

## Usos de biomarcadores en *Corbicula fluminea* (Mollusca, Bivalvia) como sistema de alerta temprana sobre la presencia de plaguicidas en sistemas acuáticos

Lic. Alejandra Kröger ([alekroger@yahoo.com](mailto:alekroger@yahoo.com))

Orientador: Dr. Néstor Mazzeo ([mazzeobeyhaut@yahoo.com](mailto:mazzeobeyhaut@yahoo.com))



Tribunal: -Dra. Gabriela Eguren ([eguren67@gmail.com](mailto:eguren67@gmail.com))  
-Dr. Guillermo Goyenola ([goyenola@gmail.com](mailto:goyenola@gmail.com))  
-Dr. Javier García Alonso ([jgalonso@cure.edu.uy](mailto:jgalonso@cure.edu.uy))

Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales

2020

## Resumen

A nivel global los principales problemas de calidad del agua se vinculan con los procesos de eutrofización y el aporte de xenobióticos como por ejemplo plaguicidas. En Uruguay los principales aportes de nutrientes y plaguicidas provienen de las actividades agrícola-ganaderas y el vertimiento de efluentes domésticos e industriales. La presente tesis explora el desarrollo de estrategias de alerta temprana para la detección del ingreso de residuos de plaguicidas e identificación de efectos en la biota de ecosistemas acuáticos continentales, considerando como modelos de estudio: *Corbicula fluminea*, Laguna del Sauce (Maldonado) y dos biomarcadores (test de micronúcleos-Mn y ensayo cometa-Ec). En este marco, se expusieron organismos por 24 hs. a diferentes concentraciones de Metolaclor (0,025, 0,05, 0,1, 0,2 µg/l) y Metalaxil (0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 µg/l). El diseño experimental incluyó un control positivo con peróxido de hidrógeno (250 µM) y un control negativo (ausencia de plaguicidas). La exposición a Metolaclor evaluada con el test de Mn condicionó respuestas significativas a partir de 0,025 µg/l con respecto al control negativo, mientras que para ensayo cometa se observaron efectos significativos a partir de 0,1 µg/l. La exposición a Metalaxil evaluada con el test de micronúcleos determinó respuestas adversas (estadísticamente significativas) a partir de 0,0125 µg/l, mientras que con el ensayo cometa presentó diferencias significativas a partir de 0,025 µg/l. Adicionalmente se evaluó el daño genético presente en organismos de campo *versus* ejemplares aclimatados en el laboratorio. Los organismos colectados en la Laguna del Sauce y en el arroyo Pan de Azúcar presentaron respuestas a nivel de los biomarcadores analizados respecto a los organismos previamente aclimatados en laboratorio (condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo, alimentación y ausencia de plaguicidas) durante 30 días.

La utilización de los biomarcadores de micronúcleos y ensayo cometa en hemolinfa de *Corbicula fluminea* resultan ser una herramienta de gran utilidad para detectar la presencia y efectos producidos por residuos de plaguicidas (por ej. Metolaclor y Metalaxil). Dicha herramienta puede ser utilizada en forma complementaria en los programas de monitoreo clásicos de detección de residuos en agua, sedimento y matrices biológicas, contribuyendo a la detección temprana del ingreso de

contaminantes, comprender sus potenciales efectos en los organismos y sus consecuencias en el ámbito de la provisión de servicios ecosistémicos claves como la producción de agua potable.

Palabras claves: biomarcadores, micronúcleo, ensayo cometa, Metolaclor, Metalaxil, monitoreo de calidad del agua, Laguna del Sauce.

## Agradecimientos

A mi tutor Néstor Mazzeo, que con su experiencia y dedicación, me guió y acompañó en todo este proceso, siempre confiando y apoyando mis decisiones.

A Wilner Martínez-López quien me permitió trabajar en el laboratorio de Epigenética e inestabilidad genómica, en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. A su vez le quiero agradecer por los consejos y dedicación para lograr buenos resultados a la hora de preparar y analizar las muestras.

A Franco Teixeira de Mello por sus valiosos comentarios y consejos que contribuyeron a enriquecer el trabajo realizado. Y por acompañarme en varias ocasiones al campo a colectar los bivalvos.

A los integrantes del tribunal, Gabriela Eguren, Guillermo Goyenola y Javier García por sus aportes que ayudaron a mejorar el trabajo.

A Facultad de Ciencias, en especial a Javier Gorga, por el apoyo brindado para realizar la pasantía “Uso de biomarcadores cito-moleculares de alerta temprana sobre bioindicadores en ambientes acuáticos”, en la Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

A Guisella Poletta, Fernanda Simoniello y Lucia Odetti por su calidez y guiarme en el aprendizaje de las técnicas de micronúcleos y ensayos cometas en el laboratorio de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal (Santa Fe, Argentina).

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la beca de Maestría otorgada.

A Soledad Marroni por ayudarme a la mantención de los individuos y transmitir su experiencia en el bioterio.

A Juan Clemente y Giancarlo Tesitore que tuvieron la gentileza acompañarme al campo a colectar individuos.

## Índice

1.	Introducción.....	1
1.1	Problemática en Uruguay.....	2
1.2	Análisis de la contaminación por residuos de plaguicidas y los desafíos en la gestión ambiental.....	3
1.3	Efectos a nivel de biota y procesos ecosistémicos.....	4
1.4	Biomonitoreo con bivalvos .....	6
1.5	Señales de alerta temprana .....	7
1.6	Caso de estudio .....	11
2.	Objetivos, preguntas e hipótesis.....	13
2.1	Objetivo general.....	13
2.2	Objetivos específicos .....	13
2.3	Preguntas .....	13
2.4	Hipótesis .....	14
2.5	Predicciones.....	14
3.	Materiales y métodos.....	15
3.1	Área de estudio .....	15
3.2	Plaguicidas a evaluar (Metolaclor y Metalaxil).....	16
3.3	<i>Corbicula fluminea</i> (Molusca, Bivalvia, Corbiculidae) .....	18
3.4	Colecta de individuos y aclimatación en laboratorio.....	19
3.5	Ensayos de laboratorio.....	20
3.5.1	Control negativo (CN) .....	20
3.5.2	Control Positivo (CP) .....	21
3.5.3	Metolaclor .....	22
3.5.4	Metalaxil.....	22
3.6	Micronúcleos y anomalías nucleares.....	22
3.7	Ensayo cometa.....	24
3.8	Comparación de organismos en condiciones de campo vs organismos en condiciones de laboratorio .....	25
3.9	Análisis de datos.....	25
4.	Resultados.....	25
4.1	Control positivo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	27
4.2	Metolaclor.....	28
4.3	Metalaxil .....	29
4.4	Heterogeneidad espacial de los efectos observados en condiciones de campo .....	31

5. Discusión.....	35
5.1 Patrones observados: causas y efectos .....	35
5.2 Implicancias en el diseño sistemas de alerta temprana en programa de monitoreo de calidad de agua .....	37
6. Conclusiones.....	40
7. Perspectivas .....	41
8. Bibliografía .....	43
División General de Servicios Agrícolas (DGSA)/ División Control de Insumos (2019). Anuario Estadístico de DIEA 2019 .....	45



## 1. Introducción

Las aguas continentales incluyen aguas subterráneas, ríos, arroyos, lagos y reservorios, estos últimos ecosistemas representan alrededor del 7% de la superficie de la tierra (Magnuson et al., 2006). A escala de cuenca hidrográfica, los ecosistemas están estrechamente vinculados a través de los flujos de agua intercambiando compuestos químicos disueltos y particulados, así como organismos e información (Carpenter & Biggs, 2009). El clima, los tipos de suelos, los diferentes usos del suelo y el agua, y la composición de la vegetación afectan la infiltración a aguas subterráneas y la escorrentía de aguas superficiales que llegan a los cursos de agua. Por lo tanto, cualquier perturbación a nivel de la cuenca puede reflejarse en cambios que podrán observarse en los diferentes organismos y comunidades de los cuerpos de agua superficiales, así como procesos a nivel ecosistémico (Waxman, 1998). La presión externa de origen antropogénico es múltiple, compleja, de similar magnitud o superior a los controles o forzantes de la naturaleza. Estas presiones se están acelerando e interactuando entre sí y pueden desencadenar cambios bruscos a partir de umbrales críticos (Scheffer et al., 2001; Rockström et al., 2009). Dado la complejidad de los sistemas, resulta difícil predecir y anticiparse a las consecuencias de las presiones, interacciones o retroalimentaciones con los diferentes componentes y niveles de organización de los sistemas naturales.

Un forzante antrópico clave (driver, impulsor) de estos cambios es la necesidad de incrementar la producción de alimentos para una población en crecimiento, lo cual demanda un aumento por la competencia de agua, suelos y otros recursos naturales. La urbanización es otra forzante de cambio relevante, las ciudades concentran demanda de energía, agua, alimentos y otros recursos, que la mayoría deben de ser importados de sus alrededores o de largas distancias. Al mismo tiempo, generan desechos y efluentes que superan ampliamente la capacidad de depuración de los sistemas naturales. En este sentido, los cambios del uso de suelo en la cuenca de drenaje afectan directa o indirectamente diversos aspectos estructurales y funcionales de los sistemas acuáticos (Dudgeon, 2010; Geist, 2011).

Los ecosistemas dependen del agua y al mismo tiempo regulan la disponibilidad de la misma para todas las actividades humanas (Rockström et al., 2014). De forma muy resumida, los ecosistemas de agua dulce proveen bienes y servicios para las sociedades humanas, alguno de ellos claves para el bienestar humano. De acuerdo con Carpenter & Biggs (2009), la sostenibilidad de los servicios ecosistémicos incluye varios aspectos fundamentales, de los cuales tres son de suma importancia:

1. Las sociedades humanas usan el agua dulce intensamente. En muchas regiones, la tasa de uso del agua supera la tasa de reemplazo por el ciclo hidrológico.
2. Los ecosistemas de agua dulce son frecuentemente degradados por procesos físicos, químicos y/o biológicos. Por ejemplo, introducción de especies, contaminación por fertilizantes y la descarga de aguas residuales provocan eutrofización.
3. La competencia por los escasos recursos de agua genera conflictos de intereses lo cual condiciona sistemas complejos de gobernanza.

A nivel de paisaje los ecosistemas de agua dulce son espacios de alta biodiversidad y a su vez son los más amenazados por las actividades humanas (Geist, 2011). La amenaza a la biodiversidad acuática se vincula a la sobreexplotación de recursos, modificaciones en el régimen hídrico o en el régimen de circulación del agua, degradación del hábitat, fragmentación del hábitat, contaminación por plaguicidas, metales pesados, eutrofización de los cuerpos de agua, e invasión de especies exóticas (Mazzeo et al., 2010; Waykar & Deshmukh, 2012).

### 1.1 Problemática en Uruguay

Los principales problemas de calidad del agua a escala nacional se vinculan con los procesos de eutrofización (entrada excesiva de nutrientes limitantes) y el aporte de compuestos y elementos tóxicos de muy diverso origen como por ejemplo plaguicidas. Los principales aportes de nutrientes provienen de la actividad agrícola-ganadera y el vertimiento de efluentes domésticos e industriales sin tratamiento adecuado (Mazzeo et al., 2014; Ernst et al., 2018; Griffero et al., 2019; Soutullo et al., 2020). En consecuencia se observa una proliferación desmedida de productores primarios (plantas, algas o cianobacterias), en detrimento de la calidad de agua, pérdida de diversidad y servicios

ecosistémicos, e interferencias significativas con los usos mayoritarios del recurso (Mazzeo et al., 2014).

En las últimas décadas Uruguay ha experimentado un gran desarrollo agrícola, incrementándose un 80% la superficie cultivada en el período 2003–2011, lo cual representa en hectáreas cultivadas un salto de 450 mil a 800 mil. En el período 2018/19 la superficie cultivada aumento a un total de 1 millón 616 hectáreas. (Narbondo, 2012; MGAP, 2019). Esto condicionó un aumento en el uso de fertilizantes y plaguicidas, para el caso de los plaguicidas (insecticidas, nematocidas, herbicidas, funguicidas, rodenticidas, agentes reguladores del crecimiento y agentes para raleo de la fruta, OMS/PNUMA, 1990). Todos estos compuestos son considerados biocidas, sustancias o mezclas de sustancias que están compuestas por uno o más principios activos (incluidos los microorganismos) cuyo objetivo es destruir, contrarrestar, neutralizar, o impedir la acción sobre cualquier organismo, (MITECO 2019). La importación de biocidas aumentó en volumen (kg/L) en un 233,6 % y un 303,5% kg de principios activos desde el 2002 al 2019 (Uruguay - MGAP - DGSA / División Control de Insumos).

### 1.2 Análisis de la contaminación por residuos de plaguicidas y los desafíos en la gestión ambiental

Los plaguicidas pueden ingresar a los cuerpos de agua desde el aire a través de la volatilización o pérdidas por deriva durante la aplicación. Además, pueden ingresar a través de la escorrentía superficial, sub-superficial y subterránea, asociado a partículas o en forma disuelta. La concentración de plaguicidas que ingresa a los cuerpos de agua va a depender de una serie de factores: propiedades físicas [peso molecular, solubilidad coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ), coeficiente de adsorción en suelo ( $K_{oc}/K_d$ )], y químicas de los productos aplicados (degradación en agua y en sedimento, fotodegradación, entre otros); régimen de aplicaciones (frecuencia, número de aplicaciones, dosis) y modo de aplicación (equipamiento utilizado); variación temporal de las precipitaciones (intensidad y distribución); topografía y textura del suelo, vegetación asociada al mismo, entre los más importantes (Willis, 1982; Tano, 2011). Una vez que los residuos de plaguicidas alcanzan los ecosistemas acuáticos son rápidamente transportados y distribuidos entre las diferentes matrices ambientales (agua, sedimento,

biota) y compartimentos (zona pelágica, bentónica o litoral) (Schäfer et al., 2007; Belenguer et al., 2014; Masiá et al., 2015).

La detección de los mismos en los cuerpos de agua resulta compleja debido a que muchos (o la mayoría) suelen ser detectables durante muy breves ventanas temporales luego de las precipitaciones que ocurren post aplicación (Willis, 1982) y pueden encontrarse en una sola matriz o compartimento debido a la partición (distribución) entre las distintas matrices ambientales (Schulz, 2004).

### 1.3 Efectos a nivel de biota y procesos ecosistémicos

Cuando los contaminantes alcanzan los sistemas acuáticos, se pueden observar efectos en diferentes niveles de organización biológica, dependiendo de la concentración y duración de la exposición a la cual el sistema está sometido (Parolini et al., 2013). El primer nivel de acción de un contaminante, una vez que ingresa al organismo, es el molecular, desencadenando respuestas que tienden a mantener la homeostasis. Si las concentraciones son elevadas o el tiempo de exposición es prolongado, los mecanismos de detoxificación pueden ser insuficientes para contrarrestar la acción del contaminante y se desencadenan efectos que pueden alcanzar diferentes niveles de organización biológica. En el caso de que estas barreras compensatorias sean superadas, se generan respuestas tendientes a reparar el daño y si éstos son de carácter irreversible pueden generar efectos subletales o letales (Freedman, 1995; Giest, 2011). Los efectos en los organismos pueden eventualmente propagarse a nivel poblaciones, comunitario y ecosistémico.

Las respuestas a nivel molecular ocurren en cortos períodos de exposición, pudiendo ser utilizadas como señal de alerta temprana, y poseen baja relevancia ecosistémica (en términos de comprender como afecta la integridad de todo el ecosistema y la provisión de bienes y servicios ecosistémicos). Las respuestas a nivel de poblacional, comunitario o ecosistémicos se expresan luego de largos períodos de exposición y presentan una mayor relevancia ecológica (Freedman, 1995) (Figura 1).

