies ( $P<0.05$ ) (Figura 3 C2), registrándose los menores valores en *Diplodon delodontus*.

#### Defensa no enzimática

En branquias de *C. fluminea*, el contenido de GSH no mostró diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre muestreos, pero sí lo hizo para *D. delodontus*, aumentando entre tiempos y difiriendo significativamente de la otra especie, presentando el menor valor en junio y mayor en septiembre (Figura 3 A3). En glándula digestiva, la defensa no enzimática GSH no mostró diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre especies en cada fecha, pero sí se registró un aumento considerable ( $P<0.05$ ) para cada una en particular. En manto aumentó significativamente de junio a septiembre para ambas especies ( $P<0.05$ ), pero los valores de *C. fluminea* no variaron de manera significativa en relación a ninguno de los dos tiempos ( $P>0.05$ ) (Figura 3 C3).

#### Daño oxidativo a lípidos

En branquias, ambas especies analizadas mostraron un aumento estadísticamente significativo ( $P<0.05$ ) entre junio y septiembre en el daño oxidativo a lípidos. El valor obtenido en septiembre para *D. delodontus* no varió significativamente del observado en junio y septiembre para *C. fluminea* (Figura 4A). En glándula digestiva, el daño a lípidos



**Figura 3.** Actividad catalasa (U CAT/g de tejido húmedo), actividad glutatión transferasa (U GST/g de tejido húmedo) y contenido de glutatión reducido (nmols GSH/g de tejido húmedo) en branquias (A), glándula digestiva (B), manto (C), entre especies y fechas de muestreo en el río Paraná de las Palmas. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).

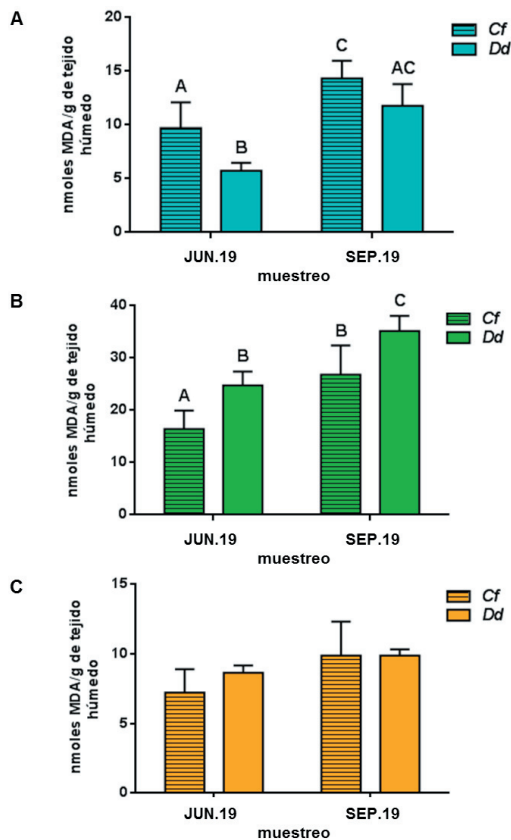
**Figure 3.** Catalase activity (U CAT/g of wet tissue), glutathione transferase activity (U GST/g of wet tissue) and glutathione reduced content (nmol GSH/g wet tissue) in gills (A), digestive gland (B), mantle (C), between species and sampling dates in the Paraná de las Palmas river. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n=5). Different letters indicate significant differences (P<0.05).

aumentó de manera relevante ( $P < 0.05$ ) de junio a septiembre para ambas especies, siendo significativamente mayor en *D. delodontus*, sin presentar diferencia significativa entre el valor de junio de dicha especie y el de septiembre de *C. fluminea* ( $P > 0.05$ ) (Figura 4 B). En manto, no se observaron diferencias entre especies ni fechas de muestreos ( $P > 0.05$ ) (Figura 4 C).

#### Sustancia de reserva

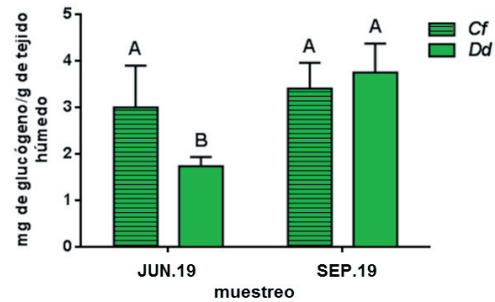
La reserva energética, determinada por medio del contenido de glucógeno, no varió de manera significativa ( $P > 0.05$ ) entre fechas de muestreo para la especie invasora, aunque sí lo hizo para la especie nativa ( $P < 0.05$ ). Al comparar entre ambas especies, el contenido

de glucógeno fue considerablemente menor para *D. delodontus* en junio, pero no presentaron diferencias en septiembre. El contenido de glucógeno de junio para *D. delodontus* fue similar al de junio y septiembre para *C. fluminea* (Figura 5).



