



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

El bivalvo de agua dulce *Diplodon chilensis*
como herramienta para el estudio de ambientes
acuáticos contaminados en Patagonia Norte.

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Lic. Virginia A. Bianchi

Director de tesis: Dr. Carlos M. Luquet

Codirectora: Dra. Iara Rocchetta

2014

*“Hay hombres que de su ciencia
Tienen la cabeza llena;
Hay sabios de todas menas,
Mas digo sin ser muy ducho:
Es mejor que aprender mucho
El aprender cosas buenas.”*

El Gaucho Martín Fierro
-José Hernández (1872)-

A mis padres,

*“las palabras son enanos,
los ejemplos gigantes”*

-proverbio suizo-

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Instituto de Investigación en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA) – Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), con una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: CONICET PIP 0282; ANPCYT PICT 00214; ANPCYT PICT 1293; CONICET PIP 0283; UBACYT 01/W290.

A Carlos, mi director, por su apoyo constante, por ser un buen maestro, por encontrar una solución a cada problema, por el tiempo dedicado.

A Iara, mi directora, porque a pesar de la distancia, supo estar presente durante todo este proceso. Por sus aportes y su actitud positiva.

A la Administración de Parques Nacionales por permitirnos la extracción de muestras en el lago Lacar, Parque Nacional Lanín (permiso N° 815).

A la Escuela Buceo de los Andes, matrícula Registral N°19 de Prefectura Naval Argentina, perteneciente al Club Náutico San Martín de los Andes, por proveer los equipos necesarios para las tareas de campo.

Al Centro de Ecología Aplicada del Neuquén, a la Cooperativa de Agua y Saneamiento de San Martín de los Andes y a la Estación de Biología Acuática, San Martín de los Andes por su asistencia técnica y datos complementarios.

Al Dr. Martín Tresguerres por su colaboración en la corrección idiomática de artículos científicos, a la Dra. Luciana Piudo y al Lic. Martín Monteverde por su asistencia en análisis estadísticos, a Leandro Castiñeira por su colaboración técnica, a la Dra. Angela Juárez por proveer la cepa de *Scenedesmus vacuolatus*, a la Dra. Visitación Conforti por proveer la cepa de *Euglena gracilis* y al Dr. Daniel Nahabedian por su asistencia en técnicas y análisis histológicos.

A mi esposo “el negro” Juan, mi compañero de vida y de trabajo, porque gracias a su apoyo, comprensión, aguante y amor, estoy donde estoy.

A Flavia Bieczynski y Fedra Granata por su ayuda en las tareas de campo y de laboratorio, por todo lo compartido y lo aprendido.

A Carla Alvarez, por la alegría y la buena onda durante el año que estuvo de lava ependorfs.

A la gente del CEAN, Jorge, Lucho, Pablito, Leo, Pablo, Mariela, Walter, Martín, Luciana y a todos, por abrirme las puertas y recibirme con tan buena predisposición.

A los buzos buscadores de almejas, Flavia Bieczynski, Miguel Selser, Santiago Franzoni y Santiago Dominguez, gracias por estar, con frío y todo.

A mi Madre y Padre, por su ejemplo, sacrificio, consejo y amor constante. Por enseñarme lo importante del estudio.

Al resto de la flia., Lela y Lelito, Abuela, Lalo, Elena, Leo, Pri, Nico, Leti, José, Nadia, Nacho, Ceci, Mili, Vitoriti, tías, tíos y primos, y al Panchito, por ser el marco de todo esto.

A mis amigas, Euge, Eli, Eugin y Ale por estar siempre, incondicionalmente, sin importar la distancia.

A Andre y Ada, Ely y Juan por estos años de buenos momentos, por recibirme como una familia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
I- PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	6
II- CASO DE ESTUDIO	8
III- MODELO DE ESTUDIO.....	10
IV- BIOMONITOREO	11
V- BALANCE OXIDATIVO.....	13
<i>VI- Biomarcadores de Estrés Oxidativo</i>	<i>16</i>
VI- A) Peroxidación Lipídica	16
VI- B) Estabilidad de la Membrana Lisosomal	17
VI- C) Frecuencia de Micronúcleos	17
VI- D) Viabilidad Celular.....	18
VI- E) Actividad Enzimática Antioxidante y Detoxificante.....	18
VI- F) Capacidad Antioxidante Total	19
VII- RESPUESTA INMUNE	19
<i>VIII- Biomarcadores de Respuesta Celular</i>	<i>21</i>
VIII- A) Número de Hemocitos	22
VIII- B) Actividad Fagocítica.....	22
VIII- C) Agregación y Encapsulación	23
VIII- D) Producción de EROs.....	24
VIII- E) Respuesta Inflamatoria.....	26
<i>IX- Biomarcadores de Respuesta Humoral</i>	<i>26</i>
IX- A) Actividad de Lisozimas	26

IX-B) Actividad Fenoloxidasa	27
X- CONDICIÓN METABÓLICA.....	27
<i>X-A)- Biomarcadores de Condición Metabólica</i>	28
<i>XI- A) 1) Actividad de Proteína Fosfatasa 1</i>	28
<i>X- A) 2) Cambios Morfométricos y en las Reservas Energéticas</i>	28
<i>X- A) 3) Relación ARN/ADN</i>	29
XI- COMPLEMENTOS INMUNOESTIMULANTES Y ANTIOXIDANTES	29
XII- BIOREMEDIACIÓN	31
HIPÓTESIS GENERALES	33
OBJETIVO GENERAL	33
METODOLOGÍA GENERAL	34
I- RECOLECCIÓN DE ALMEJAS	34
II- PROCESADO DE HEMOLINFA	34
III- PROCESADO DE TEJIDOS	35
IV- EVALUACIÓN DEL BALANCE OXIDATIVO.....	36
<i>IV- A) Proteínas Totales</i>	36
<i>IV- B) Peroxidación Lipídica</i>	36
<i>IV- C) Estabilidad de la Membrana Lisosomal</i>	37
<i>IV- D) Micronúcleos</i>	37
<i>IV- E) Viabilidad Celular</i>	38
<i>IV- F) Actividad Glutación S-transferasa</i>	39
<i>IV- G) Actividad Catalasa</i>	39
<i>IV- H) Capacidad Antioxidante Total</i>	40
V- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	40
<i>V- A) Recuento de Hemocitos Totales</i>	40
<i>V- B) Actividad Fagocítica</i>	41

V- C) Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.....	42
V- D) Contenido de Proteínas Totales en Plasma.....	42
V- E) Actividad Bacteriolítica.....	43
V- F) Actividad Fenoloxidasa.....	43
VI- EVALUACIÓN DE LA CONDICIÓN METABÓLICA	44
VI- A) Actividad de Proteína Fosfatasa I.....	44
VI- B) Factores Morfométricos.....	44
VI- C) Contenido de glucógeno.....	45
VI- D) Contenido de lípidos.....	45
VI- E) Relación ARN / ADN.....	45
VII- MICROORGANISMOS UTILIZADOS	45
VII- A) <i>Escherichia coli</i>	45
VII- B) <i>Scenedesmus vacuolatus</i>	46
VII- C) <i>Euglena gracilis</i>	46
VII- C) 1) Determinación del contenido de Paramilon.....	47
VIII- ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS Y BACTERIOLÓGICOS DE AGUA Y SEDIMENTOS.....	48
VIII- A) Recolección y Preservación de Muestras.....	48
VIII- B) Coliformes Fecales y Bacterias Entéricas.....	48
VIII- C) Clorofila a.....	48
VIII- D) Materia Orgánica.....	49
VIII- E) Formas de Nitrógeno.....	49
VIII- F) Formas de fósforo.....	50
VIII- G) Sulfatos.....	50
VIII- H) Turbidez.....	50
VIII- I) Cobre.....	50
VIII- J) Hierro.....	50

CAPÍTULO I: BIOMARCADORES DE RESPUESTA EN *DIPLODON CHILENSIS* EXPUESTO A CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES CLOACALES EN LA CUENCA DEL RÍO POCAHULLO. 51

I- INTRODUCCIÓN..... 52

HIPÓTESIS 55

OBJETIVOS 55

II- MATERIALES Y MÉTODOS..... 56

II- A) SITIOS DE ESTUDIO 56

II- B) EXPOSICIÓN A CAMPO..... 56

II- C) EXPOSICIÓN EN LABORATORIO 58

II- D) ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 58

III- RESULTADOS..... 59

III- A) CALIDAD DEL AGUA..... 59

III- B) EXPOSICIÓN A CAMPO 61

III- C) EXPOSICIÓN EN LABORATORIO..... 64

IV- DISCUSIÓN 65

IV- A) EXPOSICIÓN A CAMPO 65

IV- B) EXPOSICIÓN EN LABORATORIO..... 69

VI- CONCLUSIONES 71

CAPÍTULO II: RESPUESTA INMUNE, BALANCE OXIDATIVO Y CAPACIDAD FILTRADORA EN *DIPLODON CHILENSIS* EXTRAÍDO DE POBLACIONES NATURALES, EXPUESTAS A CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES CLOACALES EN EL LAGO LACAR..... 72

I- INTRODUCCIÓN..... 73

HIPÓTESIS	76
OBJETIVOS	76
II- MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
II- A) ESTUDIO A CAMPO.....	77
II- B) ESTUDIO EN LABORATORIO	77
II- B) 1) <i>Bioremediación de Agua Contaminada</i>	77
II- B) 2) <i>Bioremediación de Sedimentos Contaminados</i>	78
II- B) 3) <i>Tasas de Alimentación</i>	79
II- C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	80
III- RESULTADOS.....	81
III- A) ESTUDIO A CAMPO	81
III- A) 1) <i>Calidad del Agua y los Sedimentos</i>	81
III- A) 2) <i>Estado de Salud</i>	82
III- B) ESTUDIO DE LABORATORIO.....	84
III- B) 1) <i>Bioremediación de Agua y Sedimentos</i>	84
III- B) 2) <i>Tasas de Alimentación</i>	85
IV- DISCUSIÓN	88
IV- A) RESPUESTA INMUNE, BALANCE OXIDATIVO Y CITOTOXICIDAD EN HEMOCITOS	89
IV- B) RESERVAS ENERGÉTICAS	92
IV- C) FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS Y FACTOR DE MASA BRANQUIAL	93
IV- D) TASAS DE ALIMENTACIÓN Y POTENCIAL BIOREMEDIADOR.....	94
VI- CONCLUSIONES	96

CAPÍTULO III: ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE, ANTIOXIDANTE Y METABÓLICA EN *DIPLODON CHILENSIS* ALIMENTADO A LARGO PLAZO

CON *EUGLENA GRACILIS*: IMPLICANCIAS EN ESTRATEGIAS DE BIOREMEDIACIÓN DE EFLUENTES CLOACALES..... 97

I- INTRODUCCIÓN..... 98

PARTE A: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE *EUGLENA GRACILIS* SOBRE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *DIPLODON CHILENSIS* EXPUESTO A LA BACTERIA COLIFORME FECAL *ESCHERICHIA COLI*..... 101

HIPÓTESIS	102
OBJETIVO	102

II- MATERIALES Y MÉTODOS..... 103

II- A) RECOLECCIÓN DE ALMEJAS.....	103
II- B) DISEÑO EXPERIMENTAL	103
II- C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105

III- RESULTADOS..... 105

III- A) DOSIS DE PARAMILON	105
III- B) RESPUESTA INMUNE	106
<i>III- B) 1) Respuesta Celular.....</i>	<i>106</i>
<i>III- B) 2) Respuesta Plasmática</i>	<i>109</i>
<i>III- C) Respuesta Tisular.....</i>	<i>109</i>
III- D) BALANCE OXIDATIVO.....	112
<i>III- D) 1) EROs y Capacidad Antioxidante Total en Plasma.....</i>	<i>112</i>
<i>III- D) 2) Actividades GST y CAT, y Peroxidación Lipídica en Tejido.....</i>	<i>113</i>
IV- RELACIÓN ARN / ADN.....	117

IV- DISCUSIÓN 117

IV- A) RESPUESTA INMUNE.....	118
<i>IV- A) 1) Respuesta Celular y Plasmática</i>	<i>118</i>

IV- A) 2) <i>Respuestas en Branquia y Glándula Digestiva</i>	120
IV- B) BALANCE OXIDATIVO.....	122
IV- C) RELACIÓN ARN/ADN.....	123
VI- CONCLUSIONES.....	125
PARTE B: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE <i>EUGLENA GRACILIS</i> SOBRE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE <i>DIPLODON CHILENSIS</i> EXPUESTO A CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES CLOACALES EN EL RÍO POCAHULLO.....	126
HIPÓTESIS	127
OBJETIVO	127
II- MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
II- A) RECOLECCIÓN DE ALMEJAS.....	128
II- B) DISEÑO EXPERIMENTAL	128
II- C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129
IV- RESULTADOS.....	129
IV- A) CALIDAD DEL AGUA.....	129
IV- B) RESPUESTA EN HEMOCITOS	131
IV- B) 1) <i>Respuesta Inmune</i>	131
VI- B) 2) <i>EROs y Capacidad Antioxidante Total</i>	131
VI- B) 3) <i>Citotoxicidad</i>	132
VI- C) RESPUESTA EN TEJIDOS.....	133
VI- C) 1) <i>Actividad Enzimática y Peroxidación Lipídica</i>	133
VI- C) 2) <i>Contenido de Proteínas</i>	135
IV- D) CONDICIÓN METABÓLICA.....	135
IV- DISCUSIÓN	136

IV- A) RESPUESTA CELULAR Y CITOTOXICIDAD EN HEMOCITOS.....	136
IV- D) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN TEJIDOS	139
IV- E) CONDICIÓN METABÓLICA	140
V- CONCLUSIONES.....	142
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN.....	143
BIBLIOGRAFÍA	144
ANEXO 1: DATOS COMPLEMENTARIOS	160
ANEXO 2: DATOS COMPLEMENTARIOS	161
ANEXO 3: ARTÍCULO DE RESPALDO	162

RESUMEN

El incremento en el vertido de efluentes cloacales hacia los cuerpos de agua, como producto de la expansión de las áreas urbanas, representa una amenaza tanto a nivel ecosistémico como sanitario. En particular, la cuenca del río Pocahullo, en la ciudad de San Martín de los Andes, se encuentra afectada por descargas de efluentes cloacales con y sin tratamiento, los cuales son transportados y vertidos finalmente en la margen este del lago Lacar. La búsqueda de biomarcadores que reflejen la calidad del agua y el desarrollo de estrategias de bioremediación, constituyen herramientas útiles para su implementación en programas de biomonitoreo y en políticas de restauración de ambientes contaminados.

En este trabajo de tesis se evalúa el potencial de la almeja nativa *Diplodon chilensis* como especie centinela y bioremediadora en ambientes acuáticos contaminados por efluentes cloacales. Con este objetivo, se estudiaron sus respuestas fisiológicas concernientes al balance oxidativo, la respuesta inmune y la condición metabólica, como biomarcadores de exposición. Además, se evaluó la capacidad filtradora de la almeja sobre agua y sedimentos contaminados por este tipo de efluentes. Por otro lado y con fines de implementación en estrategias de bioremediación, se evaluó el potencial inmunoestimulante y antioxidante de la alimentación previa con *Euglena gracilis* en almejas expuestas a *Escherichia coli* en laboratorio y a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pocahullo. Se utilizaron técnicas fisicoquímicas, bioquímicas, citológicas e histológicas.

En el Capítulo I, se evalúa la capacidad de respuesta de biomarcadores en branquia y glándula digestiva de *D. chilensis* expuesto a contaminación por efluentes cloacales, a corto y largo plazo. Almejas recolectadas en una zona no contaminada en el Lago Lacar fueron trasplantadas en cajas a un sitio de referencia no contaminado y a otros dos sitios con contaminación cloacal creciente en la cuenca del río Pocahullo. Se evaluaron respuestas antioxidantes y/o detoxificantes, daño oxidativo y condición metabólica al primer y tercer mes de la exposición a campo. Luego, almejas aclimatadas a largo plazo (siete meses) en el sitio de mayor contaminación fueron expuestas de forma aguda (8 h) en el laboratorio a agua contaminada con aproximadamente el doble de concentración bacteriana que la medida en ese sitio al momento de la recolección. Las respuestas enzimáticas se evaluaron antes y después de

la exposición aguda. Los resultados más relevantes de estos experimentos sugieren que las actividades enzimáticas glutatión S- transferasa y catalasa en branquia de *D. chilensis* son biomarcadores aplicables para la detección de contaminación por efluentes cloacales con altas concentraciones de coliformes fecales, independientemente de que los individuos sean previamente aclimatados o no. Además, la actividad catalasa en glándula digestiva es sensible al aumento agudo en la carga bacteriana, tanto en almejas previamente expuestas a contaminación como en almejas extraídas de sitios no contaminados, mientras que la enzima glutatión S- transferasa en glándula digestiva se torna sensible luego de la exposición a largo plazo. Complementariamente, se sugiere que los efectos de trasplante sobre las respuestas fisiológicas deberían ser correctamente monitoreados para evitar interpretaciones erróneas en estudios de campo.

En el Capítulo II, se evalúa el estado fisiológico de almejas expuestas crónicamente a contaminación por efluentes cloacales en el lago Lacar. Con este fin, se recolectaron individuos de poblaciones naturales de *D. chilensis* en un sitio no contaminado y en el área del lago contaminada por efluentes cloacales en la desembocadura del río Pocahullo. Se estudiaron y compararon biomarcadores de respuesta inmune, balance oxidativo, daño a ADN, reservas energéticas, factores morfométricos y capacidad filtradora, junto con el potencial biorremediador, en ambos grupos. Los resultados de este estudio sugieren que *D. chilensis* modula sus respuestas fisiológicas ante la exposición crónica a contaminación por efluentes cloacales, favoreciendo respuestas inmunes celulares, como el número de hemocitos y la actividad fagocítica, y evitando efectos deletéreos en estas células. Sin embargo, en branquia se observa sensibilidad a estas condiciones, la cual se evidencia en cambios morfométricos y en daño a ADN. Por otro lado, la capacidad filtradora de *D. chilensis* no es afectada por la exposición crónica a contaminación por efluentes cloacales, destacándose su actividad bioremediadora en agua y sedimentos contaminados con bacterias entéricas.

Finalmente, en el Capítulo III se evalúan y comparan los efectos de modulación ejercidos por la alimentación previa con *E. gracilis* sobre la respuesta inmune, el balance oxidativo y la condición metabólica de *D. chilensis* expuesto a *E. coli* en laboratorio, por 5 días y a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pocahullo, por 10 días. Los resultados sugieren que *E. gracilis* constituye un potencial complemento dietario con

propiedades protectoras y nutricionales para ser utilizado en estrategias de biorremediación con bivalvos filtradores. En general, en ambos casos se observa que la alimentación con *E. gracilis* favorece la respuesta inmune celular (fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno) y la resistencia al daño en hemocitos (viabilidad, estabilidad de la membrana lisosomal), como así también la condición metabólica (síntesis de proteínas, crecimiento somático, masa de glándula digestiva) en esta almeja. Sin embargo, la dosis y el tiempo de administración requieren un mayor estudio, ya que la alimentación con *E. gracilis* por sí misma y bajo condiciones de ayuno o trasplante, puede comprometer el balance oxidativo en branquia y glándula digestiva.

ABSTRACT

Sewage water discharges from growing urban areas constitute an ecosystemic and sanitary threat for aquatic environments and human health. Particularly, in San Martín de los Andes city, treated and untreated sewage water is discharged into the Pocahullo river basin, carried along the river course and finally released into the East cost of Lacar lake. Biomarkers for water quality assessment and bioremediation strategies are useful tools to be implemented in biomonitoring and restoration programs.

In this thesis, the native mussel *Diplodon chilensis* is evaluated as a sentinel and bioremediator species in sewage polluted environments. Therefore, physiological responses related to oxidative balance, immune response and metabolic condition were evaluated in this mussel as biomarkers of exposure, while their filtering capacity was assessed for remediating sewage polluted water and sediments. In addition, immunostimulant and antioxidant potential of *Euglena gracilis* diet was evaluated in *D. chilensis* challenged with *Escherichia coli* in laboratory conditions and exposed to sewage polluted water in Pocahullo river basin. Physicochemical, biochemical, cytological and histological techniques were applied in this work.

In Chapter I, biomarkers of response to short and long-term exposure to sewage polluted water were evaluated in gill and digestive gland of *D. chilensis*. Mussels from an unpolluted area in Lacar lake were caged at a reference site and at two sites with increasing sewage pollution in Pocahullo river basin. Antioxidant and detoxifying responses, along with oxidative damage and metabolic condition biomarkers were evaluated in the first and third month of field exposure. Then, mussels acclimated for seven months in the most polluted site were acutely exposed in laboratory (8 h) to sewage polluted water with a higher concentration of fecal bacteria than that measured in the site at the time of collection (aprox. [] x 2). Enzyme responses were evaluated before and after acute exposure. The results of these experiments suggest that glutathione S- transferase and catalase activities in gill of *D. chilensis* are suitable biomarkers for sewage pollution detection at high fecal bacteria concentrations, regardless of previous exposure history. In addition, catalase activity in digestive gland is sensitive to the acute increase in bacterial load, both in mussels previously exposed and in those from the reference site, while glutathione S- transferase activity becomes responsive after long-term

acclimation. Complementary, transplantation effects on physiological variables should be accurately monitored in order to avoid data misinterpretation.

In Chapter II, physiological status was evaluated in mussels chronically exposed to sewage water pollution in Lacar lake. Mussels were collected from natural populations of *D. chilensis* inhabiting an unpolluted site and the sewage polluted site next to Pocahullo river mouth. Biomarkers of immune response, oxidative balance, DNA damage, energetic reserves, morphometric factors and filtering capacity were evaluated in both groups, along with their bioremediation potential. The results of this study suggest that *D. chilensis* modulates physiological responses upon chronic exposure to sewage pollution, favoring cellular immune responses, such as hemocyte number and phagocytosis, and avoiding deleterious effects in these cells. However, gills are sensitive to these conditions, suffering morphometric changes and DNA damage. *D. chilensis* maintains its filtering capacity under chronic exposure to sewage pollution, showing bioremediation activity on bacteriological quality of polluted water and sediments.

Finally, in Chapter III, the modulating effects of *E. gracilis* diet on immune response, oxidative balance and metabolic condition are evaluated and compared in *D. chilensis* challenged with *E. coli* in laboratory, for 5 days and exposed to sewage pollution in Pocahullo river basin, for 10 days. The results of these experiments suggest that *E. gracilis* is a potential dietary complement with protective and nutritional qualities for filtering bivalves used in bioremediation strategies. In general in both cases, *E. gracilis* diet favors immune cellular response (phagocytosis, ROS production) and damage resistance in hemocytes (viability, lysosomal membrane stability), as well as metabolic condition (protein synthesis, somatic growth, digestive gland mass). Nevertheless, doses and time of administration require further study, since *E. gracilis* diet may compromise oxidative balance in gill and digestive gland, under control, starvation and transplantation conditions.

INTRODUCCIÓN GENERAL

I- PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

La contaminación acuática, generada por las actividades antrópicas, representa un tema de preocupación a nivel mundial. En las últimas décadas, se ha detectado un aumento en la contaminación de fuentes de agua superficiales y acuíferos, originada por el vertido de efluentes cloacales, industriales, agrícola-ganaderos y/o desechos de la actividad turística (Akaishi et al., 2007; Bowes et al., 2009; Guidi et al., 2010). La detección de los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en la mezcla es frecuentemente difícil (Diniz et al., 2005) e, incluso, cuando los análisis fisicoquímicos y bacteriológicos del agua permiten cuantificar en detalle la presencia de tóxicos, ésto no permite estimar su impacto sobre la biota. Los contaminantes liberados al ambiente producen múltiples consecuencias a nivel de organismo, población y ecosistema, afectando funciones orgánicas, la reproducción, la supervivencia, el tamaño poblacional y, en última instancia, la biodiversidad del sistema (Figura 1) (Viarengo et al., 2007).

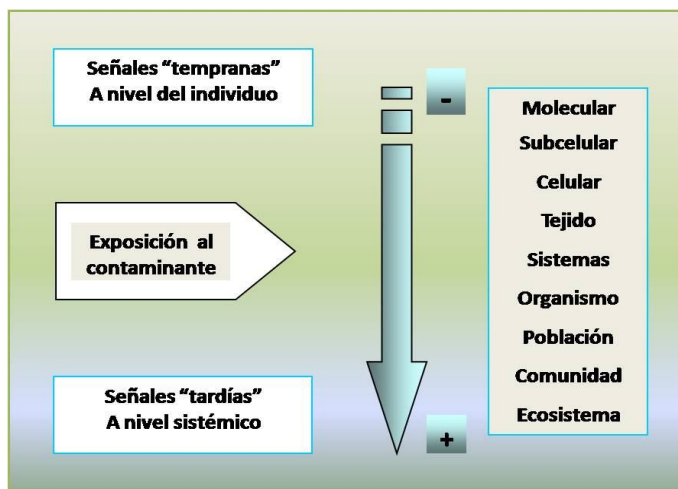


Fig. 1. Efectos de los contaminantes sobre los niveles de organización biológica.

En particular, los efluentes cloacales contienen cantidades importantes de contaminantes, que incluyen productos farmacéuticos, metales pesados, amonio, productos de higiene personal, sustancias que actúan como disruptores endocrinos y microorganismos (Bertin et al., 2011; Moynihan et al., 2012). La reducción de estos productos a niveles inocuos en el efluente requiere tratamientos sofisticados que, en muchos casos, no están disponibles (Lundström et al., 2010). Esto conlleva a que sustancias potencialmente tóxicas sean vertidas en los ambientes acuáticos y distribuidas en agua y sedimentos, comprometiendo la salud y el

desempeño ecológico de la biota residente (Akaishi et al., 2007; Azzurro et al., 2010; Penha-Lopes et al., 2011; Gillis, 2012).

Por otro lado, el vertido de este tipo de efluentes en los cuerpos de agua, aporta una gran cantidad de organismos patógenos y nutrientes que pueden desencadenar problemas sanitarios y perturbaciones ambientales. Las bacterias coliformes fecales son bacterias entéricas que se desarrollan normalmente en la flora intestinal de animales endotérmicos, incluido el ser humano, y se encuentran en muy baja proporción en ambientes acuáticos no contaminados (Rompré et al., 2002). En este grupo, se incluyen especies como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*, las cuales son capaces de producir trastornos digestivos severos en humanos, llevando en algunos casos a la muerte (Tortora et al., 2007; Cabral, 2010; Waldner et al., 2012). Adicionalmente, el incremento en las cargas de nutrientes puede conducir a la eutrofización de los cuerpos de agua (Bowes et al., 2009). En ambientes eutrofizados, se produce un incremento significativo en la producción primaria, causando un enturbiamiento de las aguas, que impide el desarrollo de procesos fotosintéticos y favorece la proliferación de organismos descomponedores aerobios. Como resultado, los niveles de oxígeno disuelto en el agua disminuyen, comprometiendo la supervivencia de organismos superiores tales como los peces (Ruuhijärvi et al., 2010). Por esto, el desafío para las autoridades de gestión de recursos hídricos es, no sólo evaluar los niveles y naturaleza de los contaminantes, sino también, minimizar las emisiones de estos elementos hacia los cuerpos de agua y, en caso necesario, implementar medidas reparadoras.

Los bivalvos de agua dulce están entre los taxa de animales que sufren mayor riesgo en norte América y Europa, con un alto porcentaje de especies clasificadas bajo algún tipo de amenaza o extintas (Williams et al., 1993; Makhrov et al., 2013). Además, una alta proporción de bivalvos de agua dulce traslocados con propósitos de conservación, mueren dentro del primer año. En este contexto, es un procedimiento común obtener datos bioquímicos y hematológicos que puedan ser usados para evaluar el estado de salud de los organismos (revisado por Burkhard et al., 2009). En cuanto a las especies nativas de Argentina y Chile, se ha avanzado en los últimos años en el conocimiento de la biología, el estado de conservación y las respuestas a condiciones estresantes en la almeja *Diplodon chilensis* (Lara et al., 2002a,b; Parada y Peredo, 2005; Parada et al., 2007; 2008; Sabatini et al., 2011a,b,c; Rocchetta et al.,

2014a,b). Sin embargo, no existen aún antecedentes sobre la caracterización del sistema inmune, ni su respuesta frente a estímulos en esta especie.

II- CASO DE ESTUDIO

La provincia del Neuquén posee numerosos ambientes de agua dulce de gran valor socioeconómico, reservas de agua potable y recursos económicos a través del turismo, la pesca deportiva y la acuicultura (Hualde et al., 1999). En particular, los lagos y ríos de Patagonia Noroeste son sistemas oligotróficos (Pedrozo et al., 1993), reconocidos como un recurso natural de importancia por su valor social, económico y ecológico. Sin embargo, en los últimos tiempos la contaminación de los sistemas acuáticos, entre otros factores, se vio incrementada por la rápida expansión de las áreas urbanas. Este crecimiento poblacional amenaza con afectar tanto la calidad del agua como la biodiversidad, a través de las prácticas de uso de la tierra y las descargas de efluentes cloacales. La presencia de bacterias coliformes, diferentes metales y floraciones fitoplanctónicas ha sido reportada anteriormente en esta zona (Hualde, 1999; Ribeiro Guevara et al., 2005; Sabatini et al., 2011b; Miserendino et al; 2011; Rocchetta et al., 2014b).

El Lago Lacar, en el sur oeste de Neuquén, tiene una superficie de 50,28 km² y una profundidad máxima de 277 m. El río Pocahullo, su principal afluente, atraviesa la ciudad de San Martín de los Andes y desemboca en la margen este del lago. Este río y sus tributarios reciben descargas de efluentes cloacales no tratados provenientes de infiltraciones de tanques sépticos y lixiviados de la actividad ganadera. Además, efluentes con tratamiento primario son vertidos desde lagunas de decantación, que proveen de sus servicios a una parte de la población de zonas periféricas a la ciudad. Cerca de la desembocadura del río Pocahullo, se encuentra la planta de tratamiento terciario, que recibe efluentes de alrededor de 20.000 personas (Figura 2). El tratamiento terciario consiste básicamente en: 1) la separación de los sólidos gruesos mediante tamices, 2) la desnitrificación en reactor biológico, 3) la sedimentación para la separación de fracción líquida y sólida, 4) el filtrado del efluente para la remoción de material en suspensión y 5) la desinfección por luz UV. Los barros resultantes son deshidratados, mientras que los productos líquidos se descargan en el curso del río

Pocahullo, actuando como una fuente puntual de contaminación en ese sitio. En épocas de alta afluencia turística y/o incremento en las precipitaciones, la capacidad de procesamiento de la planta se ve saturada y los efluentes no tratados se vierten directamente al cauce del río (“by pass”). Como consecuencia de estos procesos, se ha detectado un deterioro progresivo en la calidad química y bacteriológica del agua, a lo largo de la cuenca del río Pocahullo (Edelberg et al., 2004; Temporetti et al., 2009) y en la zona donde el río desemboca en el lago Lacar (Sabatini et al., 2011b).

Según lo expuesto, se esperaría que en la zona que recibe tratamiento terciario de efluentes, el río presentara mejores condiciones de calidad de agua que en la zona periférica, donde las descargas no son tratadas o reciben solamente tratamiento primario. Sin embargo, el volumen de efluentes que recibe la planta ubicada en el casco céntrico de San Martín de los Andes es mucho mayor que el de los volcados aguas arriba y el tratamiento terciario aplicado no sería totalmente eficiente en la reducción de nutrientes y bacterias. Por otro lado, hay que considerar que en la zona periférica la densidad poblacional es mucho menor y que aguas abajo de la confluencia de los arroyos Calvuco y Cull Rani, se produce un efecto de dilución en las aguas del arroyo.

Finalmente, cabe destacar la incorporación reciente de nuevos tanques de sedimentación a la infraestructura de la planta de la ciudad (“Lago Lacar”) y la puesta en funcionamiento de una nueva planta de tratamiento terciario que procesa los efluentes generados en las zonas periféricas (“Planta de Tratamiento Terciario 3”, Vega San Martín). Estas innovaciones permitirían ampliar la capacidad del tratamiento y, a futuro, reducir el impacto de estas emisiones. En el Anexo I se detallan los caudales medios mensuales de descargas correspondientes a la planta de tratamiento terciario de la ciudad y a las descargas generadas en las instalaciones de la Vega San Martín, antes (2009) y después (2014) de las mejoras mencionadas.

En San Martín de los Andes no existen antecedentes sobre la presencia de contaminantes de un origen diferente al urbano, ya que ésta es una ciudad con actividad económica esencialmente turística. Por otro lado, a 20 km de la ciudad, se encuentra la zona de Yuco, un área no contaminada dentro del Parque Nacional Lanín que, al igual que en

estudios anteriores (Sabatini et al., 2011a,b,c; Rocchetta et al., 2014a,b), ha sido utilizada como sitio control en el presente trabajo.

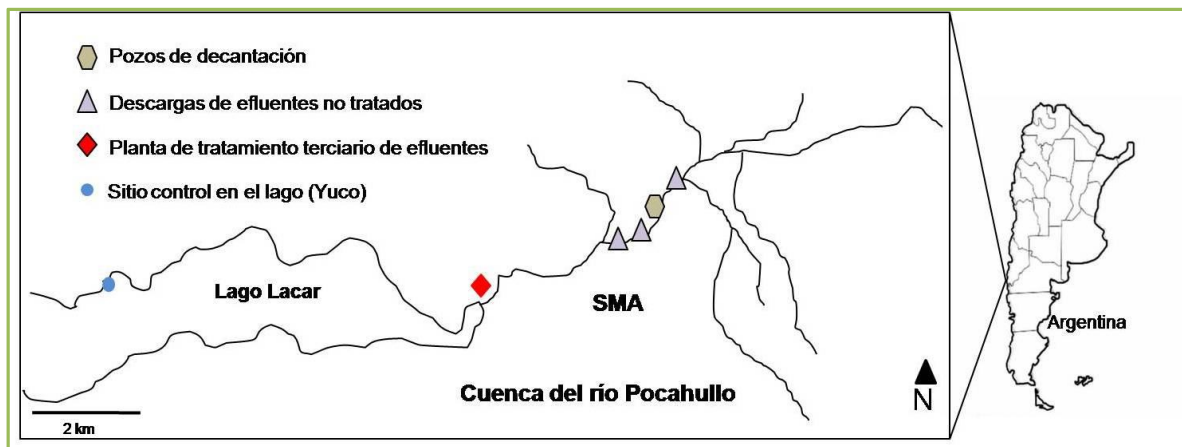


Fig. 2. Esquema de la ubicación de las fuentes de contaminación por efluentes cloacales que afectan la cuenca del río Pocahullo y la margen este del lago Lacar, en San Martín de los Andes (SMA). Se señala además el sitio control no contaminado, ubicado en el lago (basado en Temporetti et al., 2009).

III- MODELO DE ESTUDIO

Diplodon chilensis es una almeja de agua dulce, nativa de ríos y lagos cordilleranos de Argentina y Chile. En Argentina se distribuye desde Mendoza (32° 52' S; 68° 51' O) hasta Chubut (45° 51' S; 67° 28' O) (Bonetto 1973) y en Chile, desde Río Grande, al sur del pueblo de Carachilla (30° 28' S; 71° 05' O) hasta el río Negro - Itsmo de Ofqui (46° 37' S; 74° 10' O) (Parada et al., 2007) (Figura 3). Es un bivalvo de crecimiento lento y ciclo de vida largo; se han detectado ejemplares de más de 70 años en el lago Lacar (Rocchetta et al., 2014b) y recientemente, de hasta 118 años en el



Fig. 3. *Diplodon chilensis* y su distribución geográfica en la región cordillerana de Argentina y Chile (Bonetto 1973; Parada et al., 2007).

lago Paimún, cuenca del Chimehuin, en Junín de los Andes (Rocchetta et al., 2014c). Ésta es una especie de hábitos filtradores, gonocórica, ovovivípara, con actividad gonádica continua y reproducción estacional (Peredo y Parada, 1984; 1986).

Diplodon chilensis ha sido catalogado como especie de “Preocupación menor” en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, debido a sus problemas de conservación relacionados con procesos de eutrofización en algunos lagos de Chile (Valdovinos y Pedreros, 2007; Bogan y Cummings, 2011). En Argentina, Rocchetta et al. (2014b) encontraron una reducción en la densidad poblacional de almejas en la zona de la desembocadura del río Pocahullo. Además, en esta zona, se observó ausencia de individuos menores de 7 años y reducción de la longevidad, en comparación con poblaciones localizadas en áreas no contaminadas del mismo lago (Yuco y Nonthue). Sin embargo, de acuerdo con estos autores, la longevidad de almejas en esta zona se encuentra sobre los 60 años y los efectos nocivos observados a nivel poblacional dependerían principalmente de la falta de reclutamiento y/o de la mortalidad de los juveniles.

IV- BIOMONITOREO

La integración de los estudios de calidad fisicoquímica y bacteriológica del agua con sus efectos a nivel biológico en los organismos, contribuye al entendimiento de las causas y consecuencias del impacto antropogénico en el ambiente. Organismos internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency, US-EPA) han desarrollado una serie de procedimientos científicos llevados a cabo en programas de biomonitoreo, para estimar los efectos adversos, efectivos o probables, de las actividades humanas sobre los ecosistemas y sus componentes (Depledge y Fossi, 1994). Este tipo de estudios permiten orientar a los organismos gubernamentales sobre medidas políticas para el manejo sustentable del recurso hídrico.

El biomonitoreo es un conjunto de técnicas basado en la reacción y sensibilidad de distintos organismos vivos a diversas sustancias contaminantes presentes en un ecosistema. Estas respuestas se evalúan utilizando biomarcadores en organismos denominados centinelas.

Los biomarcadores son cambios medibles en parámetros que indican un estado biológico, sea bioquímico, fisiológico o morfológico, frente a distintos niveles de contaminación. La utilización de biomarcadores permite la detección temprana de elementos contaminantes que podrían tener efectos adversos a largo plazo en las poblaciones de organismos expuestos (van der Oost et al., 2003) y la asimilación de los efectos de los compuestos tóxicos que no están permanentemente en el área de estudio (Contardo-Jara et al., 2009).

En estudios de biomonitorio, es recomendable el uso de múltiples biomarcadores que brinden información fisiológica significativa, como resultado de la interacción de todas las variables implicadas. Según Viarengo et al. (2007), el conjunto de biomarcadores a utilizar debe incluir aquellos de fácil medición y bajo costo. Además, deben ser sensibles a estrés, a nivel molecular y celular, y sus respuestas de activación deben ser lo suficientemente rápidas como para brindar una señal temprana de riesgo. Por otro lado, los biomarcadores deben evaluar el daño producido por los tóxicos a nivel tisular, como así también el estrés producido a nivel de individuo, su capacidad de supervivencia y reproducción (Nicholson y Lam, 2005; Mahmoud et al., 2010).

Las respuestas dependen tanto de la biodisponibilidad de los compuestos en el ambiente, como de las particularidades del proceso tóxico-cinético (asimilación, distribución, bioacumulación, biotransformación y excreción). A su vez, las particularidades toxicocinéticas responden a diferencias fisiológicas específicas y a cambios estacionales (Contardo-Jara et al., 2009; Ellis et al., 2011). Por este motivo, es necesario considerar la fisiología del organismo centinela y su contexto, para obtener una correcta interpretación de las respuestas observadas. La especie centinela adecuada para estos estudios depende del sistema y de los compuestos tóxicos de interés. Además, debe poseer una taxonomía sencilla, un ciclo biológico conocido y una distribución geográfica extensa.

Los bivalvos marinos y de agua dulce son ampliamente utilizados como organismos centinela en programas de biomonitorio, debido a las características de su ciclo de vida y a las particularidades de sus hábitos alimenticios. Los bivalvos son animales sésiles o con escasa movilidad dentro de las zonas de estudio, lo que permite que sean fácilmente colectados y manipulados. Además, debido a que son organismos filtradores, los bivalvos se encuentran considerablemente expuestos a los contaminantes, incorporándolos y bioacumulándolos desde

la columna de agua (Nicholson y Lam, 2005; Ribeiro Guevara et al., 2005; Mahmoud et al., 2010; Sabatini et al., 2011a,b,c).

La salud y el desempeño ecológico de los bivalvos dependen del mantenimiento del balance oxidativo y de la modulación de respuestas inmunes no específicas ante condiciones estresantes (Akaishi et al., 2007; Bouchard et al., 2009). En este sentido, tanto las defensas antioxidantes, detoxificantes e inmunes, como así también, los parámetros de condición metabólica, pueden ser muy sensibles ante condiciones pro-oxidantes y/o ante la presencia de tóxicos (ej. Tsangaris et al., 2010; Box et al., 2007).

V- BALANCE OXIDATIVO

En la célula se producen reacciones químicas y funcionan mecanismos tendientes a mantener el equilibrio químico de las reacciones óxido-reducción, también llamado equilibrio redox. En particular, el control homeostático de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) es crítico para el funcionamiento normal de la célula. Estas moléculas son continuamente producidas en los sistemas biológicos como productos del metabolismo aerobio o como productos de sistemas especializados (ej. sistema inmune). La mayor producción de EROs se lleva a cabo en la mitocondria, como producto de la reducción parcial

de O_2 en la cadena de transporte de electrones. Las EROs más ampliamente estudiadas en este proceso incluyen: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Figura 4). También se producen EROs en el retículo endoplasmático a través de la acción de enzimas citocromo P450, que catabolizan productos celulares y xenobióticos. Además, ciertas cantidades de EROs son producidas en el citosol y en los peroxisomas por la acción de diferentes oxidasas (revisado por Lushchack, 2011).

La concentración celular de EROs es un parámetro dinámico que cambia bajo ciertas condiciones. Diferentes vías antioxidantes y detoxificantes son las encargadas de eliminar las

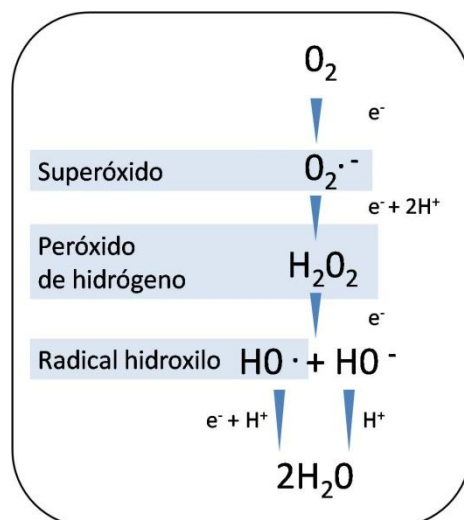


Fig. 4. Reducción secuencial de O_2 y consecuente producción de EROs.

EROs, generadas en forma espontánea durante los distintos procesos metabólicos (Figura 5). En los casos en que la generación de EROs es significativamente incrementada y las vías antioxidantes no son lo suficientemente eficientes como para contrarrestar ese aumento, se produce un desequilibrio del estado redox, denominado “estrés oxidativo” (Lushchack, 2011). El estrés oxidativo es una situación donde el nivel estable de EROs es elevado de forma temporal o crónica, con consecuencias deletéreas sobre el metabolismo celular y su regulación. Las EROs son altamente reactivas, por lo que pueden interactuar con macromoléculas intracelulares, tales como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, produciendo daño oxidativo y consecuente muerte celular (revisado por Yang et al., 2012). Por otro lado, el sistema puede estabilizarse a niveles de EROs por encima de los niveles originales, en cuyo caso se denomina “nivel quasi- estacionario” y es considerado como un nuevo estado estacionario mayor al anterior (Lushchack, 2011).

El sistema antioxidante en animales acuáticos comprende compuestos de peso molecular bajo y alto (Livingstone, 2001). Los antioxidantes de bajo peso molecular incluyen compuestos hidrosolubles, tales como el glutatión reducido (GSH) y el ácido ascórbico (vitamina C), y compuestos liposolubles, como los carotenoides, el retinol (vitamina A) y el α -tocoferol (vitamina E). Estos compuestos actúan neutralizando radicales libres o como parte de otros mecanismos antioxidantes (ej. el glutatión actúa como cofactor de enzimas antioxidantes y detoxificantes, como glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa). Los antioxidantes de alto peso molecular incluyen proteínas específicas, tales como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa dependiente de Se (GPx), glutatión reductasa (GR) y glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PD). Por otro lado, las proteínas antioxidantes no específicas incluyen proteínas que previenen el daño inducido por EROs mediante la unión con iones metálicos de transición, entre ellas se encuentran las metalotioneínas y la ferritina. La producción de antioxidantes responde a las necesidades del organismo y se encuentra activamente regulada.

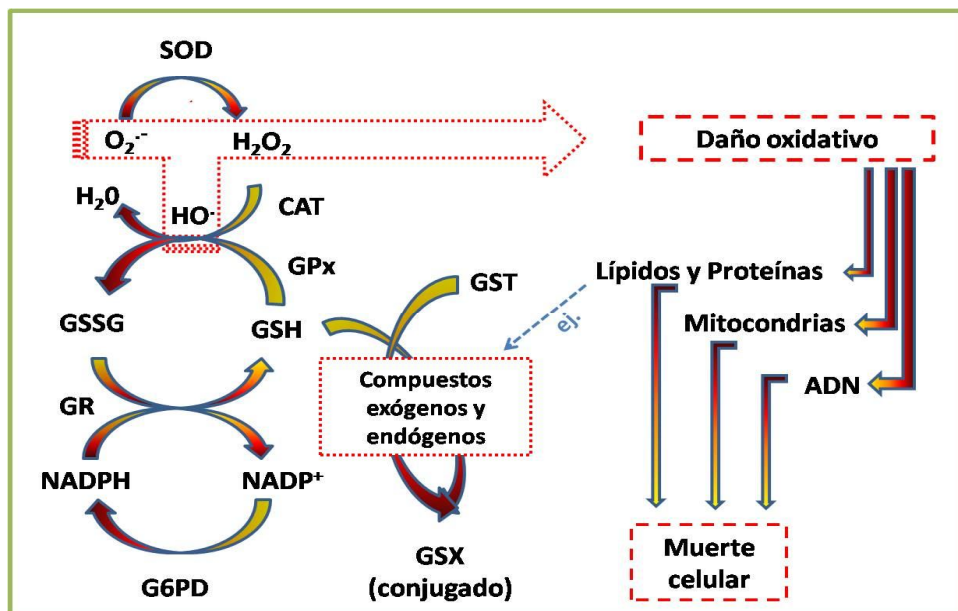


Fig. 5. Esquema representativo de las reacciones antioxidantes y detoxificantes, y el daño oxidativo desencadenados por la generación de EROs. Superóxido dismutasa (SOD); Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); Peróxido de hidrógeno (H_2O_2); Radical Hidroxilo (HO^{\cdot}); Catalasa (CAT); Glutatión peroxidasa (GPx); Glutatión oxidado (GSSG); Glutatión reducido (GSH); Glutatión reductasa (GR); Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido ($NADPH$) y oxidado ($NADP^+$); Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (G6PD); Glutatión S-transferasa (GST).

La evaluación de parámetros biomarcadores de estrés oxidativo brinda una idea sobre el balance redox y sus alteraciones en el organismo, frente a diferentes condiciones y estímulos. Los contaminantes ambientales, en especial aquellos que interfieren con procesos redox, son potentes iniciadores de estrés oxidativo (Lushchack, 2011). Además, es necesario tener en cuenta que la generación de estrés oxidativo es un componente frecuente de todo estrés substancial. Este tipo de estrés refiere a alteraciones bioquímicas y/o fisiológicas inducidas tanto por los efectos tóxicos directos de los contaminantes como por cambios naturales en el ambiente. Como resultado de estas alteraciones la capacidad de adaptación ante futuros cambios ambientales puede verse modificada (Bayne, 1986). En la siguiente sección se describen diversos tipos de biomarcadores que responden a diferentes condiciones de estrés y exposición, con especial hincapié en su relación con efectos oxidativos.

VI- Biomarcadores de Estrés Oxidativo

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de fluorescencia que permiten estimar los niveles de EROs presentes en una muestra (Moss and Allam, 2006, Rivera-Ingraham et al., 2013). Sin embargo, éstas por si solas no permiten una evaluación en cuanto a sus consecuencias a nivel biológico. Debido a esto, el monitoreo de las modificaciones causadas por las EROs en diferentes componentes celulares o la inducción de compuestos específicos, es una metodología comúnmente utilizada. Entre los parámetros más evaluados se encuentran las modificaciones producidas en moléculas de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y la inducción de respuestas antioxidantes, enzimáticas y no enzimáticas (Victor et al., 2004; Viarengo et al., 2007; Yang et al., 2012).

VI- A) Peroxidación Lipídica

La oxidación de lípidos es uno de los parámetros más utilizados en el estudio del efecto de los radicales libres porque muchos organismos, especialmente los acuáticos, contienen grandes cantidades de lípidos con ácidos grasos poliinsaturados, que actúan como sustrato para la oxidación. Teniendo en cuenta que la oxidación de lípidos se lleva a cabo a través de la formación de peróxidos, este proceso se denomina “peroxidación lipídica” (Viarengo et al., 2007). La interacción de las EROs con los lípidos es particularmente dañina para la célula porque una molécula de EROs puede generar grandes cantidades de radicales peróxido, radicales alcoxy y aldehídos insaturados, como resultado de la propagación autocatalítica de este tipo de reacciones (Sharma et al., 2004).

El nivel de malondialdeído (MDA), uno de los productos finales de la cadena de peroxidación lipídica, es uno de los biomarcadores más utilizados para el monitoreo del daño oxidativo ejercido en lípidos de membrana. Este parámetro, es de fácil y rápida medición, y debido a su alta tasa de degradación, permite obtener una idea del daño inmediato. Sin embargo, su eficacia para la evaluación de efectos acumulativos, es cuestionable (Viarengo et al., 2007). En bivalvos, los niveles de MDA aumentan sensiblemente ante un amplio rango de contaminantes y tiempos de exposición (Charissou et al., 2004; Gust et al., 2013; Toufexi et al., 2013).

VI- B) Estabilidad de la Membrana Lisosomal

Los lisosomas son organelas sub-celulares, rodeadas por una membrana semipermeable, que contienen numerosas enzimas hidrolíticas involucradas en diversos procesos celulares, tales como la digestión, la defensa y la reproducción (Pipe 1993; Ferreira y Dolder, 2003). La exposición a condiciones tóxicas puede desencadenar un incremento en la actividad catabólica, el posterior daño lisosomal y la liberación de las hidrolasas ácidas hacia el citosol, causando un daño muy severo y hasta muerte celular. Se ha sugerido que algunos contaminantes químicos pueden dañar los lisosomas actuando directamente sobre su membrana o alterando algunas vías de señalización (revisado por Viarengo et al., 2007).

Los lisosomas son muy utilizados en estudios de toxicología acuática debido a que presentan una alta sensibilidad a un amplio rango de contaminantes ambientales. Además, son fáciles de visualizar en células del sistema circulatorio y en cortes de tejido congelado, y no son específicos de especie, ya que están presentes en todas las células nucleadas (Viarengo et al., 2007). En particular, la evaluación de la estabilidad de la membrana lisosomal es un buen indicador de daño a lisosomas y, aunque se considera como un indicador de estrés fisiológico no específico, se ha demostrado en almejas y mejillones, que la membrana lisosomal se desestabiliza en respuesta al aumento en la concentración de contaminantes y que esta variación se correlaciona con la modulación del equilibrio redox en la célula (Regoli et al., 2004; Guidi et al., 2013)

VI- C) Frecuencia de Micronúcleos

La generación de EROs, como así también la exposición a contaminantes químicos y/o perturbaciones físicas, puede inducir alteraciones en el ADN, tales como ruptura de cadenas, modificación de bases y formación de híbridos por entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína. En particular, cuando se produce alguna deficiencia durante el proceso de incorporación de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos en el núcleo de la célula hija durante la división celular, se forman los llamados micronúcleos. Éstos se encuentran como pequeños núcleos adicionales que permanecen en la célula durante todo su ciclo de vida. La presencia de micronúcleos puede ser incrementada por agentes clastogénicos o por

disfunciones del huso acromático, causadas por compuestos tóxicos. Por lo tanto, dependiendo de las características del ciclo de vida de cada tipo celular y de su tasa de replicación, la frecuencia de micronúcleos puede considerarse como un buen indicador de efectos genotóxicos acumulados (revisado por Viarengo et al., 2007).

La aparición de micronúcleos es frecuentemente monitoreada en estudios toxicológicos con bivalvos (Izquierdo et al., 2003; Machado-Schiaffino et al., 2009; Toufexi et al., 2013), anfibios (Gauthier et al., 2004) y peces (Rodríguez-Cea et al., 2003), ya que este procedimiento es técnicamente más fácil y rápido que los análisis de aberraciones cromosómicas durante la metafase. Sin embargo, aunque requiere de poco equipamiento e insumos, es necesaria la observación de un alto número de células, insumiendo gran cantidad de tiempo. Particularmente en bivalvos, este biomarcador es evaluado tanto en células del sistema circulatorio como en células de branquia, siendo este último tejido un mejor objeto de estudio, tanto en ensayos a campo como en individuos extraídos directamente de sitios contaminados (Viarengo et al., 2007).

VI- D) Viabilidad Celular

Como se mencionó anteriormente, el incremento desmedido de EROs y la acción directa de diferentes contaminantes puede causar un daño severo sobre la estructura de las membranas celulares y lisosomales, como así también en la estructura del ADN. Estos daños alteran la viabilidad estructural y funcional de la célula, produciendo en última instancia, su muerte. La determinación de la viabilidad celular es una medición fácil, rápida y de bajo costo, y aunque no es un biomarcador específico, es muy utilizada en bivalvos como parte de la batería de biomarcadores en estudios de exposición a contaminantes químicos (Gómez-Mendikute y Cajaraville et al., 2003; Akaishi et al., 2007) y a microorganismos (Allam et al., 2000).