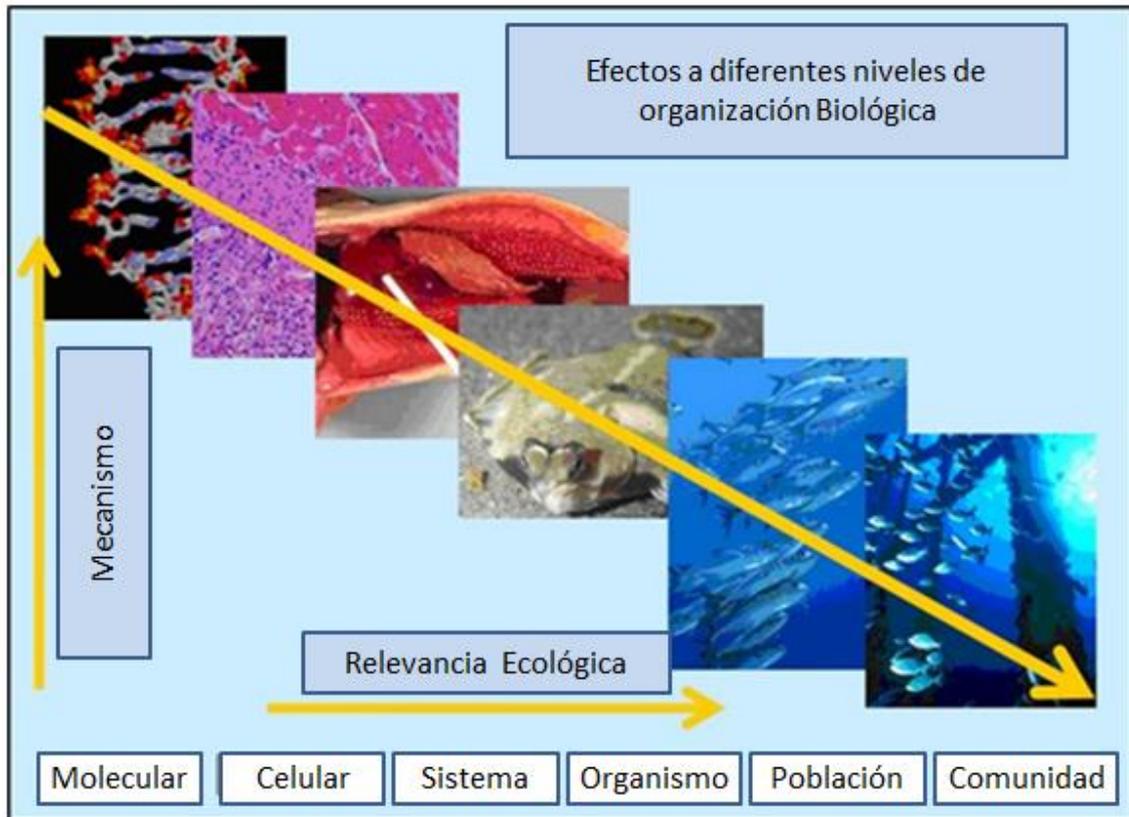


Fig.1. Significancia ecológica Los diferentes niveles de organización  
 (tomada de: [biology/levels-of-biological-organization-fsc-biology.html](http://biology/levels-of-biological-organization-fsc-biology.html))

El análisis en cada nivel de organización brinda información relevante y no deben ser considerados como aproximaciones excluyentes. Newman & Clements (2008) plantean que en ecotoxicología ningún nivel jerárquico es mejor que otro para comprender los mecanismos causales o los efectos a nivel de la biota y procesos ecosistémicos. Por ejemplo, Kidd et al. (2007) evalúan niveles de organización inferiores (sub-celular) a efectos de comprender respuestas observadas a nivel poblacional. Para cualquier nivel de organización, es necesario comprender sus componentes e interrelaciones y como los diferentes niveles interaccionan y forman parte de un todo (Figura 2). Para avanzar en la generación de conocimiento es necesario complementar enfoques reduccionistas y aproximaciones sistémicas u holísticas (Newman & Clements, 2008).

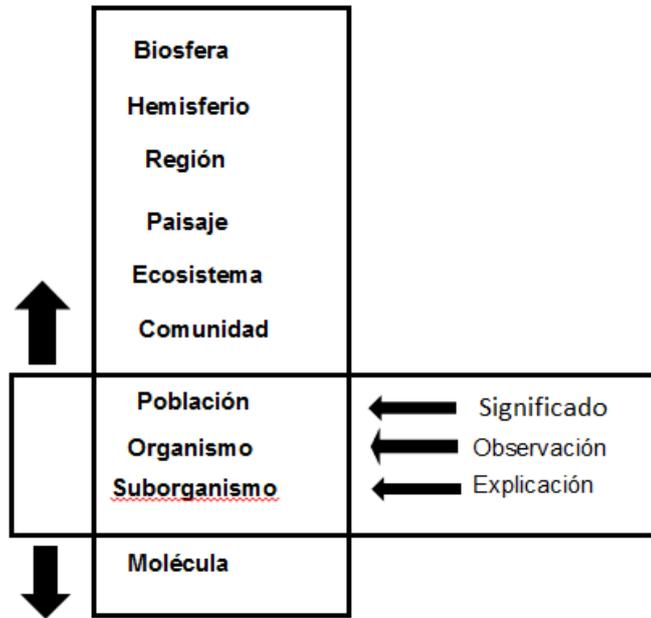


Fig. 2. Esquema de interacciones entre los niveles de organización a contemplar en el análisis de los efectos de los residuos de plaguicidas y en el discernimiento de los mecanismos causales asociados (Newman & Clements, 2008).

Los cambios en la abundancia de especies y en la composición de las comunidades pueden afectar dramáticamente la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, incluyendo las interacciones tróficas, la dinámica de los nutrientes, la producción de biomasa y transferencia de energía, las respuesta, susceptibilidad y resiliencia a los disturbios naturales o antrópicos (Crooks & Khim, 1999). Además de los efectos directos, los efectos indirectos también pueden manifestarse en cambios en las interacciones tróficas por mecanismos top-down y/o bottom-up, los que pueden provocar reducción en la competencia por un recurso o modificar la disponibilidad por un alimento determinado (Pace et al., 1999), entre otros muchos ejemplos.

#### 1.4 Biomonitoreo con bivalvos

Hay varios organismos que se utilizan como indicadores biológicos de la calidad del agua, siendo los macroinvertebrados bentónicos, entre otros, el grupo más frecuentemente utilizados (Brito & Pinto, 2014). Los bivalvos bentónicos filtradores son muy útiles para el estudio de biomarcadores (Cotou et al., 2012; Lummato et al., 2013). Los bivalvos, en términos generales, cuentan con atributos que favorecen dicha posibilidad, están ampliamente distribuidos, son abundantes, son tolerantes a variaciones ambientales y a

la presencia de contaminantes ambientales, presentan alta bioacumulación de contaminantes, muy bajos niveles (basales) de enzimas que metabolizan los contaminantes orgánicos (Villela et al., 2006; Zhou et al., 2008; Waykar & Deshmukh, 2012). Además, los adultos, cuentan con escasa capacidad de desplazamiento lo cual permite hacer un análisis espacial y temporal de los niveles de la contaminación. Los bivalvos filtran importantes cantidades de agua por día por lo que en general resultan modelos adecuados para analizar efectos producidos por tóxicos que se encuentran en concentraciones muy baja para ser detectados químicamente, o se encuentran presentes en ventanas de tiempo muy cortas (Villela et al., 2013). Otra ventaja que presentan estos organismos (por ejemplo *Diplodon* o *Corbicula*) radica en la fácil manipulación y facilidad de cultivo, lo cual pueden utilizarse en bioensayos de laboratorio y de campo (Marroni et al., 2014).

Diferentes tejidos pueden ser usados para el biomonitoreo de genotoxicidad (agentes o interacción de agentes que dañan el ADN, material genético de la célula, y desencadenan efectos en otros niveles de organización, Shugart & Theodorakis 1998), en la evaluación de la calidad del agua o impactos ambientales (Bickham et al., 2000). La hemolinfa es uno de los ejemplos con mayor cantidad de estudios, su rol fisiológico en el transporte de tóxicos y su papel en los mecanismos de defensa para el organismo determina que sus células se encuentren en contacto directo con diferentes agentes tóxicos (Mersch et al., 1996).

### 1.5 Señales de alerta temprana

Existen diferentes formas de utilizar las especies para la evaluación de la calidad de agua, entre ellas ha cobrado importancia la utilización de biomarcadores para la detección y seguimiento de contaminantes (Silva et al., 2012). Depledge & Fossi en 1994 definieron biomarcador como cambio bioquímicos, celulares, fisiológicos o de comportamiento que se pueden medir en un tejido, fluido biológico, organismo o población, y que provee evidencia de exposición y/o efecto de unos o más contaminantes.

Los biomarcadores se pueden clasificar según dos grupos: de exposición o de efecto. Los biomarcadores de exposición, son todas las respuestas que un organismo presenta en los diferentes niveles estructurales que indican exposición a un compuesto químico o a

una clase de compuesto, pero no nos indica el efecto de toxicidad que presenta el organismo. Mientras que los biomarcadores de efecto son las respuestas que indican la exposición a un compuesto tóxico y el efecto toxicológico (Fossi et al., 1999).

La lista de biomarcadores utilizados en estudios ecotoxicológicos es muy extensa, por ejemplo actividad de enzimas como la colinesterasa (AChE), la catalasa (CAT), la Atpasa; porfirinas y Mg dependientes y detoxificadoras; respuestas genotóxicas; parámetros hematológicos; respuestas fisiológicas y morfológicas; parámetros endocrinos y expresión de genes relacionados con la detoxificación, entre otros (Casini et al., 2002; Viarengo et al., 2007; Greco et al., 2011). El test de micronúcleos (Mn) y el ensayo cometa (Ec) son ampliamente utilizados en monitoreos ambientales. Este tipo de biomarcadores constituye una alternativa como sistema de señales de alerta temprana del ingreso de plaguicidas a los ecosistemas y permite comprender parte de los efectos adversos a nivel de los organismos. Estas herramientas pueden combinarse con otros ensayos toxicológicos para comprender los efectos y respuestas en los niveles de organización biológicas más complejos (Rigonato et al., 2010; Gagliardi & Pettigrove, 2013).

El test de Mn es un método citogenético empleado para evidenciar daño genético en organismos. Los micronúcleos son pequeños cuerpos que contienen ADN localizados en el citoplasma. La formación de Mn es el resultado de la rotura cromosómica debido a lesiones de ADN no reparadas o mal reparadas, o una inadecuada segregación cromosómica debido a un incorrecto funcionamiento del huso mitótico (Palanikumar & Panneerselvam, 2011). Un aumento en la frecuencia de las células con micronúcleo se considera un daño cromosómico y genómico causado por una diversidad de agentes de diferente naturaleza (físicos o químicos, naturales o de origen antrópico) (Mersch et al., 1996).

Las células con micronúcleo (Mn, Figura 3) presentan un núcleo principal y uno o más núcleos pequeños. Los Mn pueden ser redondos u ovalados y su diámetro debe de ser entre un tercio y un sexto del núcleo principal. Estos deben contar con la misma morfología y textura y observarse en el mismo plano focal que el núcleo principal. El límite de la membrana celular debe de ser distinguible de la del núcleo principal. Al

momento de evaluar la frecuencia de Mn, es necesario identificar anomalías celulares tales como, células necróticas, apoptóticas, binucleadas y brotes nucleares, descritas de forma detallada y operativa por Bolognesi & Fenech (2012).

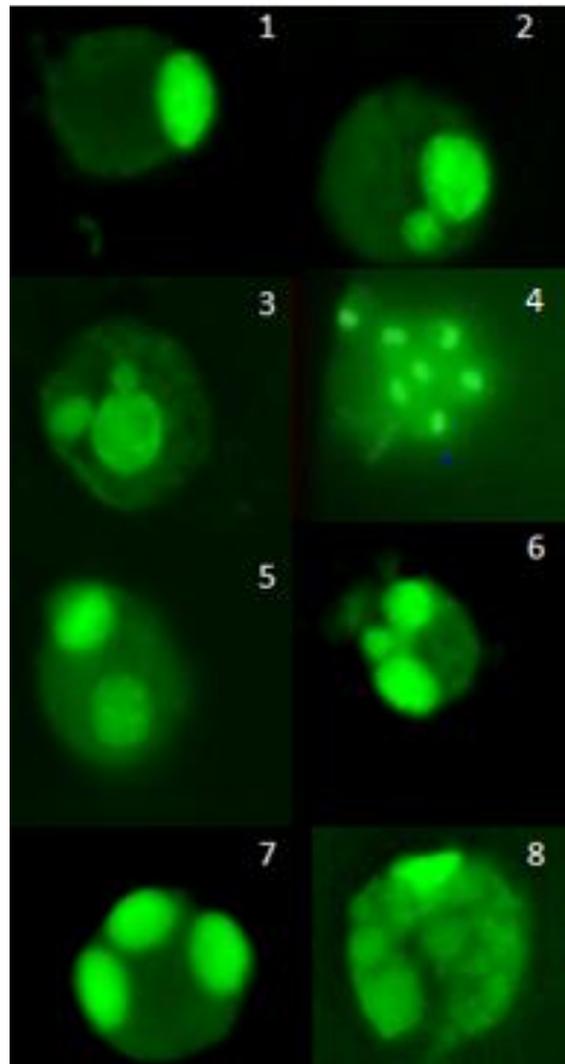


Fig.3. (1) Célula sin daño, (2 y 3) célula con Mn, (4) célula apoptótica, (5) célula binucleada, (6) célula con brotes nucleares, (7) célula con tres núcleos, (8) célula necrótica. Las células fueron teñidas con naranja de acridina y observadas bajo microscopia de fluorescencia. Composición fotográfica captada durante los bioensayos de la presente tesis.

Las células necróticas presentan una muerte prematura. El proceso se inicia con el daño a las membranas celulares u organelos y se puede distinguir observando un citoplasma pálido y vacuolas tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Las células apoptóticas (Figura 3.4) constituye una fase del proceso de muerte celular programado. A nivel nuclear, se observa una condensación de cromatina en el núcleo,

las células apoptóticas tardías muestran fragmentación nuclear y la aparición de pequeños cuerpos nucleares dentro del citoplasma.

Las células binucleadas (Figura 3.5) cuentan con un citoplasma más grande en comparación con las células normales y presentan dos núcleos principales en lugar de un solo núcleo. Estos presentan la misma morfología que la observada en las células normales.

Por último, los brotes nucleares (Figura 3.6) son células que contienen pequeñas estructuras nucleares con una morfología similar a la de Mn pero con la diferencia de que están conectados con el núcleo principal por un puente.

El mayor interés de las pruebas de Mn *in vivo* es su relevancia ecotoxicológica. La frecuencia de Mn observada en un momento dado puede considerarse una respuesta compleja entre la actividad genotóxica y la eficiencia de los mecanismos de defensa fisiológicos, por ejemplo, depuración y/o metabolización de genotóxicos, eliminación de células dañadas, y reparación del ADN (Mersch et al., 1996).

El ensayo cometa (EC) fue desarrollado por Östling & Johanson (1984), posteriormente Singh et al. (1988) modificaron la técnica en condiciones alcalinas (pH > 13). Es una prueba que detecta daños en el ADN inducido por agentes alquilantes, intercalantes u oxidativos. Por lo tanto, es capaz de detectar en células individuales la ruptura de simple y doble cadena en el ADN, eventos de reparación por escisión incompletas, lesiones alcalinos lábiles, daños oxidativos y crosslinks entre ADN-ADN, ADN-proteína.

El EC depende de la relajación del ADN superenrollado en nucleótidos embebidos en agarosa (los cuerpos residuales que quedan después de la lisis de células con detergente y sal), lo que permite que el ADN migre hacia el ánodo bajo electroforesis. La migración va a estar relacionada con el tamaño de la molécula, pequeños fragmentos de ADN migran con mayor velocidad que la matriz nuclear. De esta forma células con el ADN dañado forman imágenes similares a cometas visto bajo microscopía de fluorescencia. La cantidad relativa de ADN en la cola del cometa indica la frecuencia de rotura del mismo (Figura 4). Este ensayo es utilizado para el análisis de microlesiones, presenta ventajas respecto a los métodos citogenéticos por su alta sensibilidad y posibilidad de

evaluarse en células que no se encuentran en división. Dentro de las ventajas también se puede destacar la posibilidad de coleccionar datos a nivel de células individuales, la utilización de muestras pequeñas y su aplicación en casi todas las células eucariotas (Singh et al., 1988; Klaude et al., 1996; Speit & Hartmann, 1999; Dhawan et al., 2009).

