



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES.

Proyecto de Tesis

El uso de *Corbicula fluminea* y *Diplodon parallelipedon* como sistema de alerta temprana sobre la presencia de fitosanitarios en sistemas acuáticos.

Lic. María Alejandra Kröger Tringolo

Dr. Néstor MazzeoBeyhaut

Tribunal: Dra. Gabriela Eguren, Dr. Javier García Alonso y M.Sc. Guillermo Goyenola

06-2014

El uso de *Corbicula fluminea* y *Diplodon parallelipedon* como sistema de alerta temprana sobre la presencia de fitosanitarios en sistemas acuáticos

Resumen

El agua dulce incluye aguas subterráneas, ríos, arroyos, lagos y reservorios. Estos ecosistemas representan alrededor del 7% de la superficie de la tierra. A pesar de que los ecosistemas terrestres y acuáticos pueden ser analizado por separado, estos se encuentran estrechamente conectados entre sí. Por lo tanto, cualquier perturbación a nivel de cuenca puede reflejarse en cambios en los ecosistemas acuáticos.

La comunidad de invertebrados bentónicos es ampliamente usada para el control y monitoreo de los cuerpos de agua. En los últimos años ha cobrado importancia la detección de contaminantes a través de biomarcadores. Los biomarcadores se definen como cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos o de comportamiento que se pueden medir en un tejido, fluidos biológicos, o de organismos enteros que proporcionan evidencia frente a la exposición de un efecto tóxico, ya sea de uno o más contaminantes. Dentro de los biomarcadores más utilizados se encuentra: concentración de colinesterasa (ACHe), catalasa (CAT), porfirinas, entre otros.

El objetivo de este trabajo es analizar en dos especies de bivalvos *Corbicula fluminea* (especie exótica) y *Diplodon parallelipedon* (especie nativa) la respuesta de a nivel de porfirinas en amplio gradientes espaciales de Laguna del Sauce, sistema eutrófico con una creciente actividad agrícola en su cuenca. El uso de biomarcadores en los bivalvos será evaluado como posible herramienta de alerta temprano en los programas de monitoreo.

Introducción

El agua dulce incluye aguas subterráneas, ríos, arroyos, lagos y reservorios. Estos ecosistemas representan alrededor del 7% de la superficie de la tierra. A pesar de que los ecosistemas terrestres y acuáticos pueden ser analizados por separado, las aguas subterráneas, lagos, ríos y los ecosistemas terrestres están estrechamente conectados entre sí. 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 (Carpenter & Biggs 2009). El clima, tipo de suelos, los diferentes usos de agua y la composición de la vegetación afecta la infiltración a aguas subterráneas y la escorrentía de aguas superficiales. Por lo tanto, cualquier perturbación a nivel de la cuenca se verá reflejada en los cambios que podrán observarse en las diferentes comunidades acuáticas.

Los ecosistemas de agua dulce proveen bienes y servicios para la sociedad, alguno de ellos claves para el bienestar humano. De acuerdo a 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, la 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 sobreexplotación de recursos, contaminación, degradación del hábitat, modificaciones en el régimen hídrico o en el régimen de circulación del agua, fragmentación del hábitat, e invasión de especies exóticas. 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). La biota de agua dulce es particularmente vulnerable a estos impactos, los cuales pueden ser directos, por ej. entrada de pesticidas o hidrocarburos (Katagi, 2010)

que pueden provocar, según la sensibilidad de los organismos, efectos letales o subletales (Parolini *et al.* 2013).