**Figura 4.** Daño a lípidos (nmol MDA/g de tejido húmedo) en branquias (A), glándula digestiva (B), manto (C), entre especies y fechas de muestreo en el río Paraná de las Palmas. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4.** Lipid damage (nmol MDA/g wet tissue) in gills (A), digestive gland (B), mantle (C), between species and sampling dates in the Paraná de las Palmas river. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n=5). Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Figura 5.** Contenido de glucógeno (mg de glucógeno/g de tejido húmedo) en glándula digestiva, entre especies y fechas de muestreo en el río Paraná de las Palmas. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar (n=5). Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Figure 5.** Glycogen content (mg glycogen/g wet tissue) in digestive gland (B), between species and sampling dates in the Paraná de las Palmas river. Cf: *Corbicula fluminea*, Dd: *Diplodon delodontus*. Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n=5). Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En 1991, en la Argentina se sancionó la Ley Nacional 24051 (decreto 831/93), que regula los niveles límites de residuos peligrosos en cuerpos de agua, pero dada su falta de actualización y demora en su reglamentación, se dificulta la aplicación de soluciones a las problemáticas ambientales registradas en distintos cuerpos de agua de nuestro país, como es el caso del río Paraná de las Palmas. Hasta la fecha, la gestión de los residuos domiciliarios, agropecuarios e industriales resulta insuficiente (Maiztegui 2009), evidenciado por el aumento de fuentes puntuales o difusas provenientes de procesos tales como la lixiviación, la difusión y la escorrentía que generan las modificaciones en los valores de los parámetros fisicoquímicos naturales del ambiente acuático (Hoffman et al. 2002). Barrenechea (2004) reportó que las mayores concentraciones de amoníaco en el agua se deberían a las actividades agrícolas o ganaderas que se realizan río arriba al sitio de muestreo, en las ciudades de Escobar y Zárate, al ser este sector utilizado de forma intensiva para fabricar abonos, o por generarse como resultado de la degradación de la materia

orgánica nitrogenada y materia fecal. A su vez, el aumento en la concentración de amonio puede ser consecuente de los desechos de productos de limpieza domiciliarios e industriales. Estos desechos, también provocan aumentos en la concentración de cloruros, lo cual se evidenció en junio 2019 debido a que el sitio de estudio se encuentra próximo a (o en) asentamientos, grandes centros urbanos, centros recreativos y zonas industriales río arriba, en las cercanías de las ciudades de Zárate y Campana. El mismo autor propone que el aumento en los niveles de fosfatos suele estar asociado al uso de fertilizantes y vertidos de detergentes (industriales y agropecuarios), lo cual puede provocar floraciones de algas y cianobacterias potencialmente nocivas, fenómeno evidenciado en el año 2020 en los cuerpos de agua del Delta de Tigre. Barrenechea (2004) informó también un aumento de la conductividad eléctrica, probablemente relacionado con crecidas o vuelcos de efluentes de diferentes tipos —más aun si se dan en cortos períodos de manera tan significativa—, tal como ocurre en nuestro muestreo de septiembre 2019. Por su parte, Baigún et al. (2008) y Riglos et al. (2010) reportaron para el Paraná Inferior un aumento de los SST debido al incremento de aportes minerales u orgánicos provenientes de la erosión o afluentes, mientras que una mayor concentración de nitratos indicaría un aumento del uso de fertilizantes producto de la agricultura extensiva. Por otra parte, la presencia de nitritos se debería a la contaminación frecuente con materia fecal, mientras que el aumento en la concentración de sulfatos podría ser consecuencia de la presencia de lixiviados de basurales, residuos industriales o campos con fertilizantes. En nuestro trabajo, estos incrementos se evidenciaron en septiembre 2019, relacionados probablemente con la época de mayor actividad agrícola, ganadera, industrial y comercial, y con las actividades de extracción de arena y dragado del río que se llevan a cabo en la Hidrovía Paraná-Paraguay, de la cual forma parte el río Paraná de las Palmas.