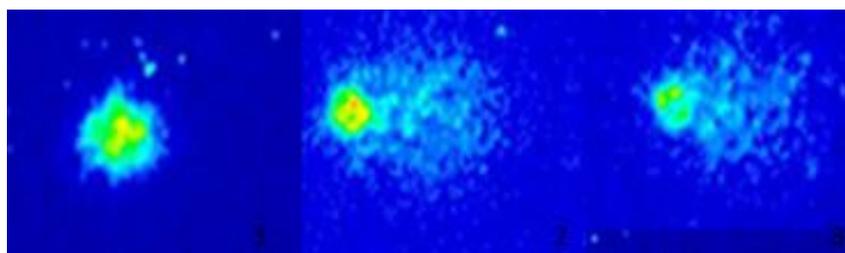


Fig.4. Migración de ADN. Célula sin daño (1), célula con diferente grado de daño (2 y 3). Composición fotográfica captada durante los bioensayos de la presente tesis.

### 1.6 Caso de estudio

La Laguna del Sauce es el principal reservorio de agua destinado para el suministro de agua potable del Departamento de Maldonado, Uruguay, abasteciendo un total de 140.000 personas y a más de 400.000 en temporada estival. Es el único cuerpo de agua del país clasificado como Clase 1 del Decreto 253/79: aguas destinadas o que puedan ser destinadas al abastecimiento de agua potable a poblaciones con tratamiento convencional (Steffen & Inda, 2010).

Actualmente la Laguna del Sauce se encuentra en un proceso de eutrofización acelerada, proceso de incremento en la entrada de nutrientes, generalmente nitrógeno y fósforo. Las respuestas del sistema son básicamente de dos tipos: floraciones microalgales o de cianobacterias y crecimiento no controlado de plantas sumergidas, estos estados pueden alternarse en el tiempo y en el espacio. La predominancia de un estado u otro va a depender de un conjunto de factores tales como el área de incidencia del viento (Crisci et al., 2017), la turbidez del agua, el tiempo de residencia del agua, la presión de consumo sobre los productores primarios (ejercida por especies del zooplancton y bivalvos filtradores). A su vez la construcción de la represa en 1947 aceleró el proceso de eutrofización debido a los efectos en el tiempo de residencia del agua y en la

disminución de la tasa de pérdida o exportación del fitoplancton (Steffen & Inda, 2010; Bianchi et al., 2018).

La presencia de plaguicidas en el sistema Laguna del Sauce es otro de los factores que puede contribuir a la pérdida de servicios ecosistémicos. Los monitoreos realizados periódicamente por OSE-UGD evidencian presencia de Glifosato y AMPA en la matriz agua. En el 2009 se pudo constatar la presencia de Clorpirifós tanto en los tributarios como en la Laguna del Sauce (OSE-UGD, 2014, 2015). Estudios recientes evidenciaron la presencia de residuos de plaguicidas tanto en peces como sedimento (Stábile, 2018). De un total de 51 muestras analizadas para detectar la presencia de plaguicidas en músculo de peces se detectaron 21 muestras con Atrazina, 15 con Metalaxil, 2 con Piraclostrobin y 1 con Espiroxamina. En las muestras analizadas de sedimento se detectaron un total de 7 plaguicidas Atrazina, Azoxystrobin, Hexytilazox, Metalaxil, Metolaclor, Pirimifosmetil y Trifloxystrobin (Stábile, 2018). Del total de plaguicidas encontrados en el sistema Laguna del Sauce (Laguna del Sauce, Laguna del Cisne y Laguna del Potrero), Metolaclor (herbicida, inhibidor de la división celular) fue el único presente en todas las muestras de sedimento analizadas. Por otra parte, se constató Metalaxil (fungicida, inhibidor de la síntesis de ARN) en todas las muestras de músculo de peces analizados. En todos los casos, los niveles observados se ubicaron entre los límites de detección y los de cuantificación de los métodos analíticos (Stábile, 2018).

La evidencia señalada plantea la necesidad de complementar los programas de monitoreo de aguas realizados en la Laguna de Sauce, incorporando biomarcadores en organismos bentónicos para poder determinar la presencia de residuos de plaguicidas. En este contexto, el sistema presenta un conjunto de bivalvos nativos y exóticos que pueden representar interesantes modelos a incorporar en los programas de monitoreo, por ejemplo *Diplodon* spp (nativos), *Corbicula fluminea* y *Limnoperna fortunei* (exóticos).

Actualmente, la Laguna del Sauce cuenta con un programa de monitoreo continuo llevado adelante por el Grupo de Ecología y Rehabilitación de Sistemas Acuáticos CURE-Udelar, OSE – UGD, Ministerio de Ambiente y la Comisión de Cuenca de la Laguna del Sauce. En el mismo se miden los parámetros físico-químicos (temperatura, alcalinidad, pH, conductividad, oxígeno disuelto, turbidez, clorofila a, ficocianina, color del agua,

nitrógeno y fósforo-total y sus formas inorgánicas disueltas) y se colectan muestras para el análisis de la comunidad fitoplanctónica (composición y abundancia). A su vez se extraen muestras de agua bruta para el análisis de glifosato y AMPA de acuerdo a la normativa vigente.

## 2. Objetivos, preguntas e hipótesis

### 2.1 Objetivo general

Desarrollar estrategias de alerta temprana para la detección del ingreso de residuos de plaguicidas e identificación de efectos en la biota de ecosistemas acuáticos continentales.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Detección y cuantificación del daño genético (micronúcleo y ensayo cometa) en experimentos de laboratorio con *Corbicula fluminea* ocasionado por Metolaclor y Metalaxil.
2. Comparar el daño genético observado en laboratorio y en condiciones de campo (sistema de Laguna del Sauce).
3. Diseñar estrategias que permitan incorporar sistemas de alerta temprana en programas de monitoreo y gestión de la Laguna del Sauce.

### 2.3 Preguntas

¿Los efectos observados en *Corbicula fluminea*, a nivel de micronúcleo y ensayo cometa, son provocados por residuos de plaguicidas seleccionados en función de su presencia y distribución en el sistema de Laguna del Sauce?

¿Cuál es la concentración y exposición necesaria para que se evidencien daños a nivel molecular frente a la exposición de plaguicidas considerados?

¿*Corbicula fluminea* y los biomarcadores seleccionados constituyen señales tempranas para evaluar el ingreso de plaguicidas a los ecosistemas acuáticos?

#### 2.4 Hipótesis

1. La presencia de Metolaclor y Metalaxil en agua provoca daños a nivel genético debido a sus modos de acción y su ocurrencia puede ser detectado mediante el test de micronúcleo y ensayo cometa en ejemplares de *Corbicula fluminea*.
2. La Laguna del Sauce y sus tributarios presenta un conjunto de factores (entre ellos residuos de plaguicidas) que provocan daño genético en las poblaciones de *Corbicula fluminea*.
3. La utilización del test de micronúcleos y el ensayo cometa en *Corbicula fluminea* constituye un sistema efectivo de alerta temprana para la detección de ingreso de plaguicidas en ecosistemas acuáticos.

#### 2.5 Predicciones

1. Se observarán diferencias significativas en las respuestas de micronúcleos y el ensayo entre ejemplares sometidos a un gradiente de concentración de Metolaclor y Metalaxil.
2. Existen diferencias significativas en las respuestas relativas de micronúcleos y el ensayo cometa en ejemplares colectados en campo versus ejemplares aclimatados en condiciones de laboratorio (ausencia de contaminantes y condiciones óptimas de alimento, temperatura y fotoperíodo).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Área de estudio

La Laguna del Sauce (34° 43' S, 55° 13' W) se encuentra en el Departamento de Maldonado- Uruguay. El complejo Laguna del Sauce está integrado por tres cuerpos de agua someros conectados: Laguna del Potrero (441 ha), Laguna de los Cisnes (205 ha) y Laguna del Sauce (4050 ha), formando un espejo de agua de 4.696 ha. (Figura 5). Este sistema presenta una profundidad media de 2,5m con máximos de 5m. Los principales tributarios son: Arroyo Pan de Azúcar, Arroyo Sauce, Cañadas Pedregosa y Mallorquina (Mazzeo et al., 2010). Del total de la cuenca, 426 km<sup>2</sup> corresponden a la cuenca del arroyo Pan de Azúcar que ingresa por la Laguna del Potrero, 112 km<sup>2</sup> a la del arroyo del Sauce que ingresa en el subsistema Laguna del Sauce (Steffen & Inda, 2010).

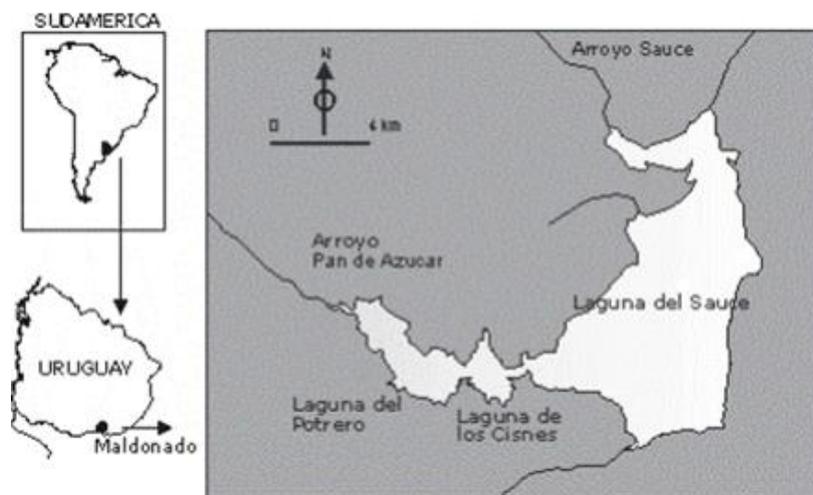


Fig. 5. Ubicación geográfica de la Laguna del Sauce y sus principales tributarios

En el norte de la cuenca la actividad forestal de *Eucalyptus* ha aumentado en las últimas décadas. En el 2018 la plantación forestal abarca un 18,9 % de la cuenca. La Laguna del Sauce recibe aportes de nutrientes de diversos orígenes, uso de fertilizantes en la agricultura, aporte de la ganadería y de efluentes domésticos de centros poblados. El sistema de saneamiento de la ciudad de Pan de Azúcar vierte sus aguas fuera de la cuenca, concretamente al arroyo Tarariras. Sin embargo, una parte de la matriz urbana carece de saneamiento por lo que persisten aportes de la ciudad de Pan de Azúcar y zonas suburbanas al sistema Laguna del Sauce. Dentro de las actividades agrícolas se

destacan los cultivos de secano: soja, trigo, maíz y sorgo. Dentro de la cuenca también hay plantaciones de frutales, tales como arándanos, olivos, vid, etc. (Figura 6) (Steffen & Inda, 2010; Levrini, 2017; Taveira et al., 2018)

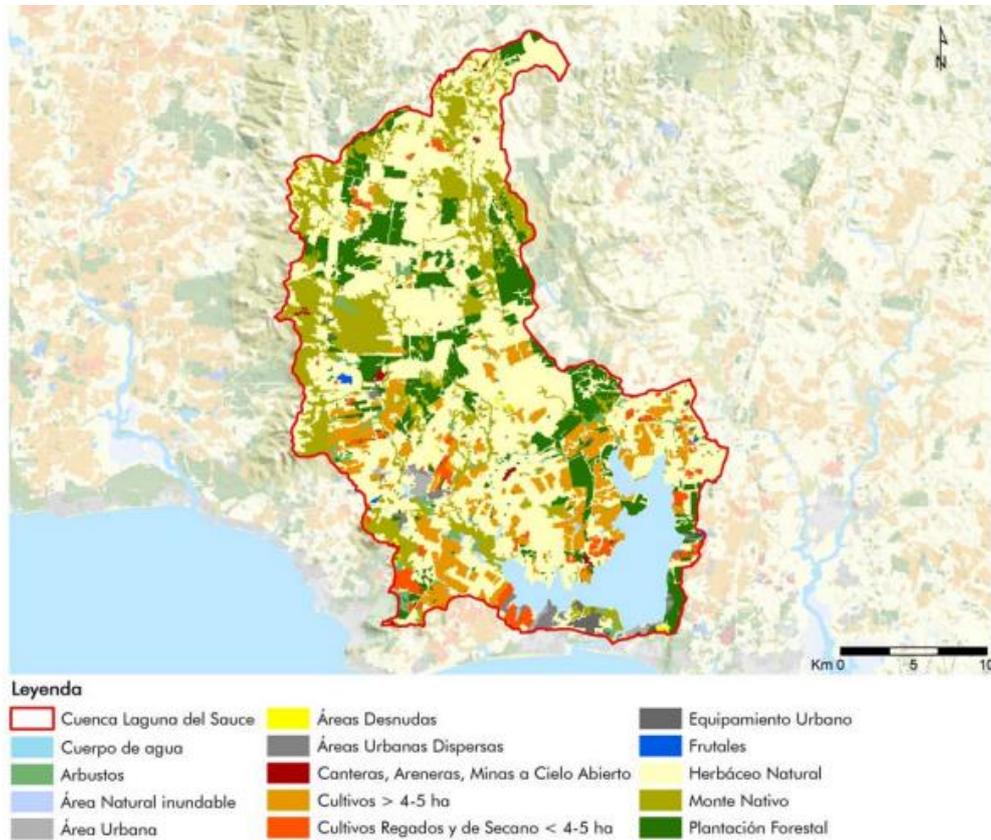


Fig. 6. Cobertura del suelo de la cuenca Laguna del Sauce hasta al 2015 (Taveira, 2018)

### 3.2 Plaguicidas a evaluar (Metolaclor y Metalaxil)

El Metolaclor ( $C_{15}H_{22}ClNO_2$ ) pertenece a la familia química de las cloroacetamidas, es un herbicida pre-emergente selectivo utilizado para varios cultivos tales como maíz, girasol, maní, soja, sorgo, forestales, entre otros. El modo de acción de este herbicida es a través de la inhibición de la división celular en las plantas debido a la interferencia con varias enzimas, actúa sobre el metabolismo de los lípidos, la síntesis de proteínas y la formación de ceras de la cutícula. Existe evidencia de que las cloroacetamidas puede interrumpir en procesos involucrados en el ciclo del carbono (Rose et al., 2016). El Metolaclor se puede perder del suelo a través de la biodegradación, fotodegradación y volatilización. Es bastante móvil, se encuentra principalmente en aguas superficiales ya

que es considerado estable en la interface agua-sedimento y bajo ciertas condiciones puede contaminar aguas subterráneas (Juri et al., 1987), sus principales propiedades se presentan en la Tabla I (Mackay et al., 2006; PPDB).

Tabla I. Principales características de Metolaclor. DT<sub>50</sub> = vida media; LC<sub>50</sub> = concentración letal al 50%; EC<sub>50</sub> = concentración efectiva al 50%. Peces: *Oncorhynchus mykiss*; invertebrados: *Daphnia magna*; plantas: *Lemna gibba*; algas: *Pseudokirchneriella subcapitata* (Mackay et al., 2006; PPDB).

Degradación en suelo DT <sub>50</sub> (días)	Degradación Agua-sed. DT <sub>50</sub> (días)	Degradación Agua DT <sub>50</sub> (días)	Solubilidad en agua (mg l <sup>-1</sup> ) (20 °C)	Coefficiente de partición Octanol-Agua (pH7,20 °C)	Factor de Bio-concentración (l kg <sup>-1</sup> )	Peces Agudo 96hs. LC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Invertebrados Acuáticos. Agudo 48hs. EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Plantas Acuáticas. Agudo 7días. EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Algas Agudo 72hs. EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )
90	365	88	530	3,4	68.8	>3.9	>23.5	>0.043	>57.1
Moderadamente persistente	Estable	Estable	Alto	Alto	Bajo potencial	Moderado	Moderado	Moderado	Bajo

El Metalaxil (C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>) es un fungicida perteneciente al grupo de las fenilamidas usado para controlar las enfermedades de las plantas causadas por oomycetes. El efecto primario de estos compuestos sobre el metabolismo de hongos, se localiza en la inhibición de la síntesis de ARN ribosomal, en la incorporación de uridina en el ARN, por lo tanto, provoca la inhibición específica de la ARN polimerasa-1 (Waxman, 1998; Sukul & Spiteller, 2000). Debido a su amplio espectro, el Metalaxil es utilizado para cultivos de soja, girasol, alfalfa, etc. El Metalaxil y sus metabolitos primarios tienen el potencial de alcanzar las aguas subterráneas (Bottoni & Funari 1992; EPA, 1995). Sus principales propiedades se muestran en la Tabla II (Mackay et al., 2006; PPDB).

Tabla II. Principales características de Metalaxil: DT<sub>50</sub> = vida media; LC<sub>50</sub> = concentración letal al 50%; EC<sub>50</sub> = concentración efectiva al 50%. Peces: *Oncorhynchus mykiss*; invertebrados: *Daphnia magna*; plantas: *Lemna gibba*; algas: *Scenedesmus subspicatus* (Mackay et al., 2006; PPDB).