Cuando los contaminantes alcanzan los sistemas acuáticos, se pueden observar efectos en diferente nivel de organización biológica, dependiendo de la intensidad y duración a la cual el sistema está expuesto (Fig.1). Al mismo tiempo, los organismos pueden exhibir un amplio rango de tolerancia a tóxicos específicos, pudiendo provocar cambios comportamentales, efectos letales y/osubletales (Parolini *et al.* 2013).El primer nivel de acción de un contaminante una vez que ingresa al organismo es el molecular y desencadena respuestas que tienden a mantener la homeostasis. Si las concentraciones son elevadas o el tiempo de exposición es prolongado, las respuestas pueden ser insuficientes para contrarrestar la acción del contaminante y se desencadenan respuestas compensatorias en niveles superiores 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 conducir a la muerte del individuo (Freedman, 1995; Giest, 2011).

Las respuestas a nivel molecular ocurren en cortos períodos de exposición, siendo utilizadas como señal de alarma temprana, pero poseen baja relevancia ecosistémica (en términos de comprender como afecta la integridad de todo el ecosistema). Mientras que las respuestas a nivel de poblacional, comunitario o ecosistémicos se expresan luego de largos períodos de exposición y presentan una alta relevancia ecológica (Freedman, 1995).

Los cambios en la composición de las comunidades y la abundancia de especies pueden afectar dramáticamente la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, incluyendo las interacciones tróficas, la dinámica de los nutrientes, la respuesta y susceptibilidad a los disturbios naturales o antrópicos (Crooks & Khim 1999). Además de los efectos directos, los efectos indirectos se pueden manifestar 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 (Peace *et al.* 1999), entre otros muchos ejemplos.

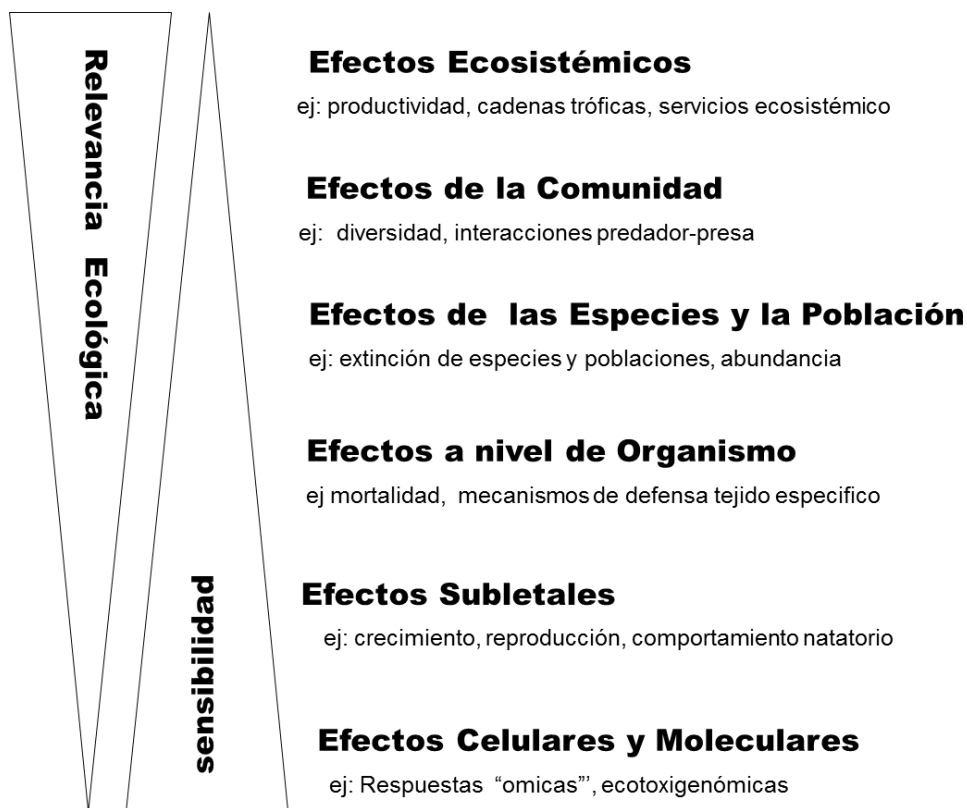


Fig. 1 Efectos tóxicos en diferentes niveles de organización. El esquema analiza la sensibilidad de la respuesta (en términos de tiempo) y la relevancia de las mismas para evaluar el conjunto de bienes y servicios suministrados por los ecosistemas. Esquema traducido de Giest (2011).