Las concentraciones de cromo, níquel, cadmio, plomo, zinc y cobre registradas en este trabajo duplican a las obtenidas por Cataldo et al. (2001), evidenciando un aumento significativo con el paso de los años debido al aumento de actividades industriales, agrícolas, ganaderas y urbanas. En 2001, las concentraciones de cromo, plomo y zinc ya habían superado los límites guía establecidos

por la Ley 24051 (Cataldo et al. 2001). Las concentraciones de metales registradas en este trabajo para los meses de junio y septiembre de 2019 también superaron los niveles guías establecidos para el agua dulce superficial, alcanzándose los mayores valores en el mes de septiembre. Páez-Osuna (2005) propone que el cromo, el níquel, el zinc y el cobre son elementos que se encuentran naturalmente en ambiente, pero sus concentraciones se ven exacerbadas por los desechos producidos por actividades industriales como las que se desarrollan río arriba, en la ciudad de Campana. Múltiples estudios previos reportaron que las concentraciones de pesticidas detectadas en el agua son consecuencia de las actividades agrícolas que se desarrollan río arriba, en las ciudades de Escobar y Zárate (Reboratti 2010; Sansiñena et al. 2018; Rodríguez Gutiérrez 2019; Peluso 2020), debido a que existen grandes extensiones de cultivo de soja, maíz y girasol lindando con áreas ganaderas en zonas aledañas al río Paraná en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y parte de Corrientes (Reboratti 2010). El registro en el agua de acetoclor en junio, pero no en septiembre, probablemente se deba a que es un herbicida pre-emergente que se aplica antes de realizar el cultivo en plantaciones de maíz, soja y girasol. Por el contrario, es probable que el valor más alto de azoxistrobina, obtenido en septiembre, sea consecuencia de su utilización como fungicida al final del ciclo en el cultivo de soja. A su vez, se registraron concentraciones apenas perceptibles de ciflutrina, un insecticida utilizado en cultivos de girasol y soja, y como antiparasitario en el ganado. La utilización de ciflutrina en actividades agrícolas fue prohibida en varios países a partir del año 2020 por los efectos neurotóxicos observados en diversos animales, incluidos los mamíferos (Rodríguez Gutiérrez 2019).

Si bien la mayoría de los efluentes industriales, así como los desechos domiciliarios, son vertidos en el río con escaso o nulo tratamiento previo, el altísimo caudal del río Paraná de las Palmas (alrededor de 18000 m<sup>3</sup>/s) tendría un efecto depurador muy importante (Colombo et al. 1995; Boltovskoy et al. 1997). Como resultante de esto, los valores de los parámetros fisicoquímicos registrados son menores a los esperados dadas las numerosas instalaciones industriales, eléctricas, petroquímicas, medicinales, metalúrgicas, areneras y papeleras presentes río arriba de la zona de estudio. Por otro lado,

las mareas y las sudestadas ocasionan cambios en el comportamiento de las variables de los ríos según la altura y la dirección del agua, siendo el régimen hidrológico el principal factor de regulación de las variaciones entre los distintos meses, además de la intensidad diferencial de las actividades antrópicas en los distintos periodos del año. El aumento de los niveles del río debido a las crecidas produciría una dilución en las concentraciones de las variables, mientras que en los periodos de bajantes aumentarían los sólidos en suspensión, resuspendiendo en el agua aquellos elementos químicos que se encuentren biodisponibles en el sedimento, tal como fue reportado previamente por Cataldo (2001). Sin embargo, frente a mareas altas con gran carga sedimentaria, el río Paraná de las Palmas aporta al tramo inferior contaminantes provenientes del tramo superior, siendo las concentraciones de los contaminantes mayores a las observadas en situaciones de bajantes. Esto se visualizó en nuestro trabajo, ya que en septiembre se registró marea alta mientras que en junio ocurrió el fenómeno contrario durante el muestreo.

Se ha reportado que un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en organismos acuáticos está asociado directamente al exceso de contaminantes ambientales (Duarte et al. 2011; Sabatini et al. 2011a, b; Rocchetta et al. 2014a, b). Esto se debe a que la mayoría de los contaminantes tienen la capacidad de generar especies reactivas del oxígeno (ERO) mediante la reacción de Fenton (Goldstein et al. 1993; Livingstone 2001). Los organismos cuentan con mecanismos celulares para disminuir el efecto de las ERO, permitiendo su supervivencia en condiciones ambientales desfavorables (Valavanidis et al. 2006). En nuestra investigación, la respuesta de la CAT en glándula digestiva y manto presentó diferencias entre especies, aumentando en *C. fluminea* y disminuyendo en *D. delodontus* en glándula digestiva y manto. Esta diferencia entre especies se debería a que la especie nativa tiene una tasa metabólica baja y un crecimiento lento, en comparación con la de otros bivalvos, al ser una especie longeva (Aldrige 1999; Valdovinos and Pedreros 2007; Rocchetta et al. 2014a). Las especies longevas como *D. delodontus* presentan valores basales de las variables relacionadas con el daño oxidativo y respuestas antioxidantes más bajas que en individuos menos longevos como sería el caso de *C. fluminea*. A su vez, dichas respuestas

también van disminuyendo con la edad en las especies longevas (Yusseppone 2016). Por ende, las respuestas frente a variaciones en el ambiente se visualizarán más tarde en la especie nativa que en la invasora. En consecuencia, se observó una mayor actividad de GST en *C. fluminea*, en comparación con *D. delodontus*, evidenciando diferencias en la fase de oxidación de los xenobióticos entre especies (Lushchak 2011).