VI- E) Actividad Enzimática Antioxidante y Detoxificante

El monitoreo de las actividades individuales de cada enzima puede servir para estimar el potencial antioxidante en condiciones específicas. En particular, la evaluación de las

actividades enzimáticas catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST), implica ensayos de bajo costo que han sido ampliamente utilizados en estudios de biomonitoreo con especies centinelas de peces (ej. Lu et al., 2010) y bivalvos (ej. Bainy et al., 2000; Gust et al., 2013). CAT es una enzima antioxidante que cataliza la descomposición del H₂O₂ producido principalmente en los peroxisomas (Figura 5) (Chance et al., 1954). GST es una enzima antioxidante y detoxificante de fase II, que cataliza la conjugación de glutatión reducido (GSH) con compuestos tóxicos endógenos y exógenos, incluyendo productos de la peroxidación lipídica (Sharma et al., 2004), que son luego eliminados de la célula (Figura 5).

La exposición a contaminantes orgánicos e inorgánicos, o a mezclas de ellos, puede producir un aumento en las actividades enzimáticas de defensa, constituyendo un biomarcador de estrés oxidativo (Lu et al., 2010). Sin embargo, estas respuestas varían según las concentraciones de tóxicos y el tiempo de exposición (Bainy et al., 2000). Cuando éstas defensas son inhibidas o superadas por el incremento en la producción de EROs, puede producirse daño oxidativo.

VI- F) Capacidad Antioxidante Total

La capacidad antioxidante total puede ser utilizada para cuantificar la resistencia celular a diferentes radicales de oxígeno (Regoli, 2000). Este es un biomarcador empleado tanto en estudios de laboratorio como de campo (Regoli, 2000; Amado et al., 2009) y permite estimar los efectos del estrés oxidativo, dentro de las alteraciones fisiológicas generales provocadas por la exposición a contaminantes. Un aumento en la capacidad antioxidante total denota una respuesta ante condiciones de estrés, por lo que una deficiencia en esta respuesta traería aparejado el consecuente daño oxidativo.

VII- RESPUESTA INMUNE

La inmunidad es definida como una reacción frente a sustancias exógenas, vivas o inertes, incluyendo aquellas de naturaleza microbiológica y química. La respuesta inmune se puede clasificar en respuesta innata y respuesta adquirida. La inmunidad innata constituye la

primera línea de defensa del hospedador contra un agente extraño, detectando su presencia según su naturaleza. La inmunidad innata es de respuesta inmediata pero carece de especificidad y “memoria”, por lo que su acción no permite una respuesta mejorada en amplitud y tiempo, tras la repetición del mismo estímulo. Por el contrario, la respuesta inmune adquirida, que se observa sólo en vertebrados, muestra mediante la acción de anticuerpos, el reconocimiento de agentes invasores y una respuesta mejorada tras la primera exposición (Roitt y Delves, 2003)

En el caso de los moluscos bivalvos, la inmunidad innata está constituida por barreras físico-químicas, como la concha y el mucus, factores humorales proteicos y células con actividad fagocítica (Donaghy et al., 2009). Cuando las barreras físico-químicas son superadas, los componentes celulares y humorales son los que se encargan de la eliminación del agente exógeno. Los moluscos, como el resto de los invertebrados, carecen de receptores de reconocimiento de antígenos, por lo que esta función se realiza a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). En las últimas décadas, se han identificado varias familias de RRP en moluscos, entre las que se destacan: los receptores tipo Toll (TLR), lectinas, proteínas de unión a lipopolisacáridos y a β -glucanos (LGBP), y receptores carroñeros (“scavenger”) (SRs) (Wang et al., 2013). Los RRP pueden detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son característicos e invariables.

La estimulación de la respuesta inmune innata entonces depende en gran medida del reconocimiento de PAMPs, tales como los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas y los β -glucanos de algas, hongos filamentosos y levaduras (Koran, 2000; Ciacci et al., 2009; Das et al., 2009; Husmann et al., 2011). Además, las respuestas inmunes en bivalvos pueden ser moduladas por la exposición a diversos contaminantes (Akaishi et al., 2007; Ahmad et al., 2011), a microorganismos (Allam et al., 2000) y a condiciones de estrés físico (Husmann et al., 2011). Esto implica que, al ser organismos sensibles, la evaluación de biomarcadores a nivel inmune sea útil para la búsqueda de señales tempranas de estrés en bivalvos.

VIII- Biomarcadores de Respuesta Celular

Las respuestas inmunes celulares son llevadas a cabo por los hemocitos, que son células sanguíneas presentes en el sistema circulatorio abierto de animales invertebrados. Los hemocitos participan en diversos procesos fisiológicos que incluyen digestión, transporte, excreción, procesos de reparación de la concha y mantenimiento de la homeostasis (Donaghy et al., 2009; Kádár, 2008). Sin embargo, se considera que la función principal de estas células es la defensa contra agentes patógenos (Aladaileh et al., 2007). En tal sentido, el reconocimiento de los PMAPs a través de receptores plasmáticos y de membrana de los hemocitos puede activar procesos de eliminación de patógenos y partículas extrañas tales como fagocitosis, agregación y encapsulación (Donaghy et al., 2009), liberación de sustancias antimicrobianas y producción de EROs (Figura 6) (Costa et al., 2009; revisado por Donaghy et al., 2009).

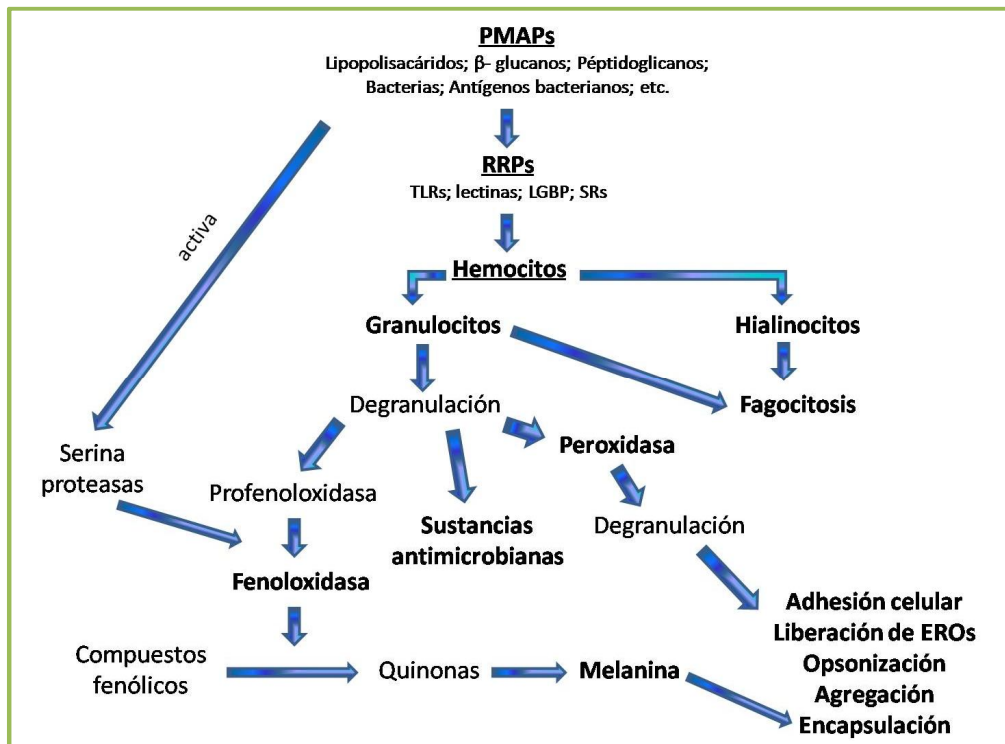


Fig. 6. Representación simplificada de las vías de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) y de activación de las respuestas inmunes mediadas por hemocitos, en organismos invertebrados. Receptores de reconocimiento de patrones (RRPs): receptores tipo Toll (TLR); proteínas de unión a lipopolisacáridos y a β-glucanos (LGBP) y receptores carroñeros (SRs). (basado en las revisiones de Smith et al., 2003 y Wang et al., 2013).

VIII- A) Número de Hemocitos

Los hemocitos se dividen funcional y morfológicamente en hialinocitos y granulocitos. El primer grupo presenta un citoplasma predominantemente claro, mientras que el segundo presenta granulaciones citoplasmáticas de abundancia variable (Bayne, 1983). Además, dentro de estos grupos se pueden distinguir algunos subgrupos celulares, con actividades inmunes variables, según su estadio de diferenciación (Aladaileh et al., 2007).

Cualquier alteración en la abundancia de los hemocitos, dado por cambios en la tasa de proliferación o en la movilización desde y hacia tejidos periféricos, podría modificar las respuestas inmunes dependientes de este compartimiento celular (Pipe and Coles, 1995). Por lo tanto, la evaluación del número total de hemocitos permite estimar el potencial de respuesta inmune celular que posee el organismo. Bivalvos expuestos a efluentes de origen urbano (Farcy et al., 2011) y a microorganismos específicos (Allam et al., 2000), muestran un aumento en el número de hemocitos, lo cual es utilizado como biomarcador de respuesta inmune.

VIII- B) Actividad Fagocítica

La fagocitosis es un mecanismo por el cual las células capturan y asimilan partículas alimenticias, siendo un proceso conservado a lo largo de la evolución, desde protozoos hasta animales superiores (Feng, 1988). Este proceso consiste, en primer lugar, en el reconocimiento de la partícula extraña en la hemolinfa o en tejidos. Luego los hemocitos migran al sitio afectado, proceso que es regulado por moléculas solubles denominadas quimiotaxinas, que pueden ser secretadas por el agente extraño o por las células huésped. La adhesión de la partícula a la membrana celular del hemocito está mediada por proteínas del tipo de las aglutininas (lectinas) amplificando la señal, en el proceso denominado opsonización (Bayne, 1983) (Figura 7). Los hemocitos pueden emitir pseudópodos para rodear la partícula o producir invaginaciones en la membrana plasmática para su internalización. Al internalizar la partícula, se forman vacuolas denominadas fagosomas que interactúan con los lisosomas en el citosol de los hemocitos. Las enzimas hidrolíticas contenidas en los lisosomas destruyen el contenido del fagosoma y como resultado de este proceso se forman gránulos de glucógeno

que pueden ser utilizados en el metabolismo celular del hemocito o liberados al plasma por exocitosis, junto con los materiales de desecho (Figura 7) (revisado por Donaghy et al., 2009).

La actividad fagocítica es uno de los parámetros más utilizados para la evaluación de la respuesta inmune, debido a que es de rápida respuesta y medición, siendo comparables los resultados obtenidos por diferentes metodologías (Ellis et al., 2011). La exposición a contaminantes de origen orgánico e inorgánico (Akaishi et al., 2007; Farcy et al., 2011), como así también la exposición a agentes microbianos (ej. Asokan et al., 1998), producen un incremento en la actividad fagocítica en hemocitos de varias especies de bivalvos, estimulando su respuesta inmune. Por el contrario, una disminución en la actividad fagocítica se relaciona a daños producidos en el sistema inmune como resultado de la exposición a contaminantes (Ahmad et al., 2011).

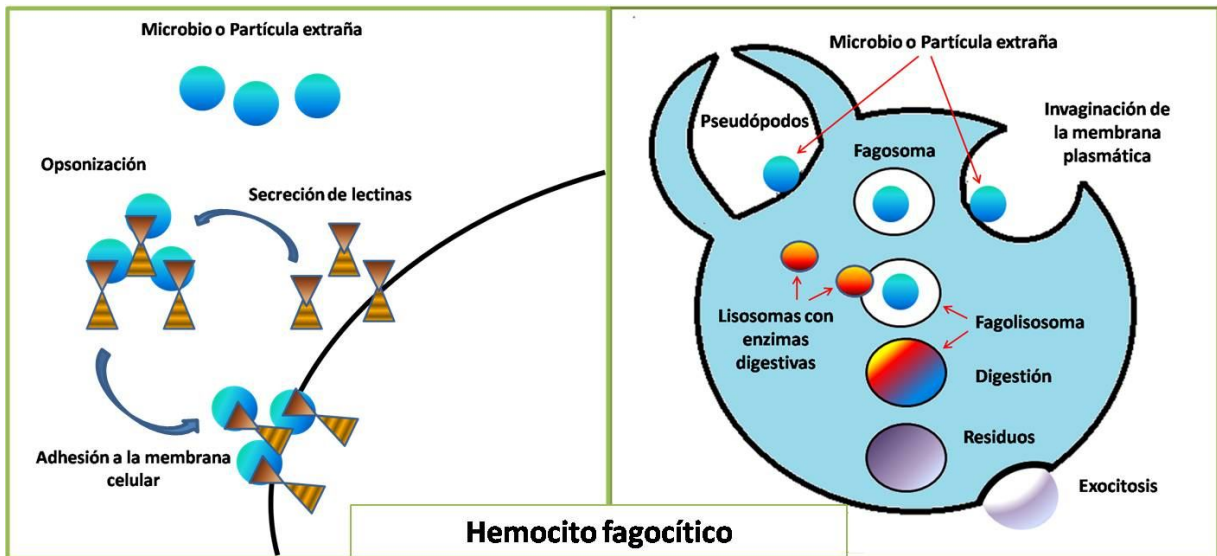


Fig. 7. Representación esquemática del proceso de reconocimiento, adhesión y fagocitosis de partículas extrañas, mediada por lectinas en hemocitos (basado en la revisión de Donaghy et al., 2009).

VIII- C) Agregación y Encapsulación

La agregación y la encapsulación son procesos que se producen cuando la hemolinfa se encuentra invadida por un alto número de partículas extrañas y la fagocitosis no puede ser llevada a cabo. En el caso de la agregación, los hemocitos y otras células no fagocíticas

utilizan proyecciones citoplasmáticas delgadas, llamadas filipodios, para formar una red tisular donde estas partículas quedan atrapadas. Se sugiere que los microorganismos dentro del agregado se exponen a procesos de inanición, producción de melanina y liberación de enzimas líticas, mediante los cuales son eliminados (Ratcliffe et al., 1985). En el caso de la encapsulación, cuando la barrera de la fagocitosis y la agregación han sido superadas, las partículas son rodeadas por los hemocitos, formando una especie de cápsula de tejido conectivo, en asociación con glicoproteínas (Bayne, 1983).

La formación de filipodios y la agregación y encapsulación celular, han sido documentados en hemocitos estimulados con bacterias, parásitos y otros agentes microbianos (revisado por Donaghy et al., 2009; Husmann et al., 2011). Además, en bivalvos expuestos a ambientes contaminados con metales, se observaron cambios en la frecuencia de agregación de hemocitos (Montaudouin et al., 2010). La deficiencia de acción en estos procesos implica una disminución en la capacidad de respuesta ante partículas no aptas para ser fagocitadas.

VIII- D) Producción de EROs

En general, las EROs son consideradas como productos dañinos originados en la respiración celular. Sin embargo, en las últimas décadas se ha descubierto que las EROs son esenciales para varias funciones biológicas, incluyendo la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular y, por supuesto, la respuesta inmune (Yang et al., 2012). La liberación de grandes cantidades de EROs por parte de los

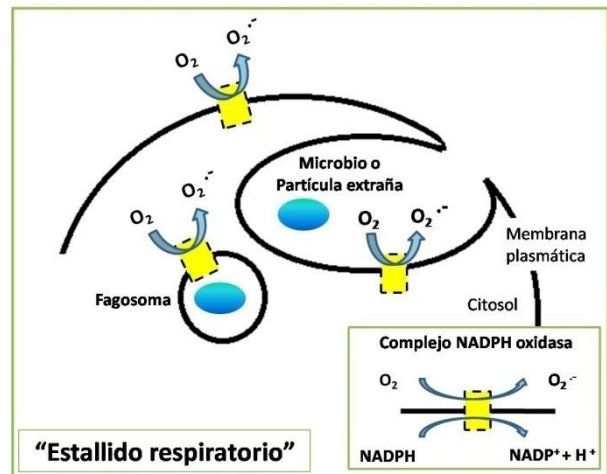


Fig. 8. Esquema del proceso de “estallido respiratorio” a través de la activación del complejo NADPH oxidasa.

hemocitos constituye una fuente de daño localizado, el denominado estallido respiratorio (“oxidative burst”), que ha sido ligado al proceso fagocítico y principalmente descrito en mamíferos (Figura 8) (Costa et al., 2009; Lushchak, 2011). Sin embargo, se ha sugerido que para hemocitos de bivalvos el uso de la denominación “estallido” no sería correcto, debido a

que el tiempo que tarda en detectarse un incremento en la producción de EROs es largo en comparación con la respuesta inmediata observada en vertebrados. Además, la evidencia sobre la relación entre la producción de EROs y la actividad fagocítica en hemocitos no ha sido del todo consistente (Donaghy et al., 2009).

Este proceso de producción de EROs no está asociado a la cadena mitocondrial, sino que se debe a la acción del complejo multiproteico conocido como NADPH-oxidasa. Cuando el hemocito entra en contacto con la partícula extraña, los componentes del sistema NADPH oxidasa se ensamblan para formar un complejo funcional enzimáticamente activo, el cual se encuentra no sólo en la membrana de los hemocitos, sino también en la membrana que recubre los fagosomas. Durante el proceso se transfieren electrones desde el NADPH al oxígeno molecular, causando la formación controlada de anión superóxido (O_2^-) y, siguiendo la cadena de reacciones, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH \cdot), el ácido hipocloroso (HOCl) y el oxígeno singlete (1O_2). Estas moléculas ejercen su efecto individualmente o en conjunto con las enzimas hidrolíticas liberadas durante la fagocitosis. Además de su función en mecanismos de defensa, las EROs están implicadas en la interacción intercelular y en la activación y supresión de la respuesta inmune. De esta manera, se eliminan microorganismos invasores y, probablemente, también se controlan los niveles celulares de EROs (Yang et al., 2012).

La producción de EROs ha sido reportada en hemocitos de bivalvos en respuesta a estímulos microbianos (Costa et al., 2008; revisado por Donaghy et al., 2009; Husmann et al., 2011). Sin embargo, esta variable puede también responder positivamente ante condiciones de estrés producido por la exposición a otro tipo de contaminantes o a condiciones de estrés físico (Luschack, 2011; Husmann et al., 2011). Por este motivo los niveles de EROs han sido propuestos como un buen indicador temprano tanto de respuesta inmune como de efectos oxidativos. Sin embargo, como se explicó anteriormente, es necesaria la integración de otros biomarcadores de respuesta y efectos para una correcta interpretación de los resultados.

VIII- E) Respuesta Inflamatoria

El proceso inflamatorio consiste en la acumulación de células sanguíneas y proteínas plasmáticas en el lugar de la infección (Roitt y Delves, 2003), por lo que en invertebrados participan tanto componentes celulares como humorales de la hemolinfa (revisado por Mani y Lawson, 2006). Cuando se produce una lesión en el tejido, acompañada o no por la invasión de algún agente extraño, comienza la respuesta inflamatoria, que puede tener como resultado la destrucción del tejido dañado, el aislamiento del organismo invasor o la reparación del tejido (Feng, 1988). En mejillones expuestos a mercurio y lipopolisacáridos (LPS) se observó un aumento en el daño tisular, consistente con efectos de inflamación en branquias, glándula digestiva y músculo aductor (Sheir et al., 2010).

IX- Biomarcadores de Respuesta Humoral

En el contexto de la inmunidad humoral en invertebrados, los microorganismos pueden eliminarse al liberar enzimas y productos intracelulares desde el hemocito hacia el plasma. Luego de reconocer al patógeno o al sufrir algún tipo de estrés fisiológico, los hemocitos pueden producir y liberar al plasma, factores antimicrobianos que incluyen: enzimas (lisozimas, profenoloxidasa, proteasas), proteínas (lectinas, proteínas de choque térmico, proteínas del complemento), péptidos y glicoproteínas (citoquinas) (Allam et al., 2000; Aladaileh et al., 2007; Kuchel et al., 2010). Adicionalmente, diferentes tipos de lisozimas pueden ser producidas por células de la branquia, el manto y la glándula digestiva, participando en la defensa del organismo (Itoh et al., 2010; Xue et al., 2010). La liberación de estas moléculas está determinada por los procesos de degranulación donde las lisozimas y otros productos acumulados en gránulos en el citoplasma se liberan al medio por procesos de exocitosis (revisado por Tiscar y Mosca, 2004).

IX- A) Actividad de Lisozimas

Las lisozimas son enzimas que destruyen las células bacterianas, al hidrolizar enlaces constitutivos de su pared celular, durante el proceso de fagocitosis. En bivalvos, se han

detectado enzimas lisosomales con propiedades bacteriolíticas, tanto en el interior de hemocitos como extracelularmente, constituyendo factores solubles en el plasma (revisado por Donaghy et al., 2009). Estas enzimas funcionan, según sus características moleculares, como efectores de defensa inmune o digestión, ya que las bacterias forman parte de la dieta de los bivalvos (Tiscar y Mosca, 2006; Xue et al., 2010). La actividad de lisozimas en este grupo es afectada tanto por exposición a agentes microbianos, como por cambios en la disponibilidad y calidad de la dieta (revisado por Donaghy et al., 2009). El aumento en la actividad de lisozimas implica una respuesta inmune aumentada, en relación a procesos de fagocitosis frente a microorganismos invasores (Allam et al., 2000).

IX-B) Actividad Fenoloxidasa

La enzima fenoloxidasa cataliza la transformación de sustancias fenólicas como la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a quinonas inestables, como la dopaquinona, y su principal función implica procesos de melanización y síntesis de adrenalina (Coles y Pipe, 1994). La estimulación inmune por medio de diferentes PMAPs produce un cambio en la enzima desde su forma inactiva (profenoloxidasa) a su forma activa, a través de una cascada de señales mediadas por serina proteasas (revisado por Wang et al., 2013). En bivalvos, se distingue actividad fenoloxidasa tanto en hemocitos como en plasma (Carballal et al., 1997; Aladaileh et al., 2007) y se la relaciona con procesos inmunes activados por LPS y β - glucanos (Wang et al., 2013).

X- CONDICIÓN METABÓLICA

El metabolismo es el conjunto de transformaciones químicas que se producen en la célula. Estas reacciones, catalizadas por enzimas, incluyen procesos de digestión, transporte de sustancias, obtención de energía, desactivación y excreción de sustancias tóxicas y mantenimiento del balance óxido-reducción. Como resultado de estos procesos, el organismo puede crecer, reproducirse, mantener sus estructuras y responder ante cambios en el ambiente.

Cualquier alteración significativa en las respuestas metabólicas se evidenciaría a nivel del organismo (Norkko et al., 2006; Li et al., 2009).

X-A)- Biomarcadores de Condición Metabólica

En general, los índices de condición y las mediciones de crecimiento somático (ej. longitud, peso) son consideradas menos confiables y sensibles que las variables bioquímicas y moleculares, para describir el estado nutricional y fisiológico de un organismo. Sin embargo, trabajos realizados en bivalvos muestran que la evaluación de esta condición puede ser llevada a cabo mediante el monitoreo de varios parámetros en conjunto (Fathallah et al., 2010). Estas mediciones incluyen parámetros morfométricos (masa, tamaño), bioquímicos (actividades enzimáticas, reservas energéticas) e índices instantáneos de crecimiento, como la relación ARN/ADN.

XI- A) 1) Actividad de Proteína Fosfatasa 1

La enzima proteína fosfatasa 1 (PP1) está activamente involucrada en la modulación de diversas funciones fisiológicas como la división celular, la meiosis, el cese del ciclo celular, la apoptosis, la síntesis de proteínas y glucógeno, la reorganización de la actina y la recuperación del estrés (Ceulemans y Bollen, 2004). Considerando la importancia de PP1 para la regulación de la función celular, esta actividad enzimática podría ser considerada como un biomarcador potencial de las respuestas metabólicas. En bivalvos, las variaciones en la actividad de proteínas fosfatasas se han utilizado para monitorear efectos de la exposición a biotoxinas, tales como la microcistina (Contardo-Jara et al., 2008) y el ácido okadaico (Romero-Geraldo et al., 2014).

X- A) 2) Cambios Morfométricos y en las Reservas Energéticas

Cuando los cambios a nivel celular son tan severos como para alterar las funciones de los tejidos u órganos, se hace posible inferir el nivel de estrés al que está sometido el organismo y en qué medida el daño podría afectar la funcionalidad (Viarengo et al., 2007). En bivalvos expuestos a diferentes condiciones de estrés, se han observado alteraciones en el crecimiento somático o en la masa de la glándula digestiva (Box et al., 2007; Farcy et al.,

2011). Adicionalmente, las variaciones en las respuestas antioxidantes e inmunes que se dan ante condiciones estresantes, pueden generar cambios en el metabolismo energético de estos animales (Smolders et al., 2004; Wang et al., 2012). En este contexto, la demanda de energía (glucógeno, lípidos, proteínas) para solventar la activación de las respuestas, implica una reducción de estas reservas para cubrir otras funciones, tales como la reproducción y el crecimiento.

X- A) 3) Relación ARN/ADN

Este índice está basado en la idea de que la cantidad de ADN es estable, mientras que la cantidad de ARN varía bajo condiciones ambientales cambiantes. La relación ARN/ADN puede ser utilizada para evaluar actividades metabólicas (ej. síntesis de proteínas) y es un indicador de estado nutricional, de estrés fisiológico y de crecimiento (revisado por Lesser et al., 2010). Este biomarcador es de respuesta instantánea, permitiendo monitorear cambios que se dan en periodos de tiempo cortos (Fathallah et al., 2010) y ha sido muy utilizado en estudios con peces (Pottinger et al., 2011; Kerambrun et al., 2012), bivalvos (Chícharo et al., 2001; Norkko et al., 2005; Fathallah et al., 2010) y camarones (Vidal et al., 2006; Penha-Lopes et al., 2011). Una disminución en la relación ARN/ADN, especialmente en tejido muscular, puede indicar una disminución de la síntesis de proteínas para el crecimiento relacionada con una condición nutricional pobre (Fathallah et al., 2010) y quizás con efectos de la exposición a contaminantes.

XI- COMPLEMENTOS INMUNOESTIMULANTES Y ANTIOXIDANTES

El concepto de “alimentación funcional” es un paradigma emergente en la industria de la acuicultura. Este involucra el desarrollo de alimentos nutricionalmente balanceados y suplementados con aditivos, que ayuden al mejoramiento del estado sanitario y del crecimiento (Gatlin y Li, 2004). Este concepto surge debido a una creciente preocupación con respecto al uso de antibióticos, cuya liberación al medio altera la diversidad de los microorganismos acuáticos y produce la dispersión de la resistencia y la acumulación de sus residuos en la cadena alimentaria (revisado por Menna et al., 2013).

En este contexto, se ha demostrado que el uso de estrategias alternativas como las vacunas y los suplementos dietarios con probióticos, prebióticos, inmunoestimulantes y antioxidantes pueden ayudar a reducir la susceptibilidad a enfermedades y favorecer la supervivencia, la incorporación de nutrientes y el crecimiento somático en animales de cultivo (Menna et al., 2013; Bidhan et al., 2014; Song et al., 2014). En particular, los inmunoestimulantes actúan incrementando las respuestas inmunes innatas, a nivel celular y humoral (Menna et al., 2013), mientras que los compuestos antioxidantes incrementan las respuestas enzimáticas asociadas (revisado por Menezes et al., 2014; Giese 2014).

Entre las sustancias más reconocidas y utilizadas, se encuentran los β - glucanos, los cuales pueden ser aplicados por inyección, por inmersión o como parte de la dieta (Vismara et al., 2004; Servaj et al., 2006). Los β - glucanos son polisacáridos constituidos por moléculas de glucosa, ligadas por uniones β -glucosídicas. Dependiendo de la fuente de donde derivan, estas sustancias presentan distintas estructuras que determinan su capacidad de extracción y su actividad biológica. Los glucanos de peso molecular alto activan eficientemente respuestas celulares, mientras que los de bajo peso molecular y glucanos de cadena corta, son considerados con poca o nula actividad, respectivamente (Bohn y BeMiller, 1995; Kogan, 2000). Los β - glucanos presentan una actividad potente y valiosa para el mejoramiento, tanto de las respuestas inmunes como de las respuestas antioxidantes, en vertebrados (Misra et al., 2006; Falco et al., 2012; Suquiyama et al., 2009) e invertebrados (Costa et al., 2008; 2009; Bai et al., 2010). Específicamente en camarones, se ha reportado que los β - glucanos activan las funciones de encapsulación, coagulación, melanización y fagocitosis (ej. Vargas-Albores et al., 1996) e incrementan la resistencia al estrés fisiológico (Vismara et al., 2004). En bivalvos, los trabajos realizados sobre el efecto inmunoestimulante y antioxidante de los β -glucanos son realmente escasos (Torreilles et al., 1996; Tafalla et al., 2003; Costa et al., 2008; 2009; Lin et al., 2011).

Las fuentes de β - glucanos más comunes corresponden a la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo los que presentan uniones β -1, 3 y β -1, 6 los más importantes. Pero en la naturaleza, los β - glucanos también forman parte de la pared celular de varias especies de bacterias y plantas (revisado por Menna et al., 2013; Kogan, 2000), o se presentan como gránulos en el citosol de organismos protozoarios (Barsanti et al., 2001). El

paramilon, 1,3 β - glucano, es una sustancia de reserva que forma gránulos en el citoplasma de células de organismos protistas unicelulares flagelados, denominados euglenoideos. La utilización de paramilon en acuicultura ha sido propuesta como alternativa a la utilización de β - glucanos extraídos de *S. cerevisiae*. En particular, *Euglena gracilis* puede acumular grandes cantidades de paramilon cuando crece en un ambiente rico en carbono. Esto, en conjunto con su alta calidad nutricional y contenido de compuestos antioxidantes, la hacen un excelente candidato de aplicación como complemento dietario (Barsanti et al., 2001).

XII- BIOREMEDIACIÓN

Las estrategias de bioremediación involucran, por lo general, el uso de microorganismos o plantas para la degradación y extracción de tóxicos presentes en el ambiente. El uso de animales como sistemas bioremediadores no ha sido considerado seriamente en épocas pasadas debido a razones éticas o porque sus productos están asociados al consumo humano (Gifford et al., 2006). Sin embargo, en los últimos años, el papel que cumplen los bivalvos en el reciclado de nutrientes en el ambiente, ha sido intensamente estudiado con el objetivo de su utilización en estrategias de remediación de ambientes eutrofizados (revisado por Gifford et al., 2004).

En cuerpos de agua superficiales, los bivalvos filtradores con frecuencia dominan la comunidad macrobentónica tanto en número como en biomasa (Cloern, 1982). Estos organismos despliegan mecanismos de filtración altamente eficientes, que les permiten concentrar partículas desde la columna de agua, digiriéndolas y depositando el material de desecho en el fondo acuático, mediante un proceso denominado biodeposición (Haven y Morales-Almo, 1966). Diversos estudios han demostrado la capacidad de los bivalvos de filtrar y alimentarse de grandes cantidades de fitoplancton, bacterias coliformes y materia orgánica particulada, pudiendo disminuir a su vez, la turbidez en el agua (Soto y Mena, 1999; Lara et al., 2002b; Gifford et al., 2004; Zhou et al., 2006). De esta forma, mediante sus actividades de alimentación y excreción, los bivalvos filtradores pueden modificar rápidamente las características fisicoquímicas y microbiológicas del agua y de los sedimentos, en ambientes eutrofizados (Yamamuro y Koike, 1993). Sin embargo, cuando los bivalvos son

sometidos a condiciones estresantes, su capacidad de filtración puede verse alterada (Soto y Mena, 1999; Ellis et al., 2002; Lara et al., 2002b; Parada et al., 2008), afectando tanto su balance energético y crecimiento, como su capacidad de bioremediación.

HIPÓTESIS GENERALES

- Diversos contaminantes, liberados en efluentes de origen cloacal, afectan las respuestas fisiológicas y la condición metabólica de *Diplodon chilensis*, en relación con el tipo y la cantidad de tóxico presente en el cuerpo de agua y con el tiempo de exposición.
- *Diplodon chilensis* constituye una herramienta aplicable y útil para la bioremediación de ambientes acuáticos contaminados con efluentes cloacales.
- *Euglena gracilis* constituye un complemento dietario protector y nutritivo para bivalvos filtradores expuestos a contaminación por efluentes cloacales, en estrategias de biorremediación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de diferentes biomarcadores en el bivalvo autóctono *Diplodon chilensis*, para su utilización en estudios de biomonitoreo de diferentes cuerpos de agua en Patagonia Norte. Evaluar su potencial uso como control biológico en cuerpos de agua con distintos grados de contaminación.

METODOLOGÍA GENERAL

I- RECOLECCIÓN DE ALMEJAS

En todos los experimentos a campo y de laboratorio, se utilizaron almejas adultas de $65,99 \pm 0,56$ mm de largo de valva. La edad estimada de los individuos fue de 10 a 30 años, de acuerdo a las curvas de crecimiento de von Bertalanffy y a la relación talla/edad obtenida al contar anillos de crecimiento en valvas de *D. chilensis* de las mismas poblaciones (Rocchetta et al., 2014b). La recolección se realizó manualmente al azar, por buceo a una profundidad de 1 a 3 metros, dependiendo del sitio. Para la extracción de muestras hemolinfáticas y tisulares, las almejas fueron inmediatamente transportadas y procesadas sobre hielo.

II- PROCESADO DE HEMOLINFA

La extracción de hemolinfa (aprox. 2 mL por almeja) se realizó desde el músculo aductor con una jeringa estéril. Las muestras fueron colocadas en tubos de microcentrífuga estériles y analizadas dentro de la primera hora desde la extracción. Las muestras de hemolinfa fueron utilizadas para la determinación del número de hemocitos totales, el potencial fagocítico, la viabilidad celular y la estabilidad de la membrana lisosomal. Luego, algunas alícuotas de hemolinfa fueron centrifugadas a 500 x g durante 20 min para separar la fracción plasmática de la fracción celular. El plasma fue reservado para la determinación de la actividad bacteriolítica, la actividad fenoloxidasa, el contenido de EROs, la capacidad antioxidante total y el contenido total de proteínas. El pellet de células se lavó dos veces, re-suspendiendo en solución anticoagulante (3 g de glucosa y 0,36 g de citrato de sodio / L, 60 mOsm / L, pH 7) (modificada de Burkhard et al., 2009) y se centrifugó nuevamente, para ser utilizado en el análisis de la producción de EROs, la capacidad antioxidante total y la estimación de peroxidación lipídica.

III- PROCESADO DE TEJIDOS

Las almejas fueron abiertas mediante incisión en el músculo aductor. Este tejido, junto con las branquias y la glándula digestiva fueron removidos (Figura 1). El músculo aductor se preservó en el fijador ARN later (Ambion) y fue mantenido a -20 °C para la determinación posterior de la relación ARN / ADN. Las branquias y la glándula digestiva se pesaron (g) y homogeneizaron (homogeneizador eléctrico Omni 1000, 20000 rpm) en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7, 1:5 m/v, con el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM (PMSF, Sigma). Los homogenatos fueron utilizados para el análisis del contenido de lípidos totales y glucógeno. El sobrenadante, obtenido luego de la centrifugación de los homogenatos (11.000 x g, a 4 °C durante 15 min), fue utilizado para los análisis enzimáticos de GST, CAT y para estimar actividad bacteriolítica y peroxidación lipídica.

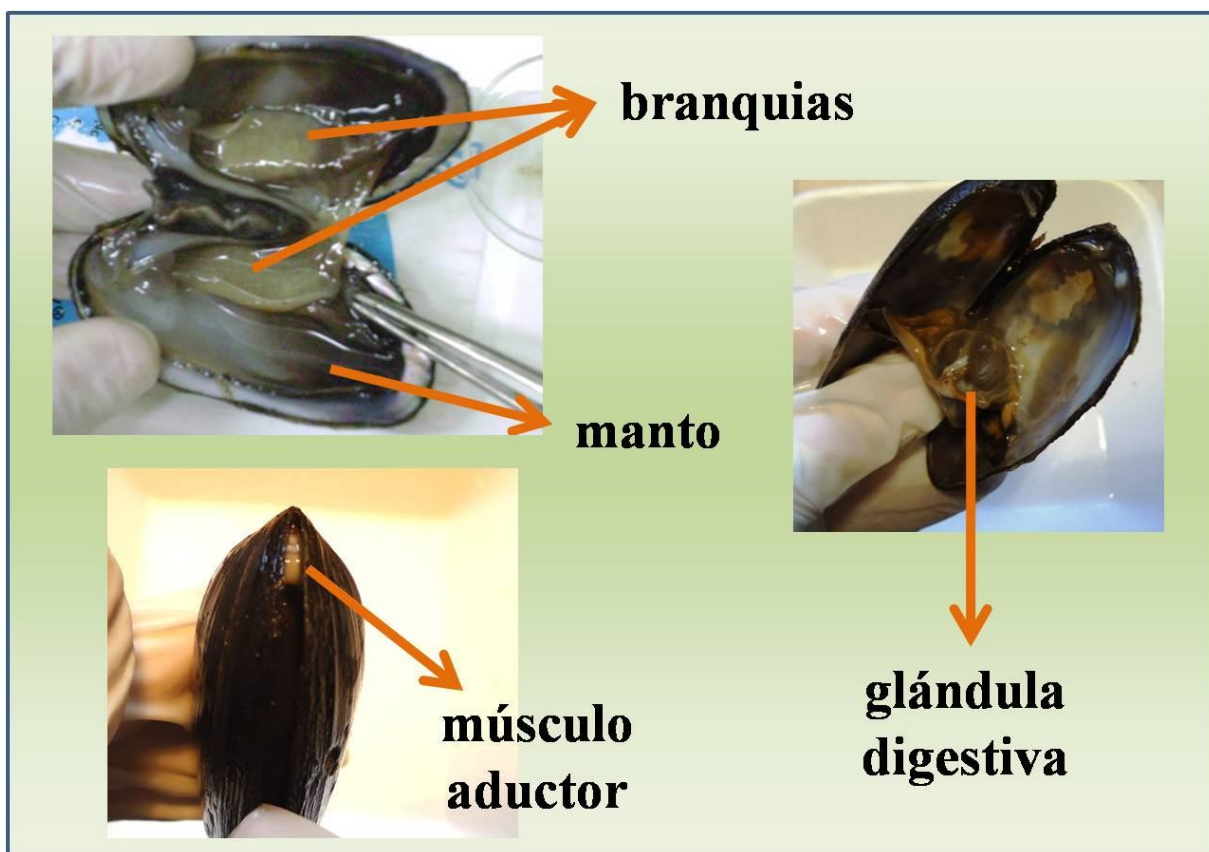


Fig. 1. Disección y extracción de tejidos en *Diplodon chilensis*.

IV- EVALUACIÓN DEL BALANCE OXIDATIVO

IV- A) Proteínas Totales

El contenido de proteínas totales en el sobrenadante de homogenatos de tejido se calculó para referir los resultados de las actividades enzimáticas y la peroxidación lipídica. Se utilizó el método propuesto por Bradford (1976). La concentración de proteína se calculó a partir de una curva de calibración de albúmina y se expresó en mg de proteínas / mL. En los casos donde la variación entre grupos del contenido de proteínas fue significativa, los parámetros mencionados se refirieron a g tejido fresco, para evitar posibles sesgos en los resultados obtenidos.

IV- B) Peroxidación Lipídica

La determinación de los niveles del producto de peroxidación lipídica, MDA, se realiza frecuentemente utilizando el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Fraga et al., 1988). El ácido tiobarbitúrico reacciona con diferentes tipos de compuestos, entre ellos, aldehídos, aminoácidos y carbohidratos, por lo que esta medición se considera una estimación del contenido de MDA.

En este caso, las TBARS se midieron en hemocitos y en sobrenadante de branquia y glándula digestiva. Una cantidad conocida de hemocitos suspendida en solución anticoagulante (sección II) o 300 μ L de sobrenadante tisular se mezclaron con 1,5 mL de reactivo (3,7 g de ácido tiobarbitúrico, 20 mL de HCl, 300 mL de ácido tricloroacético al 50% m/v, 6,8 mL butil hidroxitolueno 100mM en etanol absoluto, llevado a volumen final de 1000 mL con agua destilada). La mezcla se incubó a 95-100 °C durante 15 min y se dejó enfriar, para luego centrifugar a 1000 x g durante 15 min. La absorbancia del sobrenadante obtenido se midió inmediatamente a 535 nm. La concentración de TBARS fue estimada usando un coeficiente de extinción molar de 156 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y un control con agua destilada en lugar de muestra. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol TBARS} / 10^6$ células o $\mu\text{mol TBARS} / \text{mg}$ de proteínas o g de tejido, según el caso.

IV- C) Estabilidad de la Membrana Lisosomal

La estabilidad de la membrana lisosomal fue evaluada utilizando el método de Retención de Rojo Neutro (modificado de Mamaca et al., 2005). El colorante es secuestrado dentro de los lisosomas cuando es aplicado y, si las membranas lisosomales están dañadas, el colorante se infiltra hacia el citosol, visualizándose el color rojo (Figura 2) (Viarengo et al., 2007).

En este caso, alícuotas de 50 μ L de hemolinfa fueron extendidas por duplicado sobre portaobjetos y mantenidas en cámara húmeda durante 5 min, para permitir la adhesión de las células. Una solución de Rojo Neutro (50 μ L, 0,002% en dimetilsulfóxido) fue agregada a cada réplica para realizar el recuento de células teñidas (microscopio óptico, 400 x) cada 10 min. El tiempo que lleva el paso del colorante al citosol, está relacionado con el nivel de daño en la membrana lisosomal. Los resultados fueron expresados en min, de acuerdo con el tiempo en el cual el 50% de las células contadas tuvieron coloración roja.

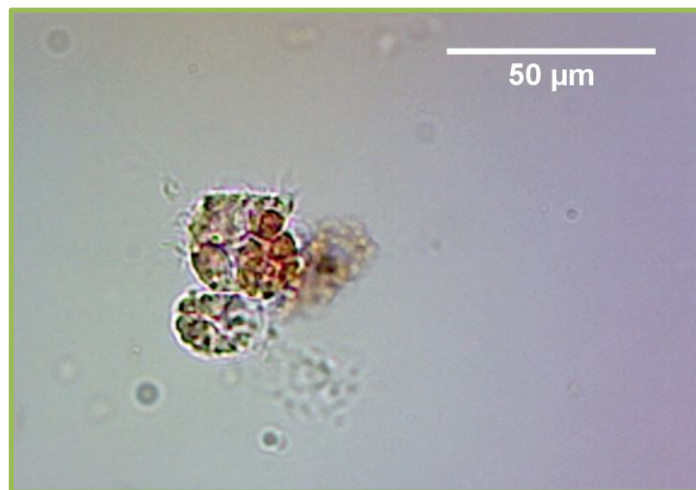


Fig. 2. Hemocitos de *Diplodon chilensis* observados durante el ensayo de Retención de Rojo Neutro. Las células teñidas indican desestabilización de la membrana lisosomal.

IV- D) Micronúcleos

La frecuencia de micronúcleos (MN) se evaluó en células de branquia. Se realizó un extendido del tejido sobre un portaobjeto (por duplicado) y se dejó secar durante unos

minutos. Las células fueron fijadas con metanol durante 30 segundos, teñidas con colorante Giemsa (1:10 en agua destilada) durante 20 min y montadas con medio DPX (Sigma). Este colorante permite la tinción diferencial de zonas con un alto contenido de ADN, concretamente de uniones adenina-timina, distinguiéndose perfectamente al microscopio óptico el núcleo celular y demás cuerpos cromatínicos.

En este caso, alrededor de 1000 células por almeja fueron observadas bajo microscopio óptico (1000 x) (Tsarpali y Dailianis, 2012; Machado-Schiaffino et al., 2009). La identificación de los micronúcleos se realizó considerando cuerpos de cromatina pequeños, circulares u ovoides, con el mismo patrón de tinción que el núcleo principal (Figura 3). Los resultados fueron expresados en MN / célula.

IV- E) Viabilidad Celular

La viabilidad se evaluó en hemocitos utilizando la técnica de tinción con Azul Tripán. Ésta es una técnica fácil y rápida de implementar, que se basa en el hecho de que las membranas de las células vivas son selectivas y no dejan pasar el colorante hacia el citosol, mientras que en las células muertas ocurre lo contrario. Como resultado, las células muertas muestran un distintivo color azul.

En este caso, alícuotas de 100 μ L de hemolinfa fueron mezcladas con 50 μ L de colorante disuelto en solución anticoagulante estéril (sección II) al 0,2 %. Luego de una incubación a 4 °C durante 5 min, se realizaron recuentos en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (400 x) por cuadruplicado, o hasta obtener un error < 10 %. Las células vivas (no teñidas) y las células muertas (teñidas) fueron contadas dentro de los 15 min de comenzado el procedimiento (Figura 3). La viabilidad de los hemocitos se expresó como la proporción de células vivas con respecto al número total de hemocitos (modificado de Akaishi et al., 2007).

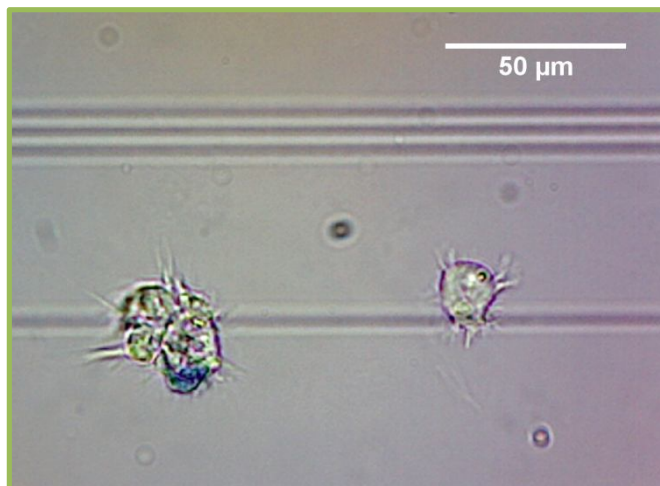


Fig. 3. Hemocitos viables (incoloros) y no viables (azules) de *Diplodon chilensis*, observados en cámara de Neubauer.

IV- F) Actividad Glutación S-transferasa

La actividad de GST se midió de acuerdo al método de Habig et al. (1974), proporcionando los dos substratos necesarios para la reacción de conjugación. Alícuotas de sobrenadante (40 μL) de branquia y glándula digestiva se mezclaron con buffer fosfato de sodio (PB, 100 mM, pH 6,5), 10 μL de glutatión reducido (Sigma, 100 mM GSH en PB) y 10 μL de 1 chloro-2,4 dinitrobenceno (Sigma, 100 mM CDNB, en etanol), registrando el cambio en la absorbancia a 340 nm, durante 5 min. Una unidad de GST se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1 μmol de GS-DNB por min, a 25°C. Los resultados fueron expresados en U GST por mg de proteínas o g de tejido, según el caso.

IV- G) Actividad Catalasa

La actividad CAT se midió de acuerdo con Aebi (1984). Se utilizaron 40 μL de sobrenadante de branquia y glándula digestiva y se los mezcló con una solución de H_2O_2 (10 mM en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7). Los cambios en la absorbancia se registraron a 240 nm durante 30 segundos. Una unidad CAT fue definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la hidrólisis de 1 μmol de H_2O_2 por min, a 25°C. Los resultados se expresaron en U CAT por mg de proteínas o g de tejido, según el caso.

IV- H) Capacidad Antioxidante Total

La capacidad antioxidante total se evaluó en hemocitos y en plasma según el método fluorométrico propuesto por Amado et al. (2009). Tres alícuotas (50 μ L) de células suspendidas o plasma, respectivamente, fueron mezcladas con 130 μ L de buffer de reacción (Hepes 30 mM, KCl 200 mM, MgCl 1 mM, pH 7) y 10 μ L de solución de ABAP (2,2'- Azobis [2-metilpropion amidina] diclorhidrato, 4 mM, Sigma) en tubos de fluorómetro (Qubit Q32856, Invitrogen) e incubados a 35 °C durante 5 min. Estas condiciones generan la aparición de EROs (radicales peróxido) por descomposición térmica del ABAP. Luego de esta primera incubación, se agregaron 10 μ L de H₂DCF-DA (2',7' diclorofluoresceína diacetato 0,8 mM, Sigma) y los tubos se incubaron 35°C, durante 12 min. Como el grupo diacetato (DA) es no polar, el compuesto difunde fácilmente a través de la membrana plasmática. Una vez dentro del hemocito, el H₂DCF-DA es clivado por las esterasas presentes en la muestra. El compuesto resultante (H₂DCF) es oxidado por las EROs y convertido en un compuesto fluorescente. Como control de niveles base de EROs, se prepararon separadamente tres tubos para cada muestra en las mismas condiciones, sin agregado de ABAP. Los cambios en la fluorescencia (485 / 530 nm) fueron registrados durante 18 min (Qubittm fluorometer, Invitrogen). La capacidad antioxidante total fue calculada como el área relativa entre las curvas obtenidas con y sin ABAP y expresada como Cap. Antiox. Total / 10⁶ células viables o Cap. Antiox. Total / mL de plasma, según el caso.

V- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

V- A) Recuento de Hemocitos Totales

La determinación del número de hemocitos totales se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer (Figura 4) (Akaishi et al., 2007). Alícuotas de 10 μ L de hemolinfa fueron analizadas bajo microscopio óptico (400 x) por cuadruplicado, o hasta obtener un error < 10 %. Los resultados fueron expresados como el número de células por mL de hemolinfa.

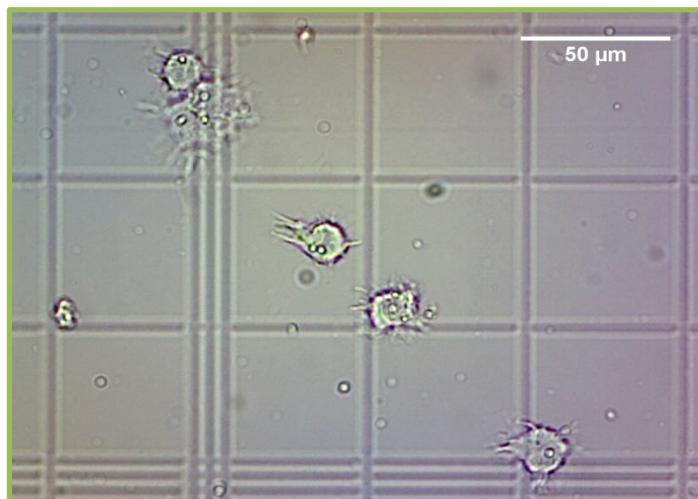


Fig. 4. Hemocitos de *Diplodon chilensis* observados en cámara de Neubauer.

V- B) Actividad Fagocítica

La actividad fagocítica fue evaluada utilizando *S. cerevisiae*. Estas levaduras fueron teñidas con rojo Congo, suspendiendo 5 mg de células en 2,5 mL de agua corriente declorada y 2,5 mL de colorante al 0,8 % m/v en agua destilada. La suspensión fue autoclavada (121 °C durante 15 min), enfriada y centrifugada (1500 x g durante 5 min), descartando el sobrenadante. El pellet resultante fue lavado, resuspendido en agua corriente declorada y centrifugado, para eliminar restos de colorante. Las células teñidas se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

Alícuotas de 100 μL de hemolinfa fueron mezcladas con un volumen de suspensión de levaduras teñidas conteniendo el doble de células que el número de hemocitos viables en la muestra. Luego de incubar a temperatura ambiente durante 30 min, un mínimo de 300 células fueron observadas bajo microscopio óptico (100 - 400 x), por duplicado (Figura 5). La actividad fagocítica fue calculada como el número de levaduras fagocitadas dividido por el número de células contadas (modificado de Kuchel et al., 2012).

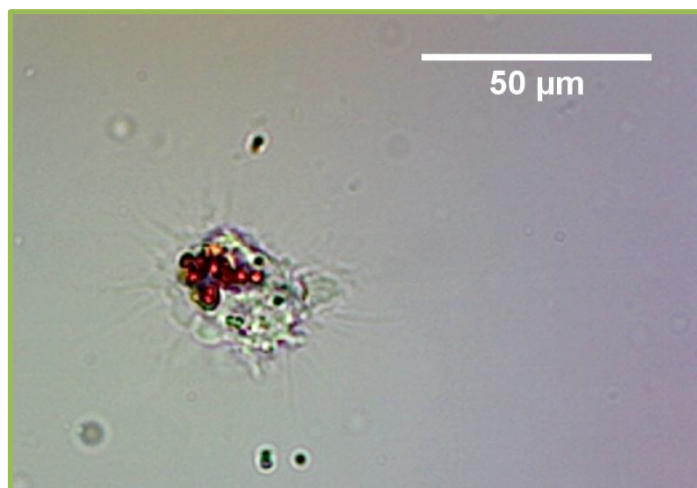


Fig. 5. Hemocitos de *Diplodon chilensis* fagocitando células de *Saccharomyces cerevisiae* teñidas con rojo Congo.

V- C) Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

La producción de EROs en hemocitos y la concentración de EROs en plasma fueron determinadas por un método fluorométrico adaptado del trabajo de Moss y Allam (2006), y está basada en los mismos fundamentos explicados para la técnica de Capacidad Antioxidante Total (sección IV-H). Tres alícuotas (50 μ L) de una suspensión de hemocitos o de plasma fueron mezcladas con 140 μ L de buffer de reacción y 10 μ L del reactivo fluorescente H₂DCF-DA en tubos para fluorómetro Qubit e incubados a 35 °C durante 12 min (sección IV- H). Los cambios en la fluorescencia (485 / 530 nm) fueron registrados durante 18 min (Qubittm). El contenido de EROs fue referido a una curva de calibración de H₂O₂ con H₂DCF-DA y los resultados fueron expresados en miliequivalentes (meq) H₂O₂ / 10⁶ células viables o meq H₂O₂ / mL de plasma, según el caso. Un meq corresponde a un μ M de H₂O₂.