Rol de la comunidad bentónica en la ecología y gestión de sistemas acuáticos

La comunidad bentónica cumplen un importante rol en los procesos de bioturbación, reciclaje e intercambio de nutrientes y energía en la interface agua-sedimento (Leal *et al.* 2003, Leal *et al.* 2007). La resuspensión de solutos y partículas, la ingestión, digestión y la liberación de productos excretados, así como los cambios en las características del sedimento causados por los macroinvertebrados bentónicos, son señalados como procesos cruciales en la dinámica de nutrientes del nitrógeno, fósforo y carbono, y en la recuperación de nutrientes desde el sedimento a la columna de agua (Leal *et al.* 2003). Los macroinvertebrados bentónicos son un componente clave para la cadena trófica ya que vincula la deposición de materia orgánica en el fondo y recursos

alimenticios como hojarasca, algas y detritus, con los niveles tróficos superiores (Li *et al.* 2010).

Se entiende como indicador biológico, o bioindicador, a un organismo o grupo de organismos cuya presencia o ausencia tiende a aportar información de las características del sistema y estado de salud. Un buen bioindicador debe contar con las siguientes características: I) solidez taxonómica, II) distribución amplia o cosmopolita, III) poca movilidad, IV) características ecológicas bien conocidas, V) abundantes, VI) fácilmente adaptados a experimentos en el laboratorio, VII) sensibles a factores de estrés ambiental, VIII) respuestas que pueda ser estandarizada y cuantificada (Li *et al.* 2010).

Hay varios organismos que se utilizan como indicadores biológicos, sin embargo los macroinvertebrados bentónicos, entre otros, son los más frecuentemente utilizados (Brito & Pino 2014). Existen diferentes formas de utilizar a la comunidad de macroinvertebrados 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 “cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos o de comportamiento que se pueden medir en un tejido, fluidos biológicos, organismos o poblaciones, y que provee evidencia de exposición y/o efecto de unos a más contaminantes”.

Los biomarcadores se pueden clasificar según dos modalidades: biomarcadores de exposición o biomarcadores 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 1999).

La lista de biomarcadores utilizados en estudios ecotoxicológicos puede ser muy extensa, como por ejemplo: Glutathione *s*-transferasa (GST), enzima involucrada en la fase II del proceso de detoxificación de pesticidas organoclorados y PCBs en invertebrados. Catalasa (CAT), sistema enzimático involucrado en la defensa contra el estrés oxidativo, biomarcador ampliamente utilizado en bivalvos. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), son marcadores de estrés oxidativo que reflejan el

estado de la peroxidación lipídica de la membrana. Concentración de acetilcolinesterasa (AChE), es una enzima esencial para la correcta transmisión de impulsos nerviosos (Tlili *et al.* 2013).

La concentración de porfirinas son buenos biomarcadores de exposición a grupos específicos de químicos (Brock 1992; De Matteies & Lim 1994; Casini *et al.* 2003). Las porfirinas son metabolitos intermediarios de las síntesis del grupo hemo. Esta ruta metabólica puede ser alterada por varios contaminantes ambientales, tales como policlorobifenilos (PCB), dioxinas y metales pesados, todos los cuales provocan cambios en su concentración debido a la acumulación o excreción. A modo de ejemplo, los compuestos aromáticos polihalogenados (como los PCB y las dioxinas) conducen a la acumulación de uroporfirina. La contaminación asociado a herbicidas promueve la acumulación de protoporfirinas, mientras que el heptacloro, lindano, arsénico, mercurio produce acumulación de coproporfirina (Carrasco-Letelier *et al.* 2006). En resumen, estos biomarcados permiten determinar cuándo un organismo está expuesto a uno o más contaminantes, información que no necesariamente se puede obtener a partir de las mediciones de residuos químicos en la interface agua-sedimento o en la propia columna de agua. En este contexto, el uso de biomarcadores son de gran utilidad en los programas de monitoreo como estrategias de alerta temprana.