Degradación en suelo DT <sub>50</sub> (días)	Degradación Agua-sed. DT <sub>50</sub> (días)	Degradación Agua DT <sub>50</sub> (días)	Solubilidad en agua (mg l <sup>-1</sup> ) (20 °C)	Coefficiente de partición Octanol-Agua (pH7,20 °C)	Factor de Bio-concentración (l kg <sup>-1</sup> )	Peces Agudo 96hs. LC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Invertebrados Acuáticos. Agudo 48hs. EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Plantas Acuáticas. Agudo 7días. EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	Algas Agudo 72hs. EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )
36	56	56	8400	1.75	7	0.96	3,74	85	0.42
Moderadamente persistente	Moderado rápido	Estable	Alto	Bajo	Bajo potencial	Moderado	Moderado	Bajo	Moderado

### 3.3 *Corbicula fluminea* (Molusca, Bivalvia, Corbiculidae)

*Corbicula fluminea* es una especie exótica de agua dulce que vive preferentemente en ambientes lóticos. Es de origen Asiático y se extendió masivamente por todo el mundo, durante el siglo pasado fue introducida en Europa en 1980 y en América del Norte a principios del siglo XX (Araujo et al., 1993; GISD, 2015).

Fue citada por primera vez para nuestro país en las costas del río Uruguay en 1979 y desde entonces se observa una rápida y continua dispersión y colonización en ríos, arroyos y lagunas. Actualmente se encuentra distribuida en todas las cuencas del país (Brugnoli et al., 2006; Clavijo et al., 2009).

*Corbicula fluminea* tiene una estrategia de vida tipo r, con un tiempo de vida entre 1 a 4 años, crece rápidamente alcanzando tallas de hasta 3.5 cm (Marroni, 2006). Presenta dos eventos reproductivos al año y ocurre en grandes densidades, es hermafrodita y se autofecunda. Presenta un periodo de incubación corto liberando un gran número de juveniles por año (Sousa et al., 2008).

Los organismos de *Corbicula fluminea* son adecuados para ser utilizados como indicadores biológicos, ya que filtran grandes cantidades de agua proporcionando una oportunidad para concentrar contaminantes disueltos o suspendidos que pueden estar presente en bajas concentraciones en la columna de agua, y que no necesariamente son detectados. También presentan alimentación pedal, capacidad de alimentarse de materia orgánica del sedimento a través de cilios en el pie (Vaughn & Hakenkamp 2001), y pueden concentrar contaminantes presentes en el sedimento. A su vez son capaces de acumular contaminantes en sus tejidos sin experimentar mortalidad (Doherty, 1990).

En la Laguna del Sauce, *Corbicula fluminea* se encuentra principalmente en sectores arenosos con una abundancia promedio de 22 ind/m<sup>2</sup> (García, 2006; Mazzeo et al., 2010). La importancia que presenta evaluar esta especie de bivalvo, radica en la amplia distribución geográfica, alta tasa de filtración, alimentación pedal y fácil manipulación (Marroni et al., 2014).

### 3.4 Colecta de individuos y aclimatación en laboratorio

Se colectaron ejemplares adultos de *Corbicula fluminea* (2,5 y 3 cm) del arroyo Sauce, arroyo Pan de Azúcar y Laguna del Sauce (Figura 7), procurando incluir la mayor diversidad en la población de estudio de acuerdo al conocimiento previo de su distribución espacial. Además, estos sectores fueron previamente incluidos en el relevamiento de plaguicidas realizado por Stábile (2018).



Fig.7. Sitios de colecta de *Corbicula fluminea*.

Los organismos fueron agrupados al azar y mantenidos en laboratorio en múltiples containers, el agua proveniente del sistema de Laguna del Sauce fue sustituida gradualmente con agua declorada hasta llegar a un 100 %. Dicha secuencia resulta clave para la sobrevivencia de los organismos en condiciones de laboratorio. Los cultivos denominados de mantenimiento permanecieron en laboratorio a una temperatura 20° C, en condiciones de saturación de oxígeno y pH neutro, fotoperíodo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y en condiciones de penumbra con malla sombra. Los ejemplares fueron alimentados con fitoplancton palatable (*Monoraphidium griffitti* y *Eutetramorus fotti*) dos veces por semana acompañando por el recambio de agua. Los containers incluyeron arena proveniente de la playa sur de Laguna del Sauce, previamente lavada y quemada (500° C durante 4 horas) para eliminar el contenido de materia orgánica. Durante este periodo se evaluó la condición de los organismos observando la movilidad

de los mismos, extracción de pie y sifones y caminos en la arena que evidencian desplazamiento.

Los cultivos de mantenimiento suministraron los ejemplares incluidos en los bioensayos. Los ejemplares seleccionados para los ensayos contaron con un período de aclimatación mínimo de 30 días, los bioensayos se realizaron en las mismas condiciones ambientales previamente señaladas. En los bioensayos, los ejemplares se dispusieron en peceras con 2 l de agua de clorada, con aireadores y arena (Figura 8).



Fig. 8. Dispositivos utilizados para el mantenimiento de *Corbicula fluminea* en el laboratorio.

### 3.5 Ensayos de laboratorio

#### 3.5.1 Control negativo (CN)

La duración y condiciones de los bioensayos antes indicados contemplaron los aportes de Rigonato et al. (2005, 2010) a efectos de utilizar un protocolo con la mayor estandarización posible (Figura 9). Estos protocolos incluyen un control denominado negativo (ausencia de compuestos citotóxicos, plaguicidas, o factor considerado) y otro denominado positivo, el cual incluye un agente citotóxico conocido. Dicha combinación de controles permite verificar si las condiciones de los cultivos son adecuadas y no existen interferencias de factores externos en los biomarcadores, aparte de los citotóxicos. En los bioensayos se contemplaron seis ejemplares (seleccionados al azar) para cada uno de los controles y concentraciones consideradas, y las respuestas fueron analizadas para cada ejemplar.



Fig. 9.\_Diseño experimental utilizado para el cultivo de *Corbicula fluminea* en condiciones controladas, sin limitación de alimento y en ausencia de residuos de plaguicidas (control negativo).

### 3.5.2 Control Positivo (CP)

Para la generación de un control positivo, individuos aclimatados a las condiciones de laboratorio (ver punto anterior) fueron expuestos a peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrogeno es un agente genotóxico capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir daño celular (Mitchelmore et al., 1998). Es un compuesto comúnmente utilizado como modelo de estudio para evidenciar daño genético y como controles positivos para estudios genotóxicos (Bienert et al., 2006; Prochazka et al., 2012; Sotil et al., 2013).

Se expusieron a los organismos de *Corbicula fluminea* a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ): 100  $\mu M$ , 250  $\mu M$ , 500  $\mu M$  y 1000  $\mu M$  durante 24 hs en peceras de 2 l con agua declorada y arena previamente quemada como se describió anteriormente. Para cada concentración se utilizaron 6 individuos ( $n=24$ ). Tanto al inicio como al final del experimento se cuantificó la concentración de  $H_2O_2$  con espectrofotómetro a 230 nm. Para determinar la concentración del  $H_2O_2$  hay que tener en cuenta que 0.79 absorbancia es igual al 11,12 mM.

Por último, se evaluó la viabilidad celular ( $\geq 90\%$ ) para todas las concentraciones de  $H_2O_2$ , se procedió a teñir hemolinfa con triple coloración: 10  $\mu l$  de fluorescein diacetate (FDA),

12,5 µl de Hoetch 33342 (Ho) y 5 µl de ioduro de propidio (IP) por 5 min a 37°C. FDA tiñe de verde las células viables, (Ho) es un colorante supra vital y tiñe las células apoptóticas de azul, mientras que IP tiñe de rojo las células necróticas. Las células fueron observadas bajo microscopia de fluorescencia (De Santis et al., 2001). El ajuste de la concentración del control positivo contempló solamente Mn ya que el Ec suele ser igual o más sensible (He et al., 2000).

### 3.5.3 Metolaclor

Las concentraciones analizadas fueron seleccionadas luego de varios ensayos de ajuste que permitieron escoger el rango finalmente considerado de acuerdo al gradiente de respuestas observado, la información ecotoxicológica existente y las concentraciones observadas en Laguna del Sauce. En simples términos, se incluyó las concentraciones más bajas y altas posibles donde se constata el mayor gradiente de respuestas observado. Es importante recordar que superado cierto nivel de peróxido o concentración de plaguicidas analizados resulta imposible cuantificar adecuadamente los efectos a nivel de los biomarcadores considerados, ya que se pueden romper las membranas celulares e imposibilita la cuantificación de las mismas.

Para evaluar las concentraciones de Metolaclor se expusieron los organismos de *Corbicula fluminea* a las siguientes concentraciones: 0,025 µg/l, 0,05 µg/l, 0,1 µg/l, 0,2 µg/l. Además, y de forma simultánea se corrieron los controles positivos (CP) y negativos (CN), para cada tratamiento se utilizaron 6 individuos (n= 36).

### 3.5.4 Metalaxil

Siguiendo con el mismo procedimiento que se realizó con Metolaclor, para evaluar las concentraciones de Metalaxil, se expusieron los organismos de *Corbicula fluminea* a las siguientes concentraciones: 0,0125 µg/l, 0,025 µg/l, 0,05 µg/l, 0,1 µg/l, 0,2 µg/l considerando al gradiente de respuestas observado en varios ensayos exploratorios previos. Además, se contó con CP y CN de forma simultánea. Para cada tratamiento se utilizaron 6 individuos (n= 42).

## 3.6 Micronúcleos y anomalías nucleares

Se evaluó la frecuencia de Mn siguiendo el procedimiento descrito por Villela et al. (2013). Se extrajo hemolinfa del musculo aductor posterior de cada bivalvo mediante

una jeringa hipodérmica de calibre 21 G previamente enjuagada con EDTA (10 Mm). Luego de la extracción de hemolinfa los organismos fueron inmediatamente eutanasiados con alcohol 75%. Luego de la extracción de hemolinfa, ésta fue fijada con citrato de sodio al 1% por 5 minutos y formaldehído al 4% por 10 minutos. Por último, la hemolinfa fue centrifugada por 8 min a 1000 rpm.

El sobrenadante fue extraído, para las células que no fueron expuestas a plaguicidas se llevó con citrato de sodio 1% a 1 ml y para las expuestas a plaguicidas a 0,5 ml. Para llegar a estas diluciones las células fueron contadas en cámara Neubauer hasta lograr un número óptimo de células por preparado. Luego la hemolinfa fue homogenizada con pipeta Pauster mediante burbujeo para no dañar a las células. Se colocaron 2 gotas del preparado en un portaobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 hs.

Previamente los portaobjetos fueron colocados en agua destilada y llevados a la heladera hasta que quedaran fríos, esto permite que la muestra se esparza con mayor facilidad en el mismo, y evitando que se rompan las membranas celulares, en especial las membranas celulares de los organismos que fueron expuestos a plaguicidas.

Finalmente, las muestras fueron teñidas con naranja de acridina 15 µg/ml y observadas al microscopio de fluorescencia Zeiss Mot II.

Mil células fueron contadas en cada preparado, solo células con membrana celular intacta y núcleo distintivo fueron registradas. Dentro de la hemolinfa se distingue dos tipos celulares: granulares y agranulares, estas se distinguen unas de otras básicamente por la forma y tamaño de la célula, posición el núcleo y presencia de estructuras granulares en el citoplasma. Las células granulares presentan un diámetro de 8-12 µm, una baja relación núcleo/citoplasma y se caracteriza por un alto número de estructuras granulares en el citoplasma. Mientras que las células agranulares son más pequeñas 3-4 µm, presentan una alta relación núcleo/citoplasma y no presentan estructuras granulares en el citoplasma. Solo las células agranulares fueron consideradas para el conteo de micronúcleos y otras anomalías celulares tales como células necróticas, apoptóticas, binucleadas y brotes nucleares (Bolognesi & Fenech, 2012)

### 3.7 Ensayo cometa

El procedimiento del ensayo cometa fue adaptado de Villela et al. (2006). Se extrajo hemolinfa del músculo aductor posterior de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente y llevadas al mismo volumen con citrato al 1%. Luego fueron centrifugadas a 1000 rpm por 10 min. Se extrajo el sobrenadante y se tomaron 10 µl de hemolinfa y se homogenizaron con 90 µl de agarosa de bajo punto de fusión 0,75% (w/v). Luego se colocaron los 100 µl en un portaobjeto previamente recubierto con agarosa de punto de fusión normal al 1,5 % (w/v). Enseguida se le colocó en cubre objetos y fue llevado a heladera 4 °C durante 15 minutos, o hasta que la agarosa solidifique.

Luego que la agarosa solidificó se le quitó el cubreobjeto y fueron colocados en solución de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH= 10) 1% Triton X-100 y 20% DMSO.

Los cubreobjetos se mantuvieron en la solución de lisis a 4° C de 1 a 3 hs. Luego de terminar la incubación de los portaobjetos en la solución de lisis, fueron lavados con PBS 1X durante 5 minutos e incubados en solución de buffer (300mM NaOH, 1mM EDTA) durante 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo la electroforesis fue realizada con el mismo buffer por 15 minutos a 270 mA y 12 V. Estos procedimientos fueron llevados a cabo bajo luz amarilla indirecta para no dañar el ADN. Una vez terminada la corrida electroforética los cubreobjetos fueron lavados con buffer de neutralización (Tris 400 mM), tres veces durante 5 minutos. Por último, se procedió a teñir las muestras con 20 µl de bromuro de etidio y observadas bajo microscopio de epifluorescencia Zeiss Mot II.

Se contabilizaron 100 células por preparado, se analizaron 6 preparados por concentración y el daño genético fue medido mediante el software Comet Imager de MetaSystems (Alemania). El sistema de software brinda una medida de ADN conocida como Tail moment Olive. Este parámetro representa el porcentaje de ADN total de la cola del cometa y se estima como la distancia entre el centro de la media de la cabeza del cometa y la media de la cola del cometa [Tail moment Olive = (media de la cola-media de la cabeza) x %de ADN en la cola del cometa]. Las muestras que no se pudieron ver en el día fueron mantenidas en cámara húmeda, para ser observadas posteriormente.

### 3.8 Comparación de organismos en condiciones de campo vs organismos en condiciones de laboratorio

Se comparó el daño genético que presentaban los organismos de poblaciones provenientes del subsistema Laguna del Sauce y sus dos principales tributarios (A° Pan de Azúcar y A° Sauce) contra el daño que presentaban los organismos en laboratorio y mantenidos en condiciones controladas (aclimatación).

Los individuos fueron colectados y transportados con agua del lugar al laboratorio para la extracción de hemolinfa. La extracción de la misma fue antes de las 24 hs. Para cada sitio se extrajo hemolinfa de 6 individuos, contabilizando un total de 6000 células para el test de Mn y 600 para el ensayo cometa. La comparación de los análisis de Ec entre individuos en condiciones de campo y cultivados en laboratorio se realizó sobre una base de 500 células analizadas.

### 3.9 Análisis de datos

Para evaluar las diferencias entre tratamientos se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA). La normalidad fue evaluada mediante el test de Shapiro-Wilk (1965) y la homocedasticidad fue analizada mediante test de Levene (1960). Cuando se constató el cumplimiento de los supuestos, se realizó test de Student y ANOVA de una vía y como post-hoc el test de Tukey (Zar, 1999) para ver diferencias significativas entre los tratamientos. Todos los análisis se realizaron en el software libre "PAST" (Hammer et al., 2001).

## 4. Resultados

El nivel basal de daño genético de los individuos aclimatados en laboratorio presentó una disminución significativa en frecuencia de Mn ( $F_{(1,33)}=23,73$ ,  $p < 0,05$ ) y la frecuencia de anomalías ( $F_{(1,33)}=30,62$ ,  $p < 0,05$ ) con ejemplares colectados en condiciones de campo (en los mismos sitios de colecta y sin aclimatación en laboratorio; Figura 10 A, B.) A la hora de evaluar el daño genético con el Ec los individuos de laboratorio también presentaron diferencias significativas con respecto aquellos en condiciones de campo ( $F_{(1,27)}=6,1$ ,  $p=0,01$ ; Figura 10 C).