En el presente estudio se observó, además, un incremento en el contenido de GSH de junio a septiembre tanto en *C. fluminea* como en *D. delodontus*. En trabajos previos se reportó que la exposición de bivalvos a metales —como así también a pesticidas— produce un aumento de los niveles de GSH (Sabatini et al. 2011ab; Rocchetta et al. 2014a,b; Peluso 2020; Yusseppone et al. 2020). El aumento observado en los niveles de GSH tanto en *C. fluminea* como en *D. delodontus* estaría indicando que en ambas especies el glutatión reducido tiene una participación activa en la defensa antioxidante frente a la exposición de los metales y pesticidas registrados en el río Paraná de las Palmas.

El aumento de los valores de MDA de junio a septiembre, tanto en branquias como en glándula digestiva de *C. fluminea* y *D. delodontus*, indicaría que ambas especies sufren daño oxidativo a lípidos. Los mayores valores registrados en branquias y glándula digestiva, no así en manto, de la especie invasora comparado con la nativa, probablemente se deban a una respuesta diferida en el tiempo entre especies, sumado a que dichos órganos están en contacto directo por más tiempo con partículas y sustancias disueltas que el manto (Sar et al. 2018). A su vez, las branquias son el principal órgano intermediario entre el organismo y el ambiente, mientras que la glándula digestiva es el principal sitio de bioacumulación de contaminantes y detoxificación, constituyendo dos órganos blanco de contaminantes ambientales (Jing et al. 2006; Attig et al. 2010). Resultados similares se obtuvieron en trabajos previos de bivalvos expuestos a metales en el norte de la Patagonia Argentina (Rocchetta et al. 2014a,b; Yusseppone 2016; Yusseppone et al. 2020).

El contenido de glucógeno, otro indicador del estado metabólico general, mostró diferencias entre especies. Mientras que *C. fluminea* mantuvo la concentración constante entre las dos fechas de muestreo analizadas, en *D.*

*delodontus* se registró un aumento considerable en el mes de septiembre. Las diferencias encontradas entre ambas especies podría deberse a que la especie nativa se encontraría en el período de acumulación de reservas energéticas para la formación de gametas, período que concluye a fines del verano para distintas especies del género (Semenas and Brugni 2002). Por su parte, la especie invasora, tiene múltiples eventos reproductivos en el año (los más relevantes en primavera) y no exhibe periodos de inactividad reproductiva, manteniendo así una concentración constante de glucógeno (Sousa et al. 2008; Cao et al. 2017). Otra hipótesis que explicaría la desigualdad en el contenido de glucógeno entre especies, sería la de las diferencias en la disponibilidad de alimento, asociado al impacto antrópico, siendo *D. delodontus* es quien aprovecha mejor los recursos alimenticios por tener estrategias y respuestas metabólicas distintas frente a la contaminación. En estudios previos de otra especie de este género, realizados en el norte de la Patagonia Argentina, se demostró que la contaminación bacteriana por coliformes fecales en los sitios impactados constituía una fuente de alimento alternativa para *D. chilensis* (Sabatini et al. 2011a; Rochetta et al. 2014b; Yusseppone 2016). Por otro lado, en otras especies de bivalvos se observó un incremento en el contenido de glucógeno en respuesta a la acumulación de metales como el cobre y el plomo. Esto se explica por el aumento de la actividad de la enzima glucógeno sintetasa y la inhibición de la glucógeno fosforilasa (Díaz and García 2001), en relación directa con la cantidad de alimento disponible y con la concentración de tóxicos en el medio acuático (Fassiano 2016).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la exposición a contaminantes a lo largo del tiempo genera un desbalance en los parámetros oxidativos y en el contenido de reserva energética en los tres órganos investigados y en ambas especies de bivalvos, en respuesta a cambios ocurridos en el medio circundante. Estos cambios son más evidentes en las branquias y en la glándula digestiva de *Corbicula fluminea*, ya que esta especie presenta respuestas

metabólicas más inmediatas en el tiempo que *Diplodon delodontus*. Sin embargo, en ambas especies se observa un efecto prooxidante evidenciado por la activación del sistema de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, el cual no logró prevenir el daño oxidativo. Además, las respuestas relacionadas con el estrés oxidativo se vieron potenciadas en septiembre debido al aumento en las concentraciones de los metales y de la azoxistrobina.