Modelo de estudio

La evidencia científica demuestra que los organismos filtradores son muy útiles para el estudio de biomarcadores (Cotou *et al.* 2013; Lummato *et al.* 2013). Varios atributos condicionan la posibilidad de utilizar a los bivalvos en los programas de biomonitoreo, en general están ampliamente distribuidos, son abundantes, tolerantes a variaciones ambientales, tolerantes a varios contaminantes ambientales, presentan alta bioconcentración de contaminantes, muy bajo niveles (base) de enzimas que metaboliza los contaminantes orgánicos (Zhou *et al.* 2008; Waykar & Deshmukh 2012). Además, cuenta 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 muy 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. Otra ventaja que presentan estos organismos radica en la fácil manipulación y

facilidad de cultivo, lo cual pueden utilizarse en bioensayos de laboratorio y de campo (Marroni *et al.* 2014).

Corbicula fluminea (mejillon dorado) es una especie exótica de agua dulce que vive preferentemente en ambientes loticos. Fue citada por primera vez para nuestro país en las costas del río Uruguay y desde entonces se observa una rápida y continua dispersión y colonización en ríos arroyos y lagunas (Brugnoli *et al.* 2006). Este organismo 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. Presenta dos eventos reproductivos, es hermafrodita y se autofecunda. Presenta un periodo de incubación corto liberando un gran número de juveniles por año (Marroni 2006). *Corbicula fluminea*, en la Laguna del Sauce (Maldonado-Uruguay), se encuentra restringida a los sectores arenosos con una abundancia promedio de 22 ind/m² (García 2006; Mazzeo *et al.* 2010a).

Diplodon parallelipedon es una especie nativa la cual se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país. Presenta una estrategia de vida tipo k, con un tiempo de vida de 40 años, tiene un crecimiento lento, pudiendo alcanzar hasta 9-10 cm. Presenta un evento reproductivo en primavera-verano y cuenta con una larva parasita, la cual se fija en las branquias de los peces (Bonetto & Tassara 1987) gracias a una estructura llamada gloquidio. A diferencia de *C. fluminea* su distribución espacial es independientemente de la naturaleza del sedimento, ya que tienen la capacidad de colonizar sustratos arenosos, areno-pedregosos y fangosos, alcanzando una abundancia promedio de 7 ind/m² (Marroni, 2006; Mazzeo *et al.* 2010a).

La importancia que presenta evaluar estas dos especies de bivalvos, radica en la diferente distribución biográfica de cada especie, sus diferencias en las preferencias de sustrato y por presentar tasas de filtración muy diferentes (Marroni *et al.* 2014). Otras de las ventajas que tiene trabajar con *C. fluminea*, es que es una especie ampliamente distribuida, por lo tanto cuenta con un número importante de estudios científicos directamente relacionados con el proyecto, en contraposición con la especie nativa considerada.

Hipótesis

Los biomarcadores (porfirinas) en bivalvos exóticos y nativos constituyen un sistema de detección de fitosanitarios en cuerpos de agua.

Predicciones

1. Los fitosanitarios más utilizados en los sistemas productivos, y con tendencia a acumularse en el medio acuático, provocan acumulación porfirinas.
2. Especímenes de *Corbicula* y *Diplodon* presentan diferencias espaciales en los niveles de porfirinas asociado a la cercanía o lejanía a las zonas de entradas de fitosanitarios.
3. El cultivo de especímenes de *Corbicula* y *Diplodon* en condiciones de laboratorio y en ausencia de fitosanitarios presentan niveles significativamente menores de porfirinas en relación ejemplares en condiciones de campo.