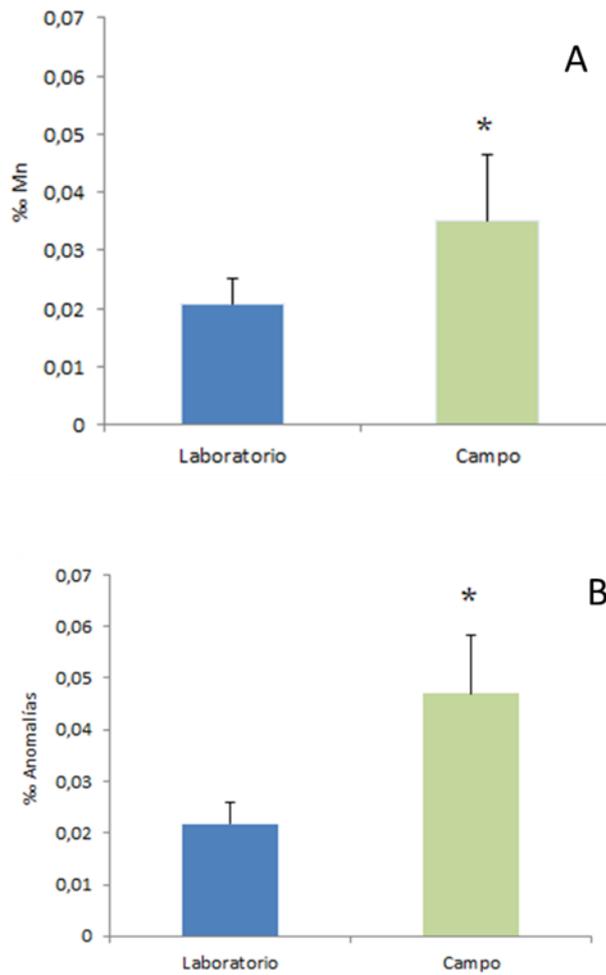


Fig. 10. A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea* \* ( $F_{(1,33)}=23,73$ ,  $p < 0,05$ ). B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea* en condiciones de laboratorio versus condiciones de campo \* ( $F_{(1,33)}=30,62$ ,  $p < 0,05$ ). Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

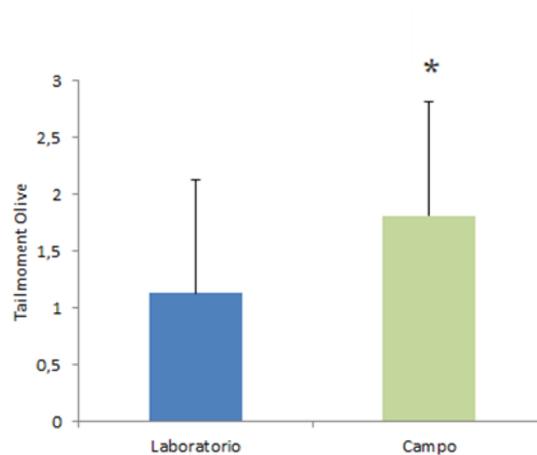


Fig. 10. C Daño de ADN sobre un total de 100 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea* en condiciones de laboratorio versus condiciones de campo \* ( $F_{(1,27)}=6,1$ ,  $p=0,01$ ). Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

#### 4.1 Control positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La exposición de *Corbicula fluminea* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evidenció diferencias significativas en la frecuencia de Mn a partir de 250 µM con respecto al control negativo ( $F_{(4,21)}=13,3$ ,  $p < 0,05$ ). Para las concentraciones más elevadas 500 µM y 1000 µM también se constataron diferencias significativas con respecto al CN, sin embargo, hay una disminución en la frecuencia de Mn si se compara con la exposición a 250 µM. Para la concentración 1000 µM no se pudo contabilizar 1000 células para todos los preparados ya que las células presentaban las membranas rotas. En varios preparados se registró una frecuencia de Mn igual o menor que en el CN lo cual se interpretó que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a esa concentración produce un efecto citotóxico (Figura 11 A).

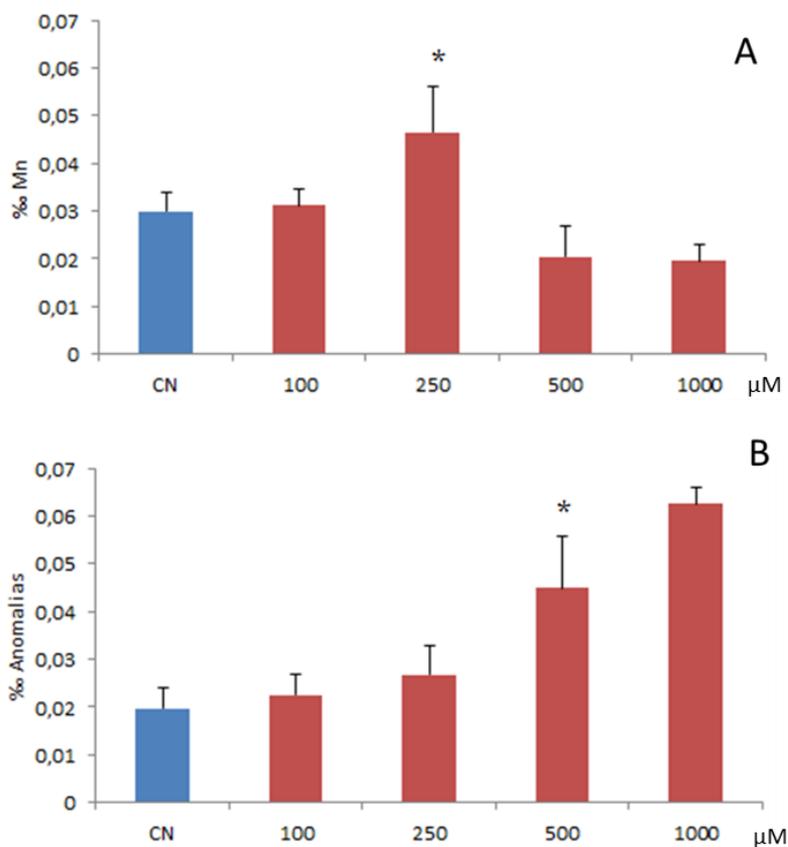


Fig. 11. A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*.  $*(F_{(5,30)} = 55,49, p < 0,05)$  B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea* expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (CN) control negativo  $*(F_{(5,30)} = 64,26, p < 0,05)$ . Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

Al momento de evaluar el total de anomalías a media que aumentaba la concentración, incrementaba el daño, encontrando diferencias significativas con el CN a partir de 500  $\mu\text{M}$ , ( $F_{(4,21)} = 24,21$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 11 B).

#### 4.2 Metolaclor

La exposición a Metolaclor para *Corbicula fluminea* evaluada con el test de Mn generó diferencias significativas a partir de la concentración más baja (0,025  $\mu\text{g/l}$ ) analizada con respecto al CN ( $F_{(5,30)} = 55,49$ ,  $p < 0,05$ ). A pesar de que todas las concentraciones presentan diferencias significativas con CN, a partir de 0,2  $\mu\text{g/l}$  comienza a disminuir la frecuencia de Mn con respecto a 0,1  $\mu\text{g/l}$ . Al momento de evaluar el total de anomalías se comienza a evidenciar diferencias significativas a partir de 0,05  $\mu\text{g/l}$  ( $F_{(5,30)} = 64,26$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 12).

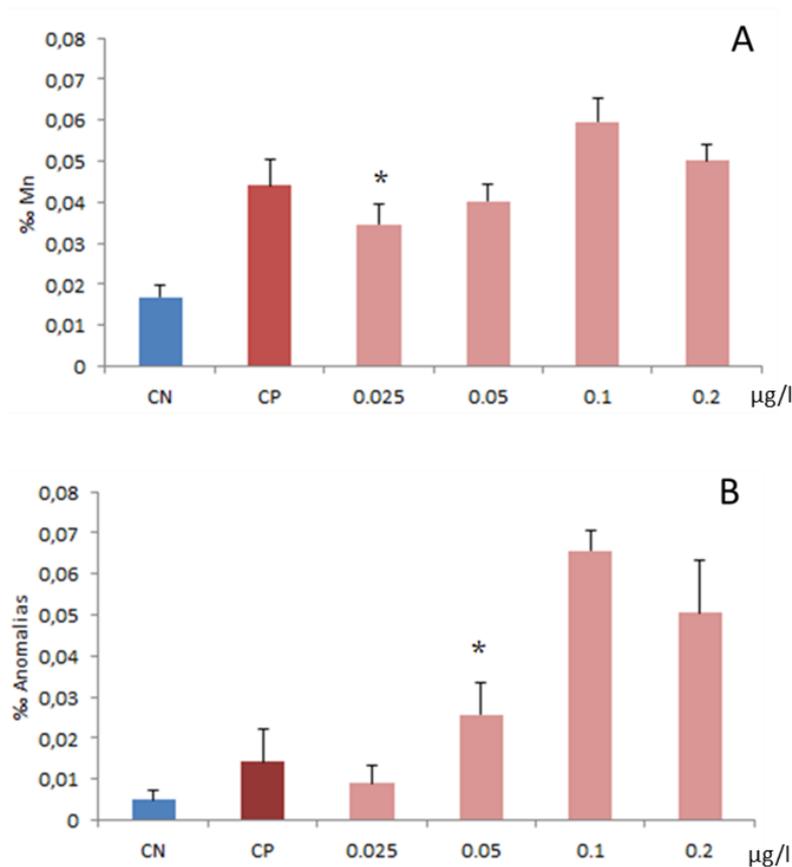


Fig. 12. A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea* ( $F_{(5,30)} = 55,49$ ,  $p < 0,05$ ). B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea* expuestos a Metolaclor. (CN) control negativo, (CP) control positivo ( $F_{(5,30)} = 64,26$ ,  $p < 0,05$ ). Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

A diferencia del test de Mn, el ensayo cometa demostró diferencias significativas respecto al CN a partir de 0,1 µg/l ( $F_{(5,30)} = 19,6$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 13).

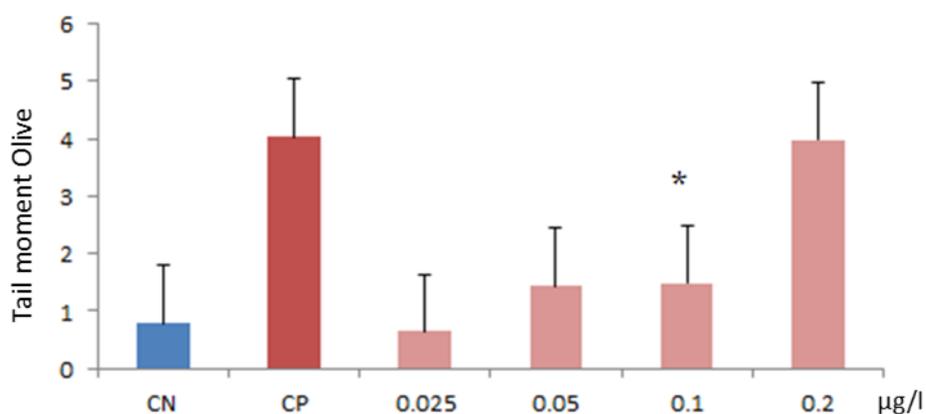


Fig. 13. Daño de ADN sobre un total de 100 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea* expuestos a Metolaclor. (CN) control negativo, (CP) control positivo ( $F_{(5,30)} = 19,6$ ,  $p < 0,05$ ). Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

#### 4.3 Metalaxil

La exposición a Metalaxil para *Corbicula fluminea* evaluada con el test de Mn presentó diferencias significativas a partir de la concentración más baja 0,0125 µg/l ( $F_{(6,35)} = 51,79$ ,  $p < 0,05$ ) con relación al CN. A pesar de que todas las concentraciones presentan diferencias significativas con el CN, mientras a partir de 0,1 µg/l comienza a disminuir la frecuencia de Mn y no se evidencia diferencia significativa con las concentraciones más bajas (0,0125 µg/l y 0,025 µg/l). La frecuencia de anomalías presentó el mismo patrón que la frecuencia de Mn, constatándose diferencias significativas con todas las concentraciones evaluadas ( $F_{(6,35)} = 16,87$ ,  $p < 0,05$ ). A partir de 0,1 µg/l la frecuencia de anomalías comienza a disminuir y no se evidencia diferencias significativas con las concentraciones más bajas (0,0125 µg/l y 0,025 µg/l; Figura 14).

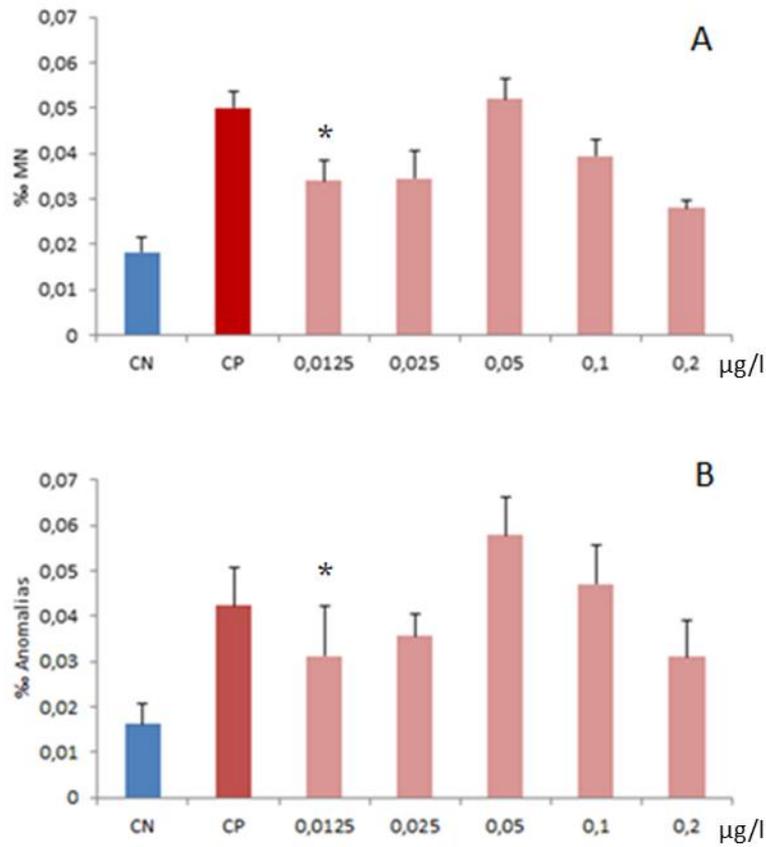


Fig. 14. A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea* ( $F_{(6,35)} = 51,79$   $p < 0,05$ ). B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea* expuestos a Metalaxil ( $F_{(6,35)} = 16,87$ ,  $p < 0,05$ ). (CN) control negativo, (CP) control positivo. Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

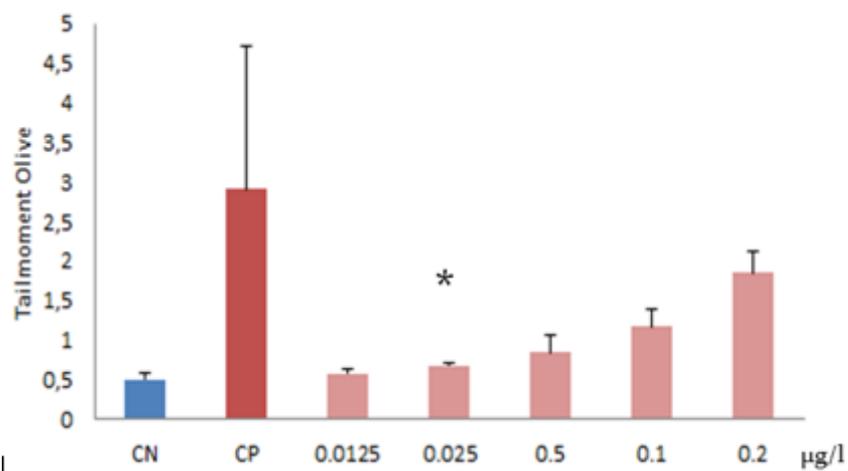


Fig. 15. Daño de ADN sobre un total de 100 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea* expuestos a metalaxil. (CN) control negativo, (CP) control positivo ( $F_{(6,35)} = 16,87$ ,  $p < 0,05$ ). Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

A la hora de evaluar el daño genético producido por Metalaxil con el ensayo cometa se encontraron diferencias significativas a partir de 0,025  $\mu\text{g/l}$  ( $F_{(6,35)}=92,6$   $p < 0,05$ ; Figura 15).