Nuestros resultados muestran que, en conjunto con el estudio de variables fisicoquímicas, *Corbicula fluminea* y *Diplodon delodontus* constituirían modelos útiles en la evaluación de la calidad del agua, para monitorear sitios impactados por actividades antrópicas. Proponemos la utilización conjunta de especies nativas e invasoras para obtener una visión más amplia del impacto antrópico de la zona y de cómo este afecta en forma diferencial a las especies que la habitan, además de proveer en paralelo datos significativos para la conservación de especies autóctonas. Consideramos, entonces, que este trabajo constituye un aporte valioso para el conocimiento del estado ambiental del tramo final del río Paraná de las Palmas (en la Primera Sección de Islas Bonaerenses), ya que la mayoría de los estudios se realizan habitualmente río arriba o cerca a la desembocadura del Río de la Plata. A su vez, los resultados aquí obtenidos permitirían una correcta interpretación del efecto de los cambios en las distintas variables fisicoquímicas y la presencia de contaminantes o xenobióticos en el medio acuático, sobre las respuestas metabólicas de *Corbicula fluminea* y *Diplodon delodontus*. Toda esta información en conjunto, otorga además, herramientas para explicar la dispersión y colonización de una especie invasora en detrimento de una nativa en el río Paraná de las Palmas.

AGRADECIMIENTOS. A Walter Santillán por su participación en la toma de muestras y colecta de animales; a Martín Fea por su soporte técnico en el laboratorio. Este proyecto fue financiado por la subvención de UBACYT 20020190200150BA y ANPCYT PICT-2018-1895 de Sebastián E. Sabatini.

## REFERENCIAS

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Alberro, N., P. Bedregal, R. Crubellati, and S. Stegen. 2011. Manual de protocolos armonizados y evaluados para la toma de muestra y el análisis de agua y sedimentos para la región de América Latina y el Caribe. Proyecto ARCAL RLA. Vol. 10.
- Aldrige, D. C. 1999. The morphology, growth and reproduction of Unionidae (Bivalvia) in a fenland waterway. *Journal of Molluscan Studies* 65:47-60. <https://doi.org/10.1093/mollus/65.1.47>. <http://doi.org/103/ollus/65.1.47>