Objetivo y pregunta

Desarrollar un sistema de alerta temprano utilizando biomarcadores en bivalvos.

¿Los bivalvos y los marcadores seleccionados constituyen herramientas de utilidad en la gestión de agua potable ?

Materiales y Métodos

Área de estudio

El estudio se llevará a cabo en la Laguna del Sauce (34° 43' S, 55° 13' W), 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 4.666 ha. Este sistema presenta una profundidad media de 4,40 -4,60 m, con máximos de 7m. Los principales tributarios son: Arroyo Pan de Azúcar, Arroyo Sauce, Cañadas Pedregosa y Mallorquina (Mazzeo *et al.* 2010a).

La cuenca está definida por un amplio valle limitado por un arco de playa al Sur, en la confluencia del Río de la Plata y el océano Atlántico; al Oeste, por la cadena de cerros de Piriápolis y la Sierra de las Ánimas; al Norte, por la Cuchilla Grande y la Sierra Carapé; al Este, por Sierra de la Ballena. La cuenca tiene una extensión de 722 km², con una pendiente hacia el Río de la Plata (Uragua, 2001). Dentro de la cuenca de drenaje la principal actividad agropecuaria es la ganadería de carne, seguido por la actividad forestal, , en tanto que la actividad lechera actualmente es mínima.

Aproximadamente el 30% de los suelos con prioridad forestal están plantados con bosques de rendimiento o de destino comercial, se estima que esta actividad pueda expandirse en un futuro ocupando entre el 30-40% adicional de los suelos con prioridad forestal (Rodríguez *et al.* 2010). En los últimos años, se ha constatado una expansión del área cultivada por soja, principalmente en campos vecinos sobre los principales tributarios del sistema, Arroyo Pan de Azúcar y Sauce (Beder *et al.* 2013).

Estrategia de investigación

En este trabajo se contemplan dos aproximaciones, una empírica en base a gradientes espaciales, se espera detectar mayores niveles de porfirinas en las zonas más próximas a las áreas de cultivo. Además, se empleará un enfoque experimental en el cual se procura comparar los niveles de porfirinas presentes en condiciones de campo en relación a ejemplares cultivados en condiciones de laboratorio en ausencia de fitosanitarios.

En función de las respuestas observadas en los niveles de porfirinas con las dos aproximaciones antes indicadas, se explorará los posibles fitosanitarios responsables en función de su uso en la cuenca y sus propiedades físico/químicas. Finalmente, se explorará en bioensayos de laboratorio la inducción de los biomarcadores en un gradiente de dos fitosanitarios potencialmente responsables de las respuestas observadas.

Aproximación empírica

Para la colecta de los organismos se propone dividir al sistema en una grilla regular que abarca los principales sistemas de Laguna del Sauce: Laguna del Potrero, Cisne y laguna del Sauce. Se tomarán 100 puntos mediante una bomba que succiona los primeros 45 cm del sedimento siendo tamizados en campo. En el laboratorio las muestras de bivalvos serán congeladas -20°C y se analizarán en función de un gradiente espacial desde los tributarios hacia el centro del sistema. De cada uno de los puntos se registrará la profundidad, transparencia del agua, temperatura, oxígeno disuelto, pH y conductividad. Se tomarán muestras de sedimento para el análisis granulométrico y determinación del contenido de materia orgánica y nutrientes.

El proyecto contempla seguir una estrategia adaptativa, procurando analizar en primer lugar zonas más cercanas a las áreas de cultivo y las zonas más distantes. Posteriormente, se analizarán ejemplares en el rango intermedio de distancia, ajustando el número de estaciones de muestreo en función de las respuestas observadas en condiciones de campo, los costos de los análisis y el tiempo requerido.