#### 4.4 Heterogeneidad espacial de los efectos observados en condiciones de campo

Al momento de evaluar el daño genético que presentaban los organismos de la Laguna del Sauce, se evidenció que los mismos presentaban un mayor daño en el ADN que los ejemplares aclimatados en el laboratorio. El test de Mn registró diferencias significativas tanto en la frecuencia de Mn como en la frecuencia de anomalías, al comparar el daño de los individuos de campo vs los aclimatados ( $F_{(1,9)}= 33,91$ ,  $p<0,05$  ,  $F_{(1,9)}= 13,8$ ,  $p<0,05$ , respectivamente; Figura 16).

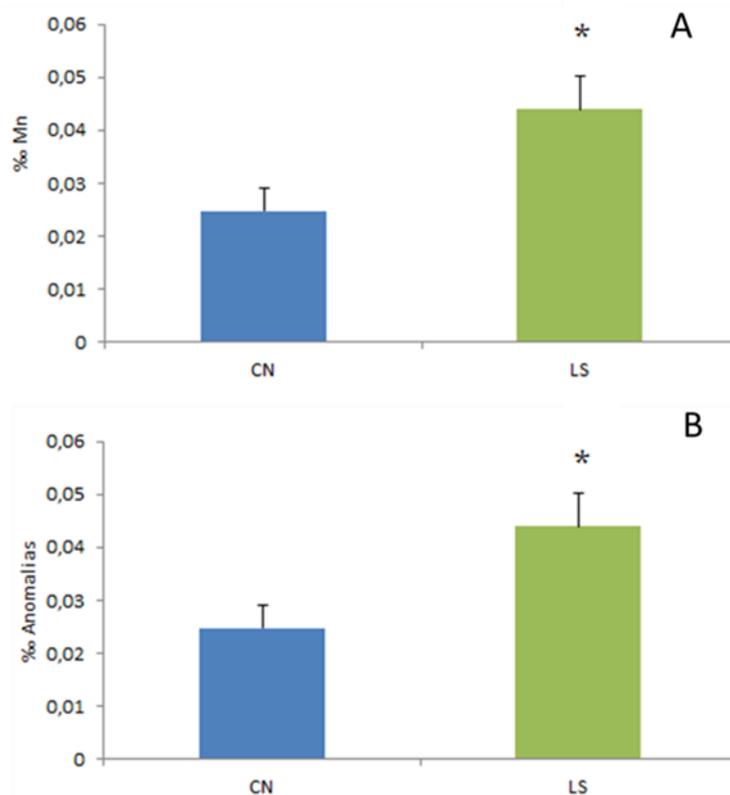


Fig. 16. A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*\* ( $F_{(1,9)}= 33,91$ ,  $p<0,05$ ). B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea*. (CN) control negativo, (LS) individuos obtenidos en Laguna del Sauce\* ( $F_{(1,9)}= 13,8$ ,  $p<0,05$ ). Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

Sin embargo, al momento de evaluar el daño genético con el ensayo cometa no se observaron diferencias entre los organismos analizados del control negativo y de la Laguna del Sauce (Figura 17).

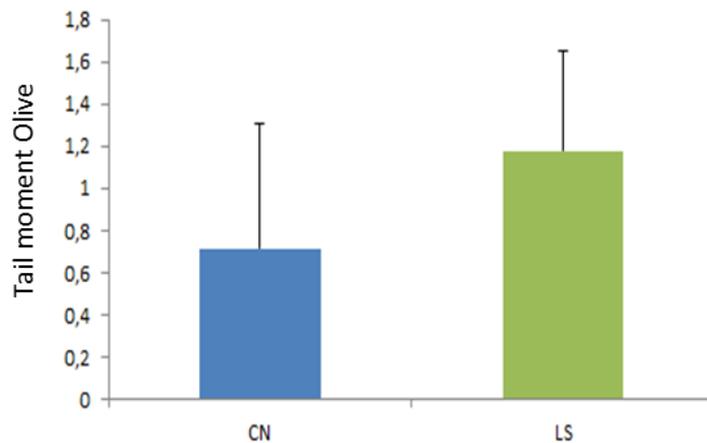


Fig. 17. Daño de ADN sobre un total de 100 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*. (CN) control negativo, (LS) individuos obtenidos en Laguna de Sauce. Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

A diferencia de los organismos colectados en la Laguna del Sauce, los organismos pertenecientes al arroyo Sauce, no presentaron diferencias significativas para Mn y Ec con respecto a los organismos previamente aclimatados (Figura 18 y Figura 19).

Al momento de evaluar el daño que presentaban los individuos colectados en el arroyo Pan de Azúcar, la frecuencia de Mn presentó diferencias significativas con los individuos aclimatados ( $F_{(1,10)}=179,6$ ,  $p<<0,05$ ) Este mismo patrón se observó con la frecuencia de anomalías ( $F_{(1,10)}=564,1$ ,  $p<<0,05$ ) (Figura 20). El ensayo cometa al igual que el test de Mn registró un mayor daño en el ADN en los organismos colectados en campo que los aclimatados ( $F_{(1,10)}=11,6$ ,  $p<<0,05$ ; Figura 21).

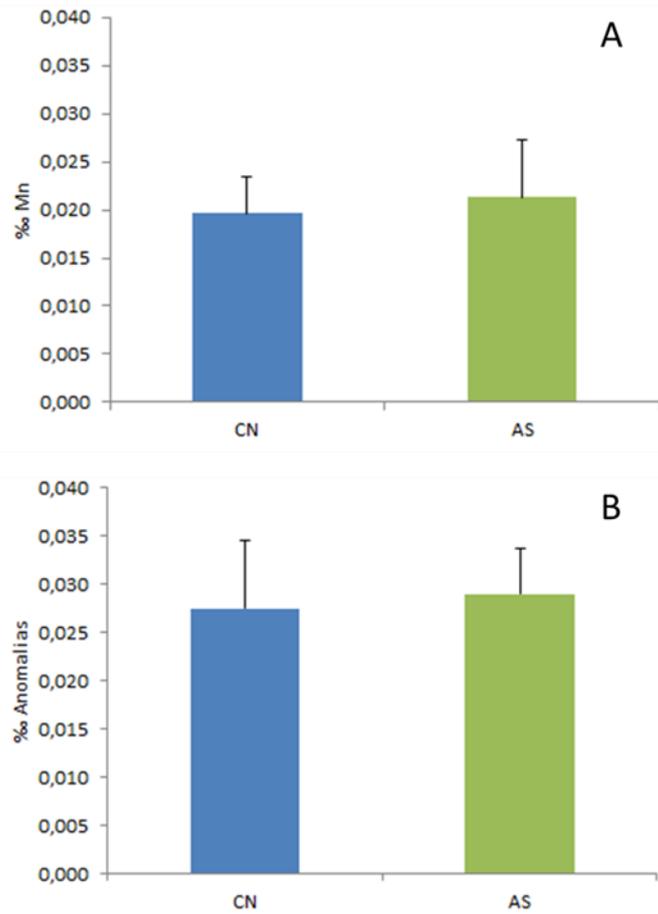


Fig. 18. A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*. B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea*. (CN) control negativo, (LA) individuos obtenidos en el A° Sauce. Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

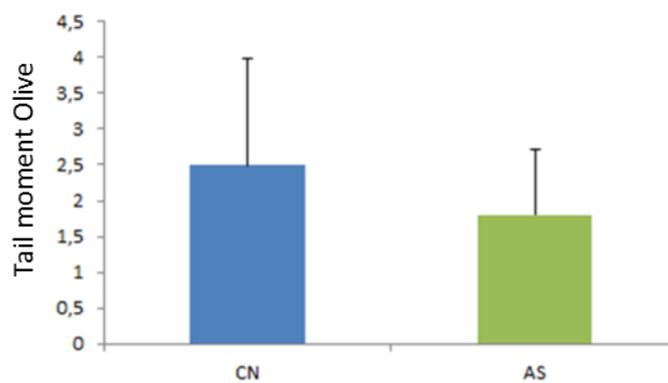


Fig. 19. Daño de ADN sobre un total de 100 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*. (CN) control negativo, (AS) individuos obtenidos en el A° Sauce. Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

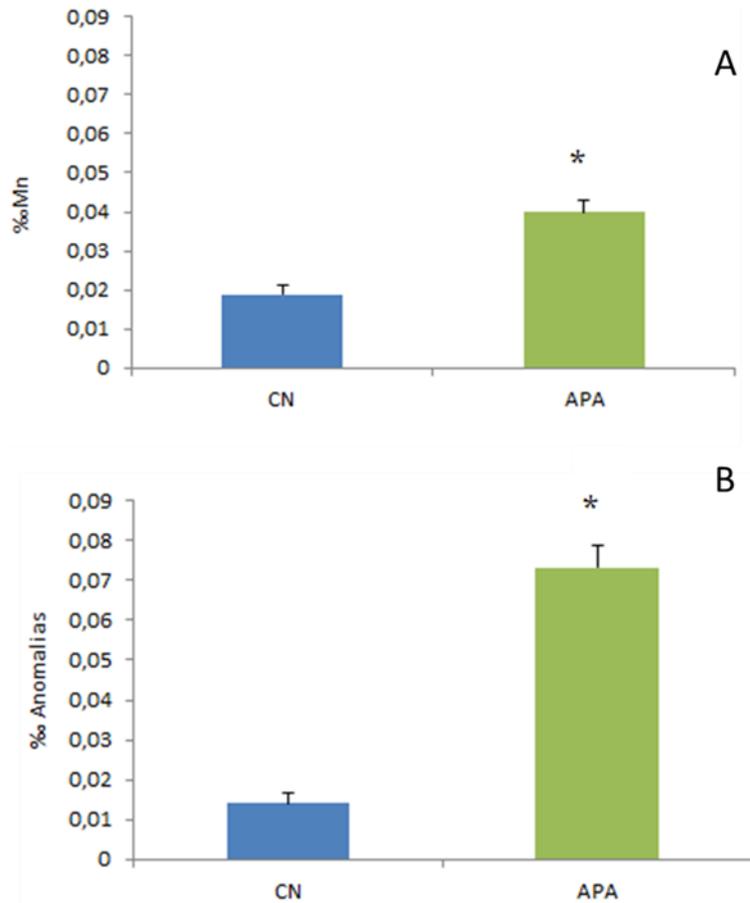


Fig. 20 A: Frecuencia de micronúcleos sobre un total de 1000 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*  $*(F_{(1,10)}=179,6 p < 0,05)$ . B: Frecuencia de anomalías en hemolinfa de *C. fluminea*. (CN) control negativo, (APA) individuos obtenidos en el A° Pan de Azúcar  $*(F_{(1,10)}=564,1 p < 0,05)$ . Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

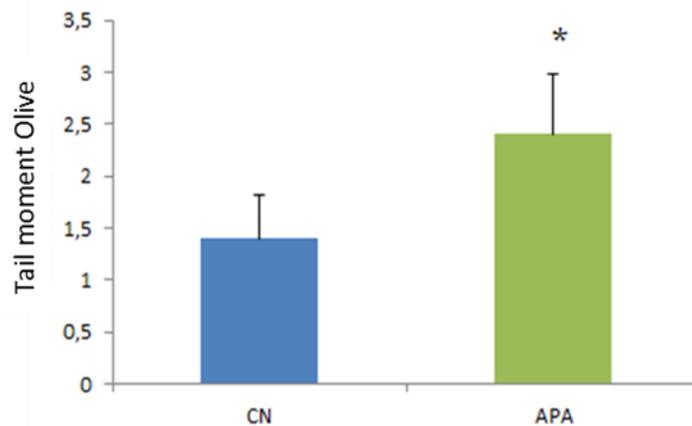


Fig. 21. Daño de ADN sobre un total de 100 células analizadas en hemolinfa de *C. fluminea*. (CN) control negativo, (APA) Arroyo Pan de Azúcar  $(F_{(1,10)}=11,6, p < 0,05)$ . Las gráficas indican los valores medios y el desvío estándar.

## 5. Discusión

Los resultados de la presente tesis confirman experimentalmente la ocurrencia de daño genético en *Corbicula fluminea* provocado por Metolalclor y Metalaxil en concentraciones próximas a los límite de cuantificación de técnicas analíticas de última generación (LC- MS/MS y GC-MS). Stábile (2018) ha demostrado el ingreso de diversos residuos de plaguicidas en el sistema de Laguna del Sauce en matrices que bioacumulan estos compuestos químicos (peces y sedimento), en concentraciones ubicadas entre los límites de detección y cuantificación. Entre ellos los dos plaguicidas considerados en la presente tesis. Las capacidades de análisis químico instaladas en el Uruguay en los últimos años han permitido evaluar la presencia de residuos de plaguicidas en concentraciones muy bajas, 0,008 µg/l para Metolalclor y Metalaxil, del orden de partes por trillón (ppt) en matriz agua, y partes por billón (ppb) en matriz sedimento y peces.

Los resultados confirman la sensibilidad de bivalvos a daños en el ADN causados por la exposición a residuos de plaguicidas reportados en la literatura (Villela et al., 2006; Villela et al., 2007; Lummato et al., 2013). De acuerdo a los resultados indicados y considerando atributos del ciclo de vida de *Corbicula fluminea*, así como la facilidad para su cultivo en condiciones de laboratorio o la implementación de experimentos en laboratorio o condiciones de campo, la almeja asiática constituye un excelente potencial para ser utilizado en monitoreos ambientales focalizados en evaluar el ingreso de los plaguicidas a cuerpos de agua. En este sentido, el test de micronúcleos y el ensayo cometa constituyen buenos indicadores para evaluar daño genético en la hemolinfa de los bivalvos (Fedato et al., 2010).

### 5.1 Patrones observados: causas y efectos

De acuerdo con los resultados, 30 días de cultivo en laboratorio constituye un plazo de tiempo adecuado para que los individuos disminuyan el daño genético observado en condiciones de campo, factor clave para el desarrollo de los bioensayos implementados (condición fundamental para controles negativos robustos). Este lapso de tiempo podría ser menor, aspecto que resulta relevante profundizar, tanto desde el punto de vista de los mecanismos de detoxificación y resiliencia de los organismos como desde la

perspectiva de los programas monitoreo (este último punto se desarrolla en profundidad más adelante).

En general, se recomienda la utilización de los dos marcadores considerados ya que presentaron diferentes sensibilidades al momento de evidenciar los efectos generados por los plaguicidas estudiados. Aunque se plantea de forma general que el Ec es igual o más sensible en la evaluación de la genotoxicidad que el ensayo de Mn, en determinados casos este patrón no se observa (Klobucar et al., 2003). Esta afirmación concuerda con los resultados aquí presentados, los organismos que fueron expuestos a Metolaclor registraron diferencias significativas con el control negativo a partir de 0,025 µg/l con Mn y 0,05 µg/l evaluado con Ec. Mientras que los organismos expuestos a Metalaxil se observaron diferencias significativas con el control negativo a partir de 0,0125 µg/l mediante Mn y 0,025 µg/l evaluado con Ec. El tiempo de la duración de los bioensayos, en este caso 24 horas, puede condicionar el patrón observado. El Ec detecta lesiones de ADN reparables, por lo tanto reversibles (sitios lábiles alcalinos, daño en el ADN en una sola cadena), mientras que el Mn detecta lesiones de ADN más persistentes o lesiones que no pueden ser reparadas (Klobucar et al., 2003). Por otra parte, los organismos expuestos al Metolaclor (evaluados con test de Mn) mostraron una reducción en la frecuencia de Mn y anomalías a partir de 0,2 µg/l, para el Metalaxil a partir de 0,1 µg/l. Es muy probable que esta reducción se deba a un efecto clastogénico que retasaría o detendría la división de células dañadas (Wrisberg et al., 1992), por lo que las respuestas evaluadas disminuyen al incrementar la concentración generando un patrón no lineal de respuestas en el gradiente de concentraciones ensayadas.

Al momento de evaluar el daño genético en hemolinfa de *Corbicula fluminea* en condiciones de campo y los aclimatados en laboratorio, se observó una diferencia significativa entre los organismos obtenidos en el subsistema Laguna del Sauce y el arroyo Pan de Azúcar en comparación con los aclimatados. Contrariamente, los individuos obtenidos en el arroyo Sauce no presentaron daño en comparación con los organismos detoxificados. Las disimilaridades entre los subsistemas considerados pueden asociarse a las diferencias en el tamaño de las subcuencas de los tributarios considerados, así como en el ensamble de las actividades productivas (profundizar usos

productivos en Levrini, 2017; Taveira et al., 2018; Ferrari et al., 2019). En este contexto, es probable que cada subcuenca (arroyo Pan de Azúcar y Sauce) reciba diferentes combinaciones de aportes y xenobióticos, y por consiguiente se observen diferencias en el espacio.

