

## Respuestas a distintos niveles de organización biológica del poliqueto *Boccardia proboscidea* ante la contaminación cloacal

MANUELA ORTELLS PRIVITERA<sup>1</sup>; MARÍA L. JAUBET<sup>1,2</sup> & MARÍA V. LAITANO<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Marinas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

**RESUMEN.** El vertido de efluentes domésticos e industriales a los océanos es una de las principales formas de contaminación marina. El impacto de estos efluentes sobre el medio marino se puede estudiar a través de las respuestas a distintos niveles de organización biológica dentro del ecosistema. El objetivo de este trabajo fue evaluar respuestas bioquímicas (actividad de amilasas, proteasas alcalinas, lipasas, fenoloxidasas y pirogalol peroxidasas) y ecológicas (abundancia, talla y estructura poblacional) del poliqueto *Boccardia proboscidea* ante la exposición ambiental a contaminación cloacal, y explorar la relación entre ellas. Para el estudio se seleccionaron las zonas intermareales expuestas a dos efluentes cloacales con distintas características: un efluente intermareal sin tratamiento previo (Quequén) y un emisario submarino con tratamiento primario (Mar del Plata), ambos con sus áreas controles correspondientes. Los resultados no mostraron diferencias en la actividad de las enzimas digestivas ni de las pirogalol-peroxidasas. En cambio, la actividad de la fenoloxidasa alcanzó el mayor valor en el área impactada de Quequén, donde se registró la mayor densidad poblacional de *B. proboscidea*. Por otro lado, los individuos del área control de Quequén fueron de mayor talla respecto del resto de las áreas. En cuanto a la frecuencia de clases de edad (larva, juvenil, adulto), en el área impactada de Quequén se registró el mayor valor de individuos adultos. El análisis de la relación entre las respuestas bioquímicas, ecológicas y las variables ambientales mostró que la materia orgánica total y la densidad de *B. proboscidea* correlacionaron lineal positivamente con la actividad de la fenoloxidasa. Estos resultados sugieren que la exposición ambiental al efluente cloacal de Quequén induciría cambios a nivel fisiológico en los individuos de *B. proboscidea*, reflejado por la alta actividad de la enzima fenoloxidasa, que, a su vez, se relacionó positivamente con la densidad poblacional de esta especie.

[Palabras clave: contaminación marina, Spionidae, biomarcadores, fenoloxidasa, Argentina]

**ABSTRACT.** Responses at different levels of biological organization of the *Boccardia proboscidea* polychaete to sewage contamination. The discharge of domestic and industrial effluents into the oceans is one of the main forms of marine pollution. The impact of these effluents on the marine environment can be studied through the responses at different levels of biological organization within the ecosystem. The objective of this work was to evaluate biochemical (amylases, alkaline proteases, lipases, phenoloxidase and pyrogallol peroxidases activity) and ecological responses (abundance, size and population structure) of *Boccardia proboscidea* polychaetes to sewage environmental exposure, and to explore the relationship among them. The intertidal zone exposed to two sewage effluents with different characteristics were selected for the study: an intertidal effluent without previous treatment (Quequén) and a submarine outfall with primary treatment (Mar del Plata), both with their corresponding control areas. The results showed that no significant differences were found in the activity of digestive enzymes, nor of the pyrogallol-peroxidases of *B. proboscidea*. In contrast, phenoloxidase activity presented the highest values in the impacted area from Quequén. In turn, the highest population density of *B. proboscidea* was recorded there. On the other hand, the individuals in the control area from Quequén were longer than those from the rest of the areas. Regarding the frequency of age classes (larvae, juvenile and adult), in the impacted area from Quequén, the highest value of adults individuals was recorded. The relationship between the biochemical and ecological responses and the environmental variables showed that the total organic matter in sediments and density of *B. proboscidea* presented a positive linear correlation with the activity of phenoloxidase. Our results suggest that exposure to the Quequén sewage effluent would induce physiological changes in *B. proboscidea*, reflected by the high activity of the enzyme phenoloxidase, which in turn showed a positive relationship with the population density of this species.

[Keywords: marine pollution, Spionidae, biomarkers, phenoloxidase, Argentina]

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los asentamientos urbanos se encuentran sobre las costas de los distintos continentes y generan, inevitablemente, contaminación marina. Una de las fuentes de este tipo de contaminación son las descargas cloacales, que en muchas ocasiones se vierten en los océanos sin tratamiento previo a través de efluentes inter o submareales (emisarios submarinos), alterando la estructura y la dinámica de las comunidades bentónicas costeras (Muniz et al. 2013).

El impacto antrópico en ambientes naturales se puede estudiar a través de los efectos de la contaminación sobre los organismos. Para ello, una de las herramientas que más se usan son los biomarcadores (Lomartire et al. 2021) (i.e., cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos o comportamentales en los organismos que revelan el/los efecto/s de uno o más contaminantes) (Amiard-Triquet and Berthet 2015; Salomão et al. 2020; Tlili and Mouneyrac 2021). Múltiples investigaciones en los últimos años demostraron la eficiencia del uso de biomarcadores para evaluar el estado de salud de los organismos y el riesgo ambiental asociado a contaminación (e.g., se demostraron los efectos de la contaminación en enzimas digestivas [Charron et al. 2015], biomarcadores de estrés oxidativo [Benedetti et al. 2015] y del sistema inmune [Gao et al. 2020]). Así, los biomarcadores se consideran herramientas de alerta temprana de contaminación (Jemec et al. 2009), ya que se espera que los efectos medibles a nivel sub-individuo (molecular, celular, tisular) aparezcan antes que se genere una alteración