Aproximación experimental

Se cultivarán ejemplares de bivalvos (*C. fuminea* y *D. parallelipedon*) de diferentes tallas en un medio controlado en ausencia de contaminantes siguiendo las condiciones de laboratorios utilizados por Marroni *et al.*(2014). Se cultivarán microalgas a efectos de contar con un adecuado suministro alimenticio.

En primera instancia, en los bivalvos cultivados luego de una etapa libre de todos contaminante (1mes) se cuantificará los niveles de porfirinas y se analizará estadísticamente las diferencias con los niveles observados en condiciones de campo.

Posteriormente se les aplicará un tratamiento de exposición a dos fitosanitarios potencialmente responsables, cuantificando concentración y tiempo necesarios para evidenciar una señal. Para la elección de fitosanitarios se tomará en cuenta los más usados en la cuenca y los compuestos con afinidad al medio acuático (aplicación de modelos de fugacidad, nivel 1). El rango de concentración de los contaminantes va a estar sujeto a concentraciones reportadas en cuerpos acuáticos. Se harán experimentos pilotos a efectos de ajustar el tiempo y concentración a la cual los individuos serán expuestos.

Análisis de muestras

Para el análisis de las muestras se extraerá el hepatopáncreas de los organismos y se preparará un homogeneizado de la muestra con agua destilada en relación 1:10. Se obtienen muestras iguales (0.2 ml) del homogeneizado. Se transferirán a tubos de ensayo individuales que contendrán 1.6ml de una mezcla metanol/ ácido perclórico 50:50. Luego de mezclarlas por vortex se mantendrán en la oscuridad durante 10 minutos y serán centrifugadas durante 3 minutos a 15000 rpm (Carrasco-Letelier *et al.* 2006).

Para la cuantificación de porfirinas se utilizará un ensayo fluorimétrico descrito por Grandchamp *et al.* (1980). El estudio fluorimétrico es de gran utilidad, tanto para las

Resultados Esperados

Se esperara desarrollar un sistema de monitoreo que permita establecer respuestas de alerta temprana al ingreso de fitosanitarios a cuerpos de agua utilizando como sustrato bivalvos filtradores nativos y exóticos ampliamente distribuidos en Uruguay.

Factibilidad

El presente proyecto se enmarca dentro de los programas de monitoreos de Laguna del Sauce adaptados por el Comité de Cuenca de Laguna del Sauce con el soporte de OSE/UGD, CURE-Facultad de Ciencias- UdelaR y la Armada Nacional.