Los biomarcadores considerados indican la presencia de agentes que provocan daño genético (de origen natural o antrópico). Los efectos observados en condiciones de campo pueden estar asociados a un conjunto de compuestos tóxicos, aspecto fundamental para interpretar los resultados. En el caso de los experimentos diseñados, queda confirmado que tanto el Metolaclor como el Metalaxil provocan daño a nivel genético a partir de las concentraciones de 0,025 µg/l y 0,0125 µg/l, respectivamente. Respuestas esperadas de acuerdo a los modos de acción de ambos compuestos. Sin embargo, el daño observado en condiciones de campo no puede ser asignado exclusivamente a los plaguicidas testeados, ya que pueden ocurrir otros agentes en la naturaleza que determinen las alteraciones genéticas observadas en condiciones de campo.

La evidencia experimental concuerda con Mitchelmore et al. (1998), quienes establecen que los biomarcadores contemplados (Mn y Ec) resultan ventajosos como alerta temprana para la detección del ingreso de plaguicidas en cuerpos de agua, así como para explorar los efectos biológicos.

## 5.2 Implicancias en el diseño sistemas de alerta temprana en programa de monitoreo de calidad de agua

Es importante recordar que los programas de monitoreo actuales de fuentes de agua potable analizan la presencia de residuos de plaguicidas en la columna de agua en dos épocas del año, no necesariamente vinculadas a los regímenes de aplicación y de precipitaciones. Una forma de contar con sistemas más robustos de monitoreo es implementar la detección de residuos en matrices acumuladoras (bióticas y no bióticas) al inicio y final de cada ciclo productivo (Pérez-Parada et al., 2018; Stábile 2018; Ernst et al., 2018; Griffiero et al., 2019; Soutullo et al., 2020).

Complementar las estrategias de detección y cuantificación de residuos de plaguicidas antes indicadas (ver Stábile 2018), con las aproximaciones analizadas en la presente tesis permite profundizar en varios aspectos claves. A modo de ejemplo, orienta la búsqueda de residuos de plaguicidas a partir de efectos observados en condiciones de campo; si residuos de plaguicidas detectados analíticamente producen efectos en los sistemas biológicos o no; o como se pueden modificar aspectos fundamentales de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas y por tanto la provisión de servicios ecosistémicos.

Utilizar exclusivamente la matriz agua en la normativa de contralor de plaguicidas en fuentes de agua potable, resulta inadecuado ya que pueden ser detectados analíticamente en períodos muy acotados de tiempo, patrón totalmente dependiente del régimen de aplicaciones y precipitaciones. Por otra parte, las características fisicoquímicas de los plaguicidas pueden condicionar una mayor afinidad por matrices diferentes al agua (Mackay et al., 2006). El uso de matrices acumuladoras o dispositivos artificiales (membranas) de acumulación en el agua permiten integrar la variabilidad temporal y espacial del ingreso de los mismos, de esta forma se obtiene un evaluaciones robustas. Stábile (2018) demostró la presencia de un conjunto de plaguicidas en biota y sedimento, identificando diversas especies de peces para el diseño de programas de biomonitoreo. Los biomarcadores considerados en la presente tesis (Mn y Ec) generan dos aportes claves. Identificar efectos biológicos de residuos de plaguicidas que ingresan al sistema generando una alerta temprana. En segundo lugar, detectar efectos en condiciones de campo que orientan la búsqueda de compuestos específicos o factores naturales que afectan a la biota.

En este sentido, incorporar el componente de bivalvos tanto desde la perspectiva de bioacumuladores, como los biomarcadores estudiados, puede resultar un aporte complementario que genere una mayor capacidad de detección y alerta temprana. Si bien se recomienda la utilización de *Corbicula fluminea* como organismo centinela para biomonitoreos, es importante recordar que es una especie invasora, por lo tanto no debe introducirse en sistemas donde no se encuentren presentes (Brugnoli et al., 2006). Otras especies de bivalvos presentes en Laguna del Sauce pueden resultar relevantes de estudiar, por ej. *Diplodon spp.* y *Limnoperna fortunei*. El mejillón asiático presenta una amplia distribución espacial de Laguna del Sauce, colonizando diversos sustratos y tipos

de sedimento, tanto duros como blandos (Clemente, 2020). La presencia de *Limnoperna* en la infraestructura de captación de agua de la planta potabilizadora de agua y la remoción mecánica recurrente, representan características relevantes para evaluar el ingreso de plaguicidas. Por otra parte, *Diplodon* es una especie muy longeva en peligro de desaparición de Laguna del Sauce por diversos efectos (Clemente, 2020), por lo tanto, no resulta conveniente extraer ejemplares para sostener un monitoreo de largo plazo como el propuesto. Sin embargo, es interesante profundizar el estudio de Mn y Ec dado la considerable frecuencia de Mn observado en ensayos preliminares. Finalmente, puede representar un buen modelo para programas de monitoreo en otros ecosistemas acuáticos del país considerando su amplia distribución geográfica (Veitenheimer-Mendes & Olazari, 1983; Scarabino, 2004).

La comparación de efectos en condiciones de campo y de laboratorio plantea otras alternativas a explorar, concretamente experimento de transplante mediante jaulas (con bivalvos previamente aclimatados) en estaciones de interés como las estaciones consideradas en los arroyos Pan de Azúcar y Sauce (ver Klobucar et al., 2002). En programas de biomonitoreo donde se han utilizado bivalvos en condiciones naturales y trasplantados, se ha observado que los bivalvos en condiciones naturales presentan frecuencias de Mn más bajas que los bivalvos trasplantados y una mayor variabilidad en respuesta integrada al estrés químico (Rigonato et al., 2005). En este contexto, se recomienda el uso de jaulas con bivalvos previamente aclimatados para programas de monitoreo (Roméo et al., 2003; Salazar & Salazar, 2003). El uso de bivalvos en jaulas, permite diseños de estudios robustos que controlan la edad y la etapa de madurez sexual de los animales, reducen la influencia de la variabilidad genética / poblacional y fenómenos adaptativos, que pueden afectar la capacidad de discriminar entre diferentes niveles de perturbación ambiental (Van Hassel & Farris, 2007; Bolognesi & Fenech, 2012).

Los experimentos de transplante podrían implementarse también a finales de invierno y otoño acompañando los ciclos agrícolas. Finalmente, otras alternativas a considerar es diseñar ensayos de laboratorio con elutriados de sedimento (EPA 1998), variante relevante considerando la acumulación de plaguicidas en esta matriz y la alimentación pedal de varias especies de bivalvos como *Corbicula* y *Diplodon* (Marroni et al., 2014).

El diseño de las alternativas consideradas y su implementación en programas de monitoreo deben incorporar a los actores involucrados directa e indirectamente en la gestión del recurso. La información de los productos aplicados, dosis y períodos de aplicación resulta crucial. En este sentido los productores agropecuarios deben formar parte de los programas de monitoreo, lo cual además promueve la comprensión de la problemática, el involucramiento y apropiación de las recomendaciones y estrategias.

Es importante propiciar estrategias proactivas y alternativas más evolucionadas de gestión del agua (co-manejo o co-diseño) que promueven una mayor capacidad de adaptación, anticipación y resiliencia. Los resultados de Stábile (2018) plantean un escenario favorable en donde las concentraciones de los residuos de plaguicidas se encuentran por debajo del límite de cuantificación. Sin embargo, esta situación no tiene por qué permanecer en el tiempo, aspecto que es imposible conocer por las limitaciones de los programas de monitoreo actuales. Por otra parte, la concentración de gran parte de las actividades agropecuarias en el territorio aledaño al cuerpo del agua plantea riesgos que deben ser evaluados periódicamente.

## 6. Conclusiones

La utilización de los biomarcadores de micronúcleos y ensayo cometa en hemolinfa de *Corbícula fluminea* resultan ser una herramienta de gran utilidad para detectar la presencia y efectos producidos por residuos de plaguicidas (por ej. Metolaclor y Metalaxil). Dicha herramienta puede ser utilizada en forma complementaria en los programas de monitoreo clásicos de detección de residuos en agua, sedimento y matrices biológicas, contribuyendo a la detección del ingreso de contaminantes, comprender sus potenciales efectos en los organismos y sus consecuencias en el ámbito de la provisión de servicios ecosistémicos claves como la producción de agua potable.

## 7. Perspectivas

Como suele suceder en el desarrollo de los trabajos de tesis, se culminan con más preguntas que las que iniciaron el proceso de investigación. A continuación, se indican algunos aspectos claves a seguir investigando.

-Analizar si es posible disminuir el período de aclimatación (30 días) de *Corbicula fluminea* para obtener un nivel basal o de referencia de daño en el ADN (en ausencia de plaguicidas u otros contaminantes).

-Estudiar efectos crónicos de plaguicidas en bioensayos con mayor tiempo de exposición.

- Establecer si los efectos observados en Mn y Ec (agudos o crónicos) se propagan en otras respuestas de gran relevancia para comprender los efectos a nivel del funcionamiento ecosistémico, por ejemplo en la tasa de filtración o tasa de excreción y reciclaje de nutrientes.

-Considerando que varias especies de bivalvos (por ej. *Corbicula fluminea*) cuentan con dos modos de alimentación, filtración de la columna de agua y consumo de materia orgánica del sedimento (alimentación pedal), comprender si los efectos generados por pesticidas dependen del canal de alimentación o principal vía de ingreso.

-Evaluar los efectos (sinergia o antagonismo) sobre Mn y Ec utilizando combinaciones de plaguicidas que se encuentren en el sistema.

-Explorar si existe una relación entre bioacumulación y daño en el ADN en *Corbicula fluminea*.

-La Laguna del Sauce presenta dos especies de bivalvos introducidos: *Corbicula fluminea*, y *Limnoperna fortunei*, produciendo varios impactos sobre las poblaciones locales como por ejemplo disminución de las poblaciones locales (Veitenheimer-Mendes & Olazari 1983; Scarabino, 2004). En este contexto, resulta conveniente comenzar a explorar otras especies con amplia distribución geográfica, tanto nativas como exóticas, así como

estrategias de vida (r y K). Un mayor portafolio de especies puede ayudar a comprender más robustamente los efectos a nivel comunitario y ecosistémico.

## 8. Bibliografía

- Araujo, R., Moreno, D., & Ramos, M.A. (1993) «The asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe». *American Malacological Bulletin* 10 (1), pp.39-49.
- Belenguer, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A. & Picó, Y. (2014) « Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (eastern Spain)». *Journal of Hazardous Materials*, 265, pp. 271–279.
- Bianchi, P., Taveira, G., Goyenola, G., Fuentes, M., Steffen, M. & Mazzeo, N. (2018) «Estrategias de rehabilitación de Laguna del Sauce desde la perspectiva». En: *Aportes para la rehabilitación de la Laguna del Sauce y el ordenamiento territorial de su cuenca*. Bianchi, P. Taveira, Inda, H. & Steffe, M. (Ed) UDELAR-SARAS. Montevideo, pp. 81–97.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L. & Athwal, R. (2000) «Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology». *Mutation research*, 463(1), pp. 33-51. doi: 10.1016/s1383-5742(00)00004-1.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P. (2006) «Membrane transport of hydrogen peroxide». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), pp. 994-1003. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
- Bolognesi, C. & Fenech, M. (2012) «Mussel micronucleus cytome assay». *Nature Protocols*, 7(6), pp. 1125-1137.
- Bottoni, P. & Funari, E.(1992) «Criteria for evaluating the impact of pesticides on groundwater quality». *Science of The Total Environment*, 123(124), pp. 581–590. doi:10.1016/0048-9697(92)90180-z.
- Brito, C., & Pinto, F. (2014) «Biological Monitoring Using Macroinvertebrates as Bioindicators of Water Quality of Maroaga Stream in the Maroaga Cave System, Presidente Figueiredo, Amazon, Brazil». *International Journal of Ecology*, 2014, pp. 7. ID 308149,

- Brugnoli, E., Clemente, J., Riestra, G., Boccardi, L., Bortthagaray, A. (2006) «Especies acuáticas exóticas en Uruguay: situación, problemática y manejo». En: Bases para la Conservación y el Manejo de la Costa Uruguaya. Menafra, R., Rodríguez-Gallego, L. & Scarabino, F. (ed.). Vida Silvestre Uruguay. Graphis Ltd., Montevideo, p. 668.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., & Cristobal S. (2012) «Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution». Journal of Proteomics, 75(14), pp. 4346-4359. doi: 10.1016/J.JPROT.2012.04.027.
- Carpenter, S.R. & Biggs, R. (2009) «Freshwaters: Managing Across Scales in Space and Time». en Principles of Ecosystem Stewardship. New York, Springer, pp. 197-220. doi: 10.1007/978-0-387-73033-2\_9.
- Casini, S., Fossi, M., Cavallaro, K., Marsili, L., & Lorenzani, J. (2002) «The use of porphyrins as a non-destructive biomarker of exposure to contaminants in two sea lion populations». Marine Environmental Res., 54(3-5), pp. 769–773. doi:10.1016/s0141-1136(02)00147-2
- Clavijo C, F Scarabino, A Carranza & A Soutullo. (2009) «Distribución de las especies del género Corbicula (Bivalvia: Corbiculidae) en Uruguay». En: Livro de resumos XX Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro. pp: 271.
- Clemente, J.M. (2020) «Crónica de una invasión biológica tradicional: *Limnoperna fortunei* en Laguna del Sauce (Maldonado, Uruguay). Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República.
- Cotou, E., Tsangaris., C., & Henry, M. (2012) «Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site». Environ Sci Pollut Res 20 pp.1812–182. DOI 10.1007/s11356-012-1150-3.
- Crooks, J.A. & Khim, H.S. (1999) «Architectural vs. biological effects of a habitat-altering, exotic mussel, *Musculista senhousia*». Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 240(1), pp. 53-75. doi: 10.1016/S0022-0981(99)00041-6.
- Crisci, C., Terra, R., Pacheco, J.P., Ghattas, B., Bidegain, M., Goyenola, G., Lagomarsino, J.J., Méndez, G. & Mazzeo, N. (2017) «Multi-model approach to predict phytoplankton

biomass and composition dynamics in a eutrophic shallow lake governed by extreme meteorological events». *Ecological Modelling*, 360, pp. 80-93. doi: 10.1016/J.ECOLMODEL.2017.06.017.

DAISIE 2008 «Elaboración de inventarios de especies exóticas invasoras en Europa». Disponible en: [http://www.europealiens.org/pdf/Rattus\\_norvegicus.pdf](http://www.europealiens.org/pdf/Rattus_norvegicus.pdf).

Depledge, M.H. & Fossi, M.C. (1994) «The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates». *Ecotoxicology*, 3(3), pp. 161-172. doi: 10.1007/BF00117081.

De Santis, L. P., Garcia, C. L., Balajee, A. S., Brea Calvo, G. T., Bassi, L., & Palitti, F. (2001) «Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UV61 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B». *Mutation Research/DNA Repair*, 485(2), 121–132. doi:10.1016/s0921-8777(00)00065-3

Dhawan, A., Bajpayee, M., & Parmar, D. (2008) « Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models». *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), pp. 5–32. doi:10.1007/s10565-008-9072-z

División General de Servicios Agrícolas (DGSA)/ División Control de Insumos (2019). Anuario Estadístico de DIEA 2019

División General de Servicios Agrícolas (DGSA)/ División Control de Insumos. <http://www.mgap.gub.uy>.

Doherty, F.G. (1990) «The Asiatic clam, *Corbicula* spp., as a biological monitor in freshwater environments». *Environmental Monitoring and Assessment*, 15(2), pp. 143-181. doi: 10.1007/BF00398912.

Dudgeon, D. (2010) «Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: linking ecosystem structure and function». *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2(5-6), pp. 422-430. doi: 10.1016/j.cosust.2010.09.001.

EPA (1995), «Prevention, Pesticides And Toxic Substances ». EPA-738-F-95-007.

EPA, Federal Register. (1996). «Notice of Voluntarily Cancellation of Ciba Crop Protection Registration of Metalaxyl Technical and End-Use Products that Contain Metalaxyl». 61(85), pp. 19281.

Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., Márquez, A., Errico, E., Segura, A.M., Heinzen, H., Pérez, A. « Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems», *Science of the Total Environment*, pp. 631, 2018, 169-179. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.320.

Fedato, R.P., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R. & Sofia, S.H. (2010) «Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 700(1-2), pp. 80-85. doi: 10.1016/J.MRGENTOX.2010.05.012.

Ferrari, G., Kröger, A., Torrendel, M. (2019) «Calidad de agua de los tributarios de la Laguna del Sauce, Maldonado, Uruguay, en base al Índice Diatomológico Pampeano (IDP)». *INNOTEC*, 18, pp. 10-35.

Fossi, M.C., Casini, S. & Marsili, L. (1999) «Nondestructive biomarkers of exposure to endocrine disrupting chemicals in endangered species of wildlife». *Chemosphere*, 39(8), pp. 1273-1285.

Freedman, B. (1995) «Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses». San Diego, Academic Press, 606 pp.

Gagliardi, B., & Pettigrove, V. (2013) «Removal of intensive agriculture from the landscape improves aquatic ecosystem health». *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 176, pp. 1-8. doi: 10.1016/j.agee.2013.05.020.

Geist, J. (2011) «Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation». *Ecological Indicators*, 11(6), pp. 1507-1516. doi: 10.1016/j.ecolind.2011.04.002.

GISD- Global Invasive Species Database (2015). « Species profile *Corbicula fluminea*».

Greco, L., Pellerin, J., Capri, E., Garnerot, F., Louis, S., Fournier, M., Couture, P. (2010). «Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell

clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia) ». *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), pp. 132–141. doi:10.1002/etc.359

Griffero, L., Alcántara-Durán, J., Alonso, C., Rodríguez-Gallego, L., Moreno-González, D., García-Reyes, J.F., Pérez-Parada, A. (2019). «Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons». *Science of The Total Environment*, 697, pp. 12. doi: 134058. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134058

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. (2001). «PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. Paleontological Museum, University of Oslo, Noruega.(<http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>).

He, J., Chen, W., Jin, L., & Jin, H. (2000). «*Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation*». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(2), 223–231. doi:10.1016/s1383-5718(00)00077-2

Iummato, M.M., Di Fiori, E., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón, A.C., de Molina Mdel, C., & Juárez. A.B. (2013) «Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms». *Ecotoxicol Environ Saf.* 9, pp.123–9. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.05.024.

Jury, W. A., Focht, D. D., & Farmer, W. J. (1987) «Evaluation of Pesticide Groundwater Pollution Potential from Standard Indices of Soil-Chemical Adsorption and Biodegradation». *Journal of Environment Quality*, 16(4), pp 422. doi:10.2134/jeq1987.00472425001600040022x.

Kidd, K. A., Blanchfield, P.J., Mills K. H., Palace, V.P ., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., & Flick, R.W. (2017) «Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(21), pp. 8897-8901.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., & Ahnström, G. (1996) «The comet assay: Mechanisms and technical considerations». *Mutat Res* 363 pp. 89-96.

- Klobucar, G.I.V., Pavlica, M., Erben, R., & Papes, D. (2003) «Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments». *Aquat. Toxicol.* 64 15–23 pp.
- Kruskal, W.H., & Wallis, W.A. (1952) «Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis». *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), p. 583. doi: 10.2307/2280779.
- Levene, H. (1960) «Robust Tests for Equality of Variances». En: *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Olkin, I., Ghurye, S.G, Hoeffding, W., Madow, W.G. & Mann, H.B. (ed). Redwood City, Stanford University Press, 517 pp.
- Levrini, P. (2017) «Análisis espacio-temporal de las propiedades físicoquímicas en la red de tributarios de la cuenca de Laguna del Sauce (Maldonado) y su relación con controles naturales y de origen antrópico». Tesina final de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo, Uruguay, 59 pp.
- Mackay, D., & Mackay, D. (2006) «Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals». CRC/Taylor & Francis. Disponible en: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Physical-Chemical-Properties-and-Environmental-Fate-for-Organic/Mackay-Shiu-Ma-Lee/p/book/9781566706872>.
- Magnuson, J.J., T.K. Kratz, & B.J. Benson (2006). *Long-term dynamics of lakes in the landscape: long-term ecological research on north temperate lakes*. Oxford University Press, London, UK.
- Marroni, S., Iglesias, C., Mazzeo, N., Clemente, J., Teixeira de Mello, F., & Pacheco, J.P. (2014) «Alternative food sources of native and non-native bivalves in a subtropical eutrophic lake». *Hydrobiologia*, 735(1), pp. 263-276. doi: 10.1007/s10750-013-1714-3.
- Marroni, S. (2006) «Distribucion espacial de la almeja nativa *Diplodon parallelipeton* (Bivalvia, Hyriidae) en la Laguna del Sauce (Maldonado)». Facultad de Ciencias- UdelaR. Uruguay, 79 pp.
- Masiá, A., Campo, J., Vázquez-Roig, P., Blasco, C., Picó, Y., 2013. «Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River basin (Spain) ».

J. Hazard. Mater. 263 (1), pp. 95–104

Mazzeo, N., Steffen, M., Inda, H., Goyenola, G., Clemente, J., Teixeira de Mello, F., Iglesias, C., Pacheco, J.P., Sciandro, J. (2014) «Navegando una transición múltiple: Recursos hídricos: usos, tecnología y participación social un enfoque interdisciplinario». Montevideo.

Mazzeo, N., Garcia-Rodriguez, F., Rodriguez, A., Mendez, G., Iglesias, C., Inda, H. (2010) «Estado trófico de Laguna del Sauce.», En: Bases técnicas para el manejo integrado de Laguna del Sauce y cuenca asociada. Steffen. M & Inda, H. I. (ed.). Montevideo, UDELAR-SARAS, 149 pp.

Mersch, J., Beauvais, M.N., & Nagel, P. (1996) «Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens». *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 371(1-2), pp. 47-55. doi: 10.1016/S0165-1218(96)90093-2.

(MITECO) Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (2019) «[www.miteco.gob.es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/](http://www.miteco.gob.es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/)».

Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Livingstone, D.R., & Chipman, J.K. (1998) «Detection of DNA Strand Breaks in Isolated Mussel (*Mytilus edulis*L.) Digestive Gland Cells Using the “Comet” Assay». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(1), pp. 51-58. doi: 10.1006/eesa.1998.1666.

Narbondo, E.M. (2012) «Cambios en el uso del suelo en Uruguay 2003-2012». Uruguay. Disponible:[https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R147/R\\_147\\_38.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R147/R_147_38.pdf).

Newman, M.C., & Clements, W.H. (2008) «The Hierarchical Science of Ecotoxicology». en *Ecotoxicology : a comprehensive treatment*. Newman, M.C. & Jagoe, C.H. (ed). Boca Raton, CRC Press, pp. 1-11.

OMS/PNUMA (1990) «The WHO recommended classification of pesticides by hazard, and guidelines to classification 1990-1991». Ginebra.

Östling, O., & Johanson, K.J. (1984) «Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. Biochemical and Biophysical». Research Communications, 123 pp. 291-298.

Pace, C., & Kitchell, C. (1999) «Trophic cascades revealed in diverse ecosystems.», Trends in ecology & evolution, 14(12), pp. 483-488.

Palanikumar, L., & Panneerselvam, N. (2011) «Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies», Russian Journal of Genetics, 47(9), pp. 1033-1038. doi: 10.1134/S1022795411090146.

Parolini, M., Pedriali, A., Riva, C., & Binelli, A. (2013) «Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*». The Science of the total environment, 444, pp. 43-50. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.076.

Pérez-Parada, A., Goyenola, G., Teixeira de Mello, F., & Heinzen, H. (2018) «Recent advances and open questions around pesticide dynamics and effects on freshwater fishes». Current Opinion in Environmental Science & Health, 4, pp 38–44. doi.org/10.1016/j.coesh.2018.08.004

Prochazka, S.T., Cope, W., & Recio, L. (2012) «Genotoxic Response Of Unionid Mussel Hemolymph To Hydrogen Peroxide And Polycyclic Aromatic Hydrocarbons». WALKERANA, Freshwater Mollusk Conservation Society (FMCS), 15(2), pp. 113-125.

PPDB - Pesticides Properties DataBase (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>).

Rigonato, J., Mantovani, M.S., & Jordão, B.Q. (2005) «Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity». Genetics and Molecular Biology, 28(3), pp. 464-468. doi: 10.1590/S1415-47572005000300023.

Rigonato, J., Mantovani, M.S., & Jordão, B.Q. (2010) «Detection of Genotoxicity of Water from an Urbanized Stream, in *Corbicula fluminea* (Mollusca) (In Vivo) and CHO-K1 Cells (In Vitro) Using Comet Assay». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 59(1), pp. 31-38. doi: 10.1007/s00244-009-9446-0.

Rockström, J., Falkenmark, M., Folke C., Lannerstad, M., Barron, J., Enfors, E., Gordon, L., Heinke, J., & Pahl-Wostl, C. (2014) «Human Modification of the Earth System.», en *Water Resilience for Human Prosperity*. New York.: Cambridge University Press, pp. 46-67 doi:10.1017/CBO9781139162463.006.

Roméo, M., Hoarau, P., Garelo G., Gnassia-Barelli , M., Girard, J.P. (2003) Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122(3) pp. 369-378. doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00303-2

Rose, M.T., Cavagnaro. T.R., Scanlan,C.A., Rose, T.J., Vancov, T., Kimber, S., Kennedy, I.R., Kookana, R.S., & Van Zwieten, L. (2016) « Impact of Herbicides on Soil Biology and Function». *Advances in Agronomy*. 136, pp. 133-220.

Salazar, M.H., & Salazar, S.M., (2003) «Using an integrated risk assessment strategy to characterize exposure and effects in the field with caged bivalves». *Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, Proceedings of the Fifth International Conference*, pp. 13.

Salazar, M.H., & Salazar, S.M., (2003) « Linking Bioaccumulation and Biological Effects to Chemicals in Water and Sediment EN: A Conceptual Framework for Freshwater» *Bivalve Ecotoxicology*. Jerry L. Farris, John H. Van Hassel (ed) CRC Press. Boca Raton New York. pp 227-232.

Scarabino, F. (2004) «Conservación de la malacofauna uruguaya». *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 8(82/83), pp. 267-273.

Schäfer, R.B., Caquet, t., Siimes, k., Mueller, R., Lagadic, L. & Liess, M. (2007) «Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe». *Science of the Total Environment*. 382, pp. 272–285.

Scheffer, M., Carpenter, S., Foley, J.A., Folke, C., & Walker, B. (2001). «Catastrophic shifts in ecosystems». *Nature*, 413(6856), pp. 591-596. doi: 10.1038/35098000

Schulz, R. (2004) «Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review». *Journal of environmental quality*,

33(2), pp. 419-48.

Shapiro, S.S., & Wilk, M.B. (1965) «An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)». *Biometrika*, 52(3/4), pp. 591-611.

Shugart, L. & Theodorakis, C. (1998). New trends in biological monitoring: Application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy* (Dordrecht, Netherlands). 11. 119-27. 10.1023/A:1007911027243.

Silva, C., Mattioli, M., Fabbri, E., Yáñez, E., DelValls, T.A., & Martín-Díaz M.L. (2012) «Benthic community structure and biomarker responses of the clam *Scrobicularia plana* in a shallow tidal creek affected by fish farm effluents (Rio San Pedro, SW Spain)». *Environment international*, 47, pp. 86-98. doi: 10.1016/j.envint.2012.06.008.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., & Scheider, E.L. (1988) «A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells». *Experimental Cell Research*, 237, pp. 123- 130.

Sotil, G., Alvis, R., Francia, J.C., & Shiga, B. (2013) «Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos». *Revista Peruana de Biología*, 13(3), pp 249-253. doi: 10.15381/rpb.v13i3.2350.

Sousa, R., Antunes, C., & Guilhermino, L. (2008) «Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview». *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 44(2),pp.85-94.

Stábile, F. (2018) «Presencia de plaguicidas y estructura de la red trófica del sistema Laguna del Sauce: hacia el desarrollo de estrategias de biomonitorio». Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-UdelaR, 112 pp.

Steffen M., & Inda H. (2010). «Bases técnicas para el manejo integrado de Laguna del Sauce y cuenca asociada». Montevideo, Universidad de la República & SARAS, 150 pp.

Soutullo, A., Ríos, M., Zaldúa, N., & Teixeira de Mello, F. (2020) «Soybean expansion and the challenge of the coexistence of agribusiness with local production and conservation initiatives: pesticides in a Ramsar site in Uruguay ». *Environmental Conservation*, pp. 7. doi: 10.1017/S0376892920000089

Speit, G., & Hartmann, A. (1999) «The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair». *Methods Mol Biol.* 113, pp.203-12.

Sukul, P., & Spiteller, M. (2000) «Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods». *Rev Environ Contam Toxicol.* pp. 1641-1626.

Tano, Z.J. (2011) «Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides». En *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*. Stoytchava, M. (ed) InTech, 514 pp. doi: 10.5772/17513.

Taveira, G., Bianchi, P., Fuentes, M., Díaz, I., & Inda, H. (2018) «¿Cuáles son los principales usos del suelo actuales y tendencias en la cuenca de Laguna del Sauce? En: Aportes para la rehabilitación de la Laguna del Sauce y el ordenamiento territorial de su cuenca. Bianchi P., Taveira G., Inda H. & Steffen M. (ed). Montevideo, UDELAR-SARAS, pp.47-59.

Uno, S., Shiraishi, H., Hatakeyama, S., Otsuki, A., & Koyama, J. (2001) «Accumulative characteristics of pesticide residues in organs of bivalves (*Anodonta woodiana* and *Corbicula leana*) under natural conditions». *Archives of environmental contamination and toxicology*, 40(1), pp. 35-47.

Van Hassel, J.H., & Farris, J.L. (2007) «A Review of the Use of Unionid Mussels as Biological Indicators of Ecosystem Health». en *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Van Hassel, J. H. & Farris, J. L. (ed), New York: Gorsuch Environmental Management Services. Inc, pp. 19-49.

Vaughn, C.C & Hakenkamp, CC. (2001) «The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems». *Freshwater Biology* 46(11), pp. 1431- 1446. doi:10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x.

Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007) «The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), pp. 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011

Villela, I., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A. (2006) «DNA damage and repair in

haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants». *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(1-2), pp. 78-86.

Villela, I., de Oliveira, I.M., Silveira, J.C., Dias, J.F., Henriques, J.A., & da Silva, J. (2007) «Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions». *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(2), pp. 76-86. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.12.001.

Villela, I., da Silva, J., Marques de Oliveira, I., da Silva Machado, M., Ferraz Dias, J., & Pêgas Henriques, J.A. (2013) «The use of genetic bioassays to evaluate the environmental quality in a region under the influence of urban waste in Guaíba lake basin (Brazil)». *Journal of Environmental Science and Water Resources*, 2(5), pp. 138-149.

Veitenheimer-Mendes, I. & Olazarri, J. (1983) «Primeros registros de *Corbicula Megerle*, 1811 (Bivalvia, Corbiculidae), para el Río Uruguay». *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 1 (Segunda Época), Montevideo, pp. 50-53

Waykar, B., & Deshmukh, G. (2012) «Evaluation of Bivalves as Bioindicators of Metal Pollution in Freshwater». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(1), pp. 48-53. doi: 10.1007/s00128-011-0447-0.

Waxman, M.F. (1998) «Pesticides and Environmental Protection» En *Agrochemical and pesticide safety handbook*. Florida, Lewis Publisher, 616 pp.

Willis, G.H., & McDowell, L.L. (1982) «Pesticides in agricultural runoff and their effects on downstream water quality». *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1(4), pp. 267-279. doi: 10.1002/etc.5620010402.

Wrisberg, M.N., Bilbo, C.M. & Spliid, H. (1992) «Induction of Micronuclei in Hemocytes of *Mytilus edulis* and Statistical Analysis», *Ecotoxicology and environmental safety*, 23, pp. 191-205.

Zar, J. (1999) «*Bioestatistical Analysis*». Fourth Edition. Prentice Hall, USA, 663 pp.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., & Jiang, G. (2008) «Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem». *Analytica chimica acta* 606 pp. 135–150. DOI:10.1016/j.aca.2007.11.018.

Zuykov, M., Pelletier, E., & Harper, D.T. (2013) «Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring». *Chemosphere*, 93(2), pp. 201-8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.001.