V- D) Contenido de Proteínas Totales en Plasma

De acuerdo a la disponibilidad de reactivos, el contenido total de proteínas en plasma (mg / mL) fue medido por dos métodos. Para las muestras correspondientes al Capítulo II, se utilizó el método fluorométrico propuesto por Invitrogen en el kit Quant-it protein assay (Q33211); mientras que las muestras correspondientes al Capítulo III se evaluaron mediante el

método propuesto por Bradford (1976), refiriendo los resultados a una curva de calibración de albúmina.

V- E) Actividad Bacteriolítica

La actividad bacteriolítica (AB) fue evaluada mezclando 150 μL de plasma o sobrenadante de tejido (branquia, glándula digestiva) con 850 μL de una suspensión de células de *E. coli*, preparada como se describe en la sección VII- A. Los cambios en la absorbancia a 625 nm, registrados durante 5 min, se corresponden con la pérdida de sensibilidad de la lectura, al romperse las paredes celulares bacterianas y desintegrarse la célula. Una unidad de AB fue definida como un cambio de 0,001 en la absorbancia y los resultados se expresaron en U AB / mL de plasma o g de tejido, según el caso (adaptado de Das et al., 2009).

V- F) Actividad Fenoloxidasa

La actividad fenoloxidasa (FO) fue medida en plasma monitoreando la transformación de L-DOPA en pigmentos coloreados, denominados dopacromos. Se incubaron 500 μL de plasma con 300 μL de L-DOPA (3 mg / mL L-DOPA, Sigma en buffer fosfato salino) y solución anticoagulante (sección II) a un volumen final de 1000 μL , durante 4 hs. Se realizaron controles negativos de actividad agregando el inhibidor tropolone (concentración final, 16 mM, Sigma) y controles de oxidación espontánea del sustrato, mezclando solución anticoagulante con L-DOPA. La absorbancia a 490 nm fue registrada en muestras y controles durante 20 min, luego de la incubación inicial. Una unidad de actividad FO fue definida como un cambio de 0,001 en la absorbancia y los resultados se expresaron en U FO / mg de proteína (modificado de Aladaileh et al., 2007 y Thomas-Guyon et al., 2009).

VI- EVALUACIÓN DE LA CONDICIÓN METABÓLICA

VI- A) Actividad de Proteína Fosfatasa 1

La técnica utilizada para la medición de la actividad de PP1 se basa en la habilidad de esta enzima para desfosforilar el fosfato de p-nitrofenilo (Carmichael y An, 1999). Alícuotas de 10 μ L de sobrenadante de branquia y glándula digestiva se mezclaron con 90 μ L de solución A (3 mL de ditiotreitol 3 mM, 3 mL de albúmina de suero bovino 0,5 mg / mL, 3 mL de $MnCl_2$ 1,5 mM) y 100 μ L de solución B (fosfato de p-nitrofenilo 40 mM en solución A, Merck). Los cambios en la absorbancia se registraron a 412 nm durante 40 min. Una unidad de PP1 se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la defosforilación de 1 μ mol de fosfato de p-nitrofenilo por min a 25°C. Los resultados se expresaron en U PP1 por mg de proteínas.

VI- B) Factores Morfométricos

Relación MGD / LV (Sabatini et al., 2011b):

$MGD / LV = \text{peso húmedo de glándula digestiva (g)} / \text{largo de valva (cm)}$

Factor de condición (FC): Para el cálculo de este factor, el tejido blando total de cada almeja y su valva se secaron a 60 °C, durante 24 hs (Soto y Mena, 1999).

$FC = \text{peso total de tejido seco (g)} / \text{largo de valva}^3 \text{ (cm)} * 100$

Factor de masa de glándula digestiva (FGD) (modificado de Soto y Mena, 1999)

$FGD = \text{peso húmedo de glándula digestiva (g)} / \text{largo de valva}^3 \text{ (cm)} * 100$

Factor de masa branquial (FB) (modificado de Soto y Mena, 1999)

$FB = \text{peso húmedo de branquia (g)} / \text{largo de valva}^3 \text{ (cm)} * 100$

VI- C) Contenido de glucógeno

El contenido de glucógeno fue extraído y medido en glándula digestiva según el método propuesto por Van Handel (1965). Los resultados se refirieron a una curva de calibración de glucosa y se expresaron en meq Glc / g de tejido húmedo.

VI- D) Contenido de lípidos

El contenido total de lípidos en glándula digestiva fue extraído utilizando la solución de Folch (cloroformo-metanol 2:1 v / v) y cuantificado de acuerdo a la técnica de Bligh y Dyer (1959). Los resultados se expresaron en mg de lípidos / g de tejido húmedo.

VI- E) Relación ARN / ADN

El músculo aductor preservado en ARN later y congelado (sección III) fue descongelado, lavado en buffer fosfato de sodio (100 mM, pH 7) y homogeneizado en buffer de lisis y extracción (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, dodecilsulfato sódico 1 % m / v, pH 8), modificado del trabajo de Serafim et al. (2012). El contenido de ARN y ADN se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen), utilizando el Quant-it RNA Assay kit (Q32852) y el Quant-it DNA BR Assay kit (Q32850), respectivamente.

VII- MICROORGANISMOS UTILIZADOS

VII- A) *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* (cepa JM109, proporcionada por el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires) fue cultivada en medio nutritivo agarizado (CM0003, OXOID) a 37 °C durante 24 hs. Luego de la incubación, se preparó una suspensión bacteriana inoculando células en solución salina estéril (NaCl 0,9 %, Merck) a una densidad de $1,5 \times 10^8$ células / mL, de acuerdo con el estándar de 0,5 en la escala de McFarland (0,080 – 0,100 abs a 625 nm). Esta suspensión fue

utilizada en todos los ensayos de actividad bacteriolítica y en la exposición de laboratorio descrita en el Capítulo III-A.

VII- B) *Scenedesmus vacuolatus*

El alga verde *Scenedesmus vacuolatus* (cepa BAFC CA4, proporcionada por el Laboratorio de Ficología del Departamento de Biodiversidad y Biología experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Figura 6) fue cultivada en medio basal de Bold (BBM; Bischoff y Bold, 1963) a 20 °C, bajo luz blanca fluorescente fría (11 W). Las células fueron recuperadas desde cultivos estacionarios por centrifugación a 4000 x g durante 15 min, liofilizadas y mantenidas a -20 °C hasta su utilización.

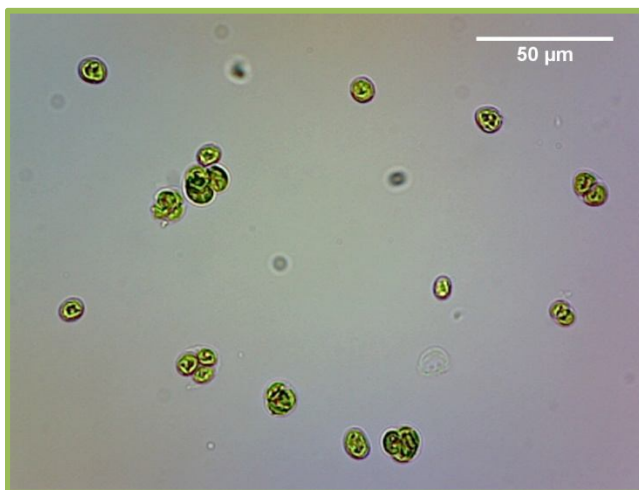


Fig. 6. *Scenedesmus vacuolatus*, cepa BAFC CA4.

VII- C) *Euglena gracilis*

Euglena gracilis (cepa UTEX 753, obtenida de la Colección de Cultivo de Algas de la Universidad de Texas, EEUU, Figura 7) fue cultivada en medio *Euglena gracilis* (EGM; CCAP, 1988) a 20 °C. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de oscuridad para favorecer la producción de paramylon (Barsanti et al., 2001). Las células fueron recuperadas

desde cultivos estacionarios por centrifugación a 1000 x g durante 15 min, liofilizadas y mantenidas a -20 °C hasta su utilización.



Fig. 7. *Euglena gracilis*, cepa UTEX 753.

VII- C) 1) Determinación del contenido de Paramilon

Para la determinación del contenido de paramilon en *E. gracilis* se utilizó la técnica de Kiss y Triemer (1988). Se tomaron 11 mg de células liofilizadas, se re-suspendieron en buffer Tris-HCl (0,125 M) con dodecilsulfato sódico al 2% (m/v) y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Los gránulos de paramilon obtenidos, se precipitaron por centrifugación a 3500 x g durante 20 min. Este procedimiento fue repetido hasta obtener un sobrenadante traslúcido. Luego, el paramylon fue lavado tres veces con agua destilada a 70 °C y secado hasta peso constante a 60° C. La calidad de los extractos fue evaluada y los resultados corregidos midiendo el contenido de proteínas totales remanentes luego del tratamiento (Bradford, 1976).

VIII- ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS Y BACTERIOLÓGICOS DE AGUA Y SEDIMENTOS

VIII- A) Recolección y Preservación de Muestras

Las muestras de agua ($n = 3$) y de sedimentos ($n = 3$), correspondientes a los experimentos de campo y de laboratorio, se tomaron en recipientes plásticos estériles para el análisis bacteriológico o en botellas de plástico pre-lavadas con HCl 5% para los análisis fisicoquímicos. Las muestras se conservaron en frío ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente) hasta su procesamiento, por duplicado. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un equipo HACH DR/4000.

VIII- B) Coliformes Fecales y Bacterias Entéricas

Las concentraciones de bacterias coliformes fecales (CF) se midieron con la técnica del Número Más Probable (APHA, 1998). En el caso de las muestras de agua, los resultados se expresaron como NMP / 100 mL. En el caso de las muestras de sedimento, se preparó una suspensión de muestra en una solución estéril de NaCl (0,9 % en H_2O_2 destilada), la cual fue utilizada para el análisis. Luego, las alícuotas de sedimento fueron secadas ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h) y pesadas (g) para expresar los resultados en NMP / g de sedimento seco (gss).

Las concentraciones de bacterias entéricas se evaluaron por siembra superficial y recuento directo en placa con medio agarizado de McConkey (Merck), incubando durante 24 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (APHA, 1998). Se utilizaron muestras de agua diluidas de forma seriada, mientras que para sedimento se utilizó la dilución seriada de una suspensión preparada como se describió para el caso de las CF. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) / mL o UFC / gss, según el caso.

VIII- C) Clorofila *a*

Para la medición del contenido de clorofila *a* (Chl *a*) en agua, un volumen conocido se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GFF, $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de poro), los cuales se

mantuvieron a -20°C hasta su análisis. Luego, se realizó una extracción con acetona a 4°C durante 24 h, seguida de una centrifugación a $4000 \times g$ durante 15 min. En el caso de los sedimentos, el contenido de Chl *a* fue extraído a 100°C en acetona al 90 % tamponada con CaCO_3 (modificado de Tett et al., 1977). La muestra de sedimento fue secada (60°C) y pesada (g). En ambos casos, la absorbancia de los sobrenadantes fue medida a 644 y 647 nm y la concentración de Chl *a* ($\mu\text{g} / \text{L}$ ó $\mu\text{g} / \text{gss}$) se calculó de acuerdo a Lichtenthaler (1987).

VIII- D) Materia Orgánica

La medición del contenido de materia orgánica se realizó por incineración, utilizando filtros de fibra de vidrio (Whatman GFF, $0,45 \mu\text{m}$ de poro) previamente secados (60°C durante 24 h), pesados, muflados (500°C durante 4 h) y vueltos a pesar (Juhel et al., 2006). Para el agua, se filtró un volumen conocido de muestra y los filtros se pesaron luego de secarlos y muflarlos. En el caso del sedimento, se dispusieron alícuotas de muestra sobre los filtros y se procedió de la misma manera que para el agua. El contenido de materia orgánica se calculó por diferencia de masa y se expresó en mg de materia orgánica particulada (MOP) MOP / L ó $\text{mg MO} / \text{gss}$, según correspondiera.

VIII- E) Formas de Nitrógeno

El contenido de nitrógeno total (NT) en agua fue medido utilizando el método de reducción de cadmio (Método HACH 8192) en muestras digeridas con persulfato ácido a 120°C durante 55 min. En muestras de sedimentos, se utilizó el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), mediante digestión húmeda con ácido sulfúrico y sulfato de cobre como catalizador. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g} / \text{L}$ ó $\mu\text{g} / \text{gss}$, según el caso.

El contenido de nitrato (NO_3) en agua fue medido utilizando el método de reducción de cadmio (HACH method 8192), mientras que el contenido de nitrito (NO_2) se evaluó por el método de diazotación (HACH method 8507). Los resultados se expresaron en $\mu\text{g} / \text{L}$.

VIII- F) Formas de fósforo

El contenido de fósforo total (FT) en agua se evaluó mediante la técnica del ácido ascórbico, luego de la digestión con persulfato de potasio (APHA, 1998); mientras que en sedimentos, el FT fue medido según el método propuesto por Takeuchi (1988). Los resultados se expresaron en $\mu\text{g} / \text{L}$ ó $\mu\text{g} / \text{gss}$. El contenido de fosfatos (PO_4) se midió con el método del ácido ascórbico descrito en APHA (1998). Los resultados se expresaron en $\mu\text{g} / \text{L}$.

VIII- G) Sulfatos

El contenido de sulfatos (SO_4^{-2}) se midió utilizando un método turbidimétrico propuesto por la APHA (1998). Los resultados fueron expresados en mg / L .

VIII- H) Turbidez

El grado de turbidez se midió utilizando el método de Radiación Atenuada (HACH Method 10047). Los resultados se expresaron en Unidades de Absorbancia de Formacina (UAF).

VIII- I) Cobre

El contenido de cobre total en muestras de agua se determinó mediante el método del ácido bicinónico, utilizando un kit HACH (Método 8506). Los resultados se expresaron en mg / L .

VIII- J) Hierro

El contenido de hierro total en muestras de agua se determinó mediante el método Ferrozina, utilizando un kit HACH (Método 8147). Los resultados se expresaron en mg / L .

CAPÍTULO I:

**Biomarcadores de respuesta en
Diplodon chilensis expuesto a
contaminación por efluentes
cloacales en la cuenca del río
Pocahullo.**

I- INTRODUCCIÓN

La exposición a contaminantes de origen cloacal puede afectar la actividad de múltiples enzimas, causando un daño significativo sobre diferentes compuestos celulares. El efecto resultante estará dado por la acción antagónica o sinérgica entre los diferentes tóxicos y los mecanismos de respuesta desencadenados en el organismo. Por esto, en las etapas iniciales del biomonitoreo, se recomienda el uso de biomarcadores generales que permitan obtener una visión general (Nicholson y Lam, 2005).

En la búsqueda de biomarcadores, la inducción del estrés oxidativo debe ser evaluada considerando tanto las dinámicas del proceso como los efectos de las concentraciones, en función de la sensibilidad del organismo (Viarengo et al., 2007, entre otros). En este sentido, la dinámica es muy importante porque diferentes biomarcadores muestran variados patrones temporales (Lushchack, 2011). La caracterización de las respuestas bioquímicas y somáticas y su cambio potencial ante condiciones de exposición a contaminantes es un paso esencial para evaluar si un biomarcador determinado es aplicable en estudios de biomonitoreo a corto y largo plazo (Box et al., 2007; Tsangaris et al., 2010).

Para discriminar efectos en una escala espacio-tiempo controlada, el biomonitoreo debe realizarse de forma activa, por trasplante de organismos desde poblaciones naturales de referencia hacia el área de estudio. Esta metodología permite también que los resultados puedan ser evaluados con más detalle en exposiciones de laboratorio (revisado por Contardo-Jara et al., 2009). Con el objetivo de reducir los efectos de la variación fisiológica entre individuos, se recomienda el trasplante de animales enjaulados desde una única población de referencia en un sitio no contaminado (Viarengo et al., 2007). Además, para evitar confusiones derivadas de funciones biológicas naturales, tales como el estado reproductivo y la alimentación, es necesaria la realización de estudios simultáneos en la población de referencia seleccionada (Lau et al., 2004; Bocchetti et al., 2006).

Se ha observado que la exposición a bacterias, metales, productos farmacéuticos y detergentes, presentes en el efluente cloacal, causa efectos oxidativos en branquias y glándula digestiva de diferentes especies de bivalvos (Bainy et al., 2000; Gagné et al., 2004; Mahmoud et al., 2010; Tsangaris et al., 2010). La actividad glutatión S-transferasa (GST) en glándula

digestiva del mejillón *Perna perna* se incrementó luego de 180 días de exposición en un sitio contaminado de la costa brasileña; aunque no se había observado efecto durante los primeros 150 días. Por otro lado, la actividad catalasa (CAT) en este mejillón no varió en todo el periodo (Bainy et al., 2000). En poblaciones naturales de los bivalvos *Scrobicularia plana* y *Cerastoderma edule* expuestas a contaminación por efluentes cloacales no tratados y a efluentes de origen industrial en un ambiente estuarial, se encontró una elevada actividad CAT junto con el incremento en los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) (Bergayou et al., 2009). Por otro lado, en ambientes eutrofizados por el aporte de materia orgánica a través de descargas cloacales, podría producirse la liberación de biotoxinas desde floraciones fitoplanctónicas, produciendo estrés oxidativo, afectando la actividad proteína fosfatasa 1 (PP1) y llevando a un daño celular irreparable (Campos y Vasconcelos, 2010).

La liberación de efluentes de origen cloacal hacia los cuerpos de agua implica un aumento en la carga de nutrientes y materia orgánica disponible, por lo que en bivalvos expuestos a estas condiciones, se ha observado un elevado índice hepatosomático dado por el incremento del crecimiento somático (Box et al., 2007; Sabatini et al., 2011b). Sin embargo, este crecimiento podría ser reducido por la pérdida de tejido, debido a la exposición a metales, como el cobre (Sabatini et al., 2011c) y/o a la autofagia, por activación de enzimas líticas (Viarengo et al., 2007). Además, el consumo de las reservas energéticas debido a la activación de mecanismos de protección y/o al ayuno como consecuencia del daño al tejido branquial filtrante, es otra causa de pérdida de masa tisular (Smolders et al., 2004; Nicholson y Lam, 2005; Chakraborty et al., 2010).

Estudios recientes muestran evidencia de estrés y daño oxidativo en poblaciones naturales de *Diplodon chilensis* que habitan la zona en que el río Pocahullo desemboca en el lago Lacar (Sabatini et al., 2011b; Rocchetta et al., 2014b). Estos resultados concuerdan con experimentos de laboratorio donde las almejas fueron expuestas a *E. coli* por 6 semanas (Sabatini et al., 2011b). Por otro lado, en esta misma población, Rocchetta et al. (2014b) han reportado un incremento en el tamaño de los individuos y en su tasa de crecimiento, comparada con su control de la zona de Yuco.

En este capítulo se estudia el efecto sobre *Diplodon chilensis* del transplante en cajas a áreas no contaminadas y contaminadas con efluentes cloacales, en la cuenca del río Pocahullo.

Además, se evalúan las respuestas enzimáticas rápidas de esta especie frente a una exposición aguda en laboratorio, luego de una exposición crónica a campo. Se busca detectar, mediante la integración de ambos estudios, los cambios fisiológicos y bioquímicos que responden a la calidad del agua y evaluar su aplicabilidad como biomarcadores, a corto y largo plazo, frente a este tipo de contaminación.

HIPÓTESIS

- Las respuestas fisiológicas y bioquímicas en bivalvos expuestos a contaminación de origen cloacal dependen de la concentración de los contaminantes y del tiempo de exposición.
- Las actividades enzimáticas antioxidantes y detoxificantes responden de manera órgano-específica a la exposición a contaminantes de origen cloacal.
- La exposición a largo plazo, o aclimatización, en sitios contaminados modula las respuestas enzimáticas, ante un incremento agudo de la carga contaminante.

OBJETIVOS

- Evaluar los cambios en las respuestas fisiológicas y bioquímicas medidas en branquia y glándula digestiva de *Diplodon chilensis* expuesto a contaminación por efluentes cloacales, en relación con cambios en la calidad del agua y en las variables ambientales.
- Determinar la aptitud de tales respuestas como biomarcadores de contaminación por efluentes cloacales a corto y largo plazo.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

II- A) Sitios de Estudio

Se recolectaron almejas del sitio control en el lago Lacar (Yuco, S0), a una profundidad de 3 metros en fondo arenoso (Figura 1). La exposición a campo se llevó a cabo en tres sitios seleccionados en la cuenca del río Pocahullo (Figura 1). El sitio control (S1), situado en una zona rural levemente afectada por actividades ganaderas, aguas arriba en el arroyo Maipú-Calvuco (40° 07' 20,3'' S, 71° 14' 57,4'' O). El segundo sitio (S2), también en el arroyo Maipú-Calvuco, 8 km aguas abajo de S1, recibe descargas difusas de efluentes ganaderos y domiciliarios y la descarga puntual de lagunas de sedimentación (tratamiento primario) desde zonas suburbanas (40° 08' 48,74'' S, 71° 19' 35,2'' O). El tercer sitio (S3), ubicado 20 m aguas abajo de la descarga de efluentes de la principal planta de tratamiento terciario de la ciudad (40° 10' S, 71° 20' 60'' O), cerca de la desembocadura del río Pocahullo en lago Lacar.

II- B) Exposición a Campo

Un total de 270 almejas fueron separadas en grupos de 15 individuos y colocadas en 18 cajas (estructura de hierro cubierta con maya plástica, 40 x 40 x 15 cm). La densidad resultante fue similar a aquella medida en una población natural del área de S0, 187 individuos / m² (Rocchetta et al., 2014). En cada sitio del río (S1-S3), se colocaron 6 cajas a una profundidad de 0,5 a 1 m.

El estudio fue llevado a cabo desde agosto de 2009 hasta abril de 2010. Luego de uno y tres meses de exposición, 6 almejas (1 por caja) fueron recolectadas de cada sitio, transportadas al laboratorio a baja temperatura y procesadas. En branquia y glándula digestiva, se midieron las actividades glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y proteína fosfatasa 1 (PP1) y se estimó la peroxidación lipídica (TBARS); además, se calculó la relación masa de glándula digestiva / largo de valva (MGD / LV). Por otro lado, en cada sitio se registró la temperatura del agua (°C) y se tomaron muestras de agua para medir las concentraciones de

bacterias coliformes fecales (CF); clorofila *a* (Chl *a*); materia orgánica particulada (MOP); nitrógeno total (TN) y sulfatos (SO_4^{-2}).

Las almejas restantes fueron dejadas en el río para su aclimatización durante siete meses. Luego de este periodo, las almejas de S3 fueron seleccionadas para su utilización en los experimentos de exposición en el laboratorio, debido a que este grupo se encontraba expuesto a las condiciones crónicas más severas en el río.

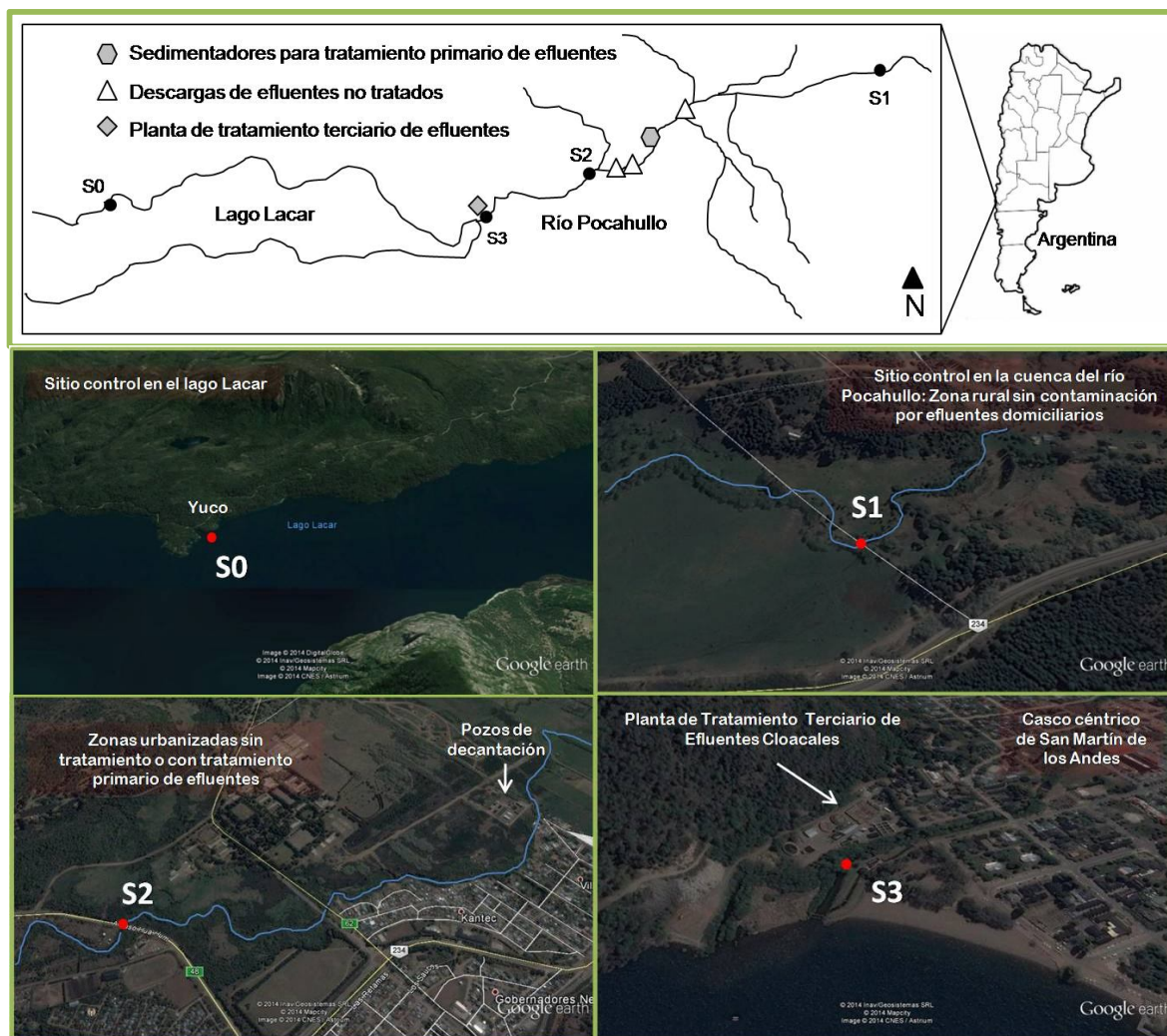


Fig. 1. Sitio de extracción de almejas y control de población natural en el lago Lacar (S0). Sitios de exposición a corto y largo plazo de *Diplodon chilensis* (n = 6 cajas por sitio; 15 almejas por caja) en la cuenca del río Pocahullo (S1: sitio de referencia, aguas arriba, con muy bajos niveles de nutrientes y bacterias coliformes; S2: sitio afectado por descargas de efluentes no tratados y de efluentes de lagunas de tratamiento primario; S3: sitio afectado por descarga de efluentes con tratamiento terciario). Imágenes satelitales extraídas de Google Earth (2014).

II- C) Exposición en Laboratorio

Se realizó un experimento de laboratorio con las almejas aclimatadas por 7 meses en S3, con el fin de evaluar la capacidad de los biomarcadores enzimáticos para la detección de un incremento agudo en la carga contaminante. Se recolectaron 12 almejas de S3 y 12 almejas de S0 y se las colocó individualmente en recipientes de plástico con 2 litros de agua obtenida 10 m aguas abajo de la descarga de la planta de tratamiento terciario de efluentes. La temperatura del agua en los recipientes se mantuvo a 10 °C. La concentración de bacterias coliformes fecales en el agua utilizada (1410 NMP / 100 mL) fue más de dos veces mayor que la medida en S3 al momento de la recolección de las almejas (600 NMP / 100 mL). Se midieron las actividades GST y CAT en branquia y glándula digestiva, antes (T_0 , $n = 6$) y después (T_8 , $n = 6$) de una exposición aguda de 8 hs. Se utilizaron controles sin almejas ($n = 2$) para considerar los cambios basales en las condiciones del agua en cada caso.

II- D) Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. La distribución normal y homogeneidad de varianzas se evaluaron con el Test de Kolmogorov-Smirnov y el Test de Levene, respectivamente. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron, los datos se transformaron usando el $\text{Log}_{10}(x)$. Para identificar diferencias entre sitios en los tiempos analizados se utilizó ANOVA de dos factores seguido del test de Newman-Keuls de comparación múltiple. Las diferencias significativas se consideraron a $P \leq 0,05$. Las correlaciones entre las variables biológicas y las variables de calidad de agua, se analizaron con el coeficiente de Spearman (significancia $P \leq 0,05$).

III- RESULTADOS

III- A) Calidad del Agua

En la Tabla 1 se muestran los datos de calidad del agua obtenidos en el lago Lacar (S0) y en el río Pocahullo (S1-3), durante los muestreos de corto plazo (1-3 meses). Los sitios S1 y S0 muestran características similares, excepto por la turbidez ($P < 0,05$), que es mayor en el río que en el lago, y por la temperatura ($P < 0,001$), la cual es más alta en el lago que en el río. Durante este periodo, la concentración de CF es más alta en S2 y S3 que en S0 y S1 ($P < 0,05$), con valores mayores en S3 que en S2 ($P < 0,01$). En el primer mes, las concentraciones de Chl *a* y NT son significativamente mayores en S3 comparado con los otros sitios ($P < 0,05$); mientras que la concentración de SO_4^{-2} se mantiene elevada en este sitio comparado con S0-S2, en ambos meses muestreados ($P < 0,05$). La carga de MOP no varía significativamente entre sitios.

Durante la exposición siguiente a los tres meses, la concentración de CF en S3 es siempre significativamente mayor que en S0 ($P < 0,001$) y muestra variaciones temporales pronunciadas desde el quinto (24000 vs. 22 ± 2 NMP / 100 mL) al séptimo mes de exposición (600 vs. 0 NMP / 100 mL). En el quinto mes, el pico de concentración de CF en S3, coincide con los picos de NT ($2743 \pm 0,15$ $\mu\text{g} / \text{mL}$, $P < 0,001$) y SO_4^{-2} ($6,38 \pm 0,04$ mg / mL , $P < 0,05$) medidos en el mismo sitio. Estas concentraciones de TN y SO_4^{-2} son significativamente mayores que las medidas en S0 ($236 \pm 0,06$ $\mu\text{g} / \text{mL}$; $1,63 \pm 0,00$ mg / mL , respectivamente). En el resto del periodo, no se observan diferencias significativas entre S3 y S0, para TN, SO_4^{-2} y MOP (los datos completos de todo el periodo se presentan en el Anexo 1).

Tabla 1. Calidad del agua en el control del lago (S0) y en los sitios de exposición de almejas en la cuenca del río Pocahullo (S1: sitio de referencia, aguas arriba en el río Pocahullo; S2: sitio del río afectado por descargas de efluentes no tratados y con tratamiento primario; S3: sitio del río afectado por descarga de efluentes con tratamiento terciario). Bacterias coliformes fecales (CF); clorofila *a* (Chl *a*); materia orgánica particulada (MOP); nitrógeno total (NT); sulfatos (SO₄⁻²). Letras distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre sitios para un tiempo dado. Los valores están expresados como media ± error estándar.

	Sitios	Un mes	Tres meses
CF (NMP / 100 mL)	S0	0 a	32 ± 8,00 a
	S1	15,5 ± 4,5 a	11 ± 0,00 a
	S2	600 ± 100 b	500 ± 0,00 b
	S3	1500 ± 100 c	1500 ± 100 c
Chl <i>a</i> (µg / L)	S0	2,46 ± 0,00	0,92 ± 0,49 a
	S1	1,81 ± 0,00	0,53 ± 0,17 a
	S2	0,34 ± 0,00	1,79 ± 0,37 a
	S3	1,43 ± 0,00	3,27 ± 0,14 b
MOP (mg / L)	S0	7,32 ± 0,00	16,5 ± 2,50
	S1	16,62 ± 2,33	21,99 ± 6,34
	S2	15,14 ± 0,86	14,37 ± 1,37
	S3	16 ± 1,00	18 ± 0,00
NT (µg / L)	S0	177 ± 0,00	135 ± 0,02 a
	S1	177 ± 0,06	118 ± 0,00 a
	S2	206 ± 0,08	177 ± 0,6 a
	S3	354 ± 0,12	678 ± 0,09 b
SO ₄ ⁻² (mg / L)	S0	2,72 ± 0,00 a	1,75 ± 0,11 a
	S1	2,40 ± 0,20 a	1,44 ± 0,14 a
	S2	2,01 ± 0,56 a	1,88 ± 0,09 a
	S3	3,39 ± 0,43 b	3,31 ± 0,99 b
Turbidez (UAF)	S0	1,5 ± 0,5 a	1,5 ± 0,5 a
	S1	6,5 ± 1,5 b	5,5 ± 0,5 b
	S2	5,0 ± 1,0 b	6,5 ± 0,5 b
	S3	5,0 ± 1,0 b	8,0 ± 0,0 b
T (°C)	S0	8,85 ± 0,05 a	13,4 ± 0,10 a
	S1	6,4 ± 0,00 b	8,1 ± 0,10 b
	S2	5,95 ± 0,50 b	8 ± 0,00 b
	S3	6,4 ± 0,00 b	8,5 ± 0,50 b
*Caudal (promedio mensual, m ³ / seg)	Cuenca del río Pocahullo	8,79	4,51
*Precipitaciones (promedio mensual, mm)		66,10	33,20

*Datos suministrados por la Estación de Biología Acuática de San Martín de los Andes.

III- B) Exposición a Campo

La actividad glutatión S-transferasa (GST) en branquia de almejas expuestas en el río muestra variaciones geográficas y temporales significativas (interacción, $P < 0,001$) (Figura 2a). Al primer mes de exposición, la actividad GST en branquia se incrementa en almejas trasplantadas a los tres sitios del río en comparación con aquellas extraídas del lago (S0) ($P < 0,01$). Además, ésta actividad es significativamente mayor en almejas de S3 que en aquellas de S1 y S2 ($P < 0,05$) y no se observan diferencias entre S1 y S2. Por otro lado, en este momento de muestreo, se encuentra una correlación significativa entre la actividad GST en branquia y las concentraciones de CF ($r^2 = 0,92$, $P < 0,05$). Al tercer mes, esta actividad recupera los niveles control en todas las almejas trasplantadas.

El análisis de ANOVA de dos factores evidencia un efecto de sitio, de tiempo y de interacción (interacción, $P < 0,05$) para la actividad catalasa (CAT) en branquia. Al primer mes de exposición, la comparación entre sitios indica que esta actividad es significativamente mayor en almejas de S3 que en aquellas de S0-S2 ($P < 0,05$); mientras que no se observan diferencias significativas entre sitios al tercer mes (Figura 2b). La actividad proteína fosfatasa 1 (PP1) en branquia no evidencia diferencias durante la exposición (Figura 2c). Los valores de peroxidación lipídica (TBARS) en branquia se incrementan en almejas de S3 al primer mes ($P < 0,05$), sin mostrar diferencias significativas al tercer mes de exposición (Figura 2d).

En glándula digestiva, las actividades enzimáticas presentan diferencias significativas entre sitios y entre tiempos (interacción, $P < 0,001$). Al primer mes, todas las almejas trasplantadas muestran una depresión general de las actividades GST ($P < 0,05$), CAT ($P < 0,05$) y PP1 ($P < 0,01$) en este órgano, con respecto a S0 (Figura 2e-g). En particular, en este tiempo, la actividad GST correlaciona negativamente con la turbidez del agua ($P < 0,05$; $r = -0,85$). Al tercer mes de exposición, la actividad GST alcanza niveles control (S0) en almejas de S1 y S3, pero se incrementa significativamente en almejas de S2 ($P < 0,001$). La actividad CAT en glándula digestiva es mayor en todas las almejas trasplantadas que en aquellas de S0 ($P < 0,05$). La actividad PP1 en éste órgano disminuye a niveles control (S0) en almejas de S1 y se incrementa significativamente en almejas expuestas a los sitios contaminados ($P < 0,01$). Los niveles de TBARS se incrementan en todas las almejas trasplantadas al primer mes de exposición ($P < 0,001$), mientras que al tercer mes, el incremento es significativo sólo para S2

en comparación con S0 ($P < 0,005$), y con S1 y S3 ($P < 0,05$). Además, al tercer mes, TBARS disminuye significativamente en almejas de S1 y S3 ($P < 0,05$ and $P < 0,01$, respectivamente), con respecto al primer mes, sin mostrar diferencias con los valores observados para las almejas de S0 (Figura 2h). Al tercer mes, la relación DGM/SL se incrementa en todos los grupos, aunque el aumento es menor en almejas de S2 ($P < 0,01$) (Figura 3).

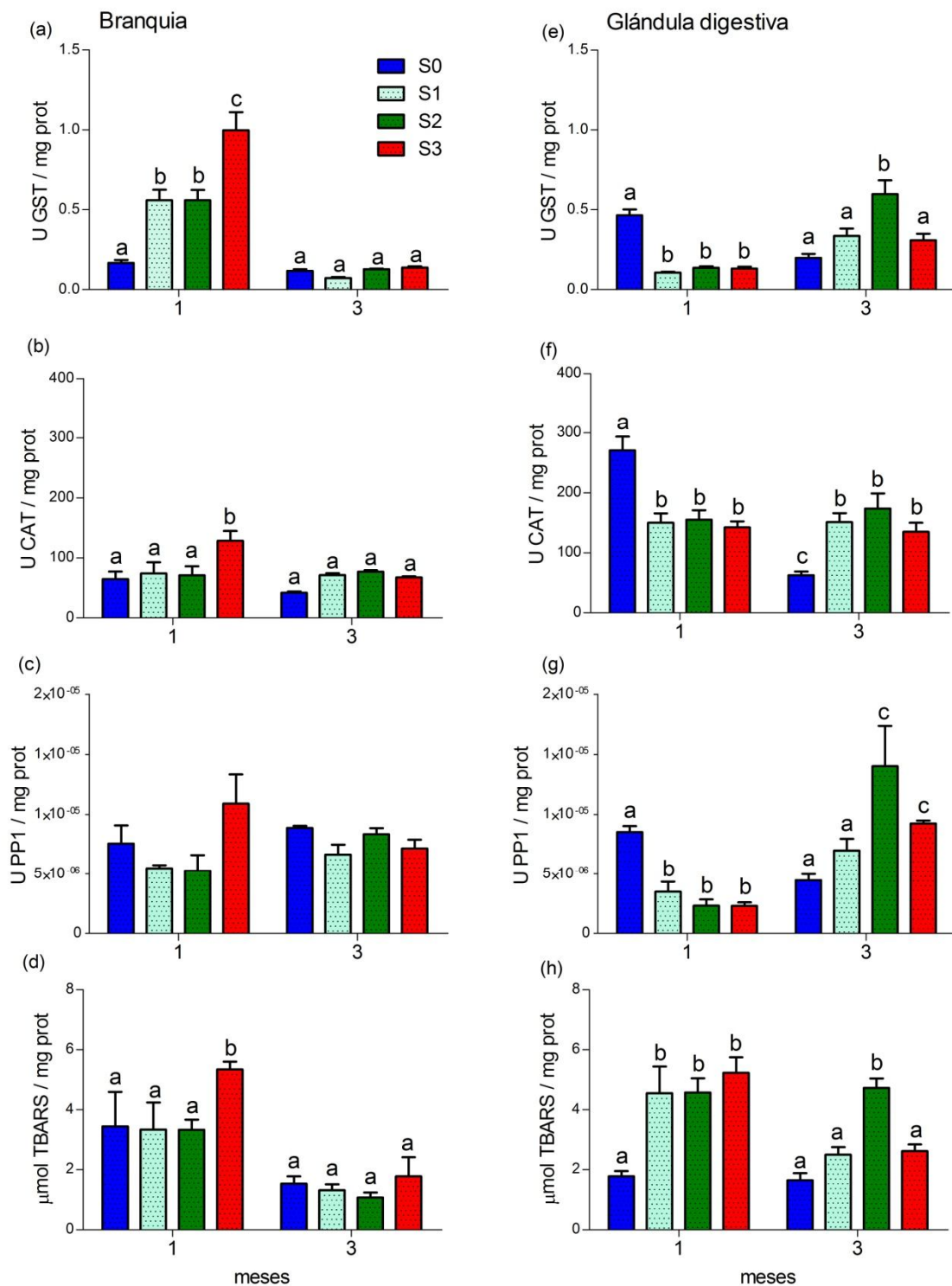


Fig. 2. Efectos de la exposición a corto plazo (1-3 meses) en las actividades enzimáticas y peroxidación lipídica en branquia (a-d) y glándula digestiva (e-h) de *Diplodon chilensis* (S0: sitio control en el lago; S1: sitio de referencia, aguas arriba en el río Pochaullo; S2: sitio de río afectado por descargas de efluentes no tratados y con tratamiento primario; S3: sitio del río afectado por descarga de efluentes con tratamiento terciario). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos individuales.

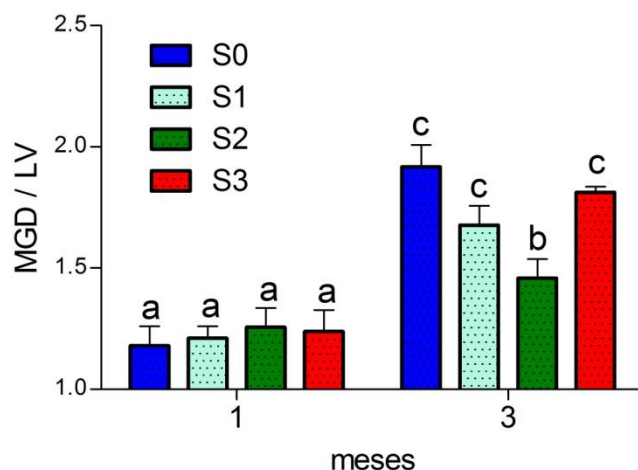


Fig. 3. Efectos de la exposición a corto plazo (1-3 meses) a contaminación por efluentes sobre la relación MGD/LV (masa de la glándula digestiva/ largo de valva) en *Diplodon chilensis* (S0: sitio control en el lago; S1: sitio de referencia, aguas arriba en el río Pocahullo; S2: sitio de río afectado por descargas de efluentes no tratados y con tratamiento primario; S3: sitio del río afectado por descarga de efluentes con tratamiento terciario). Los valores están expresados como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos individuales.

III- C) Exposición en Laboratorio

A T_0 , la actividad GST en branquia es similar en almejas de S0 y S3. La exposición a una concentración más elevada de bacterias ([S3] x 2) por 8 h (T_8) produce un aumento que triplica la actividad enzimática en ambos grupos ($P < 0,001$, entre tiempos) (Figura 4a). Al contrario, luego de la exposición aguda, la actividad GST en glándula digestiva muestra una respuesta diferencial entre almejas de S0 y S3 ($P < 0,0001$). A T_8 , la actividad de esta enzima se incrementa trece veces en almejas de S3 ($P < 0,001$), pero permanece sin cambios en almejas de S0 (Figura 4b). La actividad CAT en ambos órganos es mayor en almejas de S3 comparadas con aquellas de S0 ($P < 0,0001$), siendo ambas significativamente incrementadas a T_8 ($P < 0,0001$) (Figura 4c,d).

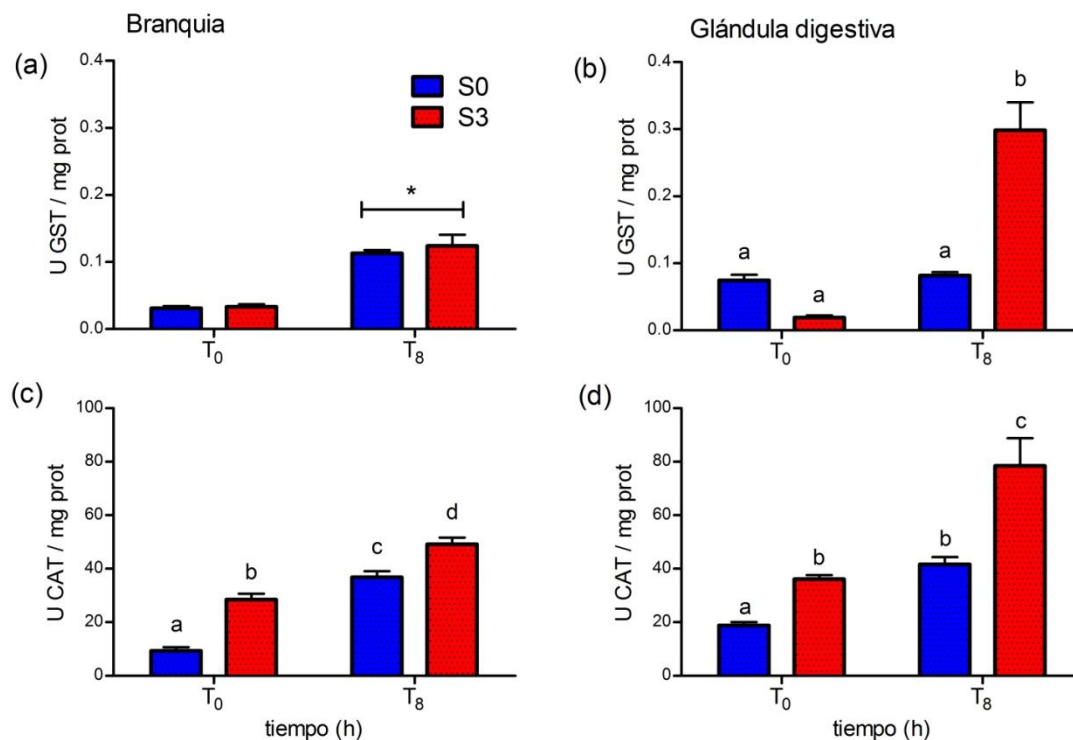


Fig. 4. Efectos agudos (8 h) de la exposición a efluentes domiciliarios concentrados ([S3 FC] x 2) sobre las actividades enzimáticas en branquia (a,c) y glándula digestiva (b,d) de *Diplodon chilensis* control (S0) o expuesto previamente a contaminación cloacal en S3, por siete meses. Los valores están expresados como media \pm error estándar. Letras diferentes indican $P < 0,05$ (c,d) y $P < 0,001$ (b) entre tratamientos individuales. * indica $P < 0,05$ entre T₀ y T₈.

IV- DISCUSIÓN

IV- A) Exposición a Campo

Las almejas trasplantadas desde el lago hacia los sitios del río muestran respuestas bioquímicas diferentes en branquia y glándula digestiva. Esta respuesta órgano-específica se debe, probablemente, a diferencias en el grado de exposición y biodisponibilidad de los contaminantes (Cossu et al., 2000; Box et al., 2007). Las branquias son consideradas como un órgano apto para el estudio de los efectos de los contaminantes en los bivalvos, debido a su amplia superficie de contacto directo con el medio acuático (Nicholson y Lam, 2005; Contardo-Jara et al., 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que esta

aptitud depende del tiempo de exposición y del biomarcador elegido. Por ejemplo, la mayoría de los biomarcadores analizados en *Diplodon chilensis* reflejan las diferencias en la calidad del agua luego de un mes de exposición en el río, pero esta sensibilidad no es evidente a los tres meses.

La actividad enzimática en branquia evidencia una tendencia general a incrementarse al primer mes de exposición. La actividad glutatión S- transferasa (GST) se eleva en todas las almejas trasplantadas al río (S1-3) en comparación con las almejas control del lago (S0). En particular, el incremento de esta actividad en almejas de S1 sugiere estrés producido por el propio trasplante, ya que éstas no están expuestas a un nivel de contaminación significativa. Una respuesta similar se observa en almejas de S2, expuestas a contaminación moderada (CF = 600 NMP / 100 mL); mientras que la respuesta de GST se incrementa significativamente en almejas expuestas a un mayor nivel de contaminación en S3 (CF = 1500 ± 100 NMP / 100 mL). Estos resultados sugieren que el límite de susceptibilidad para la actividad GST en branquia, bajo estas condiciones, se encuentra entre 600 y 1500 NMP / 100 mL de CF. Farcy et al. (2011) obtuvieron una sensibilidad similar para la actividad GST en glándula digestiva de la almeja de agua dulce *Elliptio complanata*, al ser trasplantada a sitios contaminados con efluentes domiciliarios. Estos autores encontraron un aumento en la actividad de la enzima al exponer a 1950 UFC de coliformes fecales / 100 mL, pero no observaron efectos luego de la exposición en un sitio con menor contaminación (495 UFC / 100 mL). Por otro lado, al primer mes de exposición, la actividad catalasa (CAT) en branquia de *D. chilensis* se incrementa sólo en almejas expuestas en S3, comparadas con aquellas de S0. No se evidencian efectos de estrés por trasplante en almejas de S1 con respecto a esta enzima. A pesar de la activación del sistema de defensas antioxidantes observada en branquias de almejas de S3, la peroxidación lipídica es evidente luego del primer mes de exposición. En base a estos resultados, las actividades GST y CAT, y los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) en branquia de *D. chilensis* podrían ser considerados como biomarcadores aplicables, a un mes de exposición, para la detección de concentraciones bacterianas altas en ambientes contaminados con efluentes cloacales.

A los tres meses de exposición, las actividades GST y CAT en branquia no son afectadas por el estrés de trasplante ni por las concentraciones bacterianas. Además, aunque

las concentraciones bacterianas se mantienen similares a las del primer mes, los niveles de TBARS en este órgano son compensados en todos los sitios del río. Faria et al. (2010) sugirieron que, en *Corbicula fluminea* expuesta a contaminación domiciliaria e industrial se mantiene un potencial antioxidante constante, dado por la activación de diferentes tipos de respuestas antioxidantes, en diferentes tiempos de exposición.

La glándula digestiva es la encargada de la digestión intracelular, la distribución de nutrientes, la eliminación de xenobióticos y la acumulación de reservas energéticas (Albetosa et al., 2007; 2012; Tian et al., 2014). En un estudio de laboratorio con *D. chilensis*, Sabatini et al. (2011b) no detectaron diferencias significativas entre la actividad GST en glándula digestiva de almejas alimentadas con *E. coli* y almejas alimentadas con un alga, durante 5 semanas. Viarengo et al. (2007) sugirieron que mas allá de los contaminantes, la manipulación y la exposición de bivalvos enjaulados en diferentes ambientes causa una situación de estrés que puede alterar los parámetros fisiológicos. Camus et al. (2004) observaron, en *Mytilus galloprovincialis*, una disminución en la capacidad antioxidante total relacionada con el estrés de trasplante, la cual es completamente compensada a un mes de exposición. En este trabajo, las actividades de todas las enzimas medidas en glándula digestiva de almejas trasplantadas disminuyen significativamente respecto al control S0, a un mes de exposición. Este efecto es similar en almejas de S1 y en almejas de los sitios contaminados (S2-3), lo que reflejaría muy probablemente estrés por trasplante y no una respuesta al incremento en la carga bacteriana, en acuerdo con los resultados de Sabatini et al. (2011b).

Además del estrés por trasplante, la reducción inicial de las actividades enzimáticas en la glándula digestiva de *D. chilensis* podría ser una repuesta al incremento de la turbidez en el agua del río, en comparación con la del lago. Este parámetro ambiental ha sido asociado a la disminución de las densidades poblacionales de esta especie en algunos lagos de Chile (Valdovinos y Pedreros, 2007). Ellis et al. (2002) demostraron que el incremento en los niveles de sedimentos inorgánicos suspendidos reduce la actividad filtradora de *Atrina zelandica*, luego de tres días. En este estudio, la actividad GST en glándula digestiva correlaciona negativamente con la turbidez del agua, al primer mes de exposición. Por otro lado, durante un periodo de bajo consumo de alimento o ayuno, se esperaría una disminución de la relación MGD / LV (Ellis et al., 2002; Albetosa et al., 2007), lo que no fue evidente en

D. chilensis. Con respecto a esto, Nicholson y Lam (2005) sugieren que en bivalvos ayunados, la pérdida de masa debida al consumo de reservas puede estar compensada por la incorporación de agua en el organismo. Alternativamente, la reducción en la actividad enzimática observada en este periodo podría estar reflejando una depresión metabólica, con uso reducido de las reservas energéticas. La reducción en las defensas antioxidantes/detoxificantes en *D. chilensis* podría estar produciendo el incremento en la peroxidación lipídica observado en este periodo, incluso a tasas metabólicas disminuidas.

Los efectos de trasplante observados en *D. chilensis* se compensan completamente en glándula digestiva a los tres meses de exposición, ya que la mayoría de las variables estudiadas en almejas de S1 presentan valores similares a los de S0. La excepción fue la respuesta de CAT en glándula digestiva, la cual permanece elevada en todos los sitios del río con respecto a S0. Por otro lado, la depresión en la actividad enzimática observada en el primer mes, es seguida por un incremento de las actividades GST y PP1 en glándula digestiva al tercer mes, en almejas de S2 y S3 comparadas con aquellas de S0 y S1. Patrones de respuestas similares han sido descritos por Regoli y Principato (1995) y por Franzellitti et al. (2010), quienes argumentan que la exposición a contaminación por periodos cortos de tiempo puede inducir una disminución temporal de las defensas antioxidantes, la cual puede estar seguida de una inducción de la respuesta.

Cabe destacar que, a los tres meses de exposición, se detectan picos de actividad enzimática y peroxidación lipídica en glándula digestiva de *D. chilensis* expuestos en S2; acompañados de una reducción en la relación MGD / LV. Estos cambios no están correlacionados con las concentraciones de CF en este sitio. Además, no sería probable que estos cambios se debieran a una respuesta a la contaminación bacteriana, ya que estudios previos en *D. chilensis* extraídos de este mismo lago mostraron un alto MGD / LV en almejas colectadas en una área contaminada por efluentes cloacales en comparación con almejas de un sitio control (Sabatini et al., 2011b; Roccheta et al., 2014b). Alternativamente, el efecto de contaminantes que no están directamente relacionados con este tipo de contaminación, como los metales o la microcistina, podrían reducir la relación MGD / LV en esta especie, debido al daño a tejidos y/o a la eliminación de xenobióticos por mecanismos merócrinos/holócrinos, como se describe en Sabatini et al. (2011b,c). Además, la presencia de productos

farmacéuticos en el efluente podría haber causado esta reducción en el índice de condición de las almejas expuestas, como se observó en *Elliptio complanata* expuesto a efluentes de origen domiciliario y hospitalario (Gagné et al., 2012).