Bibliografía

- Beder J., Bianchi, P., Cedrés, F., Fuentes, M., Pittalgua, B., Traveira, G.** Agua potable en Maldonado: Aportes para la gestión en la cuenca de Laguna del Sauce. [Report] : Taller interdisciplinario III, Licenciatura en Gestión Ambiental / Maldonado ; CURE. - 2013. - p. 90.
- Bonetto A.A. & M.P. Tassara.** Contribucion al conocimiento de dos nayades Sudamericanas. [Journal] // Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Ciencias Zoológicas . - 1987. - 11 : Vol. 14. - pp. 163-170.
- Brito Uherek Christiane & Pinto Gouveia, Fernando** Biological Monitoring Using Macroinvertebrates as Bioindicators of Water Quality of Maroaga Stream in the Maroaga Cave System, Presidente Figueiredo, Amazon, Brazil [Journal] // International Journal of Ecology. - 2014.
- Brock V.** Effects of mercury on the biosynthesis of porphyrins in bivalve molluscs (*Cerastoderma edule* (L.) and *C. lamarcki* (Reeve)) [Journal] // J. Exp. Mar. Biol. Ecol.. - [s.l.] : Elsevier Science, 1992. - 17-29 : Vol. 164.
- Brugnoli E., Clemente, J., Riestra, G., Boccardi, L., Bortthagaray, A.I.** Especies acuáticas exóticas en Uruguay: situación, problemática y manejo. EN:BASES para la CONSERVACIÓN y el MANEJO de la COSTA URUGUAYA.VIDA SILVESTRE URUGUAY [Book] / ed. R. Menafra L. Rodríguez-Gallego, F. Scarabino, D. Conde. - Montevideo : GRAPHIS Ltda, 2006. - p. 668.
- Carpenter S.T. & Biggs, R.** Freshwaters: Managing Across Scales in Space and Time [Book Section] // Principles of Ecosystem Stewardship / ed. F. Stuart Chapin III, Gary P. Kofinas, Carl Folke. - Nueva York : Springer, 2009.
- Carrasco-Letelier L., Eguren, G., Teixeira de Mello, F., Groves, P.A.** Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution [Journal] // Chemosphere. - [s.l.] : Elsevier, 2006. - Vol. 62. - pp. 1245–1252.
- Casini S., Fossi, M.C., Leonzio, C., Renzoni, A.** Review: Porphyrins as biomarkers for Hazard Assessment of Bird Population: Destructive and Non-destructive Use [Journal] // Ecotoxicology. - 2003. - Vol. 12. - pp. 297-305.
- Cotou E., Tsangaris, C., Henry, M.** Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site [Journal] // Environ Sci Pollut Res. - [s.l.] : Springer-Verlag, 2013. - Vol. 20. - pp. 1812-1822.
- Crooks J.A. & Khmi, H.S.** Architectural vs. biological effects of a habitat-altering, exotic mussel, *Musculista senhousia* [Journal] // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. - [s.l.] : Elsevier, 1999. - 53-57 : Vol. 240.

- De Matteis F, & IIM, C.K.** Porphyrins as « nondestructive » indicators of exposure to environmental pollutants [Journal] // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. - 1994. - Vol. 41. - pp. 65-72.
- Depledge W.H., Fossi, M.C., 1994.** The role of biomarkers in environmental assessment (2) Invertebrates. [Journal] // Ecotoxicology. - [s.l.] : Springer, 1994. - Vol. 3. - pp. 161–172.
- Dudgeon. David** Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: linking ecosystem structure and function [Journal] // Current Opinion in Environmental Sustainability. - Hong Kong : elsevier, 2010. - Vol. 2. - pp. 422–430.
- Fossi M.C., Casini, S., Marsili,L.** NONDESTRUCTIVE BIOMARKERS OF EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS IN ENDANGERED SPECIES OF WILDLIFE [Journal] // Cheraosphere. - 1999. - 8 : Vol. 38. - pp. 1273-1285.
- Freedman B.** Environmental Ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other [Book]. - san diego : Academic press, 1995. - p. 606.
- Garcia s.** Patrones de distribución espacial de la almeja asiática corbicula fluminea en la Laguna del Sauce (Maldonado-Uruguay). Tesis final de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Uruguay.. - 2006.
- Geist Juergen.** Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation [Journal] // Ecological Indicators . - germany : Elsevier, 2011. - Vol. 11. - pp. 1507–1516.
- Grandchamp B., Deybach,J.C., Grelier, M.,DE Verneuil, H., Nordmann, Y.** STUDIES OF PORPHYRIN SYNTHESIS IN FIBROBLASTS OF PATIENTS WITH CONGENITAL ERYTHROPOIETIC PORPHYRIA AND ONE PATIENT WITH HOMOZYGOUS COPROPORPHYRIA [Journal] // Biochimica et Biophysica Acta. - 1980. - Vol. 629. - pp. 577-586.
- Katagi T.** Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides in Aquatic Organisms [Book] / ed. (ed.) D.M. Whitacre. - [s.l.] : Springer Science+Business Media, 2010. - pp. 665-8555.
- Leal J.J., de Assis Esteves, F., Vinicius Fortes, V., Enrich-Prast, A.** Effect of Campsurus notatus on NH4 Bacterioplankton Production in Experimental Microcosms with Sediment-Water Interface of an Amazonian Lake Impacted by Bauxite Tailings [Journal] // Hydrobiology. - 2003. - 2 : Vol. 88. - pp. 167–178.
- Leal J.J.F., dos Santos Furtado, A.L., de Assis Esteves, F., Bozelli, R.L., Figueiredo-Barros, M.P.** The role of Campsurus notatus (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) bioturbation and sediment quality on potential gas fluxes in a tropical lake [Journal] // Hydrobiologia. - [s.l.] : Springer Science, 2007. - 143-154 : Vol. 586.
- Li L., Zheng, B., Liu, L.** Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: Definitions, Approaches and Trends [Journal] // Procedia Environmental Sciences . - Beijing, China : Elsevier, 2010. - Vol. 2. - pp. 1510–1524.