- Amé, V., and P. Carriquirborde (coords.). 2021. Principios de ecotoxicología. Medio Ambiente. Universidad Nacional de La Plata. Libro de cátedra digital, EDULP, 1ra edición. ISBN: 978-950-34-1987-8.
- Anderson, M. E. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 113:548-553. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13073-9).
- APHA. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th ed. Washington DC: American Public Health Association.
- Araujo, R., D. Moreno, and M. A. Ramos. 1993. The asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. *American Malacological Bulletin* 10(1):39-49.
- Attig, H., A. Dagnino, A. Negri, J. Jebali, H. Boussetta, A. Viarengo, F. Dondero, and M. Banni. 2010. Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicology Environmental Safety* 73:1712-1719. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.007>.
- Baigún, C. R., A. Puig, P. G. Minotti, P. Kandus, R. Quintana, R. Vicari, R. Bo, N. O. Oldani, and J. A. J. E. Nestler. 2008. Resource use in the Parana River Delta (Argentina): moving away from an ecohydrological approach?. *Ecohydrology and Hydrobiology* 8(2-4):245-262. <https://doi.org/10.2478/v10104-009-0019-7>.
- Barrenechea, A. 2004. Aspectos fisicoquímicos de la calidad del agua. Tratamiento de agua para consumo humano. Pp. 54.
- Beuge, J. A., and S. D. Aust. 1978. The Thiobarbituric Acid assay. *Methods in Enzymology* 52:306-307.
- Boltovskoy, D., N. Correa, D. Cataldo, J. Stripeikis, and M. Tudino. 1997. Environmental stress on *Corbicula fluminea* (Bivalvia) in the Paraná river delta (Argentina): complex pollution-related disruption of population structures. *Archiv für Hydrobiologie* 138(4):483-507. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/138/1997/483>.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Cao, L. M. 2020. Conservación de las poblaciones de bivalvos nativos (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) en Argentina. Variabilidad morfológica, molecular y distribución de *Diplodon delodontus*. Tesis Doctoral en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Pp. 161.
- Cao, L., C. Damborenea, P. E. Penchaszadeh, and G. Darrigan. 2017. Gonadal cycle of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in Pampean streams (Southern Neotropical Region). *PLoS ONE* 12(10):e0186850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186850>.
- Cataldo, D. H. 2001. Dinámica poblacional y potencial bioindicador de contaminación acuática del molusco bivalvo *Corbicula fluminea* en el delta del Río Paraná. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. URL: [tinyurl.com/3uj3us4u](http://tinyurl.com/3uj3us4u).
- Carr, G. M., and J. P. Neary. 2008. Water quality for ecosystem and human health, UNEP/Earthprint.
- Clavijo, C. 2009. Distribución del género Anodontites (Mollusca:Bivalvia: Mycetopodidae) en Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 9(92):201-210. ISSN: 0037-8607.
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, and A. Eaton. 1986. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington DC, USA. Pp. 162-173.
- Colombo, J. C., C. Bilos, M. Campanaro, M. J. Rodríguez Presa, and J. A. Catoggio. 1995. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides by the Asiatic Clam *Corbicula fluminea*: its use as sentinel organism in the Río de la Plata estuary, Argentina. *Environmental Science and Technology* 29:914-927. <https://doi.org/10.1021/es00004a011>.
- Conti, M. E., J. Stripeikis, M. G. Finoia, and M. B. Tudino. 2011. Baseline trace metals in bivalve molluscs from the Beagle Channel, Patagonia (Argentina). *Ecotoxicology* 20:1341-1353. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0690-5>.
- Chen, C. Y. S. R. Stemberger, B. Klau, J. D. Blum, P. C. Pickhardt, and C. L. Folt. 2000. Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes. *Limnology and Oceanography* 45(7):1525-1536. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1525>.
- Cherry, D., J. Scheller, N. Cooper, and J. Bidwell. 2005. Potential effects of Asian clam (*Corbicula fluminea*) die-offs on native freshwater mussels (Unionidae) I: water-column ammonia levels and ammonia toxicity. *North American Benthological Society* 24(2):369-380. <https://doi.org/10.1899/04-073.1>.
- Darrigran, G., and M. C. Damborena. 2005. A bioinvasion history in South America. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the golden mussel. *American Malacological Bulletin* 20:105-112.
- Darrigran, G., and N. Arcaría. 2009. Las invasiones biológicas en la costa Argentina y en la cuenca del Plata. Pp. 179-192 en R. A. López and S. C. Marcomini (coord.) 2009. Problemática de los ambientes costeros Sur de Brasil, Uruguay y Argentina. Pp. 211. Editorial Croquis S.R.L. ISBN 978-987-1527-24-3.
- Díaz, A., and J. García. 2001. Concentration of the heavy metal Cu and Pb and their relationship with the synthetase glycogen and phosphorylase glycogen enzymatic activity in the mussel (*Perna viridis*). *Zootecnia Tropical* 19:115-129.
- Di Salvatore, P., J. A. Calcagno, N. Ortiz, M. C. Ríos de Molina, and S. E. Sabatini. 2013. Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. *Marine Environmental Research* 92:244-252. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.10.004>.
- Duarte, C. A., E. Giarratano, O. A. Amin, and L. I. Comoglio. 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62(8):1895-1904. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.031>.
- Faría, M., D. Huertas, D. X. Soto, J. O. Grimalt, J. Catalan, M. C. Riva, and C. Barata. 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78(3):232-240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.003>.