IV- B) Exposición en Laboratorio

El grado de estrés al que están expuestos los organismos no es estático, si no que cambia con las variaciones en las condiciones ambientales, en el metabolismo, en la dieta, entre otros. Por otro lado, la pre-exposición a intensidades bajas de estrés puede incrementar la tolerancia a un estrés de mayor intensidad (Lushchak et al., 2011). En este trabajo, *D. chilensis* fue expuesto por siete meses a grados variables de contaminación cloacal en un sitio impactado (S3) y luego sometido en laboratorio a 8 h de exposición a agua con un mayor grado de contaminación. Las almejas colectadas en S0 y aquellas previamente expuestas en S3 muestran respuestas específicas dependientes del órgano y de la enzima analizados.

En branquia, las actividades GST y CAT son estimuladas por la exposición a un mayor nivel de contaminación en ambos órganos, independientemente del tratamiento previo. Esta sensibilidad concuerda con las respuestas de estas enzimas a una concentración bacteriana similar, observada al primer mes de exposición a campo en S3 (Fig. 2). Además, la actividad basal de CAT en branquia es mayor en las almejas aclimatizadas en S3, lo cual podría deberse a un incremento en la expresión de la enzima, correspondiéndose con lo publicado en estudios con otros bivalvos (Cossu et al., 2000; Tsung-Meng et al., 2009; Gust et al., 2013).

En el caso de la glándula digestiva de *D. chilensis*, la actividad GST implicaría también la expresión de isoformas distintas en respuesta al estímulo microbiológico y químico al que fue expuesto, según lo sugieren estudios realizados con almejas (Hoarau et al., 2001) y trigo (Mauch y Dudler, 1993). En este trabajo, las almejas de S3 muestran una actividad basal baja para esta enzima, la cual se incrementa significativamente en respuesta al aumento en las concentraciones de CF; mientras que las almejas de S0 no muestran respuesta ante el mismo estímulo. La isoforma inducible de GST permanecería inactiva a concentraciones medias de CF, tal como las medidas en S3 al momento de la recolección de almejas para este

experimento (600 NMP / 100 mL), y estaría respondiendo al incremento agudo en la carga bacteriana.

Por otro lado, la respuesta de CAT es similar en branquia y glándula digestiva. Los niveles basales de estas enzimas son mayores en almejas de S3 comparadas con aquellas de S0. Además, la actividad CAT en ambos órganos y en ambos sitios (S0, S3) se eleva significativamente ante el incremento agudo en la concentración bacteriana, lo que es consistente con el incremento en la actividad de CAT en branquia a un mes de exposición a campo, en S3. Considerando que no he encontrado antecedentes sobre la existencia de más de una isoforma de CAT en bivalvos, estos resultados sugieren un proceso de aclimatización a través del incremento en la expresión de una única isoforma, como resultado de la exposición a contaminación por efluentes urbanos. Resultados similares fueron publicados por Bigot et al. (2010) para el bivalvo de agua dulce *Unio tumidus* expuesto en un río contaminado con efluentes urbanos y de agricultura. Sin embargo, se deberían realizar estudios de biología molecular para elucidar la existencia de diferentes isoformas de GST y CAT en esta especie y su respuesta a los contaminantes.

VI- CONCLUSIONES

- La respuesta fisiológica de *D. chilensis* a la contaminación por efluentes domiciliarios es órgano-específica y depende del tiempo de exposición y del grado de contaminación.
- En branquia, los marcadores GST, CAT y TBARS responden claramente a la exposición a altas concentraciones bacterianas a campo. Sin embargo, en la glándula digestiva estos marcadores pueden ser enmascarados por los efectos del trasplante, al menos cuando las almejas son transferidas desde las condiciones del lago a las del río.
- En particular, las actividades GST y CAT en branquia constituyen biomarcadores aplicables a altas concentraciones de coliformes fecales con o sin exposición previa. En la glándula digestiva, la actividad de CAT es sensible tanto a la exposición a largo plazo, como a la exposición aguda a una carga bacteriana aumentada, mientras que la actividad de GST se vuelve sensible luego de la aclimatización a largo plazo.

CAPÍTULO II:

Respuesta inmune, balance oxidativo y capacidad filtradora en *Diplodon chilensis* extraído de poblaciones naturales, expuestas a contaminación por efluentes cloacales en el lago Lacar.

I- INTRODUCCIÓN

Investigaciones recientes han demostrado que las técnicas no letales, que incluyen el estudio de parámetros hemolinfáticos, tanto en bivalvos de agua dulce como marinos, pueden ser utilizadas para la medición de biomarcadores de toxicidad (Bulklard et al., 2009). Las respuestas inmunes han sido ampliamente estudiadas bajo condiciones de laboratorio para elucidar los efectos específicos de la exposición a microorganismos y sustancias químicas en bivalvos de interés económico (Hégaret et al., 2004; Canesi et al., 2007; Gagnaire et al., 2007; Perrigault y Allam, 2012). Otros estudios han evaluado los efectos de la exposición a efluentes industriales y agrícolas tanto en bivalvos trasplantados y nativos (Auffret et al., 2006; Falfushynska et al., 2010; Höher et al., 2012) como en exposiciones de laboratorio (Danellakis et al., 2011). Aunque los efectos de la exposición a efluentes cloacales sobre la respuesta inmune de bivalvos dulceacuícolas y marinos han sido estudiados durante los últimos años (Gagné et al., 2008; 2012; Farcy et al., 2011; Tsarpali y Dailianis, 2012; Toufexi et al., 2013), la información disponible es aún escasa. En particular, los efectos de la exposición crónica a contaminación por efluentes cloacales sobre el sistema inmune de bivalvos merecen un mayor estudio (Akaishi et al., 2007).

Los bivalvos de agua dulce son animales filtradores bentónicos, que viven en la interface agua-sedimento por largos periodos de tiempo (a veces décadas), por lo que están expuestos tanto a contaminantes disueltos como a contaminantes particulados. El biomonitoreo pasivo permite evaluar los efectos acumulativos de la exposición a contaminantes, colectando individuos que habitan las áreas de interés (revisado por Contardo-Jara et al., 2009). Bajo las condiciones pro-oxidantes, generadas tanto por el incremento en la respuesta inmune como por el efecto de los tóxicos, la capacidad antioxidante total puede ser utilizada para estimar las defensas totales contra los oxiradicales (Regoli, 2000). Cuando estas defensas son superadas, se producen daños tales como la desestabilización de la membrana lisosomal, la peroxidación lipídica y el daño a ADN (Mamaca et al., 2005; Ahmad et al., 2011). Además, el consumo energético que se produce durante este tipo de situaciones estresantes puede comprometer, entre otras cosas, la respuesta inmune (Wang et al., 2012). En este contexto, la capacidad de los bivalvos de sobrellevar largos periodos de estrés podría

eventualmente determinar la supervivencia de la población (Lundström et al., 2010; Penha-Lopes Gil et al., 2011).

Además de su contribución con sustancias químicas y bacterias, las descargas cloacales liberan grandes cantidades de material particulado, que puede afectar la tasa y el comportamiento filtrador de los bivalvos (Barillé et al., 1997; Ellis et al., 2002; Sousek et al., 2007). Bajo estas condiciones, se ha observado la capacidad de los bivalvos para seleccionar partículas alimenticias, siendo capaces de ingerir bacterias (Lara et al., 2002b), fitoplancton y materia orgánica particulada (Barillé et al., 1997; Zhou et al., 2006). Este proceso causa una reducción de las cargas de nutrientes en la columna de agua, incrementando su flujo hacia el bentos (Jones et al., 2001; Zhou et al., 2006). Como consecuencia de la exposición a condiciones estresantes, la calidad y cantidad del alimento ingerido puede ser modulado afectando el crecimiento y el balance energético en bivalvos (Albentosa et al., 2012; revisado por Sokolova et al., 2012). El comportamiento filtrador de estos animales es definido aquí como “desempeño ecológico”, ya que la eficiencia de filtración no sólo afecta el estado del individuo, si no también su influencia sobre los procesos de ciclado de nutrientes. Las alteraciones producidas sobre la tasa de filtración en bivalvos expuestos crónicamente a contaminación por efluentes cloacales o su habilidad para remediar sedimentos contaminados, no han sido estudiadas con anterioridad.

Como se mencionó en el capítulo anterior, en el área costera de San Martín de los Andes, donde desemboca el río Pocahullo, se encuentra una población nativa de *D. chilensis* en la que se han observado indicios de estrés oxidativo en glándula digestiva (Sabatini et al., 2011b; Rocchetta et al., 2014b). Considerando que este es un bivalvo longevo, de crecimiento lento, se esperaría que esta exposición crónica a contaminación por efluentes cloacales tuviera además efectos nocivos sobre su sistema inmune y capacidad de filtración.

Por otro lado, individuos de *D. chilensis* extraídos de zonas no contaminadas son capaces de remover algas, sólidos suspendidos y nutrientes en efluentes de piscicultura (Soto y Mena, 1999; Parada et al., 2008), bacterias coliformes fecales en pozos contaminados (Lara et al., 2002b) y *E. coli* en la columna de agua durante exposiciones de laboratorio (Sabatini et al., 2011b). Esta capacidad de filtración, junto a que por ser una especie nativa no causaría problemas asociados a especies invasoras, lo hacen un excelente candidato para el control de

los efectos adversos de los efluentes cloacales. En este capítulo se integran las variables fisiológicas estudiadas y se discute la condición de tolerancia crónicamente inducida por la exposición a contaminación por efluentes cloacales en *D. chilensis* y la aplicabilidad de esta almeja con propósitos de bioremediación.

HIPÓTESIS

- La exposición prolongada en ambientes acuáticos contaminados por efluentes cloacales afecta el estado de salud y el desempeño ecológico en bivalvos.
- La actividad de alimentación en bivalvos filtradores modifica las propiedades fisicoquímicas y bacteriológicas del agua y de los sedimentos contaminados con efluentes cloacales.

OBJETIVOS

- Describir la respuesta inmune, el balance oxidativo, la condición metabólica y la capacidad filtradora de *Diplodon chilensis* extraído de una población natural, expuesta crónicamente a contaminación por efluentes cloacales.
- Evaluar la capacidad de bioremediación de *Diplodon chilensis* sobre agua y sedimentos contaminados por efluentes cloacales, mediante su actividad filtradora.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

II- A) Estudio a Campo

Los muestreos se realizaron durante enero y febrero de 2013. Se recolectaron ejemplares adultos de *Diplodon chilensis* (n = 30, por sitio) en el área de referencia (Yuco) del lago Lacar; y en el área en donde el río Pocahullo desemboca en dicho lago (SMA). En cada sitio, se midió la temperatura del agua (°C) y la turbidez (UAF) y se tomaron muestras de agua y sedimentos para evaluar el contenido de bacterias coliformes fecales (CF), clorofila *a* (Chl *a*), materia orgánica (MO), nitrógeno total (NT) y fósforo total (FT).

Las almejas fueron procesadas para la evaluación de parámetros inmunológicos celulares (hemocitos totales y viables, actividad fagocítica, EROs) y plasmáticos (actividades bacteriolítica y fenoloxidasas, proteínas totales). Además, en hemocitos se midió la capacidad antioxidante total junto con la estabilidad de la membrana lisosomal y TBARS. La genotoxicidad (MN) fue analizada en branquia, mientras que las reservas energéticas (glucógeno y lípidos totales) se midieron en glándula digestiva. El crecimiento somático y la masa de branquia y glándula digestiva se estimaron usando factores morfométricos (FC, FB, FGD).

II- B) Estudio en Laboratorio

II- B) 1) Bioremediación de Agua Contaminada

Se colocaron almejas provenientes de Yuco y SMA (n = 7, de cada sitio) en peceras con 5 L de agua corriente de clorada y con aireación y se dejaron en condiciones de ayuno durante 36 h, sin cambios de agua. Luego, las almejas se colocaron individualmente en recipientes plásticos, separados del fondo por una malla plástica rígida. Los recipientes se llenaron con 700 mL de agua recolectada en el río Pocahullo, 20 m aguas abajo de la descarga de efluentes de la planta de tratamiento terciario (RP). Separadamente, se establecieron controles (n = 3) en recipientes sin almejas (Figura 1a). La temperatura de trabajo fue de 14,5

$\pm 0,5$ °C, mientras que el sistema de aireación permitió la mezcla constante del medio. Al comienzo de la exposición (T_0) y luego de 6 h (T_6), se midieron las concentraciones de bacterias entéricas, fitoplancton (fito), MO, NT y FT. A partir de los datos obtenidos se calcularon las tasas de alimentación.

II- B) 2) Bioremediación de Sedimentos Contaminados

Almejas provenientes de Yuco y SMA ($n = 7$, de cada sitio) se aclimataron en peceras con 5 L de agua corriente dechlorada y con aireación, en condiciones de ayuno durante 36 h y sin cambios de agua. Luego, las almejas fueron colocadas individualmente en recipientes de vidrio con 340 cm^3 de sedimento del sitio RP y el mismo volumen de agua corriente dechlorada. Las almejas fueron enterradas manualmente de forma oblicua para asegurar el máximo acceso a la fracción de sedimento (Lara et al., 2002a). La temperatura de trabajo fue de $14 \pm 0,5$ °C y se establecieron controles ($n = 3$) en recipientes sin almejas (Figura 1b). Al comienzo de la exposición (T_0) y luego de 24 h (T_{24}), se tomaron alícuotas al azar de la capa superficial de sedimento (0,5 cm) y se midieron las concentraciones de bacterias entéricas, Chl α , MO, NT y FT. A partir de los datos obtenidos se calcularon las tasas de alimentación.

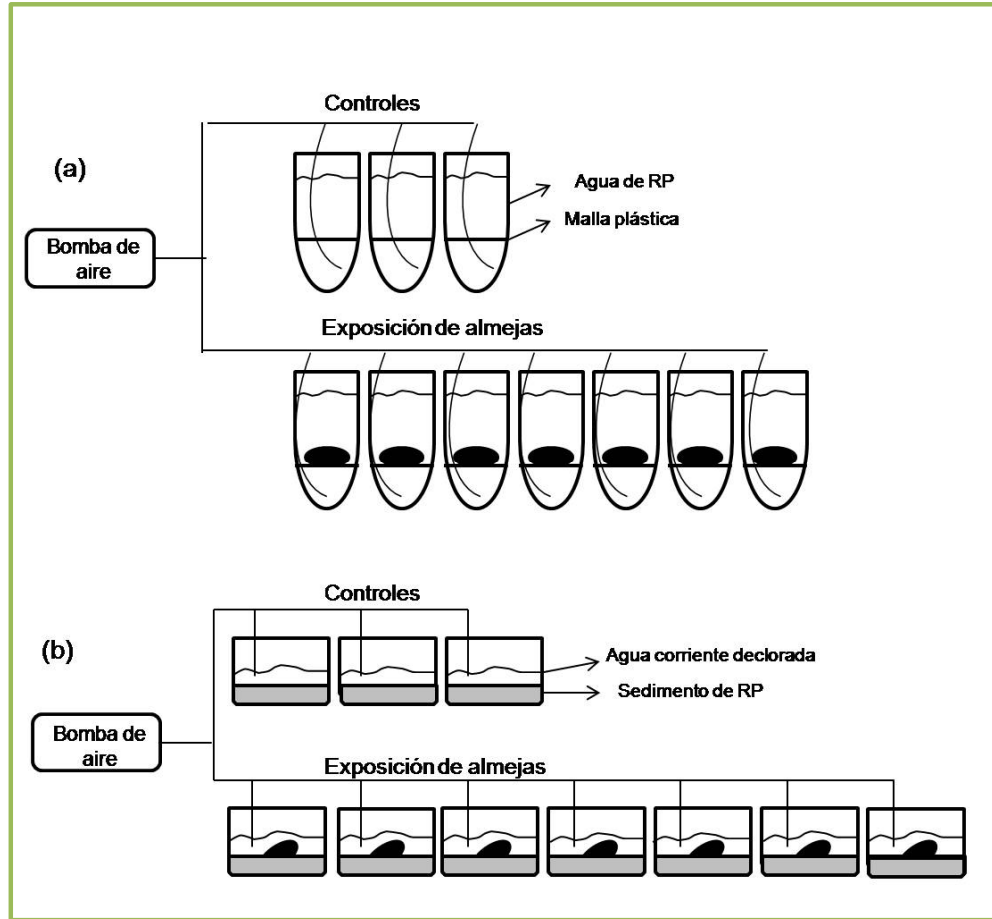


Fig. 1. Diagrama del sistema experimental estático para la evaluación de las tasas de alimentación y efectos bioremediadores de *Diplodon chilensis* en agua (a) y sedimentos (b) recolectados en el río Pocahullo, 20 m aguas abajo de la descarga de efluentes de la planta de tratamiento terciario (RP).

II- B) 3) Tasas de Alimentación

Luego de los experimentos de bioremediación, los tejidos blandos de las almejas fueron secados (60 °C) y pesados (g), para el cálculo de las tasas de remoción (TR) y filtración (TF). Estas tasas se midieron para las variaciones en el contenido de bacterias y fitoplancton como se describe a continuación (basado en Soto y Mena, 1999) y se refirieron al peso seco del tejido blando.

$$TR (L \times h^{-1} \times gts^{-1}) = V / t \times [(\ln C_i - \ln C_f) - (\ln C_i' - \ln C_f')] / gts$$

$$TF (q \times h^{-1} \times gts^{-1}) = V/t \times [(Ci - Cf) - (Ci' - Cf')] / gts$$

Donde: Ci = concentración inicial; Cf = concentración final; V = volumen en recipiente (L); t = tiempo experimental (h); Ci' y Cf' = concentración inicial y final en el recipiente control; q = unidades de cantidad; gts = gramos de tejido blando seco.

Las TR y TF en sedimento se calcularon reemplazando V, en la fórmula, por la masa de sedimento seco considerado a disposición para la bioremediación bentónica (la superficie total de una capa 0,5 cm de profundidad). La TR fue expresada en $gss \times h^{-1} \times gts^{-1}$ y la FR en $q \times h^{-1} \times gts^{-1}$.

II- C) Análisis Estadístico

Los resultados se presentan como $media \pm error\ estándar$. La distribución normal y la homogeneidad de varianzas se evaluaron con el Test de Kolmogorov-Smirnov y el Test de Levene, respectivamente. El test T de Student, se utilizó para identificar las diferencias entre grupos en el estudio a campo y para comparar las TR y TF. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron, los datos se analizaron con el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los efectos de las almejas sobre la calidad del agua y los sedimentos se evaluaron con ANOVA de dos factores de medidas repetidas y el test *post hoc* de Newman-Keuls. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron, los datos se transformaron previamente con $Log_{10} x$, $Ln x$, $Log_{10}(x + 1)$, o $Ln(x + 1)$, según el caso. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0,05$.

III- RESULTADOS

III- A) Estudio a Campo

III- A) 1) Calidad del Agua y los Sedimentos

El agua y los sedimentos en SMA presentan una mayor carga de bacterias coliformes fecales, materia orgánica y nutrientes que los de Yuco; mostrando también concentraciones elevadas de Chl *a* en sedimentos y turbidez en agua. La tabla 1 muestra las variables bacteriológicas y fisicoquímicas medidas en los sitios de extracción de almejas.

Tabla 1. Variables bacteriológicas y fisicoquímicas medidas en agua y sedimentos de Yuco (sitio no contaminado) y SMA (sitio contaminado con efluentes cloacales) en el lago Lacar. Los valores para bacterias coliformes fecales (CF), clorofila *a* (Chl *a*), material orgánica (MO), nitrógeno total (NT), fósforo total (FT), turbidez y temperatura están expresados como media \pm error estándar.

	AGUA			SEDIMENTOS		
	Yuco	SMA	<i>P</i>	Yuco	SMA	<i>P</i>
CF (NMP / 100 mL or gss)	10 \pm 10	950 \pm 150	<0,05	130 \pm 3,6	2509 \pm 150	<0,01
MO (mg / L or gss)	7,56 \pm 0,03	9,29 \pm 0,56	<0,05	22,37 \pm 0,17	25,93 \pm 1,41	<0,05
Chl <i>a</i> (μ g / L or gss)	1,7 \pm 0,0002	3,0 \pm 0,0006	<0,05	3,88 \pm 0,51	9,09 \pm 0,77	<0,01
NT (μ g / L or gss)	285 \pm 0,02	445 \pm 0,01	<0,05	1400 \pm 12	3131 \pm 606	<0,05
FT (μ g / L or gss)	10,86 \pm 1,11	67,05 \pm 0,37	<0,01	1461 \pm 38	1774 \pm 15	<0,01
Turbidez (FAU)	1,33 \pm 0,33	7,67 \pm 0,33	<0,01	-	-	-
T (°C)	19,67 \pm 0,33	20,5 \pm 0,50	0,30	-	-	-

III- A) 2) Estado de Salud

Las almejas de SMA muestran un número mayor de hemocitos totales ($P < 0,05$) y una mayor actividad fagocítica ($P < 0,01$), aunque una menor producción de EROs ($P < 0,01$) que las almejas de Yuco; mientras que la capacidad antioxidante total fue similar en almejas de ambos sitios (Figura 2a,b). Las actividades bacteriolítica (AB) y fenoloxidasa (FO) en plasma son menores en almejas de SMA que en aquellas de Yuco ($P < 0,05$, para ambas actividades) (Figura 2c). No se observan diferencias significativas en la viabilidad de hemocitos ($0,90 \pm 0,02$ vs. $0,94 \pm 0,008$), en la estabilidad de la membrana lisosomal ($14,37 \pm 1,55$ vs. $14,66 \pm 0,50$ min), en la peroxidación lipídica ($293,7 \pm 84,6$ vs. $270,7 \pm 97,7$ $\mu\text{mol} / 10^6$ células) o en la concentración de proteínas en plasma ($0,302 \pm 0,01$ vs. $0,296 \pm 0,01$ mg / mL) entre grupos (valores para SMA y Yuco, respectivamente).

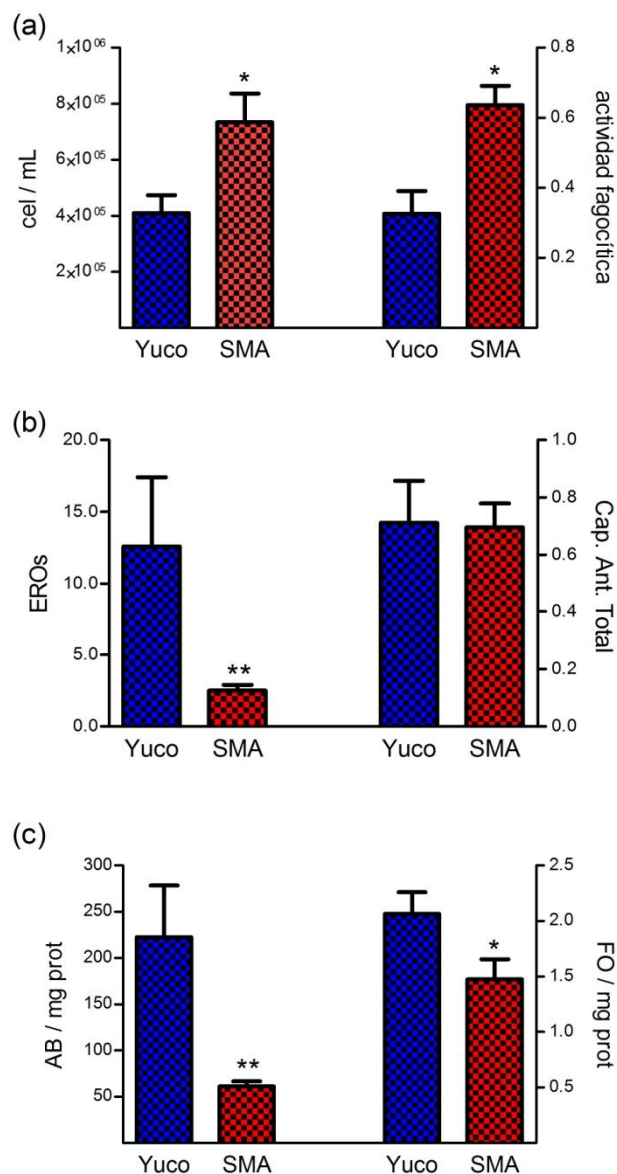


Fig. 2. Variables hematológicas medidas en *Diplodon chilensis* extraído de Yuco (sitio no contaminado) y SMA (sitio contaminado con efluentes cloacales) en el lago Lacar. (a) Hemocitos totales y actividad fagocítica; (b) producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y capacidad antioxidante total (Cap. Antiox. Total) en hemocitos; (c) actividades bacteriolítica (AB) y fenoloxidasa (FO) en plasma. Los valores están expresados como media \pm error estándar. * indica $P < 0,05$ y ** indica $P < 0,01$ entre almejas de Yuco y SMA.

El factor de condición (FC) es significativamente más alto en almejas de SMA comparadas con aquellas de Yuco ($P < 0,05$), mientras que no se observan cambios en el FGD (Figura 3). Las reservas energéticas medidas en glándula digestiva, como la cantidad de lípidos totales ($8,85 \pm 0,77$ vs. $9,77 \pm 0,61$ mg / g) y el glucógeno ($94,12 \pm 5,21$ vs. $98,70 \pm 11,21$ meq Glc / g) son similares en ambos grupos (valores para SMA y Yuco, respectivamente). Las almejas de SMA muestran valores de FB ($P < 0,05$) y frecuencia de micronúcleos ($P < 0,01$) significativamente mayores que las almejas de Yuco (Figura 4).

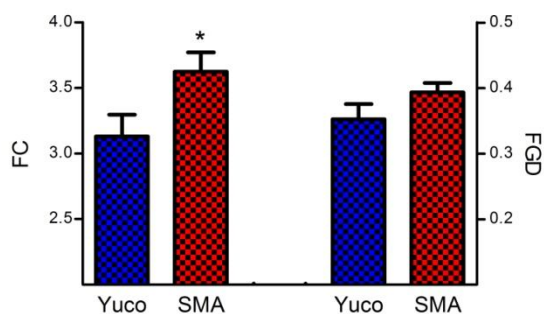


Fig. 3. Factor de condición (FC) y factor de masa de glándula digestiva (FGD) en *Diplodon chilensis* extraídos de Yuco (sitio no contaminado) y SMA (sitio contaminado con efluentes cloacales) en el lago Lacar. Los valores están expresados como la media \pm el error estándar. * indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre almejas de Yuco y SMA.

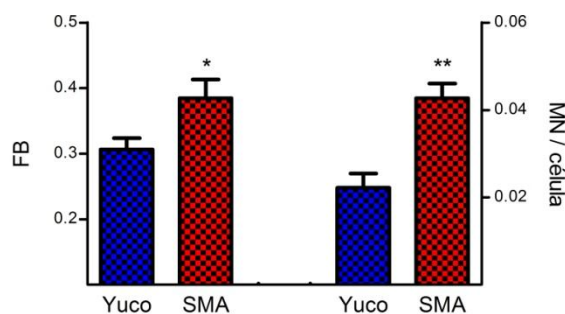


Fig. 4. Factor de masa branquial (FB) y frecuencia de micronúcleos (MN / célula) en branquia de *Diplodon chilensis* extraídos de Yuco (sitio no contaminado) y SMA (sitio contaminado con efluentes cloacales) en el lago Lacar. Los valores están expresados como media \pm error estándar. * indica $P < 0,05$ y ** indica $P < 0,01$ entre almejas de Yuco y SMA.

III- B) Estudio de Laboratorio

III- B) 1) Bioremediación de Agua y Sedimentos

Luego de seis horas de filtración (T_6), las concentraciones de bacterias entéricas ($P < 0,01$) y la turbidez ($P < 0,05$) en agua, son significativamente menores en los recipientes con almejas de ambos sitios (Yuco, SMA) con respecto a los controles. Las concentraciones de fitoplancton muestran una tendencia a disminuir en ambos grupos, pero este efecto es significativo solo para almejas de Yuco ($P < 0,001$). Las concentraciones de materia orgánica

en agua disminuyen significativamente tanto en los recipientes control como en los que contienen almejas, a T_6 ($P < 0,0001$, para ambos grupos). La carga de nutrientes en agua es disminuida en ambos grupos de almejas. Las concentraciones de FT son significativamente menores en recipientes con almejas de Yuco que en los controles ($P < 0,05$), mientras que el contenido de NT es reducido significativamente en recipientes con almejas de SMA ($P < 0,05$) (Tabla 2).

Ambos grupos de almejas reducen significativamente las concentraciones de bacterias entéricas en sedimentos, a T_{24} ($P < 0,05$). No se observan diferencias significativas en el contenido de MO en sedimentos, en ninguno de los recipientes. Los cambios en las concentraciones registrados para Chl *a*, NT y FT no muestran un patrón claro para ser analizado como efecto de la filtración por almejas (Tabla 2).

III- B) 2) Tasas de Alimentación

Teniendo en cuenta que, en los experimentos de bioremediación (Tabla 2), las concentraciones de bacterias entéricas (en agua y en sedimentos) y de fitoplancton (en agua) son reducidos significativamente por la actividad de las almejas, se calcularon las tasas de remoción y de filtración (TR and TF) para estos parámetros. Las almejas de Yuco y SMA reducen la carga de bacterias entéricas del agua de RP con tasas de remoción similares ($0,136 \pm 0,03$ y $0,155 \pm 0,01$ $L \times h^{-1} \times gts^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, la TF es significativamente mayor en almejas de SMA ($2,64 \times 10^8 \pm 5,19$ vs. $7,61 \times 10^8 \pm 7,33$ $UFC \times h^{-1} \times gts^{-1}$, para Yuco y SMA, respectivamente) ($P < 0,0001$) (Figura 5a). No se observan diferencias significativas entre almejas de ambos sitios para las TR y las TF de fitoplancton en agua y bacterias entéricas en sedimento (Figura 5b,c).

Tabla 2. Resultados bacteriológicos y fisicoquímicos de los experimentos de bioremediación. *Diplodon chilensis* extraídos de Yuco (sitio no contaminado) y SMA (sitio contaminado con efluentes cloacales) en el lago Lacar, fueron expuestos a agua (A) o sedimentos (S) recolectados en un sitio con mayor carga contaminante, RP. Los datos de control corresponden a recipientes sin almejas. Los valores para bacterias entéricas (BE), materia orgánica (MO), fitoplancton (fito), clorofila *a* (Chl *a*), nitrógeno total (NT) y fósforo total (FT) están expresados como media \pm error estándar / mL de agua o g de sedimento seco (gss). Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre cada grupo de almejas y su control se indican con (*) y diferencias entre las condiciones iniciales y finales en cada grupo se indican con (+).

	(A)	CONTROL	YUCO	CONTROL	SMA	(S)	CONTROL	YUCO	CONTROL	SMA
BE (UFC / mL or gss)	T ₀	2763 \pm 454	2929 \pm 583	4070 \pm 14	4070 \pm 301	T ₀	22164 \pm 1461	15090 \pm 2347	7312 \pm 3325	12694 \pm 5165
	T ₆	4000 \pm 681	1003 \pm 325* ⁺	10233 \pm 3670	2253 \pm 320* ⁺	T ₂₄	29446 \pm 5395	10529 \pm 3047* ⁺	13447 \pm 6434	8371 \pm 3532* ⁺
MO (mg / L or gss)	T ₀	37,88 \pm 0,0005	37,88 \pm 0,001	33,67 \pm 0,001	34,36 \pm 0,001	T ₀	103,9 \pm 2,05	118 \pm 11,22	123,6 \pm 7,83	122,9 \pm 1,56
	T ₆	27,48 \pm 0,0005 ⁺	23,64 \pm 0,001 ⁺	21,97 \pm 0,002 ⁺	21,50 \pm 0,001 ⁺	T ₂₄	138,3 \pm 21,21	122,5 \pm 4,39	132,4 \pm 12,70	183 \pm 35,49
Fito (células /mL)	T ₀	10915 \pm 292	8286 \pm 393	8125 \pm 851	10575 \pm 867	T ₀	-	-	-	-
	T ₆	10375 \pm 1491	5071 \pm 484* ⁺	9208 \pm 458	8275 \pm 396	T ₂₄	-	-	-	-
Chl <i>a</i> (μ g / mL or gss)	T ₀	-	-	-	-	T ₀	28,13 \pm 10,52	22,70 \pm 4,16	27,71 \pm 0,63	25,06 \pm 0,79
	T ₆	-	-	-	-	T ₂₄	23,78 \pm 6,96	36,68 \pm 6,59* ⁺	25,06 \pm 0,79	33,38 \pm 2,40
NT (μ g / L or gss)	T ₀	477 \pm 0,02	483 \pm 0,03	150 \pm 0,01	167 \pm 0,01	T ₀	2300 \pm 731	3287 \pm 236	3711 \pm 1095	4097 \pm 509
	T ₆	381 \pm 0,05	270 \pm 0,07	213 \pm 0,02* ⁺	143 \pm 0,01	T ₂₄	3120 \pm 291	6545 \pm 299* ⁺	4149 \pm 593	3442 \pm 884
FT (μ g / L or gss)	T ₀	309,5 \pm 5,52	313,4 \pm 13,22	245,6 \pm 5,02	246,3 \pm 33,52	T ₀	2448 \pm 122	2095 \pm 114	2003 \pm 58	2145 \pm 320
	T ₆	454,2 \pm 17	190,1 \pm 13* ⁺	222,2 \pm 3,28	173,1 \pm 9,13	T ₂₄	1267 \pm 109* ⁺	627 \pm 190* ⁺	1745 \pm 451	1415 \pm 374
Turbidez (UAF)	T ₀	9 \pm 4	11,57 \pm 0,84	3 \pm 1	4,43 \pm 0,48	T ₀	-	-	-	-
	T ₆	8,5 \pm 6,50	1,43 \pm 0,30* ⁺	4,67 \pm 0,67	1,43 \pm 0,20* ⁺	T ₂₄	-	-	-	-

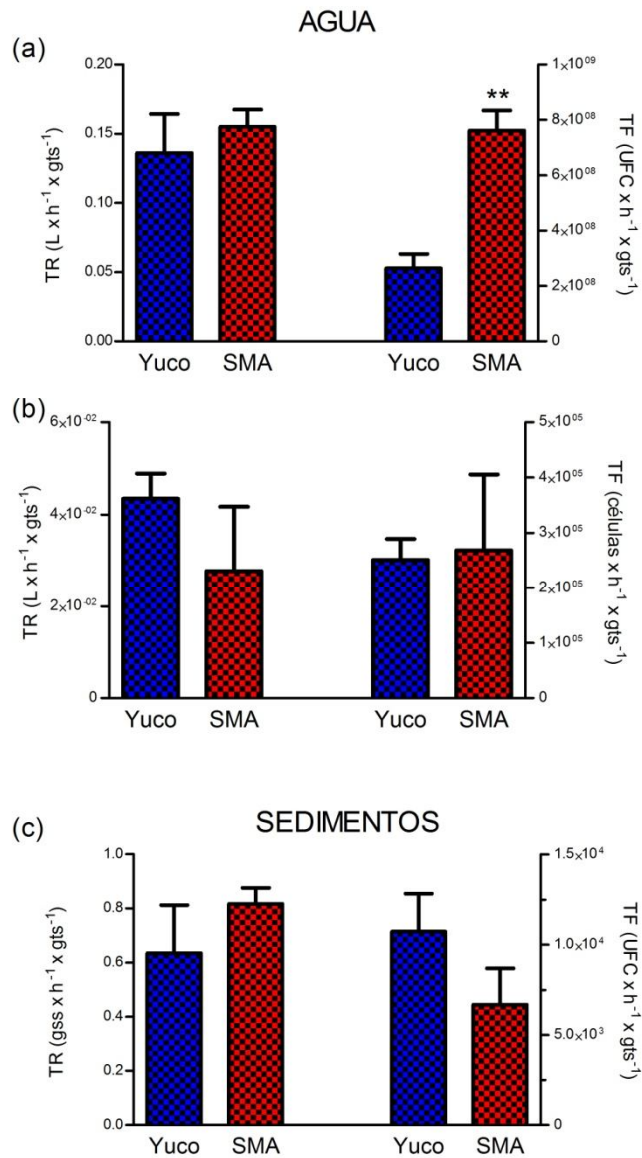


Fig. 5. Tasas de remoción (TR) y filtración (TF) de *Diplodon chilensis* extraídos de Yuco (sitio no contaminado) y SMA (sitio contaminado con efluentes cloacales) en el lago Lacar y expuestos a agua y sedimentos colectados en un sitio con mayor carga contaminante, RP. TR y TF para bacterias entéricas en agua (a) y sedimentos (c). (b) TR y TF para fitoplancton en agua. Los valores están expresados como media \pm error estándar. ** indica diferencias significativas ($P < 0,001$) en la TF entre grupos.

IV- DISCUSIÓN

En este estudio, se integra información del estado fisiológico (respuesta inmune, balance oxidativo, reservas energéticas, desempeño alimenticio) y potencial bioremediador de almejas expuestas crónicamente a contaminación por efluentes cloacales, la cual fue obtenida a partir de experimentos de campo y de laboratorio. El sitio denominado aquí como SMA, en el lago Lacar, ha sido afectado por grados variables de este tipo de contaminación por más de 10 años (Temporetti et al., 2009). Las almejas extraídas de este sitio corresponden a un intervalo etario que va desde los 10 a los 30 años, por lo que se podría deducir que este grupo estuvo expuesto a este ambiente acuático contaminado por lo menos durante una década, lo que lo convierte en un modelo valioso para estudios de toxicidad crónica. Además, considerando que *Diplodon chilensis* presenta una longevidad de 60 años para SMA y 70 años para Yuco (Rocchetta et al., 2014b), las almejas utilizadas en este trabajo son relativamente jóvenes, por lo que se esperaría una respuesta inmune y antioxidante más activa que la de individuos mayores, como se ha visto en el bivalvo antártico *Laternula elliptica* (Husmann et al., 2011; 2014).

Diversos estudios se han enfocado en las variables fisiológicas e inmunológicas en bivalvos expuestos por periodos variables a contaminación por efluentes urbanos (Akaishi et al., 2007; Gagné et al., 2008; Bouchard et al., 2009; Farcy et al., 2011; 2012; Gillis et al., 2012). Estudios realizados en poblaciones naturales han reportado que la exposición crónica a múltiples contaminantes impacta negativamente sobre la salud y la longevidad de los bivalvos (Gillis et al., 2012; Rocchetta et al., 2014b), mientras que las respuestas inmunes y antioxidantes son persistentes y características de la historia de contaminación del sitio (Matozzo et al., 2013). La respuesta inmune, el balance oxidativo y el desempeño alimenticio de *D. chilensis* extraídos de la población de SMA sugieren una modulación positiva de los mecanismos de defensa, como consecuencia de la exposición crónica a contaminación por efluentes cloacales.

IV- A) Respuesta Inmune, Balance Oxidativo y Citotoxicidad en Hemocitos

Los hemocitos pueden reaccionar rápidamente para mantener la homeostasis e integridad frente a cambios ambientales a los que se exponen los bivalvos (Donaghy et al., 2009). Akaishi et al. (2007) han reportado que la actividad fagocítica, en hemocitos del mejillón azul *Mytilus edulis*, puede elevarse luego de la exposición a largo plazo a una baja concentración de efluentes cloacales y disminuir frente a una exposición a corto plazo a efluentes más concentrados. Además, estos mismos autores muestran que, luego de 90 días, la exposición a efluentes tratados puede incrementar el número total de hemocitos, mientras que la exposición a efluentes no tratados reduce esta variable. En este trabajo, la respuesta fagocítica y el número de hemocitos están elevados casi al doble en almejas de SMA comparadas con aquellas de Yuco. En acuerdo con estos resultados, la eficiencia celular y la fagocitosis se incrementan significativamente en *E. complanata* trasplantado aguas abajo de la descarga de efluentes de una planta de tratamiento terciario en Montreal Island, Canadá (Farcy et al., 2011); mientras que Gillis et al. (2012) observan un incremento en la actividad fagocítica de almejas de agua dulce (*Lasmigona costata*) recolectadas de una población natural aguas abajo de una descarga de efluentes municipales en el sureste de Ontario, Canadá. Estas respuestas inmunitarias podrían estar asociadas a contaminantes específicos o a mezclas de contaminantes, tales como bacterias, metales y compuestos estrogénicos, encontrados frecuentemente en efluentes cloacales (Parry et al., 2004; Canesi et al., 2007; Bouchard et al., 2009). Gagné et al. (2012) han sugerido que la alteración del metabolismo de la dopamina, causado por la exposición a efluentes municipales, estaría mediando la activación en hemocitos de *E. complanata*.

La actividad antibacteriana responde en principio a la exposición a bacterias, pero los compuestos estrogénicos y los metales pueden también estimular esta respuesta (Hong et al., 2006; Canesi et al., 2007; Farcy et al., 2011). Así mismo, la actividad fenoloxidasa en bivalvos puede responder a estímulos microbiológicos y fisicoquímicos (Aladaileh et al., 2007; Kuchel et al., 2012); sin embargo, según la bibliografía revisada en esta tesis, los posibles efectos de los efluentes cloacales sobre esta enzima no han sido estudiados previamente. *D. chilensis* extraído de SMA muestra una reducción en ambas actividades plasmáticas, bacteriolítica y fenoloxidasa, lo cual podría ser interpretado como una indicación de sistema inmune

deprimido, tal como fue reportado para *E. complanata* (Bouchard et al., 2009) y *Pinctada maxima* (Kuchel et al., 2012). Sin embargo, se ha mostrado que la inmunosupresión ligada a la exposición a contaminantes domiciliarios en bivalvos, incluye: 1) disminución de la viabilidad celular (Akaishi et al., 2007); 2) disminución de la estabilidad de la membrana lisosomal (Parolini et al., 2011; Toufexi et al., 2013; Tsarpali et al., 2013); 3) incremento de la peroxidación lipídica en hemocitos (Gagné et al., 2006; Toufexi et al., 2013); 4) incremento en el contenido plasmático de proteínas (Auffret et al., 2006). Estos efectos nocivos han sido atribuidos, entre otras cosas, a la exposición a bacterias, productos farmacéuticos y metales (ej. cobre), los cuales pueden causar estrés oxidativo, daño severo a tejidos y trastornos metabólicos. En este trabajo, ninguno de estos efectos fue evidente en hemocitos de almejas de SMA. Estos resultados, junto con el incremento de la respuesta celular, sugieren que la reducción de las actividades bacteriolítica y fenoloxidasas en plasma no estarían relacionadas con procesos de inmunosupresión.

En particular, los valores obtenidos en el ensayo de retención de rojo neutro, como un indicador de la estabilidad de la membrana lisosomal en hemocitos de *D. chilensis* de sitio control (Yuco) y sitio contaminado (SMA), son similares a los observados por Regoli et al. (2006) en el caracol *Helix aspersa*. Sin embargo, estos valores son considerablemente más bajos que aquellos reportados para otros bivalvos (Mamaca et al., 2005; Parolini et al., 2011). Una posible explicación implicaría la sensibilidad de los hemocitos de *D. chilensis* al dimetilsulfóxido, utilizado para diluir el rojo neutro, o al colorante mismo. El solvente puede alterar la regulación de la integridad de la membrana, como se ha visto en *S. cerevisiae* (Zang et al., 2013), mientras que el rojo neutro presenta cierta toxicidad para la célula (Viarengo et al., 2007). De todas formas, la reducción en el tiempo de lectura no constituye un impedimento metodológico, siendo los resultados detectables y analizables.

La producción de EROs en hemocitos se ha ligado frecuentemente al incremento en la actividad fagocítica, en función de la eliminación de microorganismos (Gust et al., 2013). Sin embargo, según Donaghy et al. (2009), esta relación no ha sido siempre respaldada por los trabajos publicados en bivalvos y a pesar de la disminución en la producción de EROs, la eliminación de microorganismos no se vería afectada. Además, el incremento en la producción de EROs frente a la exposición a contaminación por efluentes cloacales podría indicar un

exceso de radicales oxidantes (Auffret et al., 2006), pudiendo causar daño celular (Toufexi et al., 2013). En este trabajo, a pesar del incremento en la actividad fagocítica en almejas de SMA, la producción de EROs es menor que en las almejas de Yuco, lo que coincide con la ausencia de daño oxidativo en hemocitos de este sitio contaminado. Donaghy et al. (2009) resaltaron también que usualmente la detección de EROs en bivalvos es difícil de lograr y depende de la metodología elegida. En este caso, la producción de EROs en hemocitos de *D. chilensis* ha sido detectada eficientemente utilizando el reactivo fluorescente H₂DCF-DA.

La activación compensatoria de los mecanismos antioxidantes permitiría contrarrestar el incremento en la producción de EROs durante condiciones estresantes; así mismo, la reducción de estas defensas implicaría una mayor vulnerabilidad del organismo frente al estrés oxidativo. El mantenimiento de la capacidad antioxidante total a niveles de control en hemocitos de almejas de SMA, sugiere la existencia de un alto potencial antioxidante que estaría disponible para responder ante un incremento en la carga bacteriana o de otros contaminantes. La ausencia de estrés oxidativo en hemocitos de almejas de SMA parecería estar relacionada con este alto potencial antioxidante. De acuerdo con estos resultados, Sabatini et al. (2011b) y Rocchetta et al. (2014b) han observado un incremento de la respuesta antioxidante, enzimática y no enzimática, en la glándula digestiva de almejas extraídas de esta población; aunque el daño oxidativo no fue completamente compensado. En hemocitos del caracol *Lymnaea stagnalis*, la exposición a efluentes domiciliarios redujo los niveles intracelulares de tiol, sugiriendo la pérdida de antioxidantes tales como el glutatión reducido (Gust et al., 2013). De la literatura revisada para esta tesis, surge que los niveles de capacidad antioxidante total en hemocitos han sido evaluados por primera vez en este trabajo.

Los resultados obtenidos sugieren que el incremento del número de hemocitos y de la actividad fagocítica es una respuesta a largo plazo, que habilita al sistema inmune a responder eficientemente ante concentraciones bacterianas medias (ej. 950 NMP / 100 mL CF), como las medidas en este estudio, manteniendo una baja producción de EROs y niveles de defensas altos (Cap. Antiox. Total), evitando el daño oxidativo. Matozzo et al. (2013) sugieren que las diferencias en las respuestas fisiológicas de almejas de sitios contaminados y no contaminados, frente a la exposición a cobre en laboratorio, podrían deberse a una adaptación genética relacionada con sus diferentes historias ecológicas. Se podría especular que *D.*

chilensis está adaptado genéticamente a la exposición a productos tóxicos de bacterias, las cuales forman parte de su dieta natural. Esta adaptación les permitiría, a almejas de SMA, el mantenimiento de una capacidad antioxidante en hemocitos que contrarrestaría el incremento en la producción de EROs causado por la presencia de altas concentraciones bacterianas, tales como las detectadas en un trabajo previo realizado en el mismo sitio (ej. 24000 NMP / 100 mL CF, Sabatini et al., 2011b). Además, Rocchetta et al. (2014a) han sugerido que el tipo de ácidos grasos incorporados en la dieta por almejas de SMA podría favorecer la resistencia al estrés oxidativo y la inmunidad frente a la exposición crónica a contaminación de origen cloacal.

IV- B) Reservas Energéticas

Las reservas energéticas en bivalvos (lípidos, carbohidratos) pueden ser consumidas en condiciones estresantes para cubrir los procesos de activación de las defensas detoxificantes y antioxidantes (Smolders et al., 2004; Mouneyrac et al., 2008), lo cual causa una disminución en la masa de la glándula digestiva y en el crecimiento somático. Sin embargo, el contenido de lípidos y glucógeno y la masa de la glándula digestiva no se vieron alterados en almejas de SMA. Además, el factor de condición (FC) fue mayor en estas almejas que en aquellas extraídas de Yuco. Como se observó anteriormente, el incremento en la disponibilidad de alimento, que se produce en ambientes acuáticos contaminados por efluentes cloacales, favorecería el crecimiento en estas almejas, aunque su longevidad se ve reducida (Sara et al., 2012; Rocchetta et al., 2014b). Las almejas filtradoras de agua dulce están genéticamente adaptadas a la alimentación con bacterias, las cuales son naturalmente abundantes en el detrito orgánico. Rocchetta et al. (2014a) detectaron una abundante cantidad de ácidos grasos ramificados (biomarcadores de bacterias), presentes en lípidos totales y neutros de *D. chilensis* recolectado de ambas poblaciones, siendo los valores para almejas de SMA significativamente mayores en comparación con los de Yuco. Esto sugiere que, además de alimentarse con bacterias naturales del sistema, las almejas de SMA pueden alimentarse también de bacterias entéricas (con lipopolisacáridos diferentes) y de complejos tóxico-materia orgánica, provenientes de la contaminación por efluentes cloacales, los cuales son potencialmente tóxicos debido a sus propiedades pro-oxidantes (Sabatini et al., 2011b; Marques et al., 2012).

Los resultados del presente trabajo sugieren que las almejas de SMA pueden compensar este estrés ambiental sin gasto de las reservas energéticas, obteniendo energía directamente de los alimentos, que son más abundantes en este sitio que en Yuco. De esta manera, se favorecería una mayor tasa de crecimiento en este grupo, como fue reportado por Rocchetta et al. (2014b).

IV- C) Frecuencia de Micronúcleos y Factor de Masa Branquial

La frecuencia de MN puede ser incrementada por la exposición a contaminantes orgánicos e inorgánicos (Çavas et al., 2003). En este estudio, el valor de MN / célula en branquia de almejas de SMA, es mayor que en branquia de almejas de Yuco. Tsarpali et al. (2012) han reportado que la frecuencia de MN en branquia de *M. galloprovincialis* se incrementa cuando éste es expuesto por 4 días a un lixiviado de desechos municipales sólidos, sugiriendo que tal efecto genotóxico podría estar relacionado con condiciones pro-oxidantes. En este sentido, un incremento de la peroxidación lipídica en branquia de *D. chilensis* fue observado luego de 7 meses de exposición en un ambiente contaminado por efluentes cloacales (Bianchi et al., datos no publicados). Considerando que actualmente no se realizan actividades industriales en el área del lago Lacar, las concentraciones de compuestos genotóxicos de este origen (ej. iones metálicos, fenoles), no serían significativas. Por lo tanto, los efectos citotóxicos observados en almejas de SMA estarían más probablemente asociados a la exposición crónica a bacterias entéricas y otros agentes pro-oxidantes, tales como productos farmacéuticos, como lo sugieren Abou-Eisha et al. (2006) y Gagné et al. (2011). Además, el FB se incrementó en almejas de SMA comparadas con almejas de Yuco. Este incremento en la masa de las branquias podría estar indicando: a- una inflamación local, causada por la exposición a bacterias (Akaishi et al., 2007; Costa et al., 2013) y/o b- adaptaciones tisulares a la turbidez del agua (Duterte et al., 2007), por ejemplo, incremento en el área de filtración y la producción de mucus en almejas del sitio contaminado. Además, como proponen Sollid et al. (2003), no se puede descartar la posibilidad de una hiperplasia debida al daño a tejidos o en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno.

IV- D) Tasas de Alimentación y Potencial Bioremediador

Las tasas de alimentación son consideradas también como indicadores del estado fisiológico en bivalvos (Sokolova et al., 2012) y pueden ser afectadas negativamente por la exposición a tóxicos y material suspendido en agua (Ellis et al., 2002; Culbertson et al., 2008). Sin embargo, algunos bivalvos pueden desarrollar mecanismos digestivos y de protección, que les permiten alimentarse de elementos potencialmente tóxicos (McHenry et al., 1979; Fernández-Reiriz et al., 2008; Sabatini et al., 2011a,b). Los resultados de este trabajo muestran que las almejas de SMA y de Yuco son capaces de reducir significativamente la turbidez del agua y la carga de bacterias entéricas en agua y sedimentos, con la misma eficiencia. Las TR para bacterias entéricas medidas en agua contaminada con efluentes cloacales ($0,150 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) son menores pero se encuentran en el mismo orden que aquellas medidas en laboratorio para *D. chilensis* expuesto a *E. coli* ($0,510 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (Sabatini et al., 2011b). La mayor TR en el citado estudio podría deberse a la elevada concentración bacteriana utilizada al inicio del experimento (alrededor de 10^5 veces) y a la mayor temperatura de trabajo comparada con el presente estudio (20 vs. 14 °C). Teniendo en cuenta estas diferencias metodológicas, las TR obtenidas en ambos estudios serían comparables; sugiriendo que la capacidad filtradora de *D. chilensis* no es afectada ni por la exposición a largo plazo ni por la presencia de material particulado en suspensión en agua de PR. Además, las TR para fitoplancton son similares en almejas de SMA y Yuco, lo que indicaría la ausencia de efectos nocivos provocados por la contaminación sobre el desempeño alimenticio. Al contrario, el estrés físico causado por el material suspendido en el agua ha sido sugerido como el responsable de la reducción de la capacidad filtradora en otros bivalvos (Barillé et al., 1997; Ellis et al., 2002).

Durante el desarrollo del presente trabajo, no se encontraron antecedentes sobre el estudio de la capacidad bioremediadora de bivalvos filtradores sobre sedimentos contaminados por efluentes cloacales. Los resultados de este estudio muestran que *D. chilensis* disminuye significativamente la carga de bacterias entéricas en sedimentos. Esta capacidad, medida como TR y TF, no se ve afectada por la aclimatización a largo plazo en un sitio contaminado.

Considerando estos antecedentes y los resultados del presente trabajo, se sugiere que almejas adultas de *D. chilensis* podrían ser relocalizadas en áreas contaminadas con efluentes cloacales para la remediación de agua y sedimentos, permaneciendo eficientes por varios años.