Lummato M.M., Di Fiori, E., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón, A.C., Ríos de Molina, M.C., VBeatriz, A. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms [Journal] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. - [s.l.] : Elsevier, 2013. - Vol. 95. - pp. 123–129.

Marroni S. Distribución espacial de la almeja nativa *Diplodon parallelipeton* (Bivalvia, Hyriidae) en la Laguna del Sauce (Maldonado). Tesis final de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Uruguay.. - 2006.

Marroni S., Iglesias, C. Mazzeo, N., Clemente, J., Teixeira de Mello, F., Pacheco, J. Alternative food sources of native and non-native bivalves in a subtropical eutrophic lake [Journal] // *Hydrobiologia*. - [s.l.] : Springer, 2014. - Vol. 735. - pp. 263–276.

Mazzeo N., Garcia-Rodriguez, F., Rodriguez, A., Méndez, G., Iglesias, C., Inda, H., Goyenola, G., Garcia, S., Fosalba, C., Marroni, S., Cisisc, C., del Puerto, L., Clemente, J., Pacheco, J.P., Carballo, C. Kröger, A., Vianna, M., Meerhoff, M., Steffen, M. Estado trófico de Laguna de Sauce y respuestas asociadas. En: Bases técnicas para el manejo integrado de Laguna del Sauce y cuenca asociada. [Book] / ed. Steffen M. & Inda, H.. - 2010. - pp. 31-35.

Parolini M., Pedriali, A., Riva, C., Binelli, A. Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* [Journal] // *Science of the Total Environment* / ed. Elsevier. - 2013. - 43-50 : Vol. 444.

Peace M.L., Cole, J.J., Carpenter, S.R., Kitchell, J.F. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems [Journal]. - [s.l.] : Elsevier, 1999. - 483-487 : Vol. 14.

Rodriguez A. Evolución del estado trófico de la Laguna del Sauce e importancia de la carga interna de nutrientes. [Report] / Universidad de la Republica . - Montevideo, Uruguay : [s.n.], 2006. - p. 133.

Silva C., Mattioli, M., Fabbri, E., Yáñez, E., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.A. 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) [Journal] // *Environment International*. - 2012. - Vol. 47. - pp. 86-98.

Tlili S., Minguez, L., Giamberinic, L., Geffard, A., Boussettab, H., Mouneyraca, C. Assessment of the health status of *Donax trunculus* from the Gulf of Tunis using integrative biomarker indices [Journal] // *Ecological Indicators*. - 2013. - 285–293 : Vol. 32.

URAGUA Estimación de la eutrofia potencial de la Laguna del Sauce en el Departamento de Maldonado (Uruguay). Informe Técnico, Maldonado. [Report]. - 2001.

Waykar B. & Deshmukh, G. Evaluation of Bivalves as Bioindicators of Metal Pollution in Freshwater [Journal] // *Bull Environ Contam Toxicol* / ed. Science Springer. - 2012. - Vol. 88. - pp. 48–53.

Zhou Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem [Journal] // *analytica chimica acta*. - [s.l.] : Elsevier, 2008. - 135–150.