- Fassiano, A. 2016. Toxicodinamia del herbicida Imazetapir en *Scenedesmus vacuolatus*. Efecto de un formulado comercial, sus componentes y la mezcla con glifosato. Transferencia en una cadena trófica. Tesis de Doctorado, FCEN, Universidad de Buenos Aires. Pp 174.
- Frías-Espéricueta, M. G., J. I. Osuna-López, G. Izaguirre-Fierro, M. Aguilar-Juárez, and D. Voltolina. 2010. Cadmio y plomo en organismos de importancia comercial de la zona costera de Sinaloa, México: 20 años de estudios. *Oceanides* 25:27-39. <http://doi.org/10.37543/oceanides.v25i2.88>.
- Goldstein, S., D. Meyerstein, and G. Czapski. 1993. The Fenton reagents. *Free Radical Biology and Medicine* 15(4): 435-445. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90043-T](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90043-T).
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22):7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8).
- Harikumar, P. S., U. P. Nasir, and M. P. Mujeebu Rahman. 2009. Distribution of heavy metals in the core sediments of a tropical wetland system. *International Journal of Environmental Science and Technology* 6:225-232. <https://doi.org/10.1007/BF03327626>.
- Hoffman, D. J., B. A. Rattner, G. A. Burton Jr, and J. Cairns Jr. 2002. Handbook of ecotoxicology. 2nd Edition. CRC press. Chapter 31. ISBN: 9780429137464. <https://doi.org/10.1201/9781420032505>.
- Janero, D. R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9(6):515-540. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2).
- Jing, G., Y. Li, L. Xie, and R. Zhang. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology and Pharmacology* 144:184-190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.005>.
- Kandus, P., N. Morandeira, and F. Schivo (eds.). 2010. Bienes y Servicios Ecosistémicos de los Humedales del Delta del Paraná. Fundación Humedales / Wetlands International. Buenos Aires, Argentina. Pp 32. ISBN 978-987-24710-2-6.
- Lesser, M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* 68(1):253-278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>.
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42(8):656-666. ISSN 0025-326X. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1).
- Lombardo, R. J., I. O'Farrell, and M. dos Santos Afonso. 2010. Spatial and Temporal Ion Dynamics on a Complex Hydrological System: The Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina). *Aquatic Geochemistry* 16:293-309. <https://doi.org/10.1007/s10498-009-9064-5>.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101:13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- Marigómez, I., M. Soto, M. P. Cajaraville, E. Angulo, and L. Giamberine. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56:358-392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>.
- Maiztegui, C. E. 2009. Actualidad del derecho ambiental argentino y su importancia para el Defensor del Pueblo de la Nación (Documento Capacitación HCDN).
- Modesto, V., M. Ilarri, A. T. Souza, M. Lopes-Lima, K. Douda, M. Clavero, and R. Sousa. 2018. Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish and Fisheries* 19:244-259. <https://doi.org/10.1111/faf.12252>.
- O'Farrell, I., R. J. Lombardo, P. de Tezanos Pinto, and C. López. 2002. The assessment of water quality in the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays. *Environmental Pollution* 120(2):207-218. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00136-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00136-7).
- Oropesa, A. L., J. J. Moreno, and L. J. Gómez. 2017. Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. *Revista Toxicología* 34:99-108. ISSN: 0212-7113.
- Ossana, N., B. Eissa, F. Baudou, P. Castañé, S. Soloneski, and L. Ferrari. 2016. Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133:73-81. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.046>.
- Páez-Osuna, F. 2005. Efectos de los metales. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: diagnóstico y tendencias. Pp. 329-360.
- Palanaippan, M., P. H. Gleick, L. Allen, M. J. Cohen, J. Christian-Smith, and C. Smith. 2017. Clearing the waters: a focus on water quality solutions, United Nations Environment Programme.
- Parrish, R. H., D. L. Mallicoate, and R. A. Klingbeil. 1986. Age dependent fecundity, number of spawnings per year, sex ratio, and maturation stages in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin* 84(3):503-517.
- Parrish, C. C., D. Deibel, and R. J. Thompson. 2009. Effect of sinking spring phytoplankton blooms on lipid content and composition in suprabenthic and benthic invertebrates in a cold ocean coastal environment. *Marine Ecology Progress Series* 391:33-51. <https://doi.org/10.3354/meps08148>.
- Peluso, J. 2020. Evaluación de la calidad de cuerpos de agua pertenecientes a la cuenca baja del río Paraná mediante indicadores fisicoquímicos y toxicológicos. Tesis doctoral. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, IIIA, UNSAM, CONICET. Pp. 240.
- Reboratti, C. 2010. Un mar de soja: la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Revista de Geografía Norte Grande* 45:63-76. <http://doi.org/10.4067/S0718-34022010000100005>.
- Riglos, C., M. Abelando, and C. Apartin. 2010. Monitoreo de los principales afluentes del río Paraná: análisis de nutrientes. Libro de resúmenes III. Congreso Argentino SETAC. Ecotoxicología: reflexiones en el año del Bicentenario.
- Rizzo, A., R. Daga, M. Arcagni, S. Pérez Catán, D. Bubach, R. Sánchez, S. Ribeiro Guevara, and M. A. Arribére. 2010. Concentraciones de metales pesados en distintos compartimentos de lagos andinos de Patagonia Norte. *Ecología*