Complementariamente, una vez saneados los ambientes hasta un nivel apto para el reclutamiento y la supervivencia de los juveniles (Rocchetta et al., 2014b), existiría la posibilidad de realizar estrategias de relocalización para la recuperación de poblaciones de *D. chilensis* afectadas por el impacto antrópico, como así lo sugieren estudios a largo plazo realizados en Chile (Parada y Peredo, 2005).

VI- CONCLUSIONES

- En *Diplodon chilensis* expuesto crónicamente a contaminación por efluentes domiciliarios, la modulación de mecanismos hematológicos de defensa (alto número de hemocitos, actividad fagocítica, reducción de producción de EROs) resulta en una mayor capacidad de respuesta a incrementos periódicos en la carga bacteriana, sin incremento del estrés oxidativo en hemocitos. Además, bajo estas condiciones, los adultos de *Diplodon chilensis* preservan su capacidad de alimentarse de bacterias, por varios años o incluso décadas.

- En *Diplodon chilensis*, el incremento en la frecuencia de micronúcleos y la masa branquial constituye una respuesta clara frente a la exposición a largo plazo a contaminación de origen cloacal.

- *Diplodon chilensis* reduce los niveles de bacterias entéricas tanto en agua como en sedimentos contaminados, ampliando el campo de posibilidades de aplicación de almejas de agua dulce en estrategias de bioremediación.

CAPÍTULO III:

**Estimulación de la respuesta
inmune, antioxidante y metabólica
en *Diplodon chilensis* alimentado a
largo plazo con *Euglena gracilis*:
Implicancias en estrategias de
bioremediación de efluentes
cloacales.**

I- INTRODUCCIÓN

Las células de *Euglena* constituyen una rica fuente del β -1,3-glucano, paramylon (Barsanti et al., 2001), proteínas (Murakami et al., 1988), ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes, como los polifenoles, flavonoides, taninos, β -carotenos, vitamina C y vitamina E (Takeyama et al., 1997; Kusmic et al., 1999; Matsumoto et al., 2009; Tolvía et al., 2013). Estas células son utilizadas comunmente en piscicultura para mejorar la calidad nutricional de la dieta (Hayashi et al., 1993; Vismara et al., 2004); mientras que los β -glucanos han sido probados para incrementar el crecimiento somático en crustáceos y peces (ej. Dalmo et al., 2008; Bai et al., 2010; Meena et al., 2013). El paramylon extraído de *Euglena gracilis* incrementa las respuestas inmunes contra la infección en peces (Skov et al., 2012), ejerce protección antioxidante en hígado dañado de ratas (Suquiyama et al., 2009) y potencia la resistencia a condiciones de estrés, durante el crecimiento y la manipulación, en camarones (Vismara et al., 2004). También se ha sugerido que las proteínas altamente nutritivas presentes en las células de *Euglena* potenciarían el efecto del paramylon; mientras que los compuestos antioxidantes ejercerían un efecto protector directo contra el estrés oxidativo (Barsanti et al., 2001). Basanta et al. (2009) encontraron que juveniles del pez *Labeo rohita* alimentados con *Euglena viridis* son más resistentes a la infección por *Aeromonas hydrophila*.

En particular para bivalvos, experimentos *in vitro* y estudios basados en la inyección de β - glucanos mostraron un incremento en la producción de óxido nítrico, en la actividad peroxidasa y antibacteriana y en la fagocitosis (Torreilles et al., 1996; Tafalla et al., 2003; Costa et al., 2008; 2009). Aunque individuos de la familia Euglenaceae han sido identificados en la dieta de ostras (Vince et al., 2008), los posibles efectos de la aplicación de células de Euglenaceae en la dieta de bivalvos no han sido estudiados anteriormente.

En el ambiente acuático, los bivalvos están expuestos a una amplia variedad de microorganismos dañinos, entre los cuales las bacterias patógenas han recibido mayor atención (Allam et al., 2000; Ciacci et al., 2009; Prado-Alvarez et al., 2012; Wang et al., 2012). Sin embargo, las bacterias no patógenas, liberadas en los cuerpos de agua a través de las descargas de efluentes cloacales, pueden amenazar la competencia inmune de los bivalvos llevando a un deterioro en su salud (Akaishi et al., 2007). *E. coli*, la bacteria coliforme fecal

más abundante, puede ser filtrada (Sabatini et al., 2011b), digerida (Lara et al., 2002b) y acumulada en tejidos (Almeida et al., 2012; Stabili et al., 2013) por los bivalvos. Esta bacteria es reconocida por los hemocitos, activando principalmente vías de señalización en respuesta al estrés (Canesi et al., 2001; 2002). El mejillón *Hyriopsis cumingii*, expuesto a ADN de *E. coli*, incrementa su actividad bacteriolítica *in vitro* y su actividad antibacteriana, de lisozimas y fenoloxidasa *in vivo* (Hong et al., 2006). Además, altas concentraciones de *E. coli* en agua aumentan las defensas antioxidantes y la peroxidación lipídica en glándula digestiva de *D. chilensis* (Sabatini et al., 2011b). Sin embargo, no se encontraron antecedentes sobre los efectos moduladores de los β -glucanos sobre la respuesta a la exposición a contaminación por efluentes de origen antrópico.

Los estudios de laboratorio para evaluar las respuestas a β -glucanos y bacterias son frecuentemente llevados a cabo mediante exposición *in vitro* o mediante inyección de bacterias o PMAPs aislados (Tafalla et al., 2003; Allam et al., 2006; Ciacci et al., 2010; revisado por Ramberg et al., 2010). En bivalvos, esta metodología permite evitar líneas de defensa primaria, tales como la valva, el epitelio del manto, el mucus de las branquias y la microbiota residente (revisado por Schmitt et al., 2012; García-García et al., 2013). Sin embargo, los efectos ejercidos *in vitro* o por inyección pueden diferir de aquellos obtenidos por administración oral. Servaj et al. (2006) reportaron que la inyección de β -glucanos y LPS produjo un porcentaje relativo de supervivencia del 100% en todas las concentraciones estudiadas, en la carpa *Cyprinus carpio* expuesta a *A. hydrophila*; por el contrario, la administración oral mostró resultados similares solo a la concentración más alta. Además, se podrían esperar resultados diferentes cuando se usan PMAPs aislados en lugar de células enteras. Por ejemplo, la exposición a LPS favorece la expresión de genes inhibidores de apoptosis en hemocitos de *Ruditapes decussatus*, mientras que la exposición a células vivas de *Vibrio splendidus* reduce la expresión de estos genes y la viabilidad celular, lo que sugiere un efecto relacionado con procesos de infección (Prado-Alvarez et al., 2012). En términos generales, existe poca información en cuanto al efecto provocado por la estimulación continua y a largo plazo, sobre la sensibilidad de las respuestas inmunes (Bai et al., 2010).

D. chilensis ha sido propuesto en esta tesis (Capítulo II) y en otros estudios como potencial bioremediador de ambientes acuáticos contaminados con bacterias de origen cloacal

(Lara et al., 2002b; Sabatini et al., 2011b). Sin embargo, también se observó que la exposición a este tipo de efluentes, ya sea a corto o a largo plazo (Capítulo I) o ante condiciones crónicas (Sabatini et al., 2011b; Rocchetta et al., 2014b) puede comprometer su balance oxidativo, crecimiento y estructura poblacional. La acción protectora, que la alimentación con células de *E. gracilis* podría conferir a *D. chilensis*, aumentaría su resistencia a la exposición a *E. coli* y a ambientes contaminados con efluentes de origen cloacal. De ser así, esto podría aplicarse a otros bivalvos utilizados en estrategias de bioremediación de ambientes eutrofizados, tanto por efluentes de origen cloacal como de piscicultura.

Para llevar a cabo este trabajo, se lo separó en dos partes y se estudió el efecto de la administración oral de *E. gracilis* a largo plazo sobre las respuestas fisiológicas de *D. chilensis* expuesto a la bacteria coliforme fecal *E. coli* (Parte A) y frente a contaminación por efluentes cloacales en el río Pocahullo (Parte B).

**Parte A: Efecto de la
administración oral de
Euglena gracilis sobre las
respuestas fisiológicas de
Diplodon chilensis expuesto a
la bacteria coliforme fecal
Escherichia coli.**

HIPÓTESIS

- La alimentación con *Euglena gracilis* modula el estado fisiológico en bivalvos y sus respuestas frente a un estímulo bacteriano.

OBJETIVO

- Evaluar la modulación ejercida por el suministro oral de *Euglena gracilis* en la respuesta inmune, el balance oxidativo y la condición metabólica de *Diplodon chilensis*, expuesto a *Escherichia coli*.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

II- A) Recolección de Almejas

Los experimentos se realizaron entre mayo y agosto de 2011, dentro del periodo no reproductivo de *Diplodon chilensis* (Peredo y Parada, 1986), para disminuir posibles cambios fisiológicos debido a esta condición. Las almejas (n = 48) fueron recolectadas en el sitio de referencia en el lago Lacar (Yuco), transportadas al laboratorio y repartidas en cuatro acuarios (150 individuos / m²) con agua corriente de clorada estéril (5 L) y aireación. Las almejas se alimentaron tres veces por semana con *S. vacuolatus* (0,133 mg de células liofilizadas c/u), durante 21 días de aclimatación. El agua de los acuarios se cambió cada vez antes de alimentar y la temperatura de trabajo fue de $12,5 \pm 2,5$ °C.

II- B) Diseño Experimental

Luego de la aclimatación, las almejas fueron separadas en dos grupos: SV: alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* y EG: alimentado con *Euglena gracilis* (n = 24). De acuerdo con Sabatini et al. (2011c), la dieta aplicada a *D. chilensis* correspondió a 3×10^6 células de *S. vacuolatus* por almeja por alimentación (0,133 mg de células liofilizadas). Considerando que las células de *S. vacuolatus* y *E. gracilis* difieren significativamente en tamaño, en lugar de utilizar el mismo número de células, la cantidad de *E. gracilis* que se suministró correspondió a la misma masa de *S. vacuolatus*. Las dietas experimentales se suministraron tres veces a la semana durante 90 días, con cambios de agua antes de la alimentación.

Una vez cumplido el periodo de alimentación experimental, las almejas se colocaron individualmente en recipientes de vidrio con 500 mL de agua corriente de clorada estéril y aireación. Considerando que el uso de bivalvos con propósitos de bioremediación implica estrategias de depuración y relocalización (Soto y Mena, 1999; Parada et al., 2008) que pueden incluir periodos de ayuno, el tratamiento de exposición a *E. coli*, en almejas previamente alimentadas con *E. gracilis* y con *S. vacuolatus*, como dieta control, fue aplicado tanto bajo condiciones de alimentación como de ayuno. A cada grupo dietario se le aplicaron

cuatro tratamientos experimentales (n = 6, para cada uno) (SV y EG): 1) Alimentación cada dos días; 2) Alimentación alternada diariamente con *E. coli*; 3) Ayuno; 4) Ayuno alternado diariamente con *E. coli* (Figura 1a,b).

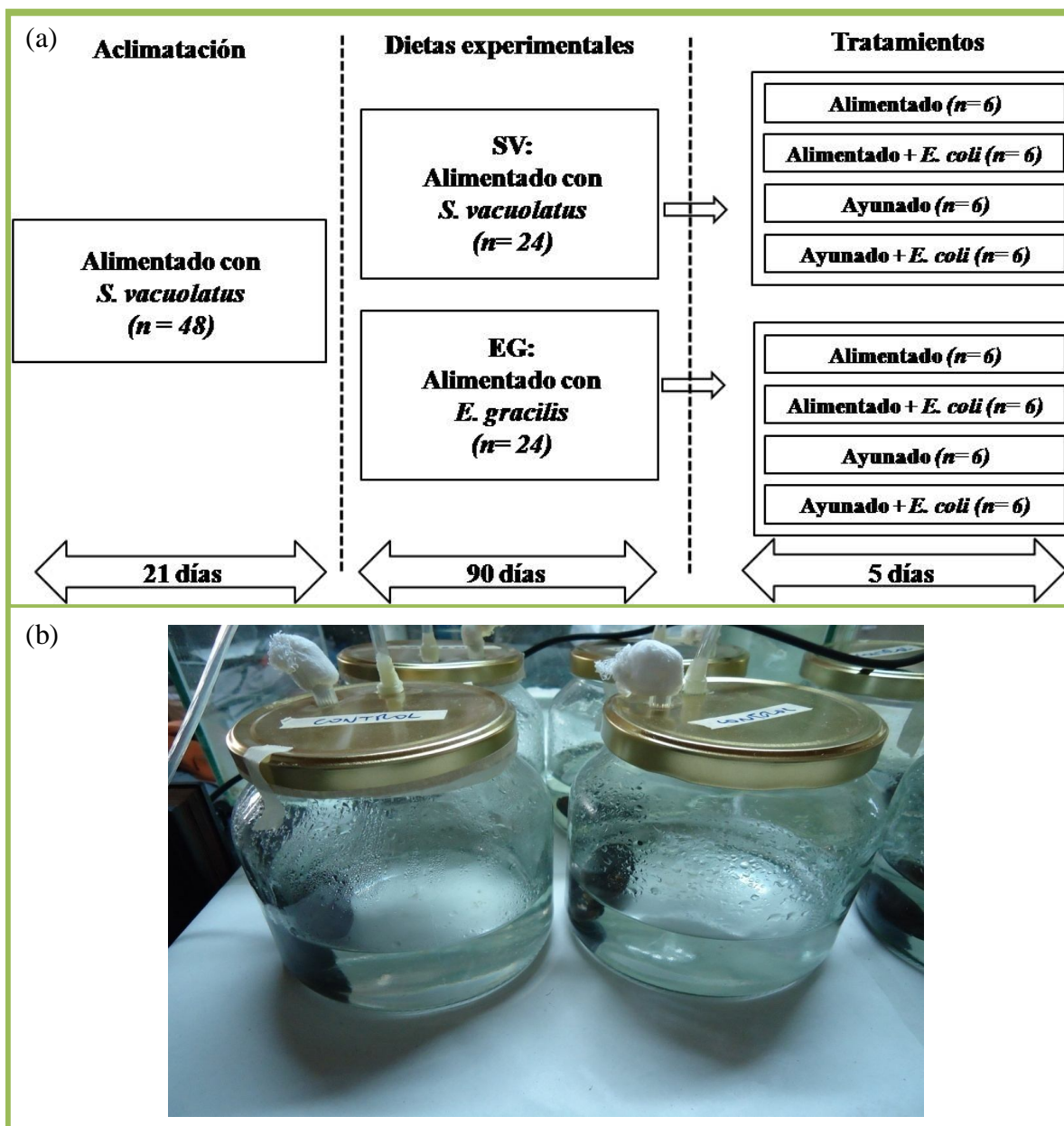


Fig. 1. (a) Diseño experimental para evaluar los efectos de la administración oral a largo plazo de *Euglena gracilis* sobre la respuesta inmune, el balance oxidativo y la condición metabólica de *Diplodon chilensis* expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. (b) Exposición individual a los tratamientos.

Las almejas fueron procesadas luego de 5 días de tratamiento. Se evaluó el número de hemocitos totales, la viabilidad celular y la actividad fagocítica junto con los niveles de EROs, la capacidad antioxidante total, la actividad bacteriolítica y el contenido de proteínas en plasma. Por otro lado, la actividad bacteriolítica se midió en branquia y glándula digestiva; mientras que en branquia y manto, se midió el número de hemocitos acumulados. Las defensas detoxificantes y antioxidantes (GST, CAT) y la peroxidación lipídica (TBARS) fueron evaluadas en branquia y glándula digestiva. La relación ARN/ADN se midió en músculo aductor como un indicador de crecimiento y de condición metabólica.

II- C) Análisis Estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. La distribución normal y homogeneidad de varianzas se evaluaron con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron, los datos se transformaron usando el $\text{Log}_{10}(x)$ o $\text{Log}_{10}(x+1)$, según el caso. Las diferencias significativas entre dietas, en almejas alimentadas o ayunadas, expuestas y no expuestas a *E. coli*, fueron analizadas con ANOVA de tres factores (dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria). En base a los resultados de este análisis, las diferencias entre tratamientos se evaluaron con el test de Newman-Keuls de comparación múltiple para interacciones significativas de dos y tres factores ($P < 0.05$). Las diferencias entre tratamientos correspondientes de las dos dietas, se evaluaron por comparaciones pareadas desde la matriz del test de Newman-Keuls ($P < 0,05$).

III- RESULTADOS

III- A) Dosis de Paramilon

El paramilon constituye el 92,91 % de la masa total de células liofilizadas de *E. gracilis*, teniendo en cuenta la substracción del 3,53 % de la masa, correspondiente al

contenido total de proteínas en el extracto. De acuerdo con esto, cada almeja recibió 128 mg de paramilon por evento de alimentación.

III- B) Respuesta Inmune

III- B) 1) Respuesta Celular

El número total de hemocitos, tanto en almejas alimentadas como en almejas ayunadas, no es afectado ni por la dieta ni por la exposición a *E. coli* (Figura 2a). La interacción dieta * exposición a bacteria es significativa ($P < 0.05$) para la viabilidad de los hemocitos. Esta variable disminuye en un 3 % en almejas del grupo SV, tanto alimentadas como ayunadas, cuando estas son expuestas a *E. coli* ($P < 0,001$); mientras que no se observa efecto en almejas del grupo EG (Figura 2b). La actividad fagocítica es mayor en todas las almejas del grupo EG comparadas con las de SV (efecto dieta, $P < 0,05$) y no es afectada por el ayuno ni por la exposición a *E. coli* (Figura 2c).

La interacción dieta * exposición a bacteria es significativa para el número de hemocitos en branquia ($P < 0,01$). Esta variable se incrementa en almejas del grupo SV expuestas a *E. coli*, tanto en condiciones de alimentación (38 %) como de ayuno (73 %), en comparación con almejas no expuestas ($P < 0,001$) (Figura 3a). En manto, la interacción dieta* condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa ($P < 0,001$). La exposición a *E. coli* aumenta el número de hemocitos en almejas alimentadas del grupo SV en un 28 % ($P < 0,001$); mientras que esta misma variable disminuye en un 37 % en almejas ayunadas ($P < 0,05$) (Figura 3b). Las almejas del grupo EG muestran, en general, un mayor número de hemocitos acumulado en ambos tejidos. En branquia, las almejas de EG expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) a *E. coli* presentan un mayor número de hemocitos en comparación con almejas no expuestas (alimentadas + ayunadas) de SV ($P < 0,001$, en ambos casos). En manto, todas las almejas de EG presentan un mayor número de hemocitos que las almejas ayunadas de SV ($P < 0,001$, para las expuestas y las no expuestas a *E. coli*) y que las almejas alimentadas no expuestas de SV ($P < 0,05$). El número de hemocitos en almejas del grupo EG no se diferencia significativamente entre

tratamientos y es similar a los valores máximos registrados en almejas expuestas a *E. coli* del grupo SV (Figura 3a,b). La Figura 4 muestra preparaciones histológicas de branquia y manto, con hemocitos infiltrados y agrupados, en almejas del grupo SV alimentadas y expuestas a *E. coli*.

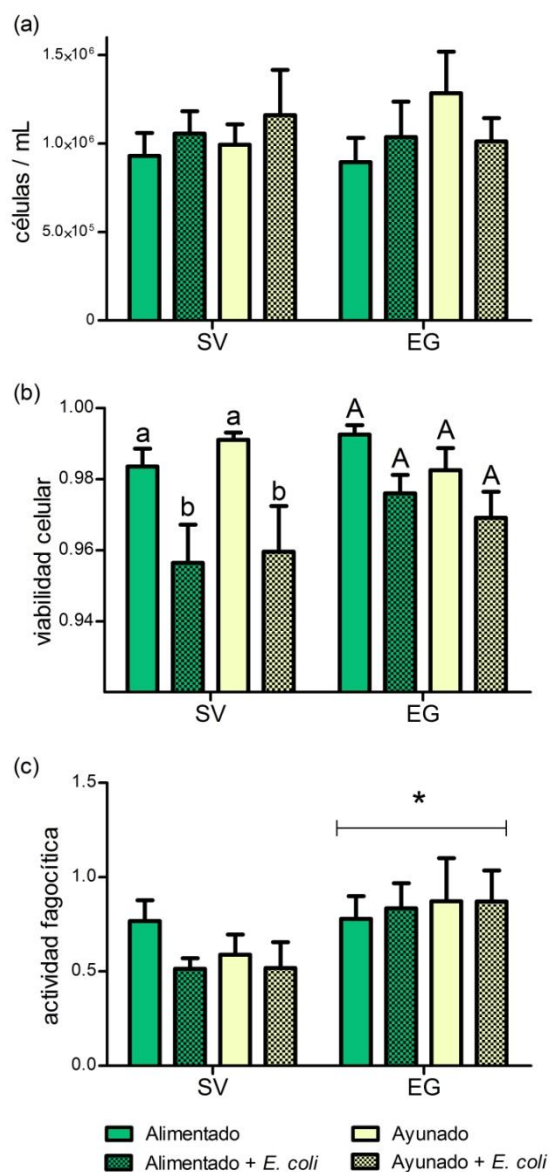


Fig. 2. Respuestas de hemocitos en *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados para el número de hemocitos totales (a), la viabilidad celular (b) y la actividad fagocítica (c) se expresan en media \pm error estándar. En (b), letras distintas indican diferencias significativas entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) para SV (letras minúsculas, $P < 0,001$) y para EG (letras mayúsculas). En (c), * indica $P < 0,05$ entre dietas (SV vs EG).

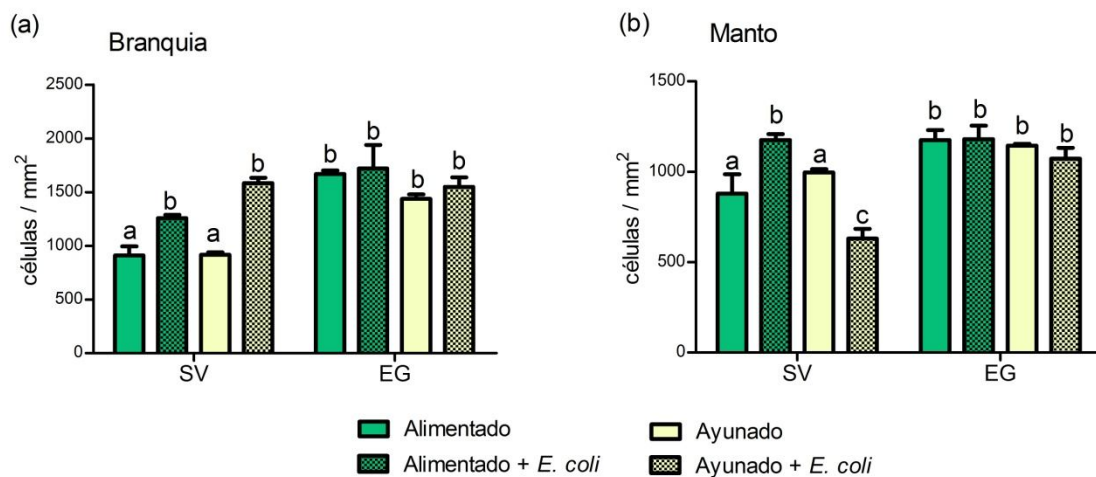


Fig. 3. Número de hemocitos en branquia (a) y manto (b) de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En (a), letras diferentes indican diferencias significativas entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) a *E. coli* ($P < 0,001$) para cada grupo (SV, EG), y entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) de EG con almejas no expuestas (alimentadas + ayunadas) de SV ($P < 0,001$ en ambos casos). En (b), letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos individuales ($P < 0,05$).

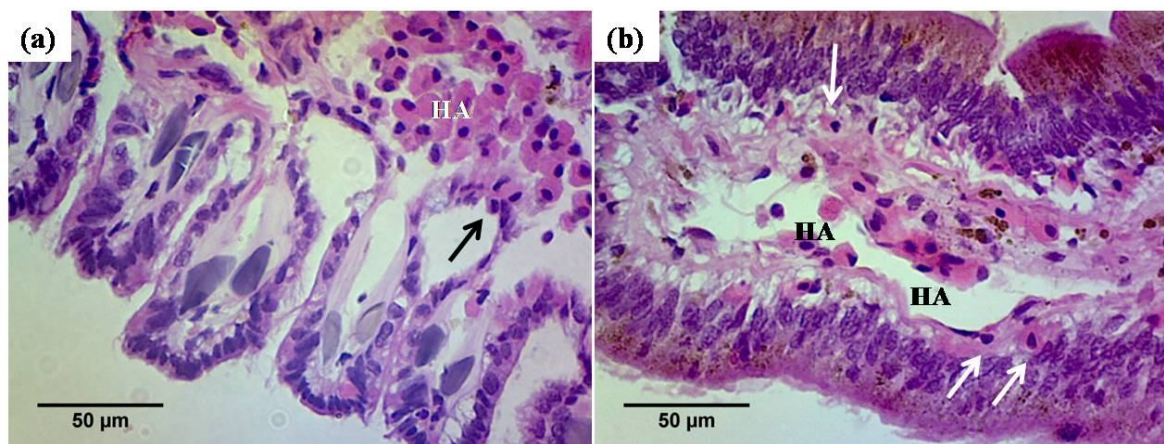


Fig. 4. Hemocitos infiltrados (flechas) en epitelio branquial (a) y en tejido conectivo de manto (b) de almejas del grupo SV alimentadas y expuestas a *E. coli*. Los hemocitos agregados en hemocele se indican con HA, en (a) y (b).

III- B) 2) Respuesta Plasmática

La interacción dieta * exposición a bacteria es significativa para actividad bacteriolítica ($P < 0.01$) y contenido de proteínas ($P < 0.05$) en plasma. Además, en almejas del grupo SV, estas variables aumentan con la exposición a *E. coli*, en comparación con almejas no expuestas ($P < 0,05$, en ambos casos) (Figura 5a,b). La actividad bacteriolítica y el contenido de proteínas en plasma de almejas del grupo EG, no responden a la exposición a *E. coli*; aunque los valores en estas almejas expuestas son similares a aquellos medidos en almejas expuestas del grupo SV. Ambas variables se incrementan en un 25% (efecto condición de alimentación, $P < 0,001$, $P < 0,01$; respectivamente) en almejas ayunadas de ambos grupos (SV, EG).

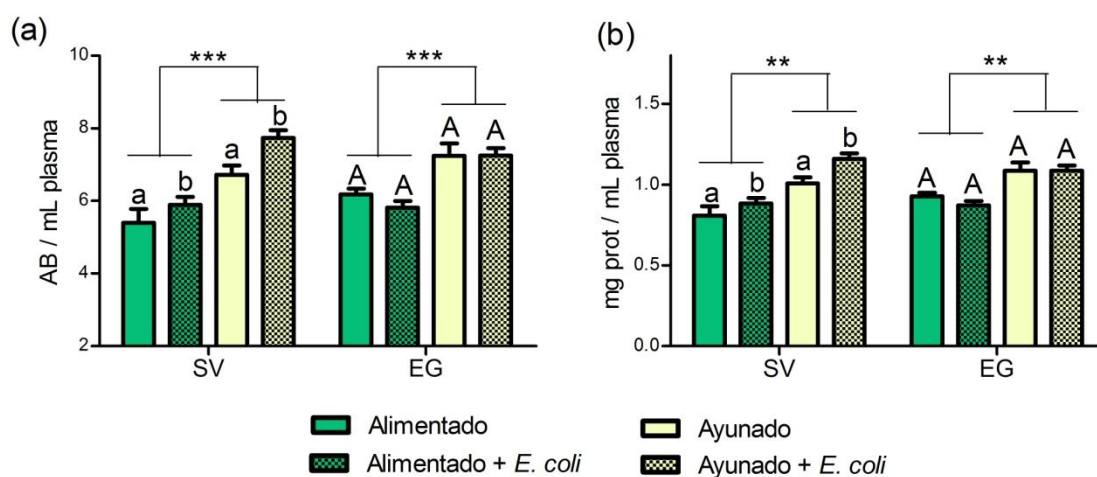


Fig. 5. Respuestas plasmáticas de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados para la actividad bacteriolítica (AB) (a) y el contenido de proteínas (b) se expresan como media \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) a *E. coli* dentro de cada grupo (letras minúsculas para SV, letras mayúsculas para EG). Líneas con **, *** indican diferencias significativas de $P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente, entre almejas alimentadas (expuestas + no expuestas) y ayunadas (expuestas + no expuestas).

III- C) Respuesta Tisular

La interacción dieta * exposición a bacteria es significativa para actividad bacteriolítica en branquia ($P < 0.01$). La exposición a *E. coli* produce una disminución de esta variable, en

un 45 % en almejas alimentadas del grupo SV y en un 34 % en aquellas ayunadas ($P < 0,01$). Además, esta actividad es incrementada en almejas no expuestas del grupo SV comparada con almejas expuestas y no expuestas de EG ($P < 0,05$, para ambos casos). No se observan efectos significativos producidos por la exposición a *E. coli* en branquias de almejas del grupo EG (Figura 6a). En la glándula digestiva (Figura 6b), la interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para actividad bacteriolítica ($P < 0,01$). En este caso, se evidencia un efecto negativo de la exposición a *E. coli* sobre la actividad bacteriolítica de almejas ayunadas de ambos grupos ($P < 0,001$), reduciéndose esta actividad en alrededor de un 63 %. La actividad bacteriolítica en glándula digestiva de almejas alimentadas del grupo EG es alrededor de un 28 % mayor que en almejas alimentadas del grupo SV ($P < 0,05$).

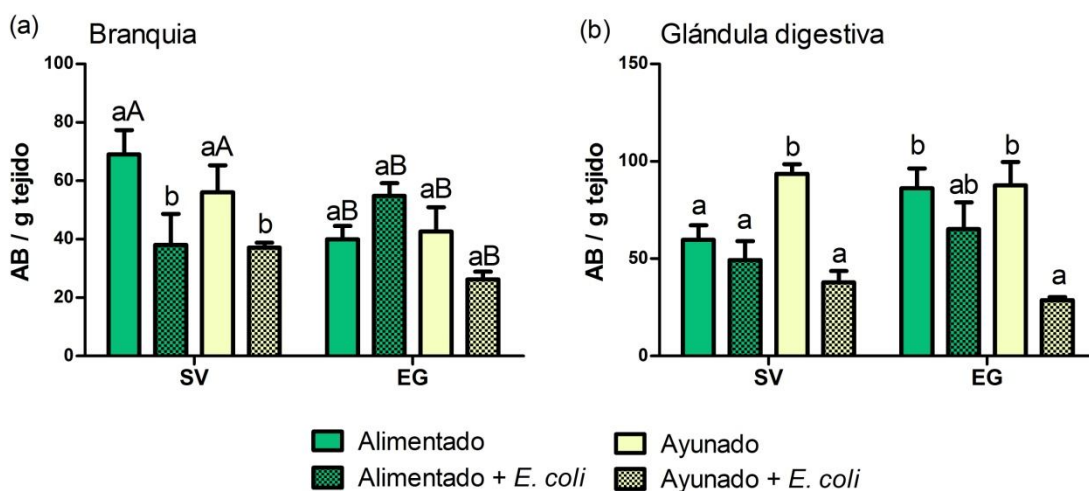


Fig. 6. Actividad bacteriolítica (U AB) en branquia (a) y glándula digestiva (b) de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En (a), letras diferentes indican diferencias significativas entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) a *E. coli* (letras minúsculas, $P < 0,05$) dentro de cada grupo (SV, EG), y entre almejas no expuestas de SV (alimentadas + ayunadas) y almejas expuestas y no expuestas de EG (letras mayúsculas, $P < 0,05$, para ambos casos). En (b), letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos individuales ($P < 0,05$).

La interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para el factor de masa branquial (FB) ($P < 0,05$) (Figura 7a). La exposición a *E.*

coli incrementa significativamente el FB en almejas alimentadas de SV ($P < 0,05$) y en almejas alimentadas ($P < 0,05$) y ayunadas ($P < 0,01$) de EG, en comparación con sus respectivos tratamientos no expuestos. No se observa efecto en almejas ayunadas del grupo SV. La interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para el factor de masa de glándula digestiva (FGD) ($P < 0,05$). El FGD se incrementa por la exposición a *E. coli* solo en almejas del grupo SV (30 %, $P < 0,05$) y en almejas ayunadas del grupo EG (50 %, $P < 0,01$) (Figura 7b).

La interacción dieta * condición de alimentación es significativa para contenido de proteínas en branquia ($P < 0,001$). El contenido de proteínas en branquia de almejas alimentadas del grupo EG es un 66 % mayor que en el correspondiente grupo de SV ($P < 0,001$). En este caso, el ayuno suprime el efecto estimulante de la dieta de EG ($P < 0,01$) (Figura 7c). En la glándula digestiva (Figura 7d), el análisis es significativo para dos interacciones: condición de alimentación * exposición a bacteria ($P < 0,01$) y dieta * condición de alimentación ($P < 0,001$). La exposición a *E. coli* afecta positivamente el contenido de proteínas en almejas alimentadas de ambos grupos ($P < 0,05$), mientras que un efecto negativo de la exposición es observado en almejas ayunadas ($P < 0,05$). El contenido de proteínas en glándula digestiva es mayor en almejas alimentadas del grupo EG en comparación con aquellas de SV (30 %, $P < 0,01$ y 68 %, $P < 0,05$, para almejas expuestas y no expuestas, respectivamente). Además, el ayuno incrementa el contenido de proteínas en glándula digestiva de almejas del grupo SV con respecto a aquellas alimentadas ($P < 0,001$).

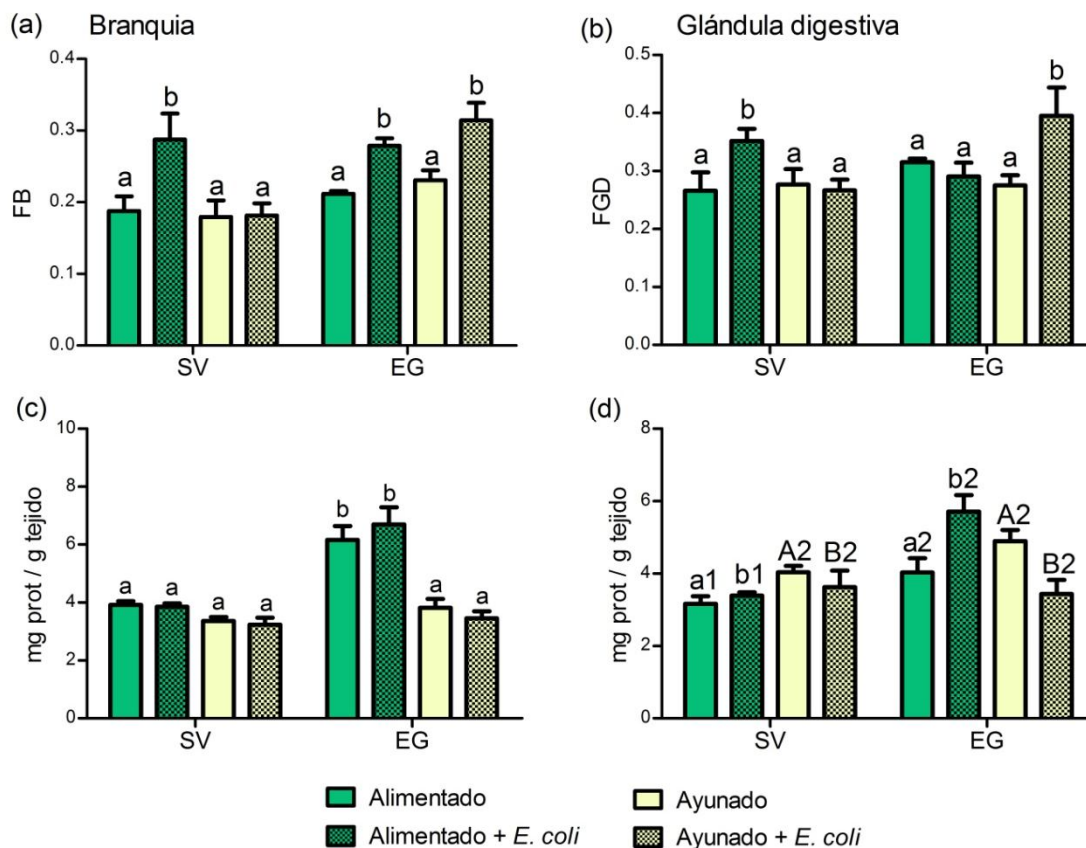


Fig. 7. Factor de masa branquial (FB) y contenido de proteínas en branquia (a,c), factor de masa de glándula digestiva (FGD) y contenido de proteínas en glándula digestiva (b,d) de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En (a) y (b) letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos individuales ($P < 0,05$). En (c), letras diferentes indican diferencias significativas entre almejas alimentadas (expuestas + no expuestas) del grupo EG y el resto de los tratamientos ($P < 0,01$). En (d), se indican diferencias significativas entre almejas alimentadas expuestas y no expuestas (SV + EG) ($P < 0,05$, letras minúsculas), entre almejas ayunadas expuestas (SV + EG) y no expuestas (SV + EG) ($P < 0,05$, letras mayúsculas) y entre almejas alimentadas (expuestas + no expuestas) de SV y el resto de los grupos expuestas + no expuestas ($P < 0,001$, números diferentes).

III- D) Balance Oxidativo

III- D) 1) EROs y Capacidad Antioxidante Total en Plasma

La interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para EROs ($P < 0,01$). Los niveles extracelulares de EROs se incrementan solo en

almejas ayunadas del grupo SV que fueron expuestas a *E. coli* ($P < 0,001$), alcanzando valores 300 % mayores en comparación con aquellos de almejas ayunadas no expuestas (Figura 8a). La interacción dieta * exposición a bacteria es significativa para TOSC ($P < 0,01$). La exposición a *E. coli* reduce la capacidad antioxidante total solo en almejas del grupo SV, tanto alimentadas (11%) como ayunadas (60 %) ($P < 0,05$), mientras que esta variable disminuye por el ayuno en un 50 % en ambos grupos, SV y EG (efecto condición de alimentación, $P < 0,001$) (Figura 8b).

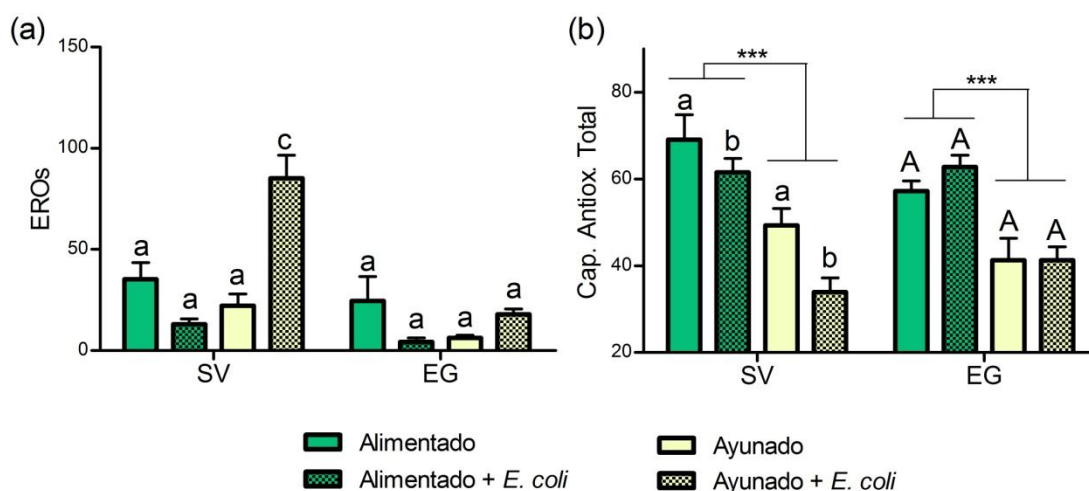


Fig. 8. Especies reactivas de oxígeno (EROs) (a) y capacidad antioxidante total (Cap. Antiox. Total) (b) en plasma de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En (a), letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos individuales ($P < 0,001$). En (b), letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) a *E. coli* dentro de un mismo grupo (letras minúsculas para SV, letras mayúsculas para EG). *** indica diferencias a $P < 0,001$ entre almejas alimentadas (expuestas + no expuestas) y ayunadas (expuestas + no expuestas) en ambos grupos.

III- D) 2) Actividades GST y CAT, y Peroxidación Lipídica en Tejido

La interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para actividad GST en branquia ($P < 0,01$). La exposición a *E. coli* incrementa significativamente esta actividad (Figura 9a) en almejas alimentadas de ambos grupos, SV (60 %) y EG (800 %) ($P < 0,001$). Esta actividad enzimática es un 84 % y un 19 % menor en

almejas no expuestas ($P < 0,001$) y en almejas expuestas ($P < 0,05$) del grupo EG, respectivamente, en comparación con los tratamientos correspondientes en SV. Para actividad CAT en branquia, tres interacciones de dos factores resultan significativas: condición de alimentación * exposición a bacteria ($P < 0,05$), dieta * exposición a bacteria ($P < 0,01$) y dieta * condición de alimentación ($P < 0,001$). Esta actividad (Figura 9b) es significativamente estimulada por la exposición a *E. coli* en almejas alimentadas y ayunadas (aprox. 97 %) del grupo SV ($P < 0,01$). Además, en almejas alimentadas de ambos grupos la exposición a *E. coli* produce un aumento de actividad CAT en comparación con almejas no expuestas (70 %) ($P < 0,01$). La actividad CAT en branquia es un 70 % y un 63 % menor ($P < 0,001$) en almejas alimentadas del grupo EG (expuestas + no expuestas a *E. coli*, respectivamente), comparadas con el mismo grupo de SV. Esta variable es afectada negativamente por el ayuno solo en almejas del grupo SV ($P < 0,001$). La interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para TBARS en branquia ($P < 0,05$) (Figura 9c). Los niveles de TBARS se incrementan por exposición a *E. coli* solo en almejas de SV ($P < 0,05$). Sin embargo, almejas alimentadas del grupo EG, expuestas y no expuestas a *E. coli*, tienen niveles de TBARS en branquia 75 % mayores que los del correspondiente grupo de SV ($P < 0,05$). En el grupo de EG, el ayuno incrementa los niveles de TBARS en branquia, comparado con los individuos alimentados ($P < 0,05$). Además, almejas ayunadas del grupo EG, expuestas y no expuestas a *E. coli*, muestran niveles mayores de TBARS en branquia que almejas alimentadas no expuestas de SV ($P < 0,001$).

En la glándula digestiva, la interacción condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para actividad GST ($P < 0,001$). Esta actividad enzimática se incrementa con la exposición a *E. coli* en almejas alimentadas de ambos grupos, SV (208 %) y EG (65 %) ($P < 0,001$) y decrece en almejas ayunadas expuestas con respecto a aquellas no expuestas ($P < 0,05$). Además, la actividad GST en branquia es mayor en almejas alimentadas no expuestas del grupo EG que en aquellas de SV (84 %, $P < 0,05$). La interacción dieta * condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para actividad CAT en glándula digestiva ($P < 0,01$). La exposición a *E. coli* aumenta la actividad CAT de almejas alimentadas de SV (85 %, $P < 0,01$) y EG (168 %, $P < 0,001$) pero disminuye esta actividad en almejas ayunadas del grupo EG (30 %, $P < 0,05$). Además, la actividad CAT es menor en

almejas alimentadas no expuestas del grupo EG que en aquellas de SV (56 %, $P < 0,05$) y mayor en almejas ayunadas no expuestas de EG que en aquellas de SV (41 %, $P < 0,05$). Las interacciones condición de alimentación * exposición a bacteria ($P < 0.001$) y dieta * condición de alimentación ($P < 0.001$) son significativas para TBARS en glándula digestiva. Almejas alimentadas de ambos grupos (SV + EG), expuestas a *E. coli*, muestran un incremento en los niveles de TBARS, comparadas con almejas no expuestas ($P < 0,001$), mientras que la exposición a *E. coli* produce una disminución en esta variable en almejas ayunadas ($P < 0.05$). Los niveles de TBARS son mayores en almejas ayunadas del grupo EG que en el resto de los grupos ($P < 0,001$, para todos los casos).

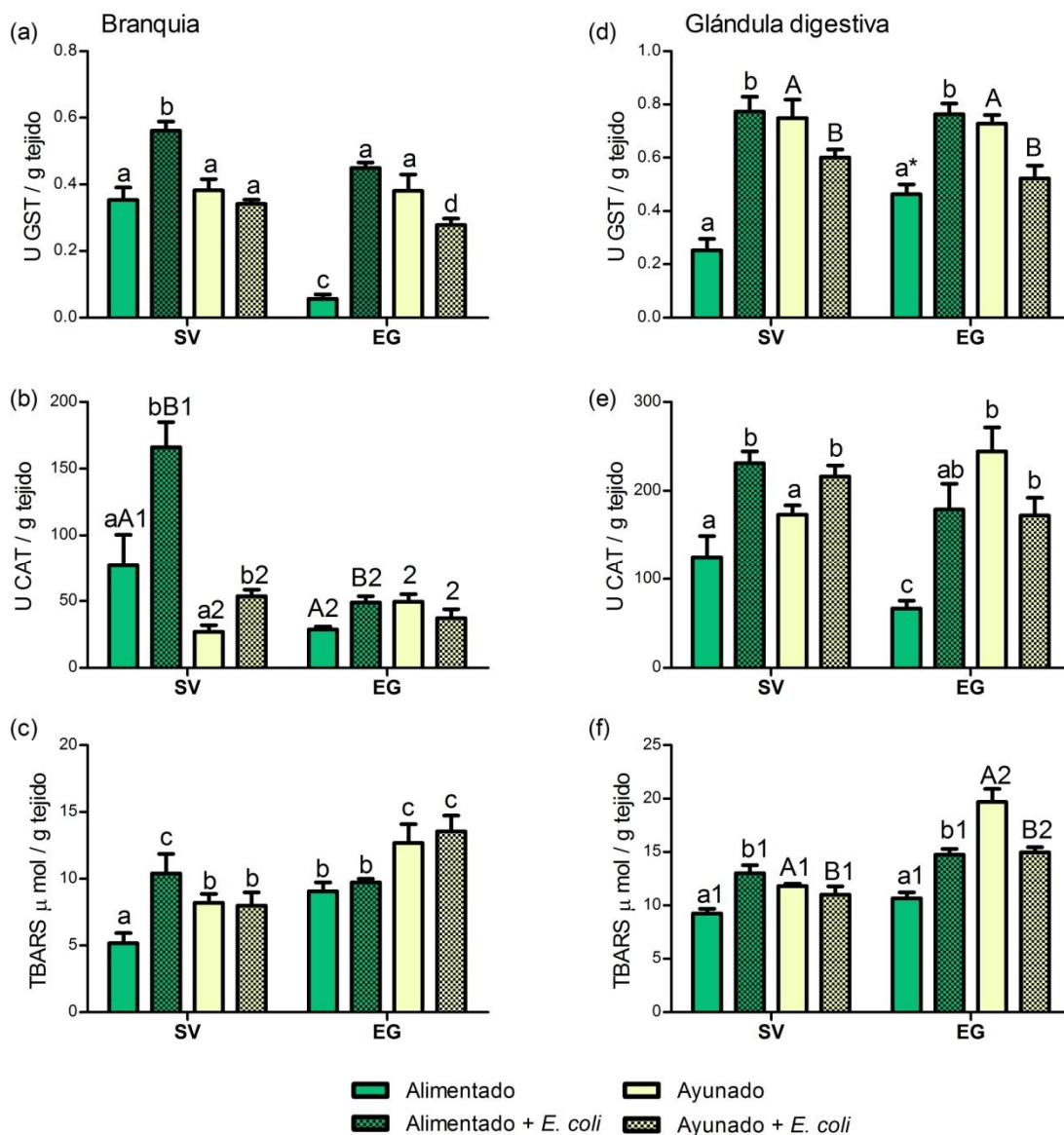


Fig. 9. Actividad glutatión S-transferasa (GST), actividad catalasa (CAT) y peroxidación lipídica (TBARS) en branquia (a-c) y glándula digestiva (d-f) de *Diplodon chilensis*, alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. En (a), (c) y (e), letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos individuales. En (b), se indican diferencias significativas entre almejas expuestas (alimentadas + ayunadas) y no expuestas (alimentadas + ayunadas) de SV (letras minúsculas, $P < 0,01$), entre almejas alimentadas expuestas (SV + EG) y no expuestas (SV + EG) a *E. coli* (letras mayúsculas, $P < 0,01$). En (d) y (f), se indican diferencias significativas entre almejas alimentadas expuestas y no expuestas a *E. coli* (SV + EG) (letras minúsculas, $P < 0,001$ y $P < 0,01$, respectivamente,) y entre almejas ayunadas expuestas (SV + EG) y no expuestas (SV + EG) a *E. coli* (letras mayúsculas, $P < 0,05$ en ambos casos). Números diferentes indican diferencias significativas entre almejas alimentadas de SV (expuestas + no expuestas) y el resto de los tratamientos en (b) ($P < 0,001$) y entre almejas ayunadas (expuestas + no expuestas) y el resto de los tratamientos en (f) ($P < 0,001$). * indica $P < 0,05$ entre tratamientos correspondientes de SV y EG en (d).

IV- Relación ARN / ADN

La interacción condición de alimentación * exposición a bacteria es significativa para la relación ARN / ADN ($P < 0,05$) (Figura 10). La exposición a *E. coli* aumenta significativamente la relación ARN / ADN en músculo aductor, en un 86 % para almejas del grupo SV y en un 52 % para aquellas de EG, comparadas en ambos casos con almejas no expuestas ($P < 0,01$). Las almejas del grupo EG muestran una relación ARN / ADN mayor que las almejas de SV (efecto dieta, $P < 0,001$).

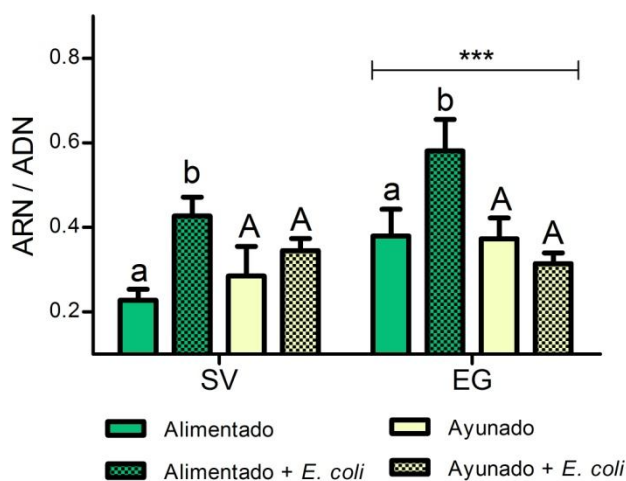


Fig. 10. Relación ARN/ADN en músculo aductor de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto a *Escherichia coli*, bajo condiciones de alimentación o ayuno. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican $P < 0,01$ entre almejas alimentadas, expuestas (SV + EG) y no expuestas (SV + EG) a *E. coli*. *** indica $P < 0,001$ entre almejas de SV y EG.

IV- DISCUSIÓN

Se estudian, por primera vez en un bivalvo, los efectos de la alimentación continua y a largo plazo con células de *Euglena*, sobre parámetros inmunológicos y de estrés oxidativo. La

respuesta inmune de *Diplodon chilensis* es modulada positivamente luego de 90 días de alimentación con células liofilizadas de *Euglena gracilis* (EG), especialmente a nivel celular. Este tratamiento también mejora la condición metabólica de la almeja al incrementar los niveles de proteínas y la relación ARN/ADN en tejidos.

IV- A) Respuesta Inmune

IV- A) 1) Respuesta Celular y Plasmática

Tres de las cinco variables estudiadas a nivel inmune celular: actividad fagocítica, número de hemocitos acumulados en branquia y número de hemocitos acumulados en manto, incrementan sus valores en almejas del grupo EG, independientemente de si están sometidas o no al tratamiento con *Escherichia coli*. Además, la exposición a *E. coli* reduce significativamente la viabilidad de los hemocitos en almejas del grupo SV, pero no en aquellas de EG, lo que sugiere efectos de protección por parte de la dieta, en este último grupo. De acuerdo con esto, Anderson et al. (2011) reportaron que al inyectar β -glucanos por 3 días en la ostra *Crassostrea virginica*, se estimula la respuesta inmune celular, en cuanto al número de hemocitos circulantes y a su capacidad de agregarse.

Estudios en los que se registraron las variables inmunes durante y después de una dieta continua con β -glucanos, muestran un incremento en el número de hemocitos en hemolinfa de camarones (Bai et al., 2010) y en el número de linfocitos en sangre de peces (Misra et al., 2006). Seguido a estos cambios, se observa una pérdida de los efectos significativos, a los que los autores citados primero denominan “fatiga inmune”. Por el contrario, el número total de hemocitos en hemolinfa de *D. chilensis* no muestra ningún cambio producido ni por la dieta, ni por la exposición a *E. coli*. Teniendo en cuenta que, en este trabajo las variables inmunes fueron medidas solo al final de los experimentos, la falta de respuesta en el número de hemocitos en hemolinfa no puede ser asignada ni a la fatiga inmune ni a la falta de estimulación. Sin embargo, el hecho de que la resistencia a *E. coli* en hemocitos, a través de la actividad fagocítica y el número acumulado en branquia y manto, permanece elevado en almejas del grupo EG con respecto a aquellas de SV, luego de 90 días, sugiere que no se

trataría de fatiga inmune. De acuerdo con esto, Misra et al. (2006) observaron que la administración de β -glucanos por 56 días, estimula la actividad fagocítica y la resistencia a una bacteria patógena en individuos juveniles del pez *L. rohita*. Además, el incremento en la acumulación de hemocitos en branquia y manto de almejas del grupo EG, podría indicar un aumento en el número total de hemocitos, aunque este aumento no sea evidente en muestras de hemolinfa, como sugieren Oubella et al. (1994).

La exposición a *E. coli* estimula la acumulación de hemocitos en branquia de todas las almejas del grupo SV y en manto de las almejas de SV alimentadas, junto con la actividad bacteriolítica y la concentración de proteínas en plasma. El hecho de que estas variables hemolinfáticas son igualmente estimuladas por la dieta en EG y por *E. coli*, sin más efecto cuando estas condiciones son combinadas, sugiere que tanto el paramilon como los LPSs activan la misma clase de receptores. En este sentido, se ha reportado que los genes de las proteínas de unión a lipopolisacáridos y β -glucanos (LGBP) y los genes de las proteínas de reconocimiento de patrones (PRP) responden tanto a LPSs como a β -glucanos, en crustáceos decápodos y en el molusco *Haliotis discus*, respectivamente (revisado por Meena et al., 2012).

Por otro lado, en *D. chilensis*, la actividad fagocítica se incrementa por la dieta en el grupo EG pero no por la exposición a *E. coli*. Esto sugiere que la actividad fagocítica responde al paramilon o a otro compuesto de las células de *E. gracilis*, a través de una vía regulatoria que no es sensible a LPSs, aunque el tiempo de exposición a *E. coli* (5 días) pudo haber sido muy corto para estimular esta respuesta. Sin embargo, en peces y crustáceos se ha reportado la existencia de múltiples sitios de unión para glucanos, LPSs u otros compuestos exógenos (Meena et al., 2013), pero existe poca información sobre este tipo de sitios de unión en moluscos (e.g. Nikapitiya et al., 2008; Wang, 2013). Por esto, resultaría interesante explorar la posible existencia de diferentes sitios de unión de glucanos y LPS, como así también los mecanismos inmunes que se despliegan en *D. chilensis* y en otros moluscos.

Por otro lado, el ayuno afecta las respuestas plasmáticas de *D. chilensis* para ambas dietas. El incremento en el contenido de proteínas plasmáticas observado en individuos ayunados, podría estar asociado a la movilización de reservas energéticas, como se ha

observado en peces (van Dijk et al., 2005; Sant'Anna Rios et al., 2011). Adicionalmente, el incremento en la actividad bacteriolítica en *D. chilensis* ayunados podría estar respondiendo a efectos relacionados con el estrés del ayuno, del cual se ha reportado que puede activar algunas respuestas inmunológicas (Caruso et al., 2011).

IV- A) 2) Respuestas en Branquia y Glándula Digestiva

La actividad bacteriolítica en branquia responde de manera opuesta, pero con el mismo patrón, que la acumulación de hemocitos en este tejido y la actividad bacteriolítica en plasma. La exposición a *E. coli* y la dieta en el grupo EG reducen los valores de estas variables con respecto a aquellas de las almejas no expuestas del grupo SV. No se observa un efecto adicional cuando las almejas del grupo EG se exponen a *E. coli*. Aunque la actividad bacteriolítica en branquia tiene principalmente una función de defensa (e.g. Xue et al., 2010), en bivalvos la respuesta inmune en tejido ha sido atribuida generalmente a la presencia de hemocitos fagocíticos (Mitta et al., 2000; Williams et al., 2009). De acuerdo con esto, como se discutió en la sección IV- A) 1), la defensa inmune en branquia de *D. chilensis* parece estar basada en el reclutamiento y la actividad fagocítica de hemocitos, más que en la actividad bacteriolítica en general.

Las bacterias constituyen parte de la dieta de los bivalvos (e.g. Birkbeck et al., 1982) y las lisozimas de la glándula digestiva están adaptativamente diferenciadas para la función digestiva (Jollès et al., 1996; Olsen et al., 2003; Xue et al., 2010, entre otros). En particular, la habilidad de *D. chilensis* para digerir *E. coli* e incorporar ácidos grasos bacterianos ha sido reportada por Lara et al. (2002b) y Rocchetta et al. (2014a), respectivamente. En este trabajo, la actividad bacteriolítica de la glándula digestiva fue mayor en almejas del grupo EG alimentadas que en aquellas de SV, y disminuyó al exponerlas a *E. coli* solo en almejas ayunadas de ambos grupos. Estos resultados sugieren una respuesta bacteriolítica diferencial en branquia y glándula digestiva, en relación a las enzimas implicadas, ej. parálogos de lisozimas órgano-específicas, como lo describen Xue et al. (2010) y/o activación de diferentes receptores o vías regulatorias por moléculas exógenas.

La exposición a *E. coli* incrementa la masa branquial (FB) en almejas alimentadas del grupo SV y en almejas alimentadas y ayunadas del grupo EG. Según trabajos en bivalvos realizados por Akaishi et al. (2007) y Donaghy et al. (2009), este incremento en el FB podría estar relacionado a procesos inflamatorios, que incluyen infiltración de hemocitos y dilatación de senos hemolinfáticos. Con respecto a esto, el incremento en el FB en almejas expuestas a *E. coli*, se corresponde con el aumento en la acumulación de hemocitos observado en este órgano luego de la exposición bacteriana. De todas formas, la acumulación de hemocitos aumenta también en almejas ayunadas del grupo SV, las cuales no muestran un incremento en el FB. Por otro lado, la dieta en EG estimula la acumulación de hemocitos en branquia tanto de individuos alimentados como en ayunados e incrementa el contenido de proteínas sólo en los alimentados, independientemente de la exposición bacteriana.

Los efectos anti-inflamatorios de los β - glucanos se han observado en el intestino del pez *C. carpio* expuesto a *Aeromonas salmonicida* (Falco et al., 2012) y en el bazo del pez *Oncorhynchus mykiss* expuesto a LPSs bacterianos (Djordjevic et al., 2009). Además, Falco et al. (2012) encontraron que el proceso inflamatorio modulado por β -glucanos puede ser órgano-específico. En *D. chilensis*, la masa de la glándula digestiva (FGD) varía con la dieta y con la condición de alimentación, ante la exposición a *E. coli*. Almejas alimentadas del grupo SV muestran un incremento en el FGD luego de la exposición, mientras que no se observa efecto en aquellas alimentadas del grupo EG. Al contrario, entre las almejas ayunadas, sólo las de EG incrementan su FGD.

La inflamación en branquia estaría relacionada con la activación de las respuestas inmunes observadas en almejas alimentadas de ambos grupos, SV y EG. Por el contrario, la falta de inflamación en la glándula digestiva de almejas alimentadas del grupo EG favorecería el transporte de nutrientes y los procesos metabólicos, como se sugiere para el intestino de *C. carpio* (Falco et al., 2012). Esto podría explicar el incremento en el contenido de proteínas observado en branquia y glándula digestiva y el alto valor de ARN/ADN en músculo de almejas alimentadas del grupo EG, comparadas con aquellas de SV (se discute en sección IV-C).

IV- B) Balance Oxidativo

Se ha observado que la exposición a β -glucanos y a LPSs incrementa la producción de EROs; sin embargo, la duración y la dosis del estímulo pueden modular esta respuesta (Costa et al., 2008; Meena et al., 2013). En este estudio, la exposición a *E. coli* incrementa significativamente los niveles plasmáticos de EROs en almejas ayunadas de SV y reduce la capacidad antioxidante total en plasma tanto en almejas alimentadas como en las ayunadas de este grupo. Al contrario, la capacidad antioxidante total y los niveles de EROs permanecieron inalterados por la exposición a *E. coli* en almejas del grupo EG. El mantenimiento de la capacidad antioxidante en plasma frente a la exposición a *E. coli* en almejas de EG podría explicar, al menos en parte, la menor sensibilidad de los hemocitos ante estas condiciones estresantes. Por otro lado, el descenso de la capacidad antioxidante total frente al ayuno en ambos grupos de almejas podría ser el resultado de una baja en el nivel de reservas energéticas. Una tendencia similar se observó para las actividades peroxidasa y superóxido dismutasa en hemolinfa de la ostra *Saccostrea glomerata* bajo ayuno (Butt et al., 2007). Por esto, se podría especular que la administración de *E. gracilis* en la dieta favorece el mantenimiento del balance oxidativo en hemolinfa de *D. chilensis*, permitiendo una respuesta adecuada incluso luego de 5 días de ayuno.

La activación de las defensas detoxificantes y antioxidantes protege a los tejidos del daño oxidativo originado por la exposición bacteriana y la respuesta inmune (Wang et al., 2013). La inyección de β -glucanos eleva las respuestas antioxidantes, tales como las actividades superóxido dismutasa, peroxidasa y mieloperoxidasa en hemocitos del ostión *Chlamys farreri* expuesto a cambios de temperatura (Tingting et al., 2011). En la “oreja de mar” *Haliotis* sp. (Gastrópoda), el estímulo bacteriano aumenta la actividad GST en diversos tejidos, incluyendo branquia y glándula digestiva (Ren et al., 2009). Sin embargo, partiendo de la bibliografía consultada en esta tesis, no existe información sobre el efecto modulador de los β -glucanos sobre las respuestas antioxidantes en bivalvos sujetos a un estímulo bacteriano.

En este estudio, branquia y glándula digestiva de almejas alimentadas de ambos grupos muestran una activación significativa de las actividades GST y CAT, luego de la exposición a *E. coli*. Aunque esta respuesta no fue suficiente para evitar el daño oxidativo a lípidos. En

almejas alimentadas del grupo EG, no expuestas a *E. coli*, las actividades CAT de branquia y glándula digestiva son menores y el nivel de TBARS en branquia es mayor que en aquellas almejas de SV, mientras que las diferencias en la actividad GST fueron órgano-específicas. Bajo estas condiciones de estudio, la dieta no reforzaría la capacidad antioxidante en branquia ni en glándula digestiva de *D. chilensis* alimentado con *E. gracilis*.

Por otro lado, los antioxidantes exógenos, tales como los flavonoides, provistos por las células de *E. gracilis* (Tolivia et al., 2013) podrían complementar la acción de las actividades enzimáticas normales. Esto explicaría las actividades reducidas de GST en branquia, y de CAT en branquia y glándula digestiva de almejas alimentadas del grupo EG y no expuestas a *E. coli*. El incremento pronunciado en la peroxidación lipídica de branquia y glándula digestiva, como así también el descenso de la capacidad antioxidante total en plasma, producidos por el ayuno en almejas del grupo EG, podría ser explicado por la pérdida de estos compuestos antioxidantes exógenos, durante el ayuno. Además, no se puede descartar un posible incremento en la susceptibilidad de los lípidos a la oxidación debido a la adquisición de grandes cantidades de ácidos grasos insaturados contenidos en las células de *E. gracilis* (Rocchetta et al., 2012).

IV- C) Relación ARN/ADN

La relación ARN/ADN es utilizada para estimar la condición nutricional y el crecimiento en peces (Kerambrun et al., 2011) y bivalvos (Chícharo et al., 2001; Fathallah et al., 2010). Se podría decir que el incremento en la relación ARN/ADN en almejas del grupo EG, refleja una ventaja energética al incorporar β -glucanos y/u otros componentes nutritivos contenidos en las células de *E. gracilis* (Murakami et al., 1988; Takeyama et al., 1997; Kusmic et al., 1999; Barsanti et al., 2001; Matsumoto et al., 2009; Tolivia et al., 2013). El incremento significativo en el contenido de proteínas en branquia y glándula digestiva de almejas del grupo EG también sugiere un alto estado nutricional (sección III-C). De acuerdo con esto, Bai et al. (2006) y Misra et al. (2006) reportaron tasas de crecimiento específico aumentadas luego de la alimentación prolongada con β -glucanos en peces y camarones, respectivamente.

López et al. (2003) sugirieron que la degradación de β -glucanos por las glucanasas de la glándula digestiva, para producir energía, favorece la utilización de proteínas para el crecimiento. Sin embargo, hasta la fecha no se han elucidado los mecanismos por los cuales los β -glucanos promueven el crecimiento. El incremento de la relación ARN/ADN en *D. chilensis* alimentados y expuestos a *E. coli*, en comparación con el mismo grupo no expuesto, podría estar indicando que la combinación de las dietas SV y EG con *E. coli*, favorecería el crecimiento en el bivalvo a través de la incorporación de una mayor variedad y/o calidad de nutrientes. Alternativamente, Ji et al. (2013) observaron un aumento en la síntesis de proteínas en relación con la respuesta ante un microorganismo invasor en *M. galloprovincialis*; lo que constituye otra posible explicación para el incremento de la relación ARN/ADN en almejas alimentadas y expuestas a *E. coli* en ambos grupos.

Como respuesta a un periodo de ayuno se esperaría una reducción en la relación ARN/ADN (Chícharo et al., 2001; Norkko et al., 2005); sin embargo, esta relación fue similar en almejas alimentadas y ayunadas de ambos grupos comparadas con la de individuos alimentados. Esta falta de efecto, podría ser explicada por la movilización de reservas de glucógeno y lípidos, según Sant'Anna Rios et al. (2011). Sin embargo, ni la relación ARN/ADN en músculo, ni el contenido de proteínas en branquia y glándula digestiva fueron incrementados en respuesta a la exposición a *E. coli* en almejas ayunadas, denotando una deficiencia en la respuesta provocada por esta condición.

VI- CONCLUSIONES

- Una dieta rica en células de *Euglena gracilis* modula positivamente las respuestas inmunes en *Diplodon chilensis*, evitando el daño producido por la exposición a *Escherichia coli*. Esta modulación está basada principalmente en las respuestas celulares, por ejemplo, activación de la fagocitosis, viabilidad aumentada e incremento en el número de hemocitos en branquia y manto.
- La alimentación con *Euglena gracilis* favorece la síntesis de proteínas, el crecimiento y la capacidad antioxidante en plasma de *Diplodon chilensis*.
- *Euglena gracilis* podría ser aplicada como un complemento protector y nutricional en la dieta de bivalvos filtradores. Sin embargo, se deberían evitar los periodos de ayuno luego de la administración, ya que parte de los beneficios adquiridos podrían ser revertidos, por ejemplo, el incremento en el contenido de proteínas inducido en branquia por la dieta en el grupo EG se pierde con el ayuno. Además, el ayuno incrementa los efectos negativos de la alimentación con *E. gracilis*, tales como el incremento en los niveles tisulares de TBARS.
- Algunos parámetros inmunológicos de *Diplodon chilensis* responden de manera similar a *Euglena gracilis* y a *Escherichia coli*, sin presentar mayores efectos cuando los estímulos son combinados, mientras que otros responden solo a *E. gracilis*, sugiriendo la existencia de diferentes tipos de receptores inmunes en almejas de agua dulce.

**Parte B: Efecto de la
administración oral de
Euglena gracilis sobre las
respuestas fisiológicas de
Diplodon chilensis expuesto a
contaminación por efluentes
cloacales en el río Pocahullo.**

HIPÓTESIS

- Las respuestas fisiológicas en bivalvos expuestos a contaminación por efluentes cloacales son modificadas por la alimentación previa con *Euglena gracilis*.

OBJETIVO

- Evaluar el efecto de la alimentación con *Euglena gracilis* sobre la respuesta inmune, el balance oxidativo y la condición metabólica de *Diplodon chilensis* expuesto a contaminación por efluentes cloacales.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

II- A) Recolección de Almejas

El trabajo se realizó entre mayo y agosto de 2012 y se procedió de manera similar a lo descrito en la Parte A de este capítulo. Las almejas ($n = 60$) fueron recolectadas en el sitio de referencia en el lago Lacar (Yuco), transportadas al laboratorio y repartidas en cuatro acuarios (150 individuos / m^2) con agua corriente de clorada estéril (5 L) y aireación. Las almejas se alimentaron tres veces por semana con $0,133$ mg de células liofilizadas de *S. vacuolatus* (c/u), durante 21 días de aclimatación. El agua de los acuarios se cambió cada vez antes de alimentar y la temperatura de trabajo fue de $11,5 \pm 1,06$ °C.

II- B) Diseño Experimental

Una vez finalizada la aclimatación, las almejas fueron separadas en dos grupos, como se describió en la Parte A de este capítulo: SV: alimentado con *S. vacuolatus* ($n = 30$) y EG: alimentado con *E. gracilis* ($n = 30$). Las dietas experimentales ($0,133$ mg de células liofilizadas por almeja) se suministraron tres veces a la semana durante 90 días, con cambios de agua antes de la alimentación.

Luego de la aplicación de las dietas experimentales, las almejas de ambos grupos, SV y EG, se separaron a su vez en seis grupos ($n = 5$), los cuales se colocaron en seis cajas (estructura de hierro cubierta con maya plástica) a una densidad final de 87 individuos / m^2 . Dos cajas de cada grupo (SV, EG) fueron colocadas en cada uno de los tres sitios elegidos en la cuenca del río Pocahullo: S1: control, sin contaminación bacteriana significativa (20 m aguas abajo del sitio 1 del Capítulo I); S2: 40 m aguas arriba de la descarga de efluentes de la planta de tratamiento terciario y afectado por descargas con tratamiento primario y sin tratamiento y S3: 20 m aguas abajo de la descarga de efluentes de la planta de tratamiento terciario. En cada sitio, se registró la temperatura del agua (°C), el pH y el oxígeno disuelto (OD) y se tomaron muestras de agua para la evaluación del contenido de bacterias coliformes fecales (CF NMP / 100 mL), clorofila *a* (Chl *a* μ g / L), materia orgánica particulada (MOP mg

/ L), nitrato (NO_3 $\mu\text{g} / \text{L}$), nitrito (NO_2 $\mu\text{g} / \text{L}$), fosfato (PO_4 $\mu\text{g} / \text{L}$), sulfato (SO_4^{-2} mg / L), turbidez (UAF), hierro (Fe) y cobre (Cu).

Luego de 10 días de exposición, los individuos fueron colectados y transportados al laboratorio para su procesamiento inmediato. Se evaluó el número total de células, la actividad fagocítica, la viabilidad celular, la estabilidad de la membrana lisosomal, la producción EROs y la capacidad antioxidante total en hemocitos. Además, se analizaron las actividades enzimáticas GST y CAT, la peroxidación lipídica (TBARS) y el contenido de proteínas en branquia y glándula digestiva. La condición metabólica se evaluó calculando los factores de masa branquial y de masa de glándula digestiva.

II- C) Análisis Estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. La distribución normal y homogeneidad de varianzas se evaluaron con el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. Se utilizó ANOVA de dos factores (sitio * dieta) seguido del test de Newman-Keuls, para identificar diferencias entre grupos. Cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron, los datos se transformaron usando el $\text{Log}_{10}(x)$ o $\text{Log}_{10}(x + 1)$, según el caso. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0,05$.

IV- RESULTADOS

IV- A) Calidad del Agua

El análisis fisicoquímico y bacteriológico llevado a cabo en muestras de agua del río Pocahullo muestra un aumento de la carga contaminante, a lo largo del curso (Tabla 1). La concentraciones de CF, NO_3 , PO_4 , SO_4^{-2} y Fe total, junto con los valores de turbidez en S3, son significativamente mayores que aquellos registrados en S2 ($P < 0,05$; $P < 0,05$; $P < 0,001$; $P < 0,001$; $P < 0,0001$; $P < 0,01$, respectivamente) y en S1 ($P < 0,01$; $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,001$; $P < 0,001$; $P < 0,001$, respectivamente). Para estos parámetros, el sitio control (S1)

presenta valores significativamente más bajos que S2 ($P < 0,05$; $P < 0,05$; $P < 0,001$; $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,001$, respectivamente). El contenido de NO_3 y MOP es mayor en los sitios contaminados que en el control ($P < 0,05$; $P < 0,001$, respectivamente, para ambos sitios). Las concentraciones de Cu en S3 son mayores que en S1 y S2 ($P < 0,001$). Se observa una disminución significativa del pH ($P < 0,001$) y un aumento del OD ($P < 0,001$) en los sitios contaminados, mientras que la T° no presenta cambios.

Tabla 1. Calidad fisicoquímica y bacteriológica del agua en los sitios de muestreo en la cuenca del río Pocahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados de temperatura ($^\circ\text{C}$), pH, oxígeno disuelto (OD), turbidez (UAF), bacterias coliformes fecales (FC), clorofila *a* (Chl *a*), nitrato (NO_3), nitrito (NO_2), fosfato (PO_4), sulfato (SO_4^{-2}), materia orgánica particulada (MOP), hierro total (Fe) y cobre (Cu) están expresados como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($P < 0,05$).

	S1	S2	S3
T ($^\circ\text{C}$)	4,9 \pm 0,03	4,01 \pm 0,07	4,43 \pm 0,07
pH	6,9 \pm 0,003 a	6,54 \pm 0,05 b	6,19 \pm 0,006 c
OD (mg/L)	11,20 \pm 0,06 a	12,43 \pm 0,03 b	12,33 \pm 0,03 b
Turbidez (UAF)	5,6 \pm 0,3 a	10 \pm 0,6 b	14 \pm 0,6 c
CF (NMP / 100 mL)	15 \pm 4 a	2350 \pm 375 b	7000 \pm 1155 c
Chl <i>a</i> ($\mu\text{g} / \text{L}$)	0,49 \pm 0,1 a	2,79 \pm 0,37 b	3,30 \pm 0,15 c
NO_3 ($\mu\text{g} / \text{L}$)	0,025 \pm 0,003 a	0,038 \pm 0,005 b	0,050 \pm 0,003 c
NO_2 ($\mu\text{g} / \text{L}$)	0,0031 \pm 0,0005 a	0,0052 \pm 0,0001 b	0,0048 \pm 0,0006 b
PO_4 ($\mu\text{g} / \text{L}$)	0,052 \pm 0,003 a	0,153 \pm 0,004 b	0,201 \pm 0,001 c
SO_4^{-2} (mg / L)	0,20 \pm 0,03 a	0,30 \pm 0,03 b	0,50 \pm 0,03 c
MOP (mg / L)	4,86 \pm 0,41 a	14,53 \pm 0,55 b	16,94 \pm 0,94 b
Fe (mg / L)	0,072 \pm 0,001 a	0,087 \pm 0,001 b	0,083 \pm 0,001 c
Cu (mg / L)	0,016 \pm 0,0003 a	0,020 \pm 0,0003 ab	0,037 \pm 0,003 b

IV- B) Respuesta en Hemocitos

IV- B) 1) Respuesta Inmune

El número total de hemocitos en hemolinfa disminuye a lo largo del curso del río, siendo los valores en S1 significativamente mayores que en S3 (efecto sitio, $P < 0,05$) (Figura 1a). La actividad fagocítica es mayor en almejas de EG con respecto a aquellas de SV (efecto dieta, $P < 0,05$), en todos los sitios estudiados (Figura 1b).

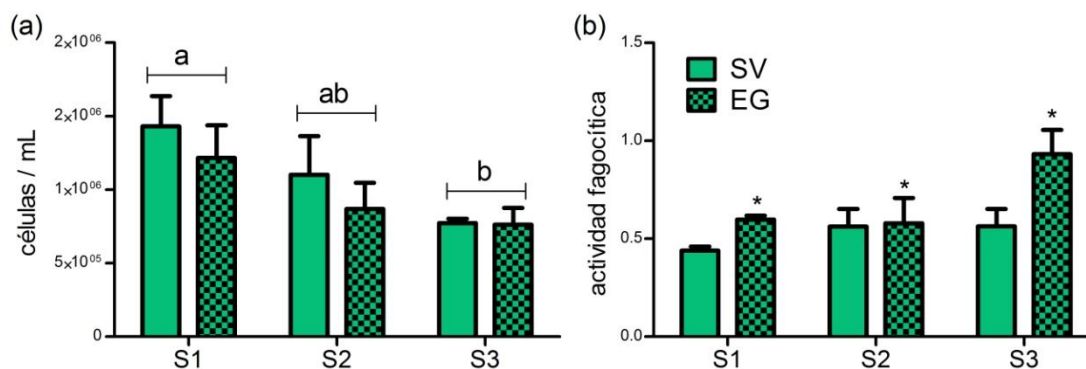


Fig. 1. Número total de hemocitos en hemolinfa (a) y actividad fagocítica (b) en *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto durante 10 días a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pocahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre sitios ($P < 0,05$). * indica $P < 0,05$ entre dietas.

VI- B) 2) EROs y Capacidad Antioxidante Total

La interacción sitio * dieta es significativa para la producción de EROs en hemocitos ($P < 0,05$). Esta variable se incrementa en ambos grupos de almejas a lo largo del río ($P < 0,001$), alcanzando valores significativamente mayores en almejas del grupo EG comparadas con aquellas de SV, expuestas en S3 ($P < 0,01$) (Figura 2a). No se observan efectos de la dieta o del sitio sobre la capacidad antioxidante total (Figura 2b).

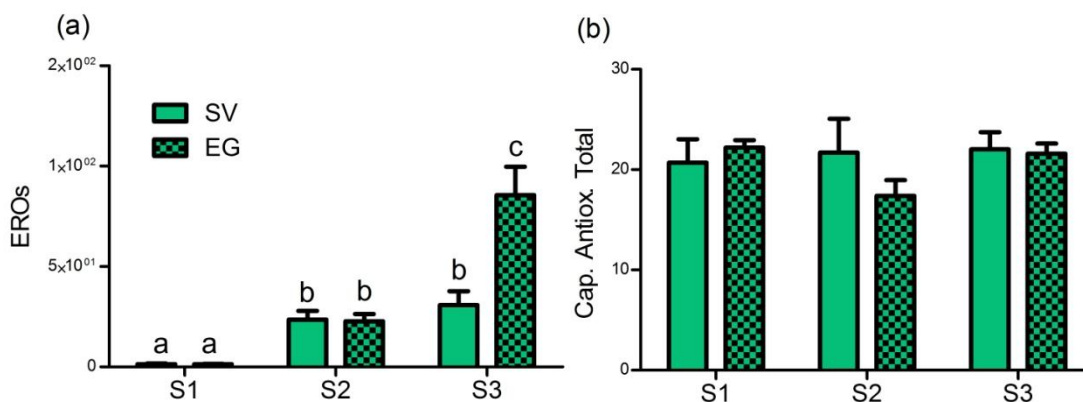


Fig. 2. Producción de EROs (a) y Capacidad Antioxidante Total (b) en hemocitos de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuestos durante 10 días a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pocahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) entre tratamientos individuales en S3.

VI- B) 3) Citotoxicidad

La interacción sitio * dieta es significativa para viabilidad celular en hemocitos ($P < 0,05$). Esta variable se incrementa en almejas del grupo EG en comparación con almejas de SV, en S1 ($P < 0,05$). En S3, la viabilidad celular es mayor en almejas de SV comparada con el mismo grupo en S1 ($P < 0,05$), y es significativamente mayor en comparación con hemocitos del grupo EG en este sitio ($P < 0,05$) (Figura 3a). La estabilidad de la membrana lisosomal es mayor en almejas del grupo EG que en aquellas de SV, en todos los sitios del río (efecto dieta, $P < 0,001$) y disminuye en ambos grupos expuestos en S2 y S3, con respecto a S1 (efecto sitio, $P < 0,001$) (Figura 3b).

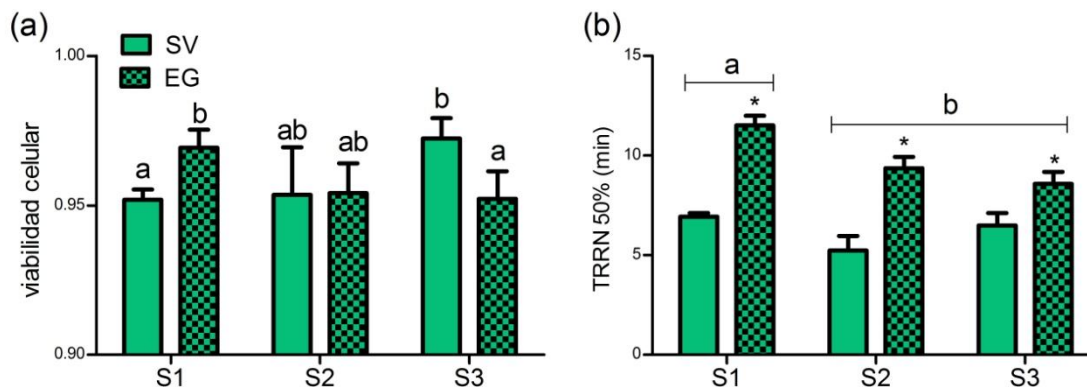


Fig. 3. Viabilidad celular (a) y estabilidad de la membrana lisosomal (TRRN 50%) (b) en hemocitos de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto durante 10 días a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pochahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos individuales en (a) ($P < 0,05$), y entre sitios en (b) ($P < 0,001$). * indica $P < 0,001$ entre dietas (SV vs EG) en (b).

VI- C) Respuesta en tejidos

VI- C) 1) Actividad Enzimática y Peroxidación Lipídica

La actividad GST en branquia es menor en almejas del grupo EG que en aquellas de SV, en todos los sitios del río (efecto dieta, $P < 0,001$) (Figura 4a). La interacción sitio * dieta es significativa para la actividad branquial de CAT ($P < 0,05$). Esta actividad se incrementa en almejas del grupo SV en S2, con respecto a los demás sitios ($P < 0,01$), y es significativamente mayor que en almejas de EG ($P < 0,01$) (Figura 4b). La interacción sitio * dieta es significativa para el contenido de TBARS en branquia ($P < 0,01$). En S1 y S2, esta variable es mayor en almejas del grupo EG que en las de SV ($P < 0,05$), sin registrarse diferencias significativas entre dietas en S3 (Figura 4c). En la glándula digestiva, se observa menor actividad GST (efecto dieta, $P < 0,05$) (Figura 4d) y CAT (efecto dieta, $P < 0,05$) (Figura 4e) en todas las almejas de EG, mientras que el contenido de TBARS se incrementa en este grupo (efecto dieta, $P < 0,05$) (Figura 4f). Adicionalmente, se observa un efecto del sitio en las actividades enzimáticas y en la peroxidación lipídica en glándula digestiva. La actividad GST

es menor en almejas trasplantadas a S3 que en aquellas de S1 y S2 ($P < 0,05$), mientras que la actividad CAT disminuye en las almejas de sitios contaminados comparadas con aquellas de S1 ($P < 0,001$). El contenido de TBARS en glándula digestiva es mayor en almejas de los sitios contaminados que en aquellas de S1 ($P < 0,001$).

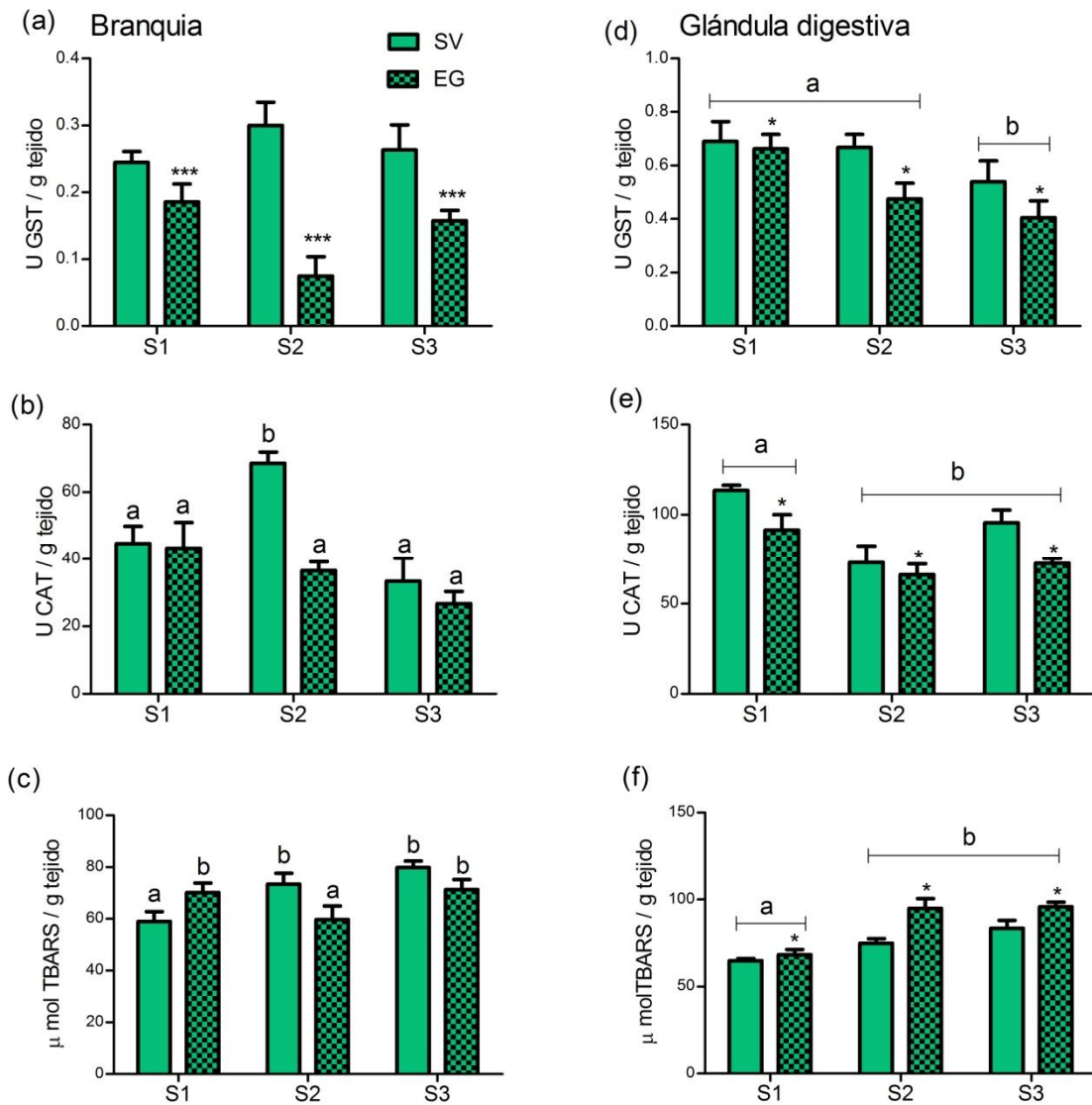


Fig. 4. Actividades glutatión S-transferasa (GST) y catalasa (CAT), y peroxidación lipídica (TBARS) en branquia (a-c) y glándula digestiva (d-f) de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuestos durante 10 días a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pochahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos individuales en (b) ($P < 0,05$) y (c) ($P < 0,05$), y entre sitios en (d) ($P < 0,05$), (e) ($P < 0,001$) y (f) ($P < 0,001$). Efectos significativos de la dieta se indican con * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$.

VI- C) 2) Contenido de Proteínas

El contenido de proteínas en branquia se incrementa en almejas de ambos grupos expuestas en S3, en comparación con almejas de S1 y S2 (efecto sitio, $P < 0.05$) (Figura 5a). El contenido de proteínas no varía en glándula digestiva (Figura 5b).

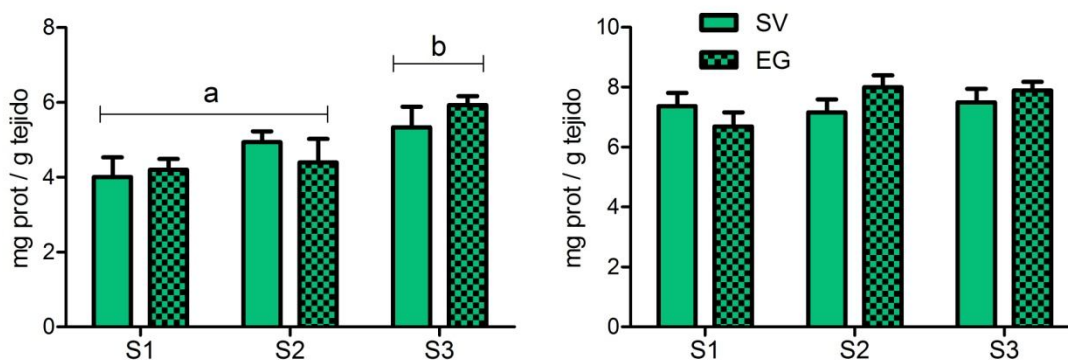


Fig. 5. Contenido de proteínas en branquia (a) y glándula digestiva (b) de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto durante 10 días a contaminación por efluentes cloacales en la cuenca del río Pocahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias entre sitios en (a).

IV- D) Condición Metabólica

El FB de almejas del grupo EG es mayor que el de las de SV en el sitio S1 ($P < 0.05$) y menor en S2 y S3 ($P < 0.05$, para ambos) (Figura 6a). El FGD es mayor en almejas del grupo EG en todos los sitios, comparadas con aquellas de SV ($P < 0.05$). No se observan diferencias entre grupos de almejas trasplantadas a S3 (Figura 6b).

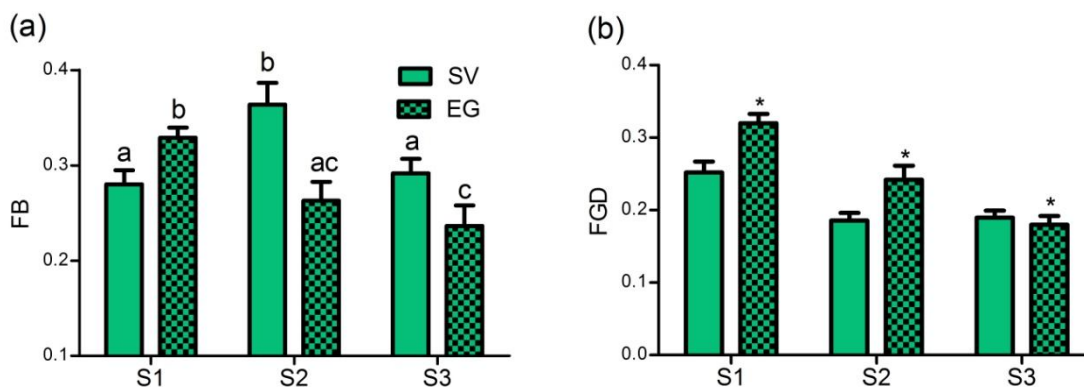


Fig. 6. Factor de masa branquial (FB) (a) y factor de masa de glándula digestiva (FGD) (b) de *Diplodon chilensis* alimentado con *Scenedesmus vacuolatus* (SV) o *Euglena gracilis* (EG) y expuesto durante 10 días a contaminación por efluentes cloacales en el río Pocahullo. S1: control, no contaminado; S2: aguas arriba de la descarga de efluentes con tratamiento terciario; S3: aguas abajo de la descarga de efluentes con tratamiento terciario. Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos individuales en (a). * indica $P < 0,05$ entres dietas (SV vs. EG) en (b).

IV- DISCUSIÓN

En este trabajo, se estudia, por primera vez, el efecto modulador de los β -glucanos sobre las respuestas inmunes, el balance oxidativo y la condición metabólica en individuos expuestos a contaminación por actividad antrópica, en particular, efluentes cloacales. La alimentación continua y a largo plazo con células liofilizadas de *E. gracilis* favorece las respuestas inmunes (actividad fagocítica, producción de EROs) y aumenta la resistencia al daño (estabilidad de la membrana lisosomal) en hemocitos de *D. chilensis*. Por otro lado, las respuestas enzimáticas (GST, CAT), el daño oxidativo, el contenido de proteínas y el factor de masa en branquia y en la glándula digestiva de almejas alimentadas con *E. gracilis*, se modulan de forma órgano-específica.

IV- A) Respuesta Celular y Citotoxicidad en Hemocitos

La respuesta inmune celular en invertebrados acuáticos puede ser modulada por diversos factores ambientales, tales como el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno

disuelto y de nutrientes nitrogenados (revisado por Ellis et al., 2011). Además, este tipo de respuestas son consideradas como primera línea de defensa en organismos expuestos a contaminantes de origen microbiológico (Galimany et al., 2008; revisado por Menna et al., 2013) y a sustancias orgánicas e inorgánicas (Parry y Pipe, 2004; Gagnaire et al., 2007; Gust et al., 2013).

En el presente trabajo, la actividad fagocítica en hemocitos de almejas de SV no muestra cambios luego de 10 días de exposición en el río Pocahullo. En el mejillón *M. edulis*, el incremento en esta respuesta se observa sólo luego de 14 días de exposición a efluentes municipales no tratados, dependiendo también de su concentración (Akaishi et al., 2007). Por el contrario, en *D. chilensis* alimentado previamente con *E. gracilis*, la actividad fagocítica es mayor, tanto en el sitio control como en los sitios contaminados, en comparación con almejas del grupo SV. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos para *D. chilensis* previamente alimentado con *E. gracilis* y expuesto a *E. coli* por 5 días (Capítulo III-A). En ambos casos, *E. gracilis* estimula la actividad fagocítica en hemocitos de almejas control y esta respuesta se mantiene al exponerlas, tanto a $2,4 \times 10^4$ células de *E. coli*/ 100 mL, como a concentraciones variables de contaminantes de origen cloacal.

El número de hemocitos totales en hemolinfa de *D. chilensis* disminuye igualitariamente tanto en almejas del grupo EG como en aquellas de SV, a medida que la carga contaminante aumenta en el agua del río Pocahullo. Este resultado concuerda con lo publicado por Akaishi et al. (2007) para *M. edulis* expuesto a concentraciones crecientes de efluentes no tratados, durante 7 días. Por el contrario, en los experimentos del Capítulo III-A, el número de hemocitos totales no fue alterado por la exposición bacteriana en ninguno de los grupos (SV, EG). Esto sugiere que el descenso en esta variable podría atribuirse a la presencia de otro tipo de contaminante (Qin et al., 2011); aunque, por otro lado, los tiempos de exposición (5 vs. 10 días) podrían no ser comparables. Como se discutió en el Capítulo III-A, otra explicación posible involucra la migración celular desde el sistema circulatorio hacia los tejidos en respuesta a la invasión por microorganismos (Oubella et al., 1994) y/o al posible daño tisular (Kádár et al., 2008; revisión de Bayne, 1983) ocasionado por la exposición a

tóxicos. Este proceso de movilización celular se reflejaría en la disminución del número total de células en hemolinfa de ambos grupos.

La producción de EROs en hemocitos responde tanto a la respuesta inmune activada como al producto del metabolismo de tóxicos presentes en el efluente (Lushchak, 2011; Yang et al., 2013). En ambos grupos dietarios de *D. chilensis*, se observa un aumento en la producción celular de EROs en respuesta al incremento de la carga contaminante a lo largo del río Pocahullo. La acción de estímulos microbiológicos bacterianos y fúngicos (Husmann et al., 2011), metales (Gómez-Mendikute y Cajaraville et al., 2003; Lushchak, 2011), fármacos (Nicosia et al., 2014) y condiciones de estrés fisiológico dadas por el incremento en la turbidez del agua, podrían estar repercutiendo en esta respuesta. Además, en el sitio más contaminado (S3) se destaca que el incremento en la generación de EROs es mayor en almejas del grupo EG que en aquellas de SV. Esto podría estar indicando una mayor capacidad de activación de la respuesta inmune o una mayor sensibilidad ante la situación de estrés producida por incremento en los niveles de contaminación. Por el contrario, en el Capítulo III-A, no se observó un efecto de la exposición bacteriana sobre la cantidad de EROs en ninguno de los grupos alimentados, aunque esta diferencia podría deberse a que estos estudios se realizaron en plasma y no en hemocitos. La capacidad antioxidante total no presentó variaciones a lo largo del río ni entre grupos dietarios, lo que indicaría que el aumento de los niveles de EROs no sería significativo como para producir un cambio en las defensas antioxidantes de los hemocitos.

La exposición a efluentes cloacales ha demostrado tener consecuencias deletéreas en hemocitos de bivalvos. La exposición a lixiviados de barros de tratamiento de desechos cloacales produce daño oxidativo en lípidos y efectos genotóxicos en *M. galloprovincialis*, luego de 4 días (Toufexi et al., 2013). Además, la exposición a ambientes contaminados por efluentes cloacales produce pérdida de viabilidad celular en *E. complanata* (Bouchard et al., 2009). Almejas alimentadas con *E. gracilis* y expuestas al sitio control en el río Pocahullo muestran una mayor estabilidad de la membrana lisosomal y una proporción mayor de hemocitos viables que las almejas del grupo SV. En los sitios contaminados, la estabilidad de la membrana lisosomal disminuye en ambos grupos, aunque se mantiene siempre más alta en

almejas del grupo EG comparadas con aquellas de SV. Esto supondría un efecto protector de la dieta con *E. gracilis* sobre la integridad celular de los hemocitos de *D. chilensis*. Sin embargo, en el sitio de mayor contaminación la viabilidad celular aumenta en almejas del grupo SV con respecto a su control en S1 y con respecto a almejas de EG en el mismo sitio. Estos resultados son difíciles de interpretar ya que un aumento de la viabilidad celular en almejas en respuesta a la contaminación, no se ha registrado en otra parte de este estudio ni tiene antecedentes en la literatura.

La disminución en el número de hemocitos en hemolinfa y la disminución en la viabilidad de los mismos en *D. chilensis* de ambos grupos, podría sugerir que la contaminación produce un estado de inmunodepresión. Sin embargo, en almejas alimentadas con *E. gracilis*, el incremento en la actividad fagocítica y la producción de EROs, podrían estar funcionando como mecanismos de compensación de esta respuesta, como lo sugieren Akaishi et al. (2007) para *M. edulis* expuesto a contaminación por efluentes cloacales. Este estado se reflejaría en los altos valores de estabilidad de la membrana lisosomal observados en almejas alimentadas con *E. gracilis*.

IV- D) Actividad Enzimática y Peroxidación Lipídica en Tejidos

En branquia de almejas del grupo EG trasplantadas a S1 se observa menor actividad GST, con mayores niveles de peroxidación lipídica, en comparación con almejas de SV. Por otro lado, en los sitios contaminados, aunque las actividades GST y CAT son menores en almejas de EG, el daño oxidativo a lípidos se mantiene más bajo que en almejas del grupo SV. Estos resultados podrían estar indicando la activación de otros mecanismos antioxidantes involucrados en el metabolismo de la branquia y favorecidos por la alimentación previa con *E. gracilis*. Sin embargo, en el Capítulo III-A, se observa una respuesta enzimática aumentada por la exposición a *E. coli* en almejas del grupo EG, comparado con el grupo no expuesto. Además, tanto las respuestas del grupo control como del grupo expuesto a *E. coli* son menores que las de sus correspondientes grupos de SV. Por lo que una explicación más probable sería, por un lado, la disminución general de la actividad metabólica en este órgano, producto de la

dieta y/o del efecto de trasplante, y por otro lado, un efecto de inhibición de las actividades enzimáticas ejercido por la exposición a contaminantes en el río Pocahullo.

En glándula digestiva, la alimentación con *E. gracilis* produce una disminución general de las actividades enzimáticas (GST, CAT), acompañada de un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, en los tres sitios de trasplante. Por el contrario, *D. chilensis* alimentado con *E. gracilis* y expuesto a *E. coli* en laboratorio (Capítulo III-A), muestra una actividad GST aumentada por la dieta y una respuesta significativa de GST y CAT ante el estímulo bacteriano. Estas diferencias sugieren un efecto del trasplante sobre el balance oxidativo de almejas del grupo EG, lo que lo haría más susceptible al daño oxidativo en estos órganos, tanto en condiciones control como en condiciones de exposición a efluentes cloacales. Además, se observa un efecto del sitio con una disminución general de las actividades enzimáticas en ambos grupos expuestos a los sitios contaminados y un aumento de la peroxidación lipídica, en comparación con el sitio control. Sin embargo, estos efectos son mayores en *D. chilensis* alimentado con *E. gracilis* que en almejas del grupo SV. Como se discutió en el Capítulo III-A, el aporte de paramilon y otros compuestos antioxidantes contenidos en las células de *E. gracilis*, podrían estar modulando negativamente la respuesta antioxidante intrínseca de branquia y glándula digestiva de *D. chilensis*. Por lo que la interrupción de esta dieta, implicaría un aumento de la susceptibilidad ante condiciones de estrés. Sin embargo, debe considerarse que el tiempo de exposición de las almejas en la cuenca del río Pocahullo fue el doble que el utilizado en los experimentos de exposición a *E. coli*, en el Capítulo III-A.

IV- E) Condición Metabólica

Se observa que la masa branquial (FB) cambia con el mismo patrón que los niveles de daño a lípidos, siendo más altos los valores de ambos parámetros en el grupo EG que en SV, en el sitio control y más bajas en EG que en SV en respuesta a la exposición a contaminación. Sin embargo, estos resultados contradicen aquellos obtenidos en el Capítulo III-A, donde el FB aumenta al exponer almejas del grupo EG a *E. coli*. Esto refuerza la idea de una disminución en la actividad metabólica en branquias de almejas alimentadas con *E. gracilis*, al

ser expuestas a condiciones de mayor estrés en el río contaminado o en respuesta a un tiempo de exposición más prolongado que el utilizado en la exposición a *E. coli*.

Por otro lado, el incremento en la masa de glándula digestiva (FGD) es favorecido por la dieta con *E. gracilis* para todos los sitios. Almejas alimentadas del grupo EG y expuestas a *E. coli* no muestran cambios en esta variable (Capítulo III-A). Sin embargo, la acción de los β -glucanos sobre la absorción de nutrientes en el sistema digestivo podría estar favoreciendo el aprovechamiento de la oferta alimentaria en el río Pocahullo, como sugieren Falco et al. (2012) para *C. carpio* alimentado con β - glucanos y expuesto a *A. salmonicida*. De esta manera, la alimentación con *E. gracilis* podría estar estimulando el crecimiento de la glándula digestiva y/o procesos de inflamación como producto del trasplante, aunque la cantidad de proteínas medidas en este órgano no presenta ninguna variación entre tratamientos.

V- CONCLUSIONES

- La alimentación continua y a largo plazo con *Euglena gracilis* favorece la respuesta inmune celular y protege a las hemocitos del daño ocasionado por la exposición a contaminación por efluentes cloacales, en *Diplodon chilensis*.

- La alimentación con *Euglena gracilis* modula las respuestas en branquia y glándula digestiva de *Diplodon chilensis* ante la exposición a contaminación por efluentes cloacales, de forma órgano-específica. En branquia, el balance oxidativo es favorecido por la dieta, mientras que en glándula digestiva, la alimentación con *E. gracilis* produce un aumento en la sensibilidad al estrés oxidativo.

- La condición metabólica es favorecida por la alimentación con *Euglena gracilis*, mediante el aumento en la masa de glándula digestiva bajo condiciones de trasplante y exposición a contaminación por efluentes cloacales.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN

- La almeja de agua dulce, *Diplodon chilensis*, aparece como un candidato de aplicación para el biomonitoreo de contaminación por efluentes cloacales a corto y largo plazo. Sin embargo, los biomarcadores bioquímicos a utilizar deberían ser seleccionados de acuerdo al tiempo de exposición propuesto y considerando los posibles efectos de estrés por trasplante.

- *Diplodon chilensis* modula sus respuestas fisiológicas ante la exposición crónica a contaminación por efluentes cloacales, evitando el daño a hemocitos; aunque, este tipo de exposición produce efectos deletéreos en branquia. Por otro lado, la capacidad filtradora y bioremediadora de contaminación bacteriana en agua y sedimentos permanece inalterada por la exposición crónica en esta almeja. Esto convierte a *D. chilensis* en un excelente candidato para ser implementado como herramienta de bioremediación en ambientes contaminados por efluentes cloacales, por largos periodos de tiempo.

- *Euglena gracilis*, administrada de forma prolongada y continua, favorece en cierta medida la respuesta inmune y la condición metabólica, evitando el daño a hemocitos en *Diplodon chilensis* expuesto a *Escherichia coli* y a ambientes contaminados por efluentes cloacales. Estos resultados implican la posibilidad de desarrollar un complemento dietario protector para almejas filtradoras utilizadas en estrategias de bioremediación de ambientes eutrofizados o contaminados por este tipo de efluentes. Sin embargo, se requiere un mayor estudio con respecto a la dosis y al tiempo de aplicación, en función de la posibilidad de disminuir los efectos adversos producidos por la dieta, ya que en las condiciones ensayadas, la alimentación con *E. gracilis* puede comprometer el balance oxidativo en branquia y glándula digestiva, en condiciones control y bajo condiciones de ayuno y trasplante.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Eisha A. Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:601-607.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984, 105, 121-126.
- Ahmad I, Coelho JP, Mohmood I, Pacheco M, Santos MA, Duarte AC, Pereira E. Immunosuppression in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* environmentally exposed to mercury and association with its accumulation. *Chemosphere* 2011; 82:1541-1546.
- Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabitto I da S, de Oliveira Ribeiro CA. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat Toxicol* 2007; 82:1-14.
- Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp Bioch Physiol B* 2007; 148:470-480.
- Albentosa M, Sánchez-Hernández M, Campillo JA, Moyano FJ. Relationship between physiological measurements (SFG -scope for growth-) and the functionality of the digestive gland in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Bioch Physiol A* 2012; 163 (3-4):286-295.
- Allam B, Paillard C, Auffret M. Alterations in Hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J Invertebr Pathol* 2000; 76:63-69.
- Almeida C, Soares F. Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): A 20 years of sanitary survey. *Mar Pollut Bull* 2012; 64: 252-262.
- Amado LL, Garcia L, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ribas Ferreira JL, Sarkis JY, Monserrat JM. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ*; 2009; 407:2115-2123.
- Anderson RS, Ozbay G, Kingsley DH, Strauss MA. Oyster hemocyte mobilization and increased adhesion activity after β -glucan administration. *J Shellfish Res* 2011; 30(3): 635-641.
- APHA, American Public Health Association. Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group. In *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th ed*; Clesceri L.S.; Greenberg A.E.; Eaton A.D., Eds; Madrid: Spain, 1998; section 9221.
- Auffret M, Rousseau S, Boutet I, Tanguya A, Baron J, Moraga D, Duchemin M. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotox and Environ Safe* 2006; 63:393-405.
- Ayllón F, Garcia-Vazquez E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotox Environ Safe* 2001; 49:221-225.
- Azzurro E, Matiddi M, Fanelli E, Guidetti P, La Mesa G, Scarpato A, Axiak V. Sewage pollution impact on Mediterranean rocky-reef fish assemblages. *Mar Environ Res* 2010; 69:390-397.
- Bai N, Zhang W, Mai K, Wang X, Xu W, Ma H. Effects of discontinuous administration of β -glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 2010; 306: 218-224.
- Bainy ACD, Almeida EA, Müller IC, Ventura EC, Medeiros ID. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar Environ Res* 2000; 50: 411-416.

- Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 1997; 212 (2):149-172.
- Barsanti L, Vismara R, Passarelli V, Gualtieri P. Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J Appl Phycol* 2001; 13: 59-65.
- Basanta KD, Pradhan J, Sahu S. The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shellfish Immunol* 2009; 26: 871-876.
- Bayne BL. Molluscan Immunobiology. In: *The Mollusca*, vol. 5. Academic Press, Inc. Physiology Part 2 1983, pp 407-486.
- Bayne BL. Measuring the effects of pollution at the cellular and organism level. *The Role of the Oceans as a Waste Disposal Option* 1986, 172: 617-634.
- Bergayou H, Mouneyrac C, Pellerin J, Moukrim A. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). *Ecotox Environ Safe* 2009; 72: 765-769.
- Bertin A, Inostroza PA, Quiñones RA. Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. *Mar Pollut Bull* 2011; 62:1530-1537.
- Bidhan CD, Meena DK, Behera BK, Das P, Das Mohapatra PK, Sharma AP. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiol Biochem* 2014; 40: 921-971.
- Bigot A, Vasseur P, Rodius F. SOD and CAT cDNA cloning, and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river. *Ecotoxicology* 2010; 19: 369-376.
- Birkbeck TH, McHenry JG. Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 1982; 72, 7-15.
- Bischoff HW, Bold HC. Some soil algae from Enchanted Rock and related algae species. *Phycol Stud* 1963; 6318: 1-95.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-917.
- Bocchetti R, Regoli F. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 2006, 65, 913-921.
- Bogan A, Cummings K. *Diplodon chilensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2; 2011. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 January 2014.
- Bohn JA, BeMiller JN. (1-4)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr Polym* 1995; 28: 3-14.
- Bonetto AA. Nayades de la Patagonia. *Rev Asoc Cienc Nat Litoral* 1973; 4: 117-185.
- Bouchard B, Gagné F, Fortier M, Fournier M. An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem and Phys C* 2009; 150:132-140.
- Bowes MJ, Smith JT, Jarvie HP, Neal C, Barden R. Changes in point and diffuse source phosphorus inputs to the River Frome (Dorset, UK) from 1966 to 2006. *Sci Total Environ* 2009; 407: 1954-1966.

- Box A, Sureda A, Galgani F, Pons A, Deudero S. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol C* 2007; 146 (4): 531-539.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Burkhard MJ, Leavell S, Weiss RB, Kuehnl K, Valentine H, Watters GT, Wolfe BA. Analysis and cytologic characterization of hemocytes from freshwater mussels (*Quadrula sp.*). *Vet Clin Pathol* 2009; 38(4):426-436.
- Butt D, Aladaileh S, O'Connor WA, Raftos DA. Effect of starvation on biological factors related to immunological defence in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 2007; 264: 82-91.
- Cabral JP. Water microbiology, bacterial pathogens and water. *Int. J Environ Res Public Health* 2010; 7 (10): 3657-3703.
- Calabretta CJ, Oviatt CA. The response of benthic macrofauna to anthropogenic stress in Narragansett Bay, Rhode Island: A review of human stressors and assessment of community conditions. *Mar Pollut Bull* 2008; 56: 1680-1695.
- Campos A, Vasconcelos V. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 268-287.
- Camus L, Pampanin DM, Volpato E, Delaney E, Sanni S, Nasci C. Total oxyradical scavenging capacity responses in *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the Venice lagoon (Italy) to measure the biological impact of anthropogenic activities. *Marine Poll Bull* 2004; 49, 801-808.
- Canesi L, Betti M, Ciacci C, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, Gallo G. Signaling pathways involving in the physiological response of mussels hemocytes to the bacterial challenge: the role of stress activated p-38 MAP kinases. *De Comp Immunol* 2002; 26: 325-334.
- Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Regoli F, Poiana G, Gallo G, Marcomini A. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 2007; 69:994-1002.
- Canesi L, Pruzzo C, Tarsi R, Gallo Gabriella. Surface Interactions between *Escherichia coli* and Hemocytes of the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Leading to Efficient Bacterial Clearance. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(1): 464-468.
- Carballal MJ, López C, Azevedo C, Villalba A. Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 1997; 70: 96-105.
- Carmichael WW, An J. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat Toxins* 1999; 7: 377-385.
- Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Mancari F, Genovese L, Maricchiolo G. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Marine Environmental Research* 2011; 72: 46-52.
- Çavas T, Ergene-Gözükara S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat Res* 2003; 538:81-91.

- Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 2004; 84: 1-39.
- Chakraborty S, Ray M, Ray S. Toxicity of sodium arsenite in the gill of an economically important mollusc of India. *Fish Shellfish Immun* 2010; 29 (1): 136-148.
- Chance B. Special methods: Catalase. En: Glick R (ed). *Methods of Biochemical Analysis*. New York: Wiley-Interscience, 408-424, 1954.
- Chícharo LMZ, Chícharo MA, Alves F, Amaral A, Pereira A, Regala J. Diel variation of the RNArDNA ratios in *Crassostrea angulata* (Lamarck) and *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758), Mollusca: Bivalvia. *J Exp Mar Biol Ecol* 2001; 259: 121-129.
- Ciacchi C, Betti M, Canonico B, Citterio B, Roch P, Canesi L. Specificity of anti-Vibrio immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 2010; 105: 49-55.
- Ciacchi C, Citterio B, Betti M, Canonico B, Roch P, Canesi L. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp Biochem Physiol B* 2009; 153: 365-371.
- Cloern JE. Does the benthos control phytoplankton biomass in south San Francisco Bay. *Mar Ecol Progr Ser* 1982; 9, 191-202.
- Coles JA, Pipe RK. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol*. 1994; 4: 337-352.
- Contardo-Jara V, Galanti LN, Amé MV, Monferrán MV, Wunderlin DA, Wiegand C. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Limnoperna fortunei* detect site impact in water courses of Córdoba, Argentina. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72:1871-1880.
- Contardo-Jara V, Wiegand C. Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. *Environ Pollut* 2008; 182-189.
- Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol Environ Safety* 2000; 45:106-121.
- Costa MM, Novoa B, Figueras A. Influence of β -glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish Shellfish Immunol* 2008; 24, 498-505.
- Costa MM, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roch P, Novoa B, Figueras A. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish & Shellfish Immun* 2009; 26:515-523.
- Costa PM, Carreira S, Costa MH, Caeiro S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat Toxicol* 2013; 126:442-454.
- Culbertson JB, Valiela I, Olsen YS, Reddy CM. Effect of field exposure to 38-year-old residual petroleum hydrocarbons on growth, condition index, and filtration rate of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Environ Pollut* 2008; 154: 312-319.
- Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). Catalogue of strains. In: Thompson, A.S., Rhodes, J.C., Pettman, I. (Eds.). *Culture Collection of Algae and Protozoa*, Cumbria, Natural Environment Research Council, 1988; 19.

- Dalmo RA, Bøggwald J. β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25: 384-396.
- Danellakis D, Ntaikou Ioanna, Kornaros M, Dailianis S. Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 2011; 101:358-366.
- Das BK, Pradhan J, Sahu S. The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shellfish Immunol* 2009; 26:871-876.
- de Montaudouin X, Paul-Pont I, Lambert C, Gonzalez P, Raymond N, Jude F, Legeay A, Baudrimont M, Dang C, Le Grand F, Le Goïc N, Bourasseau L, Paillard C. Bivalve population health: Multistress to identify hot spots. *Mar Pollut Bull* 2010; 60:1307-1318.
- Depledge M, Fossi M. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates Ecotoxicology* 1994; 3: 161-172.
- Diniz MS, Peres TI, Pihan JC. Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. *Sci Total Environ* 2005; 349: 129-139.
- Djordjevic B, Škugor S, Jørgensen SM, Øverland M, Mydland LT, Krasnov A. Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes*. *Fish Shellfish Immunol* 2009; 26: 201-209.
- Donaghy L, Lambert C, Choi K-S, Soudant P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 2009; 297:10-24.
- Dutertre M, Barillé L, Haure J, Cognie B. Functional responses associated with pallial organ variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J Exp Mar Biol Ecol* 2007; 352 (1): 139-151.
- Edelberg, C. Calidad del curso de agua superficial de la cuenca del arroyo Pocahullo. Tesis de Licenciatura. Universidad CAECE 2004.
- Ellis J, Cummings V, Hewitt J, Thrush S, Norkko A. Determining effects of suspended sediment on condition of a suspension feeding bivalve (*Atrina zelandica*): results of a survey, a laboratory experiment and a field transplant experiment. *J Exp Mar Biol Ecol* 2002; 267:147-174.
- Ellis RP, Parry H, Spicer JJ, Hutchinson TH, Pipe RK, Widdicombe S. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol* 2011; 30: 1209-1222.
- Falco A, Frost P, Miest J, Pionnier N, Irnazarow I, Hoole D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 32: 1051-1057.
- Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Farkas A, Vehovszky Á, Gyori J, Stoliar OB. Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country. *Chemosphere* 2010; 81:1342-1351.
- Farcy E, Gagné F, Martel L, Fortier M, Trépanier S, Brousseau P, Fournier M. Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environ Res* 2011; 111:1096-1106.

- Faria M, López MA, Díez S, Barata C. Are native naiads more tolerant to pollution than exotic freshwater bivalve species? An hypothesis tested using physiological responses of three species transplanted to mercury contaminated sites in the Ebro River (NE, Spain). *Chemosphere* 2010; 81: 1218-1226.
- Fathallah S, Medhioub MN, Medhioub A, Boussetta H. Biochemical indices (RNA/DNA ratio and protein content) in studying the nutritional status of *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) juveniles. *Aquac Res* 2010; 42: 139-146.
- Feng SY. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am Fish Soc Spec Publ* 1988; 18: 153-168.
- Fernández-Reiriz MJ, Navarro JM, Contreras AM, Labarta U. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat Toxicol* 2008; 87 (4) 245-251.
- Ferreira A, Dolder H. Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochem* 2003; 105: 339-352.
- Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices. Characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 155-161.
- Franzellitti S, Buratti S, Donnini F, Fabbri E. Exposure of mussels to a polluted environment: Insights into the stress syndrome development. *Comp Biochem Physiol C* 2010; 152: 24-33.
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J-Y, Saulnier D, Renault T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol* 2007; 84:92-102.
- Gagné F, Blaise C, Hellou J. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comp Biochem Physiol C* 2004; 138: 33-44.
- Gagné F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp Biochem Physiol C* 2006; 143:179-186.
- Gagné F, André C, Cejka P, Hausler R, Fournier M, Blaise C. Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: A pilot plant study. *Ecotox Environ Safe* 2008; 69:366-373.
- Gagné F, André C, Cejka P, Hausler R, Fournier M. Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. *Comp Biochem Physiol C* 2011; 154:100-107.
- Gagné F, André C, Fortier M, Fournier M. Immunotoxic potential of aeration lagoon effluents for the treatment of domestic and hospital wastewaters in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *J Environ Sciences* 2012, 24:781-789.
- Garcia-Garcia E, Galindo-Villegas J, Mulero V. Mucosal immunity in the gut: The non-vertebrate perspective. *De Comp Immunol* 2013; 40: 278-288.
- Gatlin DM III, Li P. Dietary supplementation of prebiotics for health management of hybrid striped bass morone chrysops x *M. saxatilis*. *Aqua Feeds Formul Beyond* 2004; 1(4):19-21.
- Gauthier L, Tardy E, Mouchet F, Marty J. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Sci Total Environ* 2004; 323: 47-61.

- Giese EC, Gascon J, Anzelmo G, Barbosa AM, da Cunha MA, Dekker RF. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. *Int J Biol Macromol* 2014; 12; 72C:125-130.
- Gifford S, Dunstan RH, O'Connor W, Roberts T, Toia R. Pearl aquaculture-profitable environmental remediation?. *Sci Total Environ* 2004; 319: 27-37.
- Gifford S, Dunstan RH, O'Connor W, Koller CE, MacFarlane GR. Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends Biotechnol* 2006; 25 (2): 60-65.
- Gillis PL. Cumulative impacts of urban runoff and municipal wastewater effluents on wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*). *Sci Total Environ* 2012; 431: 348-356.
- Gómez-Mendikute A, Cajaraville MP. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol in Vitro* 2003; 17: 539-546.
- Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagné F. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 2013; 126:393-403.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- Haven DS, Morales-Alamo R. Biodeposition as a factor in sedimentation of fine suspended solids in estuaries. *Geol Soc Am Mem* 1972; 133: 121-130.
- Hayashi M, Toda K, Yoneji T, Sato O, Shozaburo K. Dietary value of rotifers and Artemia enriched with *Euglena gracilis* for red sea bream. *Nippon Suisan Gakk* 1993; 59: 1051-1058.
- Hégaret H, Wikfors GH, Soudant P, Delaporte M, Alix JH, Smith BC, Dixon MS, Quérec C, Le Coz JR, Paillard C, Moal J, Samain J-F. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 2004; 234:541-560.
- Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Romeo M, Girard JP. Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. *Environ Toxicol Chem* 2001; 20 (3): 523-9.
- Höher N, Köhler A, Strand J, Broeg K. Effects of various pollutant mixtures on immune responses of the blue mussel (*Mytilus edulis*) collected at a salinity gradient in Danish coastal waters. *Mar Environ Res* 2012; 75:35-44.
- Hong X-T, Xiang L-X, Shao J-Z. The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 21:357-364.
- Hualde P. Monitoreo anual de la ictiofauna en el embalse Piedra del Aguila. Informe final mecanografiado. CEAN-Hidroeléctrica Piedra del Aguila 1999.
- Husmann G, Philipp EER, Rosenstiel P, Vazquez S, Abele D. Immune response of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to physical stress and microbial exposure. *J Exp Marine Biol Ecol* 2011; 398 (1-2): 83-90.
- Husmann G, Abele D, Rosenstiel P, Clark MS, Kraemer L, Philipp EER. Age-dependent expression of stress and antimicrobial genes in the hemocytes and siphon tissue of the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*, exposed to injury and starvation. *Cell Stress Chaperon* 2014; 19:15-32.
- Itoh N, Okada Y, Takahashi KG, Osada M. Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 2010; 29 (1):126-35.

- Izquierdo JI, Machado G, Ayllon F, d'Amico VL, Bala LO, Vallarino E, Elias R, Garcia-Vazquez E. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the Mussel *Mytilus edulis*. *Ecotox Environ Safety* 2003; 55: 24-29.
- Ji C, Wu H, Wei L, Zhao J, Wang Q, Lu H. Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics. *Fish Shellfish Immunol* 2013; 35: 489-498.
- Jollès J, Fiala-Médioni A, Jollès P. The ruminant digestive model using bacteria already employed early in evolution by symbiotic mollusks. *J Mol Evol* 1996; 43: 525-527.
- Jones AB, Dennison WC, Preston NP. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture* 2001; 193:155-178.
- Juhel G, Davenport J, O'Halloran J, Culloty SC, O'Riordan RM, James KF, Furey A, Allis O. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. *Aquat Toxicol* 2006; 79:391-400.
- Kádár E. Haemocyte response associated with induction of shell regeneration in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2008; 362: 71-78.
- Kerambrun E, Henry F, Marechal A, Sanchez W, Minier C, Filipuci I, Amara R. A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotox Environ Safe* 2012; 80: 45-53.
- Kiss JZ, Vasconcelos AC, Triemer RE. The intramembrane particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (Euglenophyceae). *J Phycol* 1988; 24: 152-157.
- Kjeldahl, JZ. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Anal Chem* 1883; 22: 366.
- Kogan G. (1→ 3,1→ 6)-β-D-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Stud Nat Prod Chem* 2000; 23: 107-152.
- Kogan G. (1-3, 1-6)-β-D- Glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry* 2000, 23: 107-152.
- Kuchel RP, McCarthy A, Raftos DA. Phenoloxidase activity as an indicator of stress in the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Aquaculture* 2012; 364-365 224-229.
- Kuchel RP, Raftos DA, Nair S. Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricata*. *Fish Shellfish Immun* 2010; 29:930-936.
- Kusmic C, Barsacchi R, Barsanti L, Gualtieri P, Passarelli V. *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild type strain and in the natural mutant WZSL. *J Appl Phycol* 1999; 10: 555-559.
- Lara G, Parada E, Peredo S. Alimentación y conducta alimentaria de la almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (BIVALVIA: HYRIIDAE). *Gayana* 2002a; 66(2):107-112.
- Lara G, Contreras A, Encina F. La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia, Hyriidae) potencial biofiltro para disminuir los niveles de coliformes en pozos. Experimentos de laboratorio. *Gayana* 2002b; 66:113-118.
- Lau PS, Wong HL, Garrigues Ph. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *Cont Shelf Res* 2004; 24: 1969-1987.

- Lesser MP, Bailey MA, Merselis DG, Morrison JR. Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comp Biochem Physiol A* 2010; 156: 541-551.
- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 1987; 148:350-382.
- Lin T, Xing J, Jiang J, Tang X, Zhan W. β -glucan-stimulated activation of six enzymes in the haemocytes of the scallop *Chlamys farreri* at different water temperatures. *Aquaculture* 2011; 315 : 213-21.
- Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 2001; 42 (8): 656-666.
- Lopez N, Cuzon G, Gaxiola G, Taboada G, Valenzuela M, Pascual C, Sanchez A, Rosas C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β -1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 2003; 224: 223-243.
- Lu GH, Ji Y, Zhang HZ, Wu H, Qin J, Wang C. Active biomonitoring of complex pollution in Taihu Lake with *Carassius auratus*. *Chemosphere* 2010; 79: 588-594.
- Lundström E, Björleinius B, Brinkmann M, Hollert H, Persson J-O, Breitholtz M. Comparison of six sewage effluents treated with different treatment technologies-Population level responses in the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquat Toxicol* 2010; 96:298-307.
- Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 2011; 101:13-30.
- Machado-Schiaffino G, Bala LO, Garcia-Vazquez E. Recovery of normal cytogenetic records in mussels after cessation of pollutant effluents in Puerto Madryn (Patagonia, Argentina). *Estuar Coast* 2009; 32 (4), 813-818.
- Mahmoud N, Dellali M, El Bour M, Aissa P, Mahmoudi E. The use of *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardiidae) in the biomonitoring of Bizerta lagoon: A mutimarkers approach. *Ecol Indic* 2010; 10: 696-702.
- Makhrov A, Bespalaya J, Bolotov I, Vikhrev I, Gofarov M, Alekseeva Y, Zotin A. Historical geography of pearl harvesting and current status of populations of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L.) in the western part of Northern European Russia. *Hydrobiologia* 2014; 735: 149-159.
- Mamaca E, Bechmann RK, Torgrimsen S, Endre Aas, Bjørnstad A, Baussant T, Le Floch S. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquat Toxicol* 2005; 75:191-201.
- Mani S, Lawson J. In vitro modulation of inflammatory cytokine and IgG levels by extracts of *Perna canaliculus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6 (1): 1-15.
- Marques Souza DS, Dores Ramos AP, Flores Nunes F, MorescoV, Taniguchi S, Guiguet DA, et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical and chemical parameters. *Ecotox Environ Safe* 2012; 76:153-161.
- Matozzo V, Giacomazzo M, Finos L, Marin MG, Bargelloni L, Milan M. Can ecological history influence immunomarker responses and antioxidant enzyme activities in bivalves that have been experimentally exposed to contaminants? A new subject for discussion in “eco-immunology” studies. *Fish Shellfish Immun* 2013; 35 (1):126-135.

- Matsumoto T, Inui H, Miyatake K, Nakano Y, Murakami K. Comparison of nutrients in *Euglena* with those in other representative food sources. *Eco-Engineering* 2009; 21(2): 81-86.
- Mauch F, Dudler R. Differential Induction of Distinct Glutathione-S-Transferases of Wheat by Xenobiotics and by Pathogen Attack. *Plant Physiol* 1993; 102: 1193-1201.
- McHenery JG, Birkbeck TH, Allen JA. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp Biochem Physiol B* 1979; 63 (1): 25-28.
- Meena DK, Das P, Kumar S, Mandal SC, Prusty AK, Singh SK, Akhtar MS, Behera BK, Kumar K, Pal AK, Mukherjee SC. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol Biochem* 2013; 39: 431-457.
- Miserendino ML, Casaux R, Archangelsky M, Di Prinzio CY, Brand C, Kutschker AM. Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. *Sci Total Environ* 2011; 409:612-624.
- Misra C, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture* 2006; 255: 82-94.
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Salzet M, Roch P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem* 2000; 275: 12954-12962.
- Moles A, Hale N. Use of physiological responses in *Mytilus trossulus* as integrative bioindicators of sewage pollution. *Mar Pollut Bull* 2003; 46: 954-958.
- Mosca F, Tiscar PG. Defense Mechanisms in Farmed Marine Molluscs. *Vet Res Comm* 2004; 28: 57-62.
- Moss B, Allam B. Fluorometric measurement of oxidative burst in lobster hemocytes and inhibiting effect of pathogenic bacteria and hypoxia. *J Shellfish Res* 2006; 25 (3):1051-1057.
- Mouneyrac C, Linot S, Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Métais I, Durou C, Minier C, Pellerin J. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *General and Comparative Endocrinology* 2008; 157:133-133.
- Moynihan MA, Baker DM, Mmochi AJ. Isotopic and microbial indicators of sewage pollution from Stone Town, Zanzibar, Tanzania. *Mar Pollut Bull* 2012; 64:1348-1355.
- Murakami T, Ogawa H, Hayashi M, Yoshizumi H. Effect of *Euglena* cells on blood pressure, cerebral peripheral vascular changes and life-span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 1998; 41: 115-125.
- Nicholson S, Lam PKS. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environ Int* 2005; 31: 121-132.
- Nicosia A, Celi M, Vazzana M, Damiano MA, Parrinello N, D'Agostino F, Avellone G, Indelicato S, Salvatore M, Cuttitta A. Profiling the physiological and molecular response to sulfonamidic drug in *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol C* 2014; 166: 14-23.
- Nikapitiya C, De Zoysa M, Lee J. Molecular characterization and gene expression analysis of a pattern recognition protein from disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25 (5): 638-647.
- Norkko J, Norkko A, Thrush SF, Cummings VJ. Detecting growth under environmental extremes: Spatial and temporal patterns in nucleic acid ratios in two Antarctic bivalves. *J Exp Mar Biol Ecol* 2005; 326: 144- 156.

- Olsen QM, Nilsen IW, Sletten K, Myrnes B: Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003; 136: 107-115.
- Oubella R, Paillard C, Maes P., Auffret M. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *J Invertebr Pathol* 1994; 64: 33-38.
- Parada E, Peredo S, Cárdenas S, Valdebenito I, Peredo M. *Diplodon chilensis* Gray, 1828 (bivalvia: mytilidae) a potential residual waters depurator on inland water salmonid fishfarms: a laboratory scale study. *Gayana* 2008; 72(1): 68-78.
- Parolini M, Binelli A, Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the fresh water bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotox Environ Safe* 2011; 74: 1586-1594.
- Parry HE, Pipe RK. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat Toxicol* 2004; 69: 311-325.
- Pedrozo F, Chillrud S, Temporetti P, Díaz M. Chemical composition and nutrient limitation in rivers and lakes of northern Patagonian Andes (39.5°-42.9°S; 71°-73°W) (Rep. Argentina). *Int Ver Theor Angew Limnol Verh* 1993; 25, 207-214.
- Penha-Lopes Gil, Torres P, Cannicci S, Narciso L, Paula J. Monitoring anthropogenic sewage pollution on mangrove creeks in southern Mozambique: A test of *Palaemon concinnus* Dana, 1852 (Palaemonidae) as a biological indicator. *Environ Pollut* 2011; 159:636-645.
- Peredo S, Parada E. Gonadal organization and gametogenesis in the fresh-water mussel *Diplodon chilensis chilensis* (Mollusca: Bivalvia). *Veliger* 1984; 27(2): 126-133.
- Peredo S, Parada E. Reproductive cycle in the freshwaters mussel *Diplodon chilensis chilensis* (Mollusca: Bivalvia). *Veliger* 1986; 28 (4): 418-425.
- Perrigault M, Allam B. Differential immune response in the hard clam (*Mercenaria mercenaria*) against bacteria and the protistan pathogen QPX (quahog parasite unknown). *Fish & Shellfish Immunol* 2012; 32:1124-1134.
- Pipe RK. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol* 1993, 16, 111-122.
- Pipe RK, Coles JA. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks. *Fish Shellfish Immunol* 1995; 5: 581-595.
- Pottinger TG, Cook A, Jürgens MD, Rhodes G, Katsiadaki I, Balaam JL, Smith AJ, Matthiessen P. Effects of sewage effluent remediation on body size, somatic RNA: DNA ratio, and markers of chemical exposure in three-spined sticklebacks. *Environ Int* 2011; 37: 158-169.
- Prado-Alvarez M, Romero A, Balseiro P, Dios S, Novoa B, Figueras A. Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 32: 69-78.
- Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal* 2010; 9: 54.
- Rasband W. ImageJ 1.48j. National Institutes of Health USA.
- Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int Rev Cytol* 1985; 97, 183-350.
- Regoli F, Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat Toxicol* 1995; 31 (2): 143-164.

- Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 2000; 50:351-361.
- Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Machella N, Bocchetti R, Benedetti M, Piva F. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ Health Persp* 2006; 114(1): 63-69.
- Ren HL, Xu DD, Gopalakrishnan S, Qiao K, Huang WB, Wang KJ.. Gene cloning of a sigma class glutathione S-transferase from abalone (*Haliotis diversicolor*) and expression analysis upon bacterial challenge. *Dev Comp Immunol* 2009; 33; (9): 980-990.
- Ribeiro Guevara S, Arribére M, Bubach D, Vigliano P, Rizzo A, Alonso M, Sánchez R. Silver contamination on abiotic and biotic compartments of Nahuel Huapi National Park lakes, Patagonia, Argentina. *Sci Total Environ* 2005; 336, 119-134.
- Rivera-Ingraham GA, Rocchetta I, Meyer S, Abele D. Oxygen radical formation in anoxic transgression and anoxiareoxygenation: Foe or phantom? Experiments with a hypoxia tolerant bivalve. *Mar Environ Res* 2013; 92: 110-119.
- Rocchetta I, Mazzuca M, Conforti V, Balzaretto V, Ríos de Molina MC. Chromium induced stress conditions in heterotrophic and auxotrophic strains of *Euglena gracilis*. *Ecotox Environ Safe* 2012; 84: 147-154.
- Rocchetta I, Pasquevich MY, Heras H, Ríos de Molina MC, Luquet CM. Effects of sewage discharges on lipid and fatty acid composition of the Patagonian bivalve *Diplodon chilensis*. *Mar Pollut Bull* 2014a; 79 (1-2): 211-219.
- Rocchetta I, Lomovasky B, Yusseppone MS, Sabatini SE, Bieczynski F, Ríos de Molina MC, Luquet CM. Growth, abundance, morphometric and metabolic parameters of three populations of freshwater bivalve subject to different levels of natural and anthropogenic organic matter input in a glacial lake of North Patagonia. *Limnologia* 2014b; 44: 72-80.
- Rocchetta I, Yusseppone MS, Albrecht C, Luquet CM, Brey T, Frickenhaus S, Held C, Abele D. Environmental conditions shape molluscan lifespan: comparing markers of cellular fitness and aging in two populations of the freshwater bivalve *Diplodon chilensis*. In 7th Congress of the European Malacological Societies. (White, T.S., ed), University of Cambridge, Cambridge, UK, 2014c.
- Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotox Environ Safe* 2003; 56: 442-448.
- Roitt I, Delves P. *Inmunología: fundamentos*, 10ma Edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 2003.
- Romero-Geraldo RJ, García-Lagunas N, Hernández-Saavedra NY. Effects of In Vitro Exposure to Diarrheic Toxin Producer *Prorocentrum lima* on Gene Expressions Related to Cell Cycle Regulation and Immune Response in *Crassostrea gigas*. *PLOS ONE* 2014; 9 (5): e97181 1-9.
- Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods* 2002; 49: 31-54.
- Ruuhijärvi J, Rask M, Vesala S, Westermarck A, Olin M, Keskitalo J, Lehtovaara A. Recovery of the fish community and changes in the lower trophic levels in a eutrophic lake after a winter kill of fish. *Hydrobiologia* 2010; 646: 145-158.
- Sabatini SE, Brena BM, Luquet CM, San Julian M, Pirez M, Ríos de Molina MC. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis* patagonicus

- upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotox Environ Safe* 2011a; 74 (5): 1188-1194.
- Sabatini SE, Rocchetta I, Luquet CM, Guido MI and Ríos de Molina MC. Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologica* 2011b; 41: 356-362.
- Sabatini SE, Rocchetta I, Nahabedian DE, Luquet CM, Eppis MR, Bianchi L, Ríos de Molina MC. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comp Biochem Physiol C* 2011c; 154: 391-398.
- Sant'Anna Rios F, Carvalho CS, Pinheiro GHD, Donatti L, Fernandes MN, Tadeu Rantin F. Utilization of endogenous reserves and effects of starvation on the health of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). *Environ Biol Fish* 2011, 91: 87-94.
- Sara G, Reid GK, Rinaldi A, Palmeri V, Troell M, Kooijman SALM. Growth and reproductive simulation of candidates hell fish species at fish cages in the Southern Mediterranean: dynamic Energy Budget (DEB) modelling for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 2012; 324-325: 259-326.
- Schmitt P, Rosa RD, Duperthuy M, de Lorgeril J, Bachèreand E, Destoumieux-Garzón D. The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. *Front Microbiol*; 2012; 3: 1-17.
- Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of b-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 15-24.
- Serafim A, Company R, Lopes B, Fonseca VF, Fran S, Vasconcelos RP, Bebianno MJ, Cabral HN. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecol Indic* 2012; 19: 215-225.
- Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Antioxidant Role of Glutathione S-transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6 (2): 289-300.
- Sheir SK, Handy RD, Galloway TS. Tissue injury and cellular immune responses to mercuric chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: Modulation by lipopolysaccharides. *Ecotox Environ Safe* 2010; 73: 1338-1344.
- Skov J, Per Kania W, H-A Lars a, Fouz B, Buchmann K. Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 33: 111-120.
- Smolders R, Bervoets L, De Coen W, Blust R. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ Pollut* 2004; 129: 99-112
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res* 2012; 79:1-15.
- Sollid J, De Angelis P, Gundersen K, Nilsson GE. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J Exp Biol* 2003; 206:3667-3673.
- Song SK, Beck BR, Kim D, Park J, Kim J, Kim HD, Ringø E. Probiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol* 2014; 40: 40-48.

- Soto D, Mena G. Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture* 1999; 171:65-81.
- Stabili L, Terlizzi A, Cavallo RA. Sewage-exposed marine invertebrates: survival rates and microbiological accumulation. *Environ Sci Pollut Res* 2013; 20:1606-1616.
- Suqiya A, Suzuki K, Mitra S, Arashida R, Yoshida E, Nakano R, Yabuta Y, Takeuchi T. Hepatoprotective effects of paramylon, a beta-1, 3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z, on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *J Vet Med Sci* 2009; 71(7): 885-90.
- Tafalla C, Gómez-León J, Novoa B, Figueras A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *De Comp Immunol* 2003; 27: 197-205.
- Takeuchi T. Laboratory work. Chemical evaluation of dietary nutrients. Fish nutrition and mariculture, Ed. por T Watanabe. JICA, 1988.
- Takeyama H, Kanamaru A, Yoshino Y, Kakuta H, Kawamura Y, Matsunaga T. Production of antioxidant vitamins, beta-carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnol Bioeng* 1997; 20 (2): 185-90.
- Temporetti P, Baffico G, Diaz M, Pedrozo F. Estado trófico del lago Lacar y del arroyo Pocahullo. Influencia de la descarga de líquidos cloacales en la cuenca oriental del lago. Technical report: Un puente entre la Universidad y la Sociedad. Secretaría de Políticas Universitarias, Ministerio de Educación Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional del Comahue, Argentina, 2009.
- Tett P, Kelly MG, Hornberger G M. Estimation of chlorophyll a and pheophytin a in methanol. *Limnol Oceanogr* 1977; 22: 579-580.
- Tian S, Pan L, Zhang H. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression modulation following exposure to benzo[a]pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. *Mar Environ Res* 2014; 94: 7-15.
- Tolivia A, Conforti V, Córdoba O, Flores L. Chemical constituents and biological activity of *Euglena gracilis* extracts. *JPR* 2013; 7: 209-214.
- Torreilles J, Gubrin M-C, Roth P. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *De Comp Immunol* 1997; 21(3): 267-275.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9º Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina, 2007.
- Toufexi E, Tsarpali V, Efthimiou I, Vidali M-S, Vlastos D, Dailianis S. Environmental and human risk assessment of landfill leachate: An integrated approach with the use of cytotoxic and genotoxic stress indices in mussel and human cells. *J Hazard Mater* 2013; 260: 593-601.
- Tsangaris C, Kormas K, Stroglyoudi E, Hatzianestis I, Neofitou C, Andral B, Galgani F. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp Biochem Physiol C* 2010; 151: 369-378.
- Tsarpali V, Dailianis S. Investigation of landfill leachate toxic potency: An integrated approach with the use of stress indices in tissues of mussels. *Aquat Toxicol* 2012; 124- 125:58-65.
- Tsung-Meng W, Yuan-Ting H, Ming-Shiuan S, Yi-Ting H, Tse-Min L. Expression of genes involved in redox homeostasis and antioxidant defense in a marine macroalga *Ulva fasciata* by excess copper. *Aquat Toxicol* 2009; 94: 275-285.
- Valdovinos C, Pedreros P. Geographic variations in shell growth rates of the mussel *Diplodon chilensis* from temperate lakes of Chile: Implications for biodiversity conservation. *Limnologica* 2007; 37: 63-75.

- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003; 13 (2): 57-149.
- van Dijk PLM, Hardewig I, Hölker F. Energy reserves during food deprivation and compensatory growth in juvenile roach: the importance of season and temperature. *J Fish Biol* 2005; 66: 167-181.
- Van Handel E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Bioch* 1965; 11: 256-265.
- Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Soderhall K. A plasma protein isolated from brown shrimp *Penaeus californiensis*, which enhances the activation of prophenoloxidase system by b-1,3-glucan. *Dev Comp Immunol* 1996; 20: 299-306.
- Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol C* 2007; 146 (3): 281-300.
- Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 327-347.
- Vincie ME. Development of a suitable diet for endangered juvenile oyster mussels, *Epioblasma capsaeformis* (bivalvia: unionidae), reared in a captive environment. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Fisheries and Wildlife, 2008, Blacksburg, VA.
- Vismara R, Vestri S, Frassanito AM, Barsanti L, Gualtieri P. Stress resistance induced by paramylon treatment in *Artemia sp.* *J Appl Phycol* 2004; 16: 61-67.
- Waldner LL, MacKenzie KD, Köster W, White AP. From exit to entry: Long-term survival and transmission of Salmonella. *Pathogens* 2012; 1: 128-155.
- Wang X, Wang L, Zhang H, Ji Q, Song L, Qiu L, Zhou Z, Wang M, Wang L. Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish Shellfish Immunol* 2012; 33: 1016-1026.
- Williams HR, Macey BM, Burnett LE, Burnett 881 KG. Differential localization and bacteriostasis of *Vibrio campbellii* among tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *De Comp Immunol* 2009; 33: 592-600.
- Williams HR, Macey BM, Burnett LE, Burnett KG. Differential localization and bacteriostasis of *Vibrio campbellii* among tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *De Comp Immunol* 2009; 33: 592-600.
- Xue Q, Hellberg ME, Schey KL, Itoh N, Eytan RI, Cooper RK, La Peyre JF. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10: 213.
- Yamamuro M, Koike I. Nitrogen metabolism of the filter-feeding bivalve *Corbicula japonica* and its significance in primary production of a brackish lake in Japan. *Limnol Oceanogr* 1993; 38 (5): 997-1007.
- Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. Reactive Oxygen Species in the Immune System. *Int Rev Immunol* 2012; 1-22.
- Zhang L, Liu N, Ma X, Jiang L. The transcriptional control machinery as well as the cell wall integrity and its regulation are involved in the detoxification of the organic solvent dimethyl sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2013; 13(2):200-18.
- Zhou Y, Yang H, Zhang T, Qin P, Xu X, Zhang F. Density-dependent effects on seston dynamics and rates of filtering and biodeposition of the suspension-cultured scallop *Chlamys farreri* in a

eutrophic bay (northern China): An experimental study in semi-in situ flow-through systems. *J Mar Sys* 2006; 59:143-158.

ANEXO 1: Datos complementarios

Caudales mensuales promedio de efluentes cloacales vertidos por la planta de tratamiento terciario "Lago Lacar" y tratados en la zona de la Vega San Martín. Datos suministrados por la Cooperativa de Agua Potable de San Martín de los Andes, correspondientes a los años 2009 (antes de la incorporación de nuevas piletas de tratamiento en la planta Lago Lacar y de la puesta en funcionamiento de la nueva planta de tratamiento terciario de efluentes 3, en la Vega San Martín) y 2014 (luego de las reformas).

Año	Mes	Planta de tratamiento Lago Lacar		Lagunas de sedimentación Vega San Martín
		Caudal de salida (m ³ /día) Vertido con tratamiento terciario	Caudal vertido por "by pass" (m ³ /día)	Caudal tratado (m ³ /día). Tratamiento primario
2009	Enero	4541,5	0	1752,6
	Febrero	4423,9	0	1273,0
	Marzo	3777,3	0	1418,2
	Abril	3799,2	30	1168,2
	Mayo	SD	355	1822,7
	Junio	3682,5	188,2	1708,2
	Julio	3750,5	643,6	1736,3
	Agosto	3892,7	SD	2077,1
	Septiembre	4310,2	957,3	1766,0
	Octubre	5242,4	245,6	1719,6
	Noviembre	4331,4	245,6	1470,7
	Diciembre	3971,5	0	1332,3
Año	Mes	Caudal de salida (m ³ /día) Vertido con tratamiento terciario	Caudal vertido por "by pass" (m ³ /día)	Planta de tratamiento 3 Caudal tratado (m ³ /día). Tratamiento terciario
2014	Enero	4605,8	0	SD
	Febrero	4520,5	0	1985
	Marzo	2384,3	SD	2609,5
	Abril	2,916,8	SD	2535,5
	Mayo	4696,5	SD	2875,7
	Junio	5207,5	SD	3811,2
	Julio	3312,6	SD	3681,9
	Agosto	3704,5	18,5	4581,4
	Septiembre	3731,3	94	4137,2
	Octubre	3661,1	SD	3015
	Noviembre	SD	SD	2597,8
	Diciembre	SD	SD	SD

ANEXO 2: Datos complementarios

Calidad del agua en el control del lago (S0) y en los sitios de exposición de almejas en la cuenca del río Pocahullo (S1: sitio de referencia, aguas arriba en el río Pocahullo; S2: sitio del río afectado por descargas de efluentes no tratados y con tratamiento primario; S3: sitio del río afectado por descarga de efluentes con tratamiento terciario). Datos de septiembre de 2009 a abril de 2010. Bacterias coliformes fecales (CF); clorofila *a* (Chl *a*); materia orgánica particulada (MOP); nitrógeno total (NT); sulfatos (SO₄⁻²). Los valores están expresados como media ± error estándar.

	Sitios	Septiembre	Diciembre	Febrero	Marzo	Abril
CF (NMP/100 mL)	S0	0	32 ± 8,00	22 ± 2,00	0	0
	S1	15,5 ± 4,5	11 ± 0,00	-	-	-
	S2	600 ± 100	500 ± 0,00	2500 ± 100	3470 ± 10	12450 ± 1550
	S3	1500 ± 100	1500 ± 100	24000 ± 0,00	3470 ± 10	600 ± 100
MOP (mg/L)	S0	7,32 ± 0,00	16,5 ± 2,50	14,2 ± 0,00	4 ± 0,00	8,37 ± 0,00
	S1	16,62 ± 2,33	21,99 ± 6,34			
	S2	15,14 ± 0,86	14,37 ± 1,37	23,74 ± 1,94	36,69 ± 4,31	18,6 ± 1,4
	S3	16 ± 1,00	18 ± 0,00	19,82 ± 1,36	28,12 ± 4,37	46,7 ± 10,10
NT (µg/L)	S0	177 ± 0,00	135 ± 0,02	236 ± 0,06	148 ± 0,03	413 ± 0,12
	S1	177 ± 0,06	118 ± 0,00	-	-	-
	S2	206 ± 0,08	177 ± 0,6	206 ± 0,03	531 ± 0,06	548 ± 0,06
	S3	354 ± 0,12	678 ± 0,09	2743 ± 0,15	534 ± 0,06	708 ± 0,12
SO ₄ ⁻² (mg/L)	S0	2,72 ± 0,00	1,75 ± 0,11	1,63 ± 0,00	1,92 ± 0,06	2,50 ± 0,22
	S1	2,40 ± 0,20	1,44 ± 0,14	-	-	-
	S2	2,01 ± 0,56	1,88 ± 0,09	2,34 ± 0,04	1,98 ± 0,01	1,49 ± 0,04
	S3	3,39 ± 0,43	3,31 ± 0,99	6,38 ± 0,04	2,84 ± 0,46	3,31 ± 0,99
Turbidez (FAU)	S0	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	2,0 ± 1,0	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5
	S1	6,5 ± 1,5	5,5 ± 0,5	-	-	-
	S2	5,0 ± 1,0	6,5 ± 0,5	6,0 ± 1,0	9,5 ± 0,5	6,5 ± 0,5
	S3	5,0 ± 1,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 1,0	11,0 ± 1,0	27,5 ± 1,5
Caudal (m ³ /s)	Cuenca del río Pocahullo	8,79	4,51	1,6	1,12	1,11
Precipitaciones (mm)		66,1	33,2	39,3	15,8	11,8

ANEXO 3: Artículo de respaldo

Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (Diplodon chilensis) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian lake. Virginia A. Bianchi, Juan M. Castro, Iara Rocchetta, Flavia Bieczynski y Carlos M. Luquet. *Fish & Shellfish Immunology* 37 (2014) 268-277.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Full length article

Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (*Diplodon chilensis*) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian lake



Virginia A. Bianchi^{a,b,*}, Juan M. Castro^{a,b}, Iara Rocchetta^{b,c,d}, Flavia Bieczynski^a, Carlos M. Luquet^{a,b}

^aLaboratorio de Ecotoxicología Acuática, INIBIOMA (CONICET-UNCo) – CEAN, ruta provincial 61, km 3, 8371 Junín de los Andes, Neuquén, Argentina

^bConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia, 1917 Buenos Aires, Argentina

^cDepartamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pab. II, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina

^dDepartment of Functional Ecology, Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2013

Received in revised form

19 February 2014

Accepted 20 February 2014

Available online 1 March 2014

Keywords:

Immune response

Oxidative balance

Bacterial pollution

Filtration rate

Clearance rate

ABSTRACT

Deleterious effects on health and fitness are expected in mussels chronically exposed to sewage water pollution. *Diplodon chilensis* inhabiting SMA, an area affected by untreated and treated sewage water, shows increased hemocyte number and phagocytic activity, while bacteriolytic and phenoloxidase activities in plasma and reactive oxygen species production in hemocytes are lower compared to mussels from an unpolluted area (Yuco). There are not differences in cell viability, lysosomal membrane stability, lipid peroxidation and total oxygen scavenging capacity between SMA and Yuco mussels' hemocytes. Energetic reserves and digestive gland mass do not show differences between groups; although the condition factor is higher in SMA than in Yuco mussels. Gills of SMA mussels show an increase in mass and micronuclei frequency compared to those of Yuco. Mussels from both sites reduce bacterial loads in polluted water and sediments, improving their quality with similar feeding performance. These findings suggest that mussels exposed to sewage pollution modulate physiological responses by long-term exposure; although, gills are sensitive to these conditions and suffer chronic damage. Bioremediation potential found in *D. chilensis* widens the field of work for remediation of sewage bacterial pollution in water and sediments by filtering bivalves.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Municipal sewage waters contain pharmaceutical products, heavy-metals, ammonia, personal care products, endocrine disruptors and microorganisms [1,2], which are usually released to the aquatic environment, implying deleterious consequences for

organisms' health and fitness [3–5]. Freshwater bivalves are benthic filter-feeding animals, which live in the sediment–water interface for long periods (sometimes many decades). Therefore these are exposed to contaminants from both dissolved and particulate compartments and their capability to overcome this long-term stress would eventually determine the population survival [6,7].

Mussels' health and fitness depends on the modulation of non-specific immune responses and oxidative balance against pollution exposure [8,9]. Cellular responses in mussels are performed by circulating hemocytes, which eliminates pathogens and foreign bodies by phagocytosis and encapsulation [10]. Additionally, activated hemocytes release large quantities of reactive oxygen species (ROS), as a source of local tissue damage (oxidative burst) [11,12]. Under these oxidative conditions, generated by both, the immune response and the effects of pro-oxidant pollutants, total scavenging capacity (TOSC) can be used to estimate the total defenses against

Abbreviations: SMA, San Martín de los Andes, sewage polluted site; FC, fecal coliform bacteria; BA, bacteriolytic activity; DGF, digestive gland factor; GF, gill factor; MN, micronuclei frequency; PR, polluted site at Pocahullo river; EB, enteric bacteria.

* Corresponding author. Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, INIBIOMA (CONICET-UNCo) – CEAN, ruta provincial 61, km 3, 8371 Junín de los Andes, Neuquén, Argentina. Tel.: +54 02972 413956x217; fax: +54 2972 423298.

E-mail addresses: vbianchi@comahue-conicet.gob.ar, virgibianchi@gmail.com (V.A. Bianchi).

oxyradicals [13]. When antioxidant and detoxifying defenses are overwhelmed, lysosomal membrane destabilization, lipid peroxidation and DNA damage can occur in the cells [14,15]. In the context of humoral immunity, hemocytes can produce and release into the plasma anti-microbial factors, such as lysozymes and phenoloxidases, after pathogen recognition or under physiological stress [16–18].

Immune responses have been widely studied under laboratory conditions to elucidate the specific effect of microbiological and chemical challenges on bivalves of economic interest [19–22]. Other studies have evaluated the effects of industrial and agricultural effluents on transplanted and wild bivalves [23–25] as well as in laboratory studies [26]. Although the effects of sewage water on the immune response of marine and freshwater bivalves have been studied in the last years [27–31], the information available is still scarce. Particularly, the effects of long-time exposure to sewage pollution on bivalves' immune system and filtration capacity deserve further investigation [8].

In the last decades, water quality and biodiversity in some lakes and rivers of North-West Patagonia has started to be threatened by population growth and human activities [32–34]. Particularly, in the city of San Martín de los Andes, untreated effluents and primary treated sewage (sedimentation ponds) are discharged in different parts of Pocahullo river basin. A sewage tertiary treatment plant (STTP), serving about 20,000 people, releases its effluents near the river mouth. In the lake area next to the river mouth, Sabatini et al. [33] have detected chemical and bacteriological water deterioration together with oxidative damage in wild individuals of the native mussel *Diplodon chilensis*. The present work is the first study on *D. chilensis*' immune system.

As it has been reported for other bivalves [35–37], *D. chilensis* individuals extracted from clean areas are able to remove algae, suspended solids and nutrients from fish farming effluents [38,39], coliform bacteria from polluted wells [40] and *Escherichia coli* from the water column in laboratory exposures [33]. However, under stressing conditions, bivalves' filtering capacity can be altered, affecting both, their energy balance and growth and their bioremediation capacity [41–43]. The retention of filtering capacity in mussels chronically exposed to sewage water pollution or their ability for cleaning sediments has not been studied yet.

The main objectives of this work are to describe the health status of wild *D. chilensis* from a sewage polluted area in Lacar lake, through the characterization of its immunological response, both at cellular (total and viable hemocytes number, phagocytic potential, ROS) and humoral (bacteriolytic and phenoloxidase activities, and total protein) level. Additionally, total antioxidant capacity (TOSC) and oxidative damage indicators (lysosomal membrane stability, TBARS) are evaluated in hemocytes. DNA damage (micronuclei frequency) is analyzed in gills and energetic reserves (glycogen and total lipid) are evaluated in digestive gland as indicators of metabolic status. Somatic growth was estimated, together with digestive gland and gills mass, using morphometric factors. Finally, the capacity of this species to remove enteric bacteria, algae, particulate organic matter and nutrients (total nitrogen, total phosphorus) from polluted water and sediments is compared between individuals collected from a polluted area and a control area in the same lake. Chronically induced tolerance of *D. chilensis* to sewage water pollution and the suitability of this species for bioremediation purposes are discussed through the integration of physiological variables.

2. Materials and methods

2.1. Mussel collection

Sampling was performed during January and February 2013. Adult individuals of *D. chilensis* ($n = 30$ per site; 70.38 ± 0.57 mm

shell length) were collected by scuba diving (1–3 m depth) from an unpolluted area (Yuco) in Lacar lake (about 20 km from the city of San Martín de los Andes) ($40^\circ 10' S$, $71^\circ 31' 30'' W$); and from the area in which Pocahullo river flows into the lake (SMA) ($40^\circ 10' S$, $71^\circ 20' 60'' W$). The estimated age of the individuals collected from both sites ranged between 10 and 30 years old. This estimation was made according to von Bertalanffy growth curves and corresponding size-at-age data obtained by counting translucent growth bands in cross-sectioned shells of *D. chilensis* from the same population [44]. Mussels were transported on ice to the laboratory for immediate processing.

2.2. Field study

2.2.1. Water quality

Water samples ($n = 3$) were taken at each site, transported to the laboratory at $4^\circ C$ and analyzed in duplicate. Fecal coliform bacteria (FC) concentrations were measured by the More Probable Number method (MPN/100 mL) [45]. Chlorophyll *a* (Chl *a*) concentration ($\mu g/L$) was calculated according to Lichtenthaler [46]. Particulate organic matter was measured according to Juhel et al. [47] and expressed as mg OM/L. Water samples for physico-chemical analysis (HACH DR/4000 spectrophotometer) were collected in polyethylene bottles (pre-washed with 5% HCl) and kept at $-20^\circ C$. Total nitrogen (TN) was measured by a cadmium reduction method (HACH method 8192), after acid persulfate digestion ($120^\circ C$ for 55 min) and expressed as $\mu g/L$. Total phosphorus (TP) was measured by the ascorbic acid method, after digestion with potassium persulfate [45] and expressed as $\mu g/L$. Turbidity was measured by Attenuated Radiation Method (HACH Method 10047) and expressed as Formazin Attenuation Units (FAU). Water temperature ($^\circ C$) was recorded at each site.

2.2.2. Sediment quality

Sediment samples ($n = 3$) were taken from the superficial layer (5 cm depth) in sterile plastic containers, transported to the laboratory at $4^\circ C$ and analyzed in duplicate. A suspension of 1:9 (v/v) of sediment in sterile NaCl (0.9%) solution was used for FC analysis by MPN method [45]. The sediment was then dried ($60^\circ C$ for 24 h) and bacteria content was expressed as MPN/g of dry sediment (gds). After that, samples were ashed at $550^\circ C$ for 4 h and weighted for estimating organic matter content (mg OM/gds). Chl *a* ($\mu g/gds$) was extracted in acetone 90% buffered with $CaCO_3$ (modified from Tett et al. [48]) and measured as described by Lichtenthaler [46]. Total nitrogen (TN) was measured by Kjeldahl's method [49] and Total phosphorus (TP) by the method proposed by Takeuchi [50]; both results were expressed as $\mu g/gds$.

2.2.3. Immune response

Working on ice, 2 mL of hemolymph were withdrawn from the adductor muscle of each individual ($n = 6$ per site) using a sterile syringe. Hemolymph was then aliquoted and placed in sterile microcentrifuge tubs for immediate analysis.

Total and viable hemocytes were measured by mixing 100 μL of hemolymph with 50 μL of Trypan Blue (0.2%) dissolved in sterile anticoagulant solution (3 g glucose and 0.36 g trisodium citrate per L, 60 mOsm/L, pH 7) (modified from Burkhard et al. [51]). After incubation ($4^\circ C$ for 5 min), live (undyed) and dead cells (dyed) were counted within 15 min in a Neubauer chamber. Total hemocytes were expressed as cells/mL of hemolymph. Hemocytes' viability was presented as proportion of total hemocytes (modified from Akaishi et al. [8]).

Hemocyte phagocytic activity was evaluated using *Saccharomyces cerevisiae*. Yeasts were stained by suspending 5 mg of cells in 2.5 mL of dechlorinated tap water and 2.5 mL Congo red solution

(0.8%). The suspension was autoclaved (121 °C for 15 min), cooled and centrifuged (1500× g, for 5 min) discarding the supernatant. The pellet was washed from stain residues and kept at 4 °C. Hemolymph (100 µL) was mixed with a volume of stained yeast suspension containing twice the number of cells respect to the number of viable hemocytes in the sample. After incubation at room temperature for 30 min, a minimum of 300 cells was counted in duplicate under light microscopy (100–400×). Phagocytic activity was calculated as phagocytosed yeast cells/viable hemocytes (modified from Kuchel et al. [18]).

Reactive oxygen species (ROS) were measured in hemocytes by a fluorometric method adapted from Moss and Allam [52]. Briefly, 300 µL of hemolymph were centrifuged at 500× g for 20 min. Plasma was discarded and hemocytes were re-suspended in the anticoagulant solution described above, centrifuged and re-suspended again to obtain washed cells. Three aliquots of this suspension (50 µL) were separately mixed with 140 µL of reaction buffer (Hepes 30 mM, KCl 200 mM; MgCl 1 mM, pH 7) and 10 µL of the fluorescent probe H₂DCF-DA (2',7' dichlorofluorescein diacetate, 0.8 mM, Sigma) in fluorometer tubes (Qubit assay tubes Q32856, Invitrogen) and incubated at 35 °C for 12 min. The change in fluorescence (485/530 nm) was followed during 18 min in a Qubit™ fluorometer, Invitrogen. ROS content was referred to a H₂O₂ standard curve with the fluorescent probe and results were expressed as meq H₂O₂/10⁶ viable cells.