- Austral 20(2):155-171.
- Rocchetta, I., B. J. Lomovasky, M. S. Yusseppone, S. E. Sabatini, F. Bieczynski, M. C. Ríos de Molina, and C. M. Luquet. 2014a. Growth, abundance, morphometric and metabolic parameters of three populations of *Diplodon chilensis* subject to different levels of natural and anthropogenic organic matter input in a glacial lake of North Patagonia. *Limnologia* 44:72-80. <http://doi.org/10.1016/j.limno.2013.06.004>.
- Rocchetta, I., M. Pasquevich, H. Heras, M. Ríos de Molina, and C. Luquet. 2014b. Effects of sewage discharges on lipid and fatty acid composition of the Patagonian bivalve *Diplodon chilensis*. *Marine Pollution Bulletin* 79:211-219. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.011>.
- Rodríguez Gutiérrez, J. L. 2019. Distribución y efectos del piretroide ciflutrin sobre el sistema nervioso central. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Farmacología y Toxicología. Pp. 212.
- Ruesink, J. L., H. S. Lenihan, A. C. Trimble, K. W. Heiman, F. Micheli, F. E. Byers, and M. C. Kay. 2005. Introduction of Non-Native Oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36:643-890. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152638>.
- Sabatini, S., I. Rocchetta, C. Luquet, M. Guido, and M. Ríos de Molina. 2011a. Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologia* 41:356-362. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2011.04.004>.
- Sabatini, S., I. Rocchetta, D. Nahabedian, C. Luquet, M. Eppis, and M. C. Ríos de Molina. 2011b. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary cooper in the freshwater bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 154:391-398. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.07.009>.
- Sabatini, S. E., M. D. Ruiz, and J. A. Calcagno. 2016. Los indicadores de la contaminación de las aguas. Monitoreo químico y biomonitoreo. *En Publicación de Divulgación Científica de la Fundación Azara y el Departamento de Ciencias Naturales y Antropológicas de la Universidad Maimónides - N° 4*. ISSN 2683-7692.
- Sansiñena, J. A., L. Peluso, C. Salgado Costa, P. M. Demetrio, T. Mac Loughlin, D. J. G. Marino, L. Alcalde, and G. S. Natale. 2018. Evaluación de la toxicidad de los sedimentos de un agroecosistema a dos especies nativas, *Hyalella curvispina* (CRUSTACEA: AMPHIPODA) y *Boana pulchella* (AMPHIBIA: ANURA), como potenciales indicadores ambientales. *Indicadores Ecológicos* 93:100-110. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.061>.
- Sar, A., J. P. Martín, R. Fernández, and C. Caminos. 2018. Ciclo reproductivo y reclutamiento del mejillón *Mytilus edulis platensis* en Bahía San Julián (Santa Cruz, Argentina). *Informe Científico Técnico UNPA* 10(2):33-51. <https://doi.org/10.22305/ict-unpa.v10i2.269>.
- Semenas, L., and N. Brugni. 2002. Características poblacionales y ciclo de vida de *Diplodon chilensis* (d'Orbigny, 1835) (Hyriidae, Bivalvia) en el lago Gutiérrez (Patagonia, Argentina). *Ecología Austral* 12(1):29-40.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1999. *Introducción a la Bioestadística*. Reverté, Barcelona, Spain.
- Sousa, R., C. Antunes, and L. Guilhermino. 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 44:85-94. <https://doi.org/10.1051/limn:2008017>.
- Student. 1908. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* 6(1):1-25. <https://doi.org/10.2307/2331554>.
- Torres, S., G. Darrigran, and C. Damborenea. 2013. Distribución del género *Diplodon* (Mollusca: Bivalvia: Hyriidae) en la Cuenca del Plata (Argentina) mediante el uso de Colecciones Biológicas. Número especial I: Aguas. Asociación de Universidades, Grupo Montevideo. ISSN: 1852-2181.
- Tulonen, T., M. Pihlström, L. Arvola, and M. Rask. 2006. Concentrations of heavy metals in food web components of small, boreal lakes. *Boreal Environment Research* 11:185-194. ISSN: 1239-6095.
- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis, and M. Scoullos. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology Environmental Safety* 64(2):178-189. <http://10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.
- Valdovinos, C., and P. Pedreros. 2007. Variaciones geográficas en las tasas de crecimiento de la concha del mejillón *Diplodon chilensis* de lagos templados de Chile: Implicaciones para la conservación de la biodiversidad. *Limnología* 37(1):63-75. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.08.007>.
- Van der Oost, R., J. Beyer, and N. P. E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry* 11(2):256-265. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90013-8).
- Vavilin, D. V., J. M. Ducruet, D. N. Matorin, P. S. Venediktov, and A. B. Rubin. 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 42(3):233-239. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00076-1).
- Walker, C., S. Hopkin, R. Sibly, and D. Peakall. 2006. Biomarkers. *Principles of ecotoxicology*. Ed. Taylor and Francis, Londres. Pp. 175-194. <https://doi.org/10.1201/9781439894224>.
- Yusseppone, M. S. 2016. Múltiples marcadores en el bivalvo de agua dulce *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) y su potencial aplicación en la caracterización de cuerpos de agua patagónicos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Natural, Universidad de Buenos Aires. Pp. 212.
- Yusseppone, M. S., V. A. Bianchi, J. M. Castro, T. Noya Abad, Y. S. Minaberry, S. E. Sabatini, C. M. Luquet, M. C. Ríos de Molina, and I. Rocchetta. 2020. In situ experiment to evaluate biochemical responses in the freshwater mussel *Diplodon chilensis* under anthropogenic eutrophication conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 193: 110341. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110341>.