Plasma was obtained after centrifugation at 500× g for 20 min and its total protein content (mg/mL) was measured fluorometrically (Quant-it protein assay Q33211, Invitrogen). Bacteriolytic activity (BA/mg prot) was measured by mixing 150 µL of plasma with 850 µL of *E. coli* JM109 strain suspension (0.5 in McFarland scale). Changes in absorbance at 625 nm for 5 min were recorded and one BA unit was defined as a 0.001 change (adapted from Das et al. [53]). Phenoloxidase activity (PO/mg prot) was measured by incubating 500 µL of plasma with 300 µL of L-DOPA (3 mg/mL L-DOPA, Sigma in phosphate buffered saline) and anticoagulant solution to a final volume of 1000 µL for 4 h. Negative controls were performed by adding tropolone (16 mM final concentration, Sigma) and spontaneous substrate oxidation was monitored by mixing anticoagulant solution and L-DOPA. Absorbance at 490 nm was followed for 20 min and one PO unit was defined as a 0.001 change in absorbance (modified from Aladaileh et al. [16]).

2.2.4. Antioxidant defense

Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) was measured in hemocytes ($n = 6$ per site) obtained as described in Section 2.2.3. Three aliquots of cell suspension (50 µL) were separately mixed with 130 µL of reaction buffer (Section 2.2.3) and 10 µL of ABAP solution (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, 4 mM, Sigma) in fluorometer tubes and incubated at 35 °C for 5 min. After this time, 10 µL of H₂DCF-DA were added and the tubes were incubated at 35 °C for 12 min. Another set of three tubes was prepared in the same conditions but omitting the addition of ABAP. Fluorescence reading was performed as described for ROS. TOSC was calculated from the relative area between the curves obtained with and without ABAP and referred to 10⁶ viable cells (modified from Amado et al. [54]).

2.2.5. Oxidative damage

Lysosomal membrane stability of hemocytes ($n = 6$ per site) was evaluated by the neutral red retention time method (modified from Mamaca et al. [15]). Briefly, 50 µL of hemolymph were placed on slides (in duplicate) and kept in a wet chamber for 5 min to let the cells attach. Neutral red solution (50 µL, 0.002% in dimethyl sulfoxide) was added and the number of red cells was counted every 10 min, using a light microscope at 400×, until stained cells

reached 50%. Results were expressed as neutral red retention time 50% (min). Lipid peroxidation ($n = 6$ per site) was estimated by the TBARS method [55] in hemocytes suspensions containing a known number of cells. Results were expressed as µmol TBARS/10⁶ cells and µmol TBARS/mg prot.

2.2.6. Energetic reserves

Digestive glands ($n = 6$ per site) were extracted, weighted and kept at –20 °C until analysis. The organs were then homogenized in phosphate buffered saline (100 mM, pH 7). Total lipid content (mg/g of wet tissue) was extracted using Folch solution (chloroform–methanol 2:1 v/v) and quantified according to Bligh and Dyer [56]. Glycogen was extracted according to Van Handel [57] and referred to a glucose standard curve as meq Glu/g of wet tissue.

2.2.7. Morphometric factors

Soft tissues and shell ($n = 12$ for each site) were dried at 60 °C for 24 h for calculation of condition factor (CF = total dry mass/shell length³ * 100) [39]. Digestive gland and gill factor (DGF, GF; $n = 12$ for each site) were calculated by replacing total dry mass for wet digestive gland mass or wet gill mass in the CF formula.

2.2.8. Micronuclei frequency

Gills ($n = 6$ per site) were extracted and dragged along a slide in a single layer of well-spread cells (in duplicate) and allowed to dry for a few minutes. Cells were then fixed with methanol for 30 s, stained with Giemsa stain (1:10 in distilled water) for 20 min and mounted with DPX medium (Sigma). Under light microscopy (1000×), about 1000 cells per mussel were counted [58,31] to estimate the micronucleated cells frequency. Small, circular or ovoid chromatin bodies showing the same staining pattern as the main nucleus were considered as micronuclei (MN). Results were expressed as MN/cell ± SE.

2.3. Laboratory study

2.3.1. Water bioremediation

Mussels from each site ($n = 7$) were placed in two aerated tanks with 5 L of dechlorinated tap water and starved for 36 h, without water changes. After that, individuals were individually placed in plastic containers, separated from the container's bottom by rigid plastic mesh. The containers were filled with 700 mL of water collected from 20 m downstream of the sewage tertiary treatment plant's discharge in Pochahullo river (PR). Mixing was provided by the aeration system. Controls were set in triplicate containers without mussels (Fig. 1(A)). Microbiological and physico-chemical variables were measured in each container at the beginning of the experiment (T_0) and after 6 h (T_6). Enteric bacteria (EB) concentrations were measured by the spread plate technique using McConkey's agar medium (Merck), incubating at 35 °C for 24 h. Results were expressed as colony forming units (CFU)/mL. Water samples for phytoplankton (Phyto) analysis were fixed in 4% formaldehyde, concentrated 20 fold and counted under light microscope (400×) in a Neubauer chamber. OM, TN and TP concentrations were measured and expressed as described in Section 2.2.1. Water temperature during the assay was kept at 14.5 ± 0.5 °C. Feeding rates calculation is described in Section 2.3.3.

2.3.2. Sediment bioremediation

Mussels from each site ($n = 7$) were starved for 36 h in aerated tanks filled with dechlorinated tap water. After that, mussels were placed in aerated glass containers with 340 cm³ of sediment from the site PR and the same volume of dechlorinated tap water. Mussels were buried obliquely to ensure the maximum access to the sediment fraction [59]. Controls were set by triplicate in containers

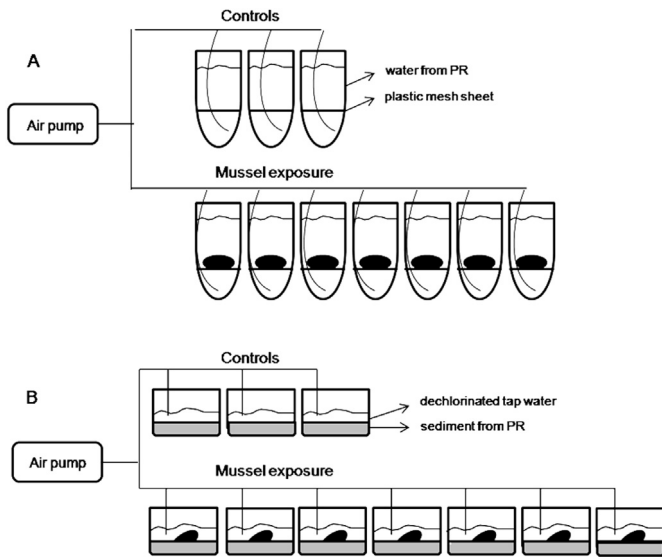


Fig. 1. Diagram of the static experimental system for the evaluation of *Diplodon chilensis* feeding rates and bioremediation effects on water (A) and sediment (B) collected from 20 m downstream of the sewage tertiary treatment plant's discharge in Pocahullo river (PR).

without mussels (Fig. 1(B)). Bacteriological and physico-chemical variables were measured by extracting samples from the superficial layer (0.5 cm) in each container at the beginning of the experiment (T_0) and after 24 h (T_{24}). EB were extracted as in Section 2.2.2 and counted by the spread plate technique (Section 2.3.1). Chl *a*, OM, TN and TP contents were measured and expressed as described in Section 2.2.2. Water temperature during the assay was 14 ± 0.5 °C. Feeding rates calculation is described in Section 2.3.3.

2.3.3. Calculation of feeding rates

After bioremediation experiments, mussels were open by adductor muscle incision and soft tissues were dried (Section 2.2.7) and weighted. Clearance (CR) and filtration (FR) rates were calculated for bacteria and phytoplankton as follows (based on Soto and Mena [39]) and referred to *g* of dry soft tissue:

$$CR \left(L \times h^{-1} \times gdt^{-1} \right) = V/t \times [(\ln Ci - \ln Cf) - (\ln Ci' - \ln Cf')]/gdt$$

$$FR \left(q \times h^{-1} \times gdt^{-1} \right) = V/t \times [(Ci - Cf) - (Ci' - Cf')]/gdt$$

where C_i = initial concentration; C_f = final concentration; V = container volume (L); t = experimental time span (h); C_i' and C_f' = initial and final concentration in control container; q = quantity units; gdt = grams of dry soft tissue.

Table 1

Bacteriological and physicochemical variables measured in water and sediments from unpolluted (Yuco) and sewage polluted (SMA) areas in Lacar lake. Values for fecal coliforms (FC), chlorophyll *a* (Chl *a*), organic matter (OM), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), turbidity and temperature are expressed as mean \pm SE.

	Water			Sediments		
	Yuco	SMA	<i>P</i>	Yuco	SMA	<i>P</i>
FC (MPN/100 mL or gds)	10 \pm 10	950 \pm 150	0.01	130 \pm 3.6	2509 \pm 150	<0.01
OM (mg/mL or gds)	7.56 \pm 0.03	9.29 \pm 0.56	0.04	22.37 \pm 0.17	25.93 \pm 1.41	<0.05
Chl <i>a</i> (μ g/mL or gds)	$1.7 \times 10^{-3} \pm 0.0002$	$3.0 \times 10^{-3} \pm 0.0006$	0.05	3.88 \pm 0.51	9.09 \pm 0.77	<0.01
TN (μ g/mL or gds)	285 \pm 0.02	445 \pm 0.01	0.03	1400 \pm 12	3131 \pm 606	<0.05
TP (μ g/mL or gds)	10.86 \pm 1.11	67.05 \pm 0.37	<0.01	1461 \pm 38	1774 \pm 15	<0.01
Turbidity (FAU)	1.33 \pm 0.33	7.67 \pm 0.33	<0.01	–	–	–
<i>T</i> (°C)	19.67 \pm 0.33	20.5 \pm 0.50	0.30	–	–	–

Sediment CR and FR were calculated replacing V , in the formula, for the dry mass of sediment considered to be available for benthic bioremediation (the total superficial layer with 0.5 cm depth). CR was expressed as $gds \times h^{-1} \times gdw^{-1}$ and FR as $q \times h^{-1} \times gdw^{-1}$.

2.4. Statistical analysis

Data were presented as media \pm standard error. Normal distribution and homogeneity of variance were checked by Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests, respectively. *T*-test was utilized to identify differences between groups in the field study and for comparison of CR and FR. When statistical assumptions were not met, the non-parametric Mann–Whitney test was applied. Two-way repeated-measures ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* comparisons were used to analyze the effects of mussels on water and sediment quality. When statistical assumptions were not met, data were previously transformed by $\log_{10} x$, $\ln x$, $\log_{10} (x + 1)$, or $\ln (x + 1)$, when appropriate.

3. Results

3.1. Field study

3.1.1. Water and sediment quality

Water and sediments from SMA have significantly higher loads of fecal coliform bacteria, organic matter and nutrients than those from Yuco; also showing elevated concentrations of Chl *a* in sediments and turbidity in water. Table 1 presents bacteriological and physicochemical variables measured in the areas of mussel extraction.

3.1.2. Health status

Mussels from SMA show significantly higher total number of hemocytes ($P < 0.05$) and phagocytic activity ($P < 0.01$) but lower hemocyte ROS production than mussels from Yuco ($P < 0.01$), while TOSC is similar in hemocytes of mussels from both sites (Fig. 2(a) and (b)). Plasmatic bacteriolytic (BA) and phenoloxidase (PO) activities are lower in SMA than in Yuco mussels ($P < 0.05$ for both activities) (Fig. 2(c)). No significant differences are observed for hemocytes' viability (0.90 ± 0.02 vs. 0.94 ± 0.008), lysosomal membrane stability (14.37 ± 1.55 vs. 14.66 ± 0.50 min), lipid peroxidation (293.7 ± 84.6 vs. 270.7 ± 97.7 μ mol/10⁶ cells; 24.45 ± 4.75 vs. 24.20 ± 5.11 μ mol/mg prot) or plasma protein concentration (0.302 ± 0.01 vs. 0.296 ± 0.01 mg/mL) between groups (values for SMA and Yuco, respectively).

CF is significantly higher in mussels from SMA than in those from Yuco ($P < 0.05$), while there is no change in DGF (Fig. 3). Energetic reserves in digestive gland, as lipids (8.85 ± 0.77 vs. 9.77 ± 0.61 mg/g) and glycogen (94.12 ± 5.21 vs. 98.70 ± 11.21 meq Glu/g) are similar in both groups (values for SMA and Yuco, respectively). SMA mussels show significantly higher GF ($P < 0.05$) and micronuclei frequency than Yuco mussels ($P < 0.01$) (Fig. 4).

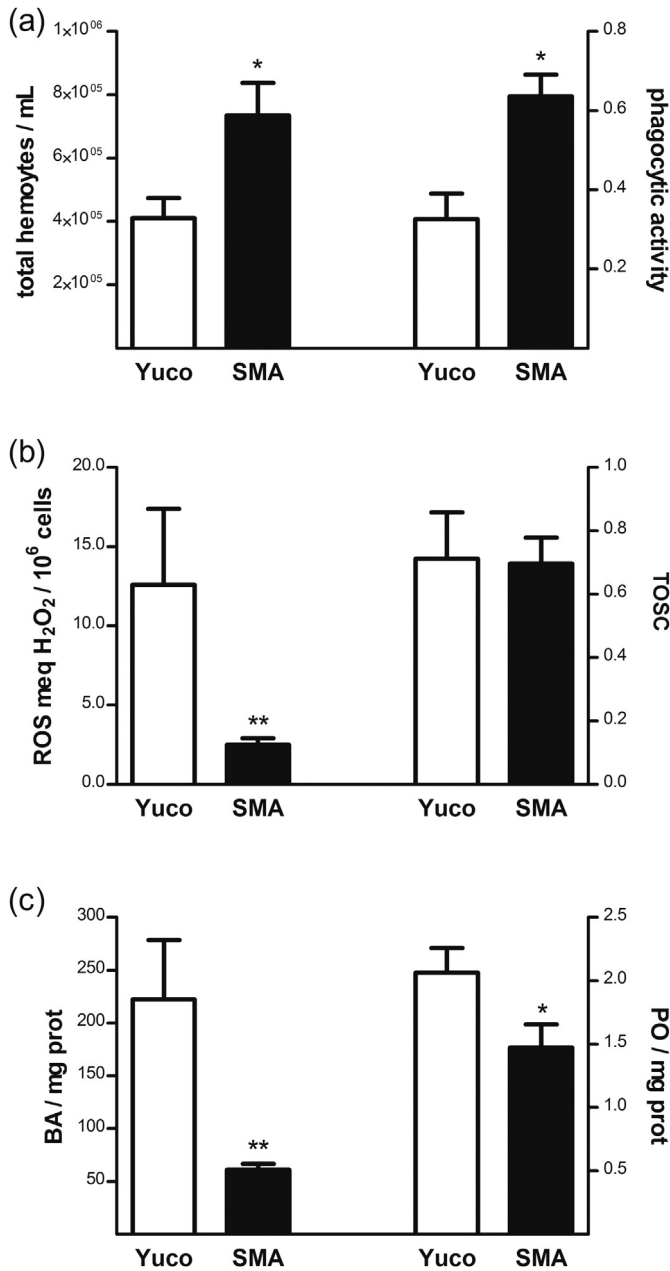


Fig. 2. Hematological variables measured in *Diplodon chilensis* collected from unpolluted (Yuco) and sewage polluted (SMA) areas of Lacar lake. (a) Total hemocytes and phagocytic activity; (b) bacteriolytic (BA) and phenoloxidase (PO) activity in plasma; (c) reactive oxygen species production (ROS) and total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in hemocytes. Results are expressed as mean \pm SE. * Denotes $P < 0.05$ and ** denote $P < 0.01$ between mussels from Yuco and SMA.

3.2. Laboratory study

3.2.1. Water and sediment bioremediation

After six hours (T_6), both water enteric bacteria concentrations ($P < 0.01$) and turbidity ($P < 0.05$) are significantly lower in the containers with Yuco or SMA mussels, respect to the control containers. Phytoplankton concentrations show a similar decreasing trend in both groups, but this effect is significant only for Yuco ($P < 0.001$). OM concentrations in water decrease at T_6 in controls and mussel containers ($P < 0.0001$ for both) while no significant difference could be observed between mussel and control containers. Water nutrient load is lowered in both mussel groups. TP is

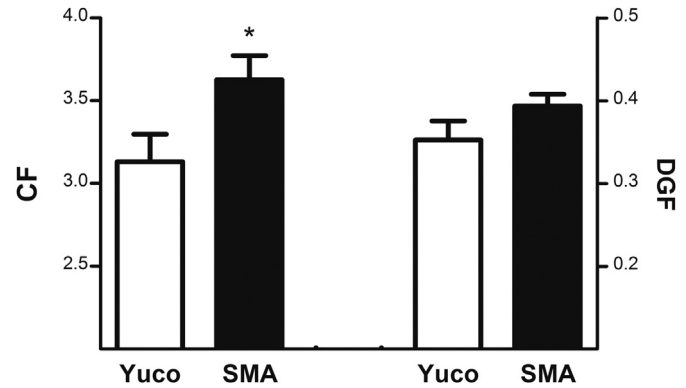


Fig. 3. Condition factor (CF) and digestive gland factor (DGF) in *Diplodon chilensis* collected from unpolluted (Yuco) and sewage polluted (SMA) areas of Lacar lake. Results are expressed as mean \pm SE. * Denotes significant differences between mussels from Yuco and SMA ($P < 0.05$).

significantly lower than the control value in containers with Yuco mussels ($P < 0.05$) while in TN is significantly reduced by SMA mussels ($P < 0.05$) (Table 2).

Both groups of mussels significantly reduce enteric bacteria concentrations in sediments at T_{24} ($P < 0.05$). There are no changes in OM content in sediments of any of the containers. Changes in Chl α , TN and TP contents do not show any clear significant trend to be analyzed as mussel filtration effects (Table 2).

3.2.2. Feeding rates

Since in the bioremediation experiments (Table 2) enteric bacteria (in water and sediment) and phytoplankton (in water) were reduced significantly by the activity of mussels, clearance and filtration rates (CR and FR) were calculated. Mussels from Yuco and SMA removed enteric bacteria from PR water at similar clearance rates of 0.136 ± 0.03 and $0.155 \pm 0.01 \text{ L} \times \text{h}^{-1} \times \text{gdt}^{-1}$, respectively. However, FR was significantly higher for SMA mussels ($2.64 \times 10^8 \pm 5.19$ vs. $7.61 \times 10^8 \pm 7.33 \text{ CFU} \times \text{h}^{-1} \times \text{gdt}^{-1}$, for Yuco and SMA, respectively) ($P < 0.0001$) (Fig. 5(a)). There were no significant differences between mussels of both sites in CR or FR neither for phytoplankton in water nor for enteric bacteria in sediments (Fig. 5(b) and (c)).

4. Discussion

The present study integrates original information on the physiological status (immune response, oxidative balance, energetic

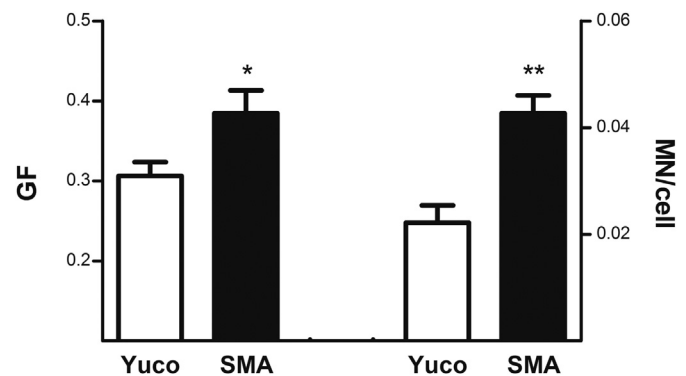


Fig. 4. Gill factor (GF) and micronuclei frequency (MN/cell) in gill cells of *Diplodon chilensis* collected from unpolluted (Yuco) and sewage polluted (SMA) areas of Lacar lake. Results are expressed as mean \pm SE. * Denotes $P < 0.05$ and ** denote $P < 0.01$ between mussels from Yuco and SMA.

Table 2

Bacteriological and physico-chemical results from bioremediation experiments. *Diplodon chilensis* from unpolluted (Yuco) and sewage polluted (SMA) areas of Lacar lake were exposed to water (W) or sediments (S) collected from the highly polluted site, PR. Control data correspond to recipients without mussels. Values for enteric bacteria (EB), organic matter (OM), phytoplankton (Phyto), chlorophyll *a* (Chl *a*), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP) are expressed as mean \pm SE/mL of water or g of dry sediment (gds). Significant differences ($P < 0.05$) between each mussel group and its control are denoted by (*) and differences between initial and final conditions in each group are denoted by (+).

	(W)	Control	Yuco	Control	SMA	(S)	Control	Yuco	Control	SMA
EB (CFU/mL or gds)	T_0	2763 \pm 454	2929 \pm 583	4070 \pm 14	4070 \pm 301	T_0	22,164 \pm 1461	15,090 \pm 2347	7312 \pm 3325	12,694 \pm 5165
	T_6	4000 \pm 681	1003 \pm 325**	10,233 \pm 3670	2253 \pm 320**	T_{24}	29,446 \pm 5395	10,529 \pm 3047**	13,447 \pm 6434	8371 \pm 3532**
OM (mg/L or gds)	T_0	37.88 \pm 0.0005	37.88 \pm 0.001	33.67 \pm 0.001	34.36 \pm 0.001	T_0	103.9 \pm 2.05	118 \pm 11.22	123.6 \pm 7.83	122.9 \pm 1.56
	T_6	27.48 \pm 0.0005 ⁺	23.64 \pm 0.001 ⁺	21.97 \pm 0.002 ⁺	21.50 \pm 0.001 ⁺	T_{24}	138.3 \pm 21.21	122.5 \pm 4.39	132.4 \pm 12.70	183 \pm 35.49
Phyto (cell/mL)	T_0	10,915 \pm 292	8286 \pm 393	8125 \pm 851	10,575 \pm 867	T_0	–	–	–	–
	T_6	10,375 \pm 1491	5071 \pm 484**	9208 \pm 458	8275 \pm 396	T_{24}	–	–	–	–
Chl <i>a</i> (μ g/mL or gds)	T_0	–	–	–	–	T_0	28.13 \pm 10.52	22.70 \pm 4.16	27.71 \pm 0.63	25.06 \pm 0.79
	T_6	–	–	–	–	T_{24}	23.78 \pm 6.96	36.68 \pm 6.59**	25.06 \pm 0.79	33.38 \pm 2.40
TN (μ g/L or gds)	T_0	477 \pm 0.02	483 \pm 0.03	150 \pm 0.01	167 \pm 0.01	T_0	2300 \pm 731	3287 \pm 236	3711 \pm 1095	4097 \pm 509
	T_6	381 \pm 0.05	270 \pm 0.07	213 \pm 0.02**	143 \pm 0.01	T_{24}	3120 \pm 291	6545 \pm 299**	4149 \pm 593	3442 \pm 884
TP (μ g/L or gds)	T_0	309.5 \pm 5.52	313.4 \pm 13.22	245.6 \pm 5.02	246.3 \pm 33.52	T_0	2448 \pm 122	2095 \pm 114	2003 \pm 58	2145 \pm 320
	T_6	454.2 \pm 17	190.1 \pm 13**	222.2 \pm 3.28	173.1 \pm 9.13	T_{24}	1267 \pm 109**	627 \pm 190**	1745 \pm 451	1415 \pm 374
Turbidity (FAU)	T_0	9 \pm 4	11.57 \pm 0.84	3 \pm 1	4.43 \pm 0.48	T_0	–	–	–	–
	T_6	8.5 \pm 6.50	1.43 \pm 0.30**	4.67 \pm 0.67	1.43 \pm 0.20**	T_{24}	–	–	–	–

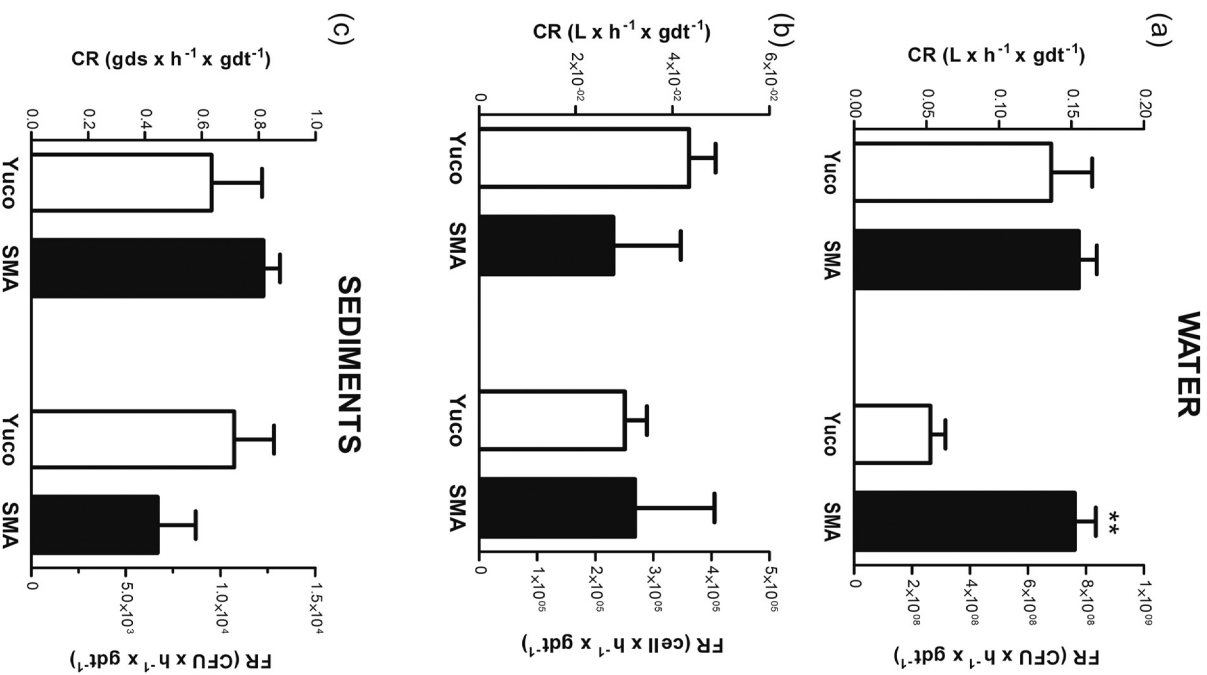


Fig. 5. Clearance (CR) and filtration (FR) rates of *Diplodon chilensis* from unpolluted (Yuco) and sewage polluted (SMA) areas in Lacar lake, calculated using water or sediments from the highly polluted site PR. CR and FR of enteric bacteria in water (a) and sediment (c); (b) CR and FR for phytoplankton in water. ** Denotes significant differences in FR between groups at $P < 0.001$.

reserves, feeding performance) and bioremediation potential of freshwater mussels chronically exposed to sewage water pollution, from field and laboratory studies. The SMA site has been affected by sewage–water pollution of varying intensity for more than 10 years [60]. The 10–30 years old individuals collected from this site have been exposed to pollution for at least one decade, which makes them a valuable model for chronic toxicity. Furthermore, considering a longevity of 60 years, for SMA and 70 years, for the reference site, Yuco [44], these are relatively young individuals, which are expected to display more active immune and antioxidant responses than older ones, as has been reported for the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* [61,62].

Several studies have focused on physiological and immunological variables of bivalves exposed to sewage water under different conditions and for variable periods [7–9,27–29,63]. Studies on wild

populations have reported that chronic exposure to multiple contaminants negatively impacts mussel health and longevity [7,44], while immune and antioxidant responses are persistent and characteristic of the site pollution history [63]. The immune response, the oxidative balance and the feeding performance of *D. chilensis* collected from SMA suggest positive modulation of defensive mechanisms by long-term exposure to sewage pollution.

4.1. Immune response, oxidative balance and cytotoxic effects on hemocytes

Hemocytes may quickly react to maintain bivalve homeostasis and integrity upon environmental changes [10]. Akaishi et al. [8] have reported that hemocytes' phagocytic activity can rise after long-term exposure to low sewage concentration and decrease upon short-term exposure to more concentrated sewage in the blue mussel *Mytilus edulis*. In addition, these authors have shown that, after a 90-day exposure, treated sewage may increase mussels' hemocyte number; while untreated sewage reduces this variable. In our work, phagocytic response and hemocyte number are almost twice as high in SMA mussels as in those from Yuco. Accordingly, cellularity and phagocytosis efficiency have been significantly increased in *Elliptio complanata* caged downstream of the outfall of tertiary-treated municipal effluents in Montreal Island, Canada [27] while Gillis et al. [7] have found increased phagocytic activity in wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*) collected downstream of municipal wastewater discharges in southern Ontario, Canada. These immune responses could be associated to individual or mixed pollutants, commonly found in sewage water, such as bacteria, metals and estrogenic compounds [9,19,64]. Gagné et al. [29] suggested that the alteration of dopamine metabolism caused by the exposure to municipal effluents in *E. complanata* would mediate hemocytes activation.

Antibacterial activity responds primarily to bacterial exposure, but estrogenic compounds and metals may also stimulate this response [19,27,65]. Phenoloxidase can also be activated in bivalves by microbiological and physico-chemical stimuli [16,66]; although, as far as we know, the possible effects of sewage water on this enzyme have not been studied before. *D. chilensis* from SMA shows a reduction in both, bacteriolytic and phenoloxidase activities in plasma, which could be interpreted as indicative of a depressed immune response capacity as has been reported for *E. complanata* [9] and *Pinctada maxima* [66].

However, sewage pollution-related immunosuppression in bivalves has been reported to include: 1) decreased cell viability [8]; 2) decreased lysosomal membrane stability [30,31,67]; 3) increased lipid peroxidation in hemocytes [30,68]; 4) increased plasmatic protein content [23]. These deleterious consequences have been attributed, among others, to the exposure to bacteria, pharmaceutical products and metals (e.g. copper), which may cause oxidative stress, severe tissue damage and metabolic disorders. In this work, none of these effects is evident in hemocytes of SMA mussels. This, together with the increased cellular response suggests that the reduction in plasmatic bacteriolytic and phenoloxidase activities is not related to immunosuppression.

In particular, the values of neutral red retention time 50% (min) recorded in *D. chilensis*, as a lysosomal membrane stability indicator, are similar to those reported by Regoli et al. [69] for the land snail *Helix aspersa*. However, these values are considerably lower than those reported for other bivalves [15,67]. *D. chilensis* hemocytes might be sensitive to dimethyl sulfoxide (used for diluting neutral red). This compound may alter cell membrane integrity regulation, as seen in *S. cerevisiae* [70]. Nevertheless, the reduction of the reading time seems not to be a methodological impediment and our results are still recordable and analyzable.

ROS production by immune cells is considered to be linked to enhanced phagocytosis in order to potentiate microorganisms killing [71]. However, Donaghy et al. [10] suggest that such relationship is not always supported by published data in bivalves and despite the lowering in ROS production, the killing of microorganisms may be not affected. In addition, the increase in hemocytes' ROS production by sewage pollution exposure may indicate an excess of oxidant radicals [23] leading to cell damage [30]. In our work, despite the elevated phagocytic activity in SMA mussels, the ROS production is lower than in Yuco ones, which is in accordance with the lack of oxidative damage in hemocytes from this polluted site. Donaghy et al. [10] have also highlighted that ROS detection in bivalves is usually difficult to assess and depends on the chosen methodology. In this case, hemocytes ROS production in *D. chilensis* hemocytes has been effectively detected by using the fluorescent probe H₂DCF-DA as substrate.

Compensatory activation of antioxidant mechanisms allows counteracting increased ROS formation during stressful conditions; thus, depletion of these defenses would make the organism more vulnerable to oxidative stress. The maintenance of TOSC at control levels in hemocytes of SMA mussels, even when ROS levels are lower than in Yuco mussels, suggests the existence of a high antioxidant potential, available to respond against increased levels of bacteria or other pollutants. The lack of oxidative damage in hemocytes from SMA mussels seems to be related to such antioxidant potential. Accordingly, Sabatini et al. [33] and Rocchetta et al. [44] have found increased enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities in digestive glands of mussels from this population; although oxidative damage had not been fully compensated. In hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*, the exposure to municipal effluents reduced the intracellular thiol levels, suggesting the loss of antioxidants, such as reduced glutathione [71]. However, to the best of our knowledge, TOSC in hemocytes is evaluated for the first time in the present paper.

Our results suggest that the increase in hemocyte number and phagocytic activity is a long-term response, which enables the immune system to cope with mild bacterial load (e.g. 950 MPN/100 mL FC) as that measured in this study, maintaining low production of ROS and high TOSC defenses and thus, avoiding oxidative stress. Matozzo et al. [63] have suggested that different physiological responses shown by clams from unpolluted and polluted sites, upon copper challenge in the laboratory might respond to genetic adaptation according to their different ecological histories. We can speculate that *D. chilensis* is genetically adapted to deal with toxic products from bacteria, which are part of its natural diet, as is discussed in Section 4.2. This adaptation would permit SMA mussels to develop an antioxidant capacity in hemocytes, which compensates sudden increases in ROS production elicited by the presence of high bacterial loads, such as those detected in the same site in previous works (e.g. 24,000 MPN/100 mL FC, Sabatini et al., 2011). In addition, Rocchetta et al. [72] have suggested that the kind of fatty acids incorporated in the diet by SMA mussels could favor stress resistance and immunity upon chronic exposure to sewage discharges.

4.2. Energetic reserves

Energetic reserves of bivalves (lipids, carbohydrates) can be consumed under stressing conditions to fuel the up-regulation of detoxifying and antioxidant defenses [42,73], leading to lowered digestive gland mass and somatic growth. In contrast, digestive gland lipid and glycogen contents and digestive gland mass (DGF) are not altered in *D. chilensis* from SMA. Furthermore, CF is higher in these mussels than in those from Yuco. As seen before, the increase in food availability in sewage polluted waters seems to favor

somatic growth in these mussels, although it reduces longevity [44,74]. As benthic filter feeders, freshwater mussels are genetically adapted to feed on bacteria, which are abundant in the natural organic detritus. Rocchetta et al. [72] have detected abundant branched fatty acids (biomarkers of bacteria) in the lipid composition of *D. chilensis* both, in Yuco and SMA mussels, with significantly higher levels in SMA. This suggests that, besides feeding on bacteria, which naturally occur in the lake's sediment–water interface, SMA mussels can also feed on enteric bacteria (with different lipopolysaccharides) and pollutant-organic matter complexes, from sewage water, which are potentially toxic due to their pro-oxidant properties [33,75]. Our results suggest that SMA mussels can compensate this environmental stress without expending energy reserves, by consuming energy from food, which is more abundant in this site than in Yuco and favors a higher growth rate [44].

4.3. Micronuclei frequency and gill mass

MN arise as chromosome fragments after mitotic processes and their frequency has been reported to be increased by both organic and inorganic pollutants [76]. In our study, MN/cell in mussels' gills is higher in SMA than in Yuco. Tsarpali et al. [31] reported an increase of MN frequency in gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed for 4 days to leachate from municipal solid waste and suggested that such genotoxic effects could be related to pro-oxidant conditions. Accordingly, *D. chilensis* have shown increased lipid peroxidation in gills after 7-month exposure to sewage water (Bianchi et al., unpublished results). Since almost no industrial activity is performed in the Lacar Lake area, the concentrations of mutagenic compounds from this origin (e.g. metal ions, phenols) are expected to be minimal. Thus, the cytotoxic effects observed in SMA mussels are more likely associated to chronic exposure to enteric bacteria and pro-oxidant compounds, such as pharmaceuticals, contained in sewage water [77–79]. In addition, GF of SMA mussels is increased compared to that of Yuco mussels. This increase in gill mass could be indicating: a – local inflammation, mostly responding to bacteria concentration [8,80] and/or b – tissue adaptations to water turbidity [81], e.g. increase in filtration area and mucus production in mussels from the polluted site. In addition, hyperplasia due to tissue damage and increased gill surface area responding to low oxygen tension could not be discarded [82]. In *D. chilensis*, the combination of MN and GF appears as a clear indication of long-term exposure to sewage water.

4.4. Feeding rates and bioremediation potential

Feeding rates are also considered as indicators of physiological status in bivalves [43], which can be negatively affected by pollutants and suspended material in water [83,84]. However, some bivalves can develop digestion and protection mechanisms, which enable them to feed on potentially harmful diets [33,85,86]. Our results show that mussels from both, unpolluted and sewage polluted areas are able to reduce water turbidity and enteric bacteria loads in water and sediments, with similar feeding performance. The CRs for enteric bacteria measured in sewage polluted water ($0.15 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) are lower but still in the same order as those measured in the laboratory for the same species with *E. coli* ($0.510 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) [33]. The higher CR in the cited study could be explained by the higher initial bacterial concentration (about 10^5 fold) and the higher assay temperature, compared to that in the present study (20 vs. 14 °C). Considering these methodological differences, the CRs obtained in both studies would be comparable; suggesting that the filtering capacity of *D. chilensis* is neither affected by long-term exposure to pollution nor by the presence of

particulate material in the water of the site PR used in the experiment. The similar CRs for phytoplankton calculated for SMA and Yuco mussels also indicate the absence of deleterious effects of chronic pollution on feeding performance. In contrast, the reduction of filtering capacity, reported for other bivalves exposed to sewage pollution, has been attributed to physical stress caused by suspended material in water [35,84].

As far as we know, bioremediation of sewage polluted sediments by filtering bivalves has not been reported before. The results of this study show that *D. chilensis* removes significant amounts of enteric bacteria from sediments. This capacity, measured as CR or FR, is not affected by long-term acclimation to the polluted site.

D. chilensis has been assessed as “Least Concern” for The IUCN Red list of Threatened species due to conservation problems related to eutrophication processes in some Chilean lakes [87,88]. In Argentina, Rocchetta et al. [44] have found reduced population density, with lack of young individuals (less than 7 years old) and reduced longevity in the polluted area of SMA, compared to populations located in clean areas of the same lake, such as Yuco and Nonthue. However, according to these authors, longevity of SMA mussels is still above 60 years and deleterious consequences observed at population level seem to be depending on lack of recruitment or juvenile mortality. Considering these data and the results of the present work, we can suggest that adult *D. chilensis* could be relocated to sewage polluted areas for remediating affected water and sediments and remain efficient for many years.

5. Conclusion

In *D. chilensis* chronically exposed to sewage pollution, the modulation of hematological defensive mechanisms (higher cell number and phagocytic activity, reduced ROS) results in higher capacity to respond to periodic increases of bacterial load without increasing hemocyte oxidative stress. These mussels preserve their capacity for feeding on bacteria, both from water and sediments, for several years or even decades, which widens the application possibilities of freshwater mussels for bioremediation strategies.

Acknowledgments

This study was supported by grants CONICET PIP 0282 and ANPCYT PICT 00214 to CML and ANPCYT PICT 1293 and CONICET PIP 112200901000283 to IR, with permission N° 815 from the Argentine National Parks Administration. We acknowledge material support from Centro de Ecología Aplicada del Neuquén and Cooperativa de Agua Potable y Saneamiento de San Martín de los Andes. The authors wish to thank Jorge Biorkman, Mariela Demicheli, Pablo Hualde and Andrés Rey for their kind help and Santiago Franzoni for scuba diving.

References

- [1] Bertin A, Inostroza PA, Quiñones RA. Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. *Mar Pollut Bull* 2011;62:1530–7.
- [2] Moynihan MA, Baker DM, Mmochi AJ. Isotopic and microbial indicators of sewage pollution from Stone Town, Zanzibar, Tanzania. *Mar Pollut Bull* 2012;64:1348–55.
- [3] Azzurro E, Matiddi M, Fanelli E, Guidetti P, La Mesa G, Scarpatto A, et al. Sewage pollution impact on Mediterranean rocky-reef fish assemblages. *Mar Environ Res* 2010;69:390–7.
- [4] Lundström E, Björnlenius B, Brinkmann M, Hollert H, Persson J-O, Breitholtz M. Comparison of six sewage effluents treated with different treatment technologies – population level responses in the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquat Toxicol* 2010;96:298–307.
- [5] Penha-Lopes Gil, Torres P, Cannicci S, Narciso L, Paula J. Monitoring anthropogenic sewage pollution on mangrove creeks in southern Mozambique: a test of *Palaemon concinnus* Dana, 1852 (Palaemonidae) as a biological indicator. *Environ Pollut* 2011;159:636–45.

- [6] de Montaudouin X, Paul-Pont I, Lambert C, Gonzalez P, Raymond N, Jude F, et al. Bivalve population health: multistress to identify hot spots. *Mar Pollut Bull* 2010;60:1307–18.
- [7] Gillis PL. Cumulative impacts of urban runoff and municipal wastewater effluents on wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*). *Sci Total Environ* 2012;431:348–56.
- [8] Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabbito I da S, de Oliveira Ribeiro CA. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat Toxicol* 2007;82:1–14.
- [9] Bouchard B, Gagné F, Fortier M, Fournier M. An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem Physiol C* 2009;150:132–40.
- [10] Donaghy L, Lambert C, Choi K-S, Soudant P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 2009;297:10–24.
- [11] Costa MM, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roch P, Novoa B, et al. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 2009;26:515–23.
- [12] Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 2011;101:13–30.
- [13] Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat Toxicol* 2000;50:351–61.
- [14] Ahmad I, Coelho JP, Mohmood I, Pacheco M, Santos MA, Duarte AC, et al. Immunosuppression in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* environmentally exposed to mercury and association with its accumulation. *Chemosphere* 2011;82:1541–6.
- [15] Mamaca E, Bechmann RK, Torgrimsen S, Aas Endre, Bjørnstad A, Baussant T, et al. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquat Toxicol* 2005;75:191–201.
- [16] Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp Biochem Physiol B* 2007;148:470–80.
- [17] Allam B, Paillard C, Auffret M. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J Invertebr Pathol* 2000;76:63–9.
- [18] Kuchel RP, Raftos DA, Nair S. Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricata*. *Fish Shellfish Immunol* 2010;29:930–6.
- [19] Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Regoli F, Poiana G, et al. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 2007;69:994–1002.
- [20] Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J-Y, Saulnier D, Renault T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol* 2007;84:92–102.
- [21] Hégarret H, Wikfors GH, Soudant P, Delaporte M, Alix JH, Smith BC, et al. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 2004;234:541–60.
- [22] Perrigault M, Allam B. Differential immune response in the hard clam (mercenaria mercenaria) against bacteria and the protistan pathogen QPX (quahog parasite unknown). *Fish Shellfish Immunol* 2012;32:1124–34.
- [23] Auffret M, Rousseau S, Boutet I, Tanguya A, Baron J, Moraga D, et al. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;63:393–405.
- [24] Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Farkas A, Vehovszky Á, Gyori J, Stoliar OB. Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country. *Chemosphere* 2010;81:1342–51.
- [25] Höher N, Köhler A, Strand J, Broeg K. Effects of various pollutant mixtures on immune responses of the blue mussel (*Mytilus edulis*) collected at a salinity gradient in Danish coastal waters. *Mar Environ Res* 2012;75:35–44.
- [26] Danellakis D, Ntaikou Ioanna, Kornaros M, Dailianis S. Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 2011;101:358–66.
- [27] Farcy E, Gagné F, Martel L, Fortier M, Trépanier S, Brousseau P, et al. Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environ Res* 2011;111:1096–106.
- [28] Gagné F, André C, Cejka P, Hausler R, Fournier M, Blaise C. Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: a pilot plant study. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;69:366–73.
- [29] Gagné F, André C, Fortier M, Fournier M. Immunotoxic potential of aeration lagoon effluents for the treatment of domestic and hospital wastewaters in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *J Environ Sci* 2012;24:781–9.
- [30] Toufexi E, Tsarpali V, Efthimiou I, Vidalis M-S, Vlastos D, Dailianis S. Environmental and human risk assessment of landfill leachate: an integrated approach with the use of cytotoxic and genotoxic stress indices in mussel and human cells. *J Hazard Mater* 2013;260:593–601.
- [31] Tsarpali V, Dailianis S. Investigation of landfill leachate toxic potency: an integrated approach with the use of stress indices in tissues of mussels. *Aquat Toxicol* 2012;124–125:58–65.
- [32] Ribeiro Guevara S, Arribére M, Bubach D, Vigliano P, Rizzo A, Alonso M, et al. Silver contamination on abiotic and biotic compartments of Nahuel Huapi National Park lakes, Patagonia, Argentina. *Sci Total Environ* 2005;336:119–34.
- [33] Sabatini SE, Rocchetta I, Luquet CM, Guido MI, Ríos de Molina MC. Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologia* 2011;41:356–62.
- [34] Miserendino ML, Casaux R, Archangelsky M, Di Prinzio CY, Brand C, Kutschker AM. Assessing land-use effects on water quality, in-stream habitat, riparian ecosystems and biodiversity in Patagonian northwest streams. *Sci Total Environ* 2011;409:612–24.
- [35] Barillé L, Prou J, Héral M, Razet D. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J Exp Mar Biol Ecol* 1997;212(2):149–72.
- [36] Jones AB, Dennison WC, Preston NP. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture* 2001;193:155–78.
- [37] Zhou Y, Yang H, Zhang T, Qin P, Xu X, Zhang F. Density-dependent effects on seston dynamics and rates of filtering and biodeposition of the suspension-cultured scallop *Chlamys farreri* in a eutrophic bay (northern China): an experimental study in semi-in situ flow-through systems. *J Mar Sys* 2006;59:143–58.
- [38] Parada E, Peredo S, Cárdenas S, Valdebenito I, Peredo M. *Diplodon chilensis* Gray, 1828 (bivalvia: hyriidae) a potential residual waters depurator on inland water salmonid fishfarms: a laboratory scale study. *Gayana* 2008;72(1):68–78.
- [39] Soto D, Mena G. Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture* 1999;171:65–81.
- [40] Lara G, Contreras A, Encina F. La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia, Hyriidae) potencial biofiltro para disminuir los niveles de coliformes en pozos. Experimentos de laboratorio. *Gayana* 2002;66:113–8.
- [41] Albentosa M, Sánchez-Hernández M, Campillo JA, Moyano FJ. Relationship between physiological measurements (SFG-scope for growth-) and the functionality of the digestive gland in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol A* 2012;163(3–4):286–95.
- [42] Smolders R, Bervoets L, De Coen W, Blust R. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ Pollut* 2004;129:99–112.
- [43] Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G, Sukhotin A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res* 2012;79:1–15.
- [44] Rocchetta I, Lomovasky B, Yusseppone MS, Sabatini SE, Bieczynski F, Ríos de Molina MC, et al. Growth, abundance, morphometric and metabolic parameters of three populations of freshwater bivalve subject to different levels of natural and anthropogenic organic matter input in a glacial lake of North Patagonia. *Limnologia* 2014;44:72–80.
- [45] APHA, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Federation. Standard methods for examination of water and wastewater. 20th ed. 1998. Madrid, Spain.
- [46] Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 1987;148:350–82.
- [47] Juhel G, Davenport J, O'Halloran J, Culloy SC, O'Riordan RM, James KF, et al. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: a bioenergetics approach. *Aquat Toxicol* 2006;79:391–400.
- [48] Tett P, Kelly MG, Hornberger GM. Estimation of chlorophyll a and pheophytin a in methanol. *Limnol Oceanogr* 1977;22:579–80.
- [49] Kjeldahl JZ. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Anal Chem* 1883;22:366.
- [50] Takeuchi T. Laboratory work. Chemical evaluation of dietary nutrients. In: Watanabe T, editor. *Fish nutrition and mariculture*. JICA; 1988.
- [51] Burkhard MJ, Leavell S, Weiss RB, Kuehnl K, Valentine H, Watters GT, et al. Analysis and cytologic characterization of hemocytes from freshwater mussels (*Quadrula* sp.). *Vet Clin Pathol* 2009;38(4):426–36.
- [52] Moss B, Allam B. Fluorometric measurement of oxidative burst in lobster hemocytes and inhibiting effect of pathogenic bacteria and hypoxia. *J Shellfish Res* 2006;25(3):1051–7.
- [53] Das BK, Pradhan J, Sahu S. The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shellfish Immunol* 2009;26:871–6.
- [54] Amado LL, Garcia L, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ribas Ferreira JL, et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 2009;407:2115–23.
- [55] Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices. Characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 1988;4:155–61.
- [56] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.
- [57] Van Handel E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem* 1965;11:256–65.
- [58] Machado-Schiaffino G, Bala LO, Garcia-Vazquez E. Recovery of normal cytogenetic records in mussels after cessation of pollutant effluents in Puerto Madryn (Patagonia, Argentina). *Estuar Coast* 2009;32(4):813–8.

- [59] Lara G, Parada E, Peredo S. Alimentación y conducta alimentaria de la almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (BIVALVIA: HYRIIDAE). *Gayana* 2002;66(2): 107–12.
- [60] Temporetti P, Baffico G, Diaz M, Pedrozo F. Estado trófico del lago Lacar y del arroyo Pocahullo. Influencia de la descarga de líquidos cloacales en la cuenca oriental del lago; 2009. Technical report: Un puente entre la Universidad y la Sociedad. Secretaría de Políticas Universitarias, Ministerio de Educación Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional del Comahue.
- [61] Husmann G, Philipp EER, Rosenstiel P, Vazquez S, Abele D. Immune response of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to physical stress and microbial exposure. *J Exp Mar Biol Ecol* 2011;398(1–2):83–90.
- [62] Husmann G, Abele D, Rosenstiel P, Clark MS, Kraemer L, Philipp EER. Age-dependent expression of stress and antimicrobial genes in the hemocytes and siphon tissue of the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*, exposed to injury and starvation. *Cell Stress Chaperones* 2014;19:15–32.
- [63] Matozzo V, Giacomazzo M, Finos L, Marin MG, Bargelloni L, Milan M. Can ecological history influence immunomarker responses and antioxidant enzyme activities in bivalves that have been experimentally exposed to contaminants? A new subject for discussion in “eco-immunology” studies. *Fish Shellfish Immunol* 2013;35(1):126–35.
- [64] Parry HE, Pipe RK. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat Toxicol* 2004;69:311–25.
- [65] Hong X-T, Xiang L-X, Shao J-Z. The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. *Fish Shellfish Immunol* 2006;21:357–64.
- [66] Kuchel RP, McCarthy A, Raftos DA. Phenoloxidase activity as an indicator of stress in the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Aquaculture* 2012;364–365:224–9.
- [67] Parolini M, Binelli A, Provini A. Chronic effects induced by ibuprofen on the fresh water bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011;74: 1586–94.
- [68] Gagné F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp Biochem Physiol C* 2006;143:179–86.
- [69] Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Machella N, et al. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ Health Perspect* 2006;114(1):63–9.
- [70] Zhang L, Liu N, Ma X, Jiang L. The transcriptional control machinery as well as the cell wall integrity and its regulation are involved in the detoxification of the organic solvent dimethyl sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2013;13(2):200–18.
- [71] Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagné F. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 2013;126:393–403.
- [72] Rocchetta I, Pasquevich MY, Heras H, Ríos de Molina MC, Luquet CM. Effects of sewage discharges on lipid and fatty acid composition of the Patagonian bivalve *Diplodon chilensis*. *Mar Pollut Bull* 2013;79(1–2):211–9.
- [73] Mouneyrac C, Linot S, Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Métails I, Durou C, et al. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *Gen Comp Endocrinol* 2008;157: 133–133.
- [74] Sara G, Reid GK, Rinaldi A, Palmeri V, Troell M, Kooijman SALM. Growth and reproductive simulation of candidate hell fish species at fish cages in the Southern Mediterranean: dynamic energy budget (DEB) modelling for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 2012;324–325:259–326.
- [75] Marques Souza DS, Dores Ramos AP, Flores Nunes F, Moresco V, Taniguchi S, Guiguet DA, et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical and chemical parameters. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012;76:153–61.
- [76] Çavas T, Ergene-Gözükarar S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat Res* 2003;538:81–91.
- [77] Abou-Eisha A. Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. *Toxicol Vitro* 2006;20:601–7.
- [78] Ayllón F, Garcia-Vazquez E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2001;49:221–5.
- [79] Gagné F, André C, Cejka P, Hausler R, Fournier M. Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. *Comp Biochem Physiol C* 2011;154:100–7.
- [80] Costa PM, Carreira S, Costa MH, Caeiro S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquat Toxicol* 2013;126:442–54.
- [81] Dutertre M, Barillé L, Haure J, Cognie B. Functional responses associated with pallial organ variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J Exp Mar Biol Ecol* 2007;352(1):139–51.
- [82] Sollid J, De Angelis P, Gundersen K, Nilsson GE. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J Exp Biol* 2003;206:3667–73.
- [83] Culbertson JB, Valiela I, Olsen YS, Reddy CM. Effect of field exposure to 38-year-old residual petroleum hydrocarbons on growth, condition index, and filtration rate of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Environ Pollut* 2008;154:312–9.
- [84] Ellis J, Cummings V, Hewitt J, Thrush S, Norrko A. Determining effects of suspended sediment on condition of a suspension feeding bivalve (*Atrina zelandica*): results of a survey, a laboratory experiment and a field transplant experiment. *J Exp Mar Biol Ecol* 2002;267:147–74.
- [85] Fernández-Reiriz MJ, Navarro JM, Contreras AM, Labarta U. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat Toxicol* 2008;87(4):245–51.
- [86] McHenry JG, Birkbeck TH, Allen JA. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp Biochem Physiol B* 1979;63(1):25–8.
- [87] Bogan A, Cummings K. *Diplodon chilensis*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2, <www.iucnredlist.org>; 2011 [Downloaded on 07 January 2014].
- [88] Valdovinos C, Pedreros P. Geographic variations in shell growth rates of the mussel *Diplodon chilensis* from temperate lakes of Chile: implications for biodiversity conservation. *Limnologia* 2007;37:63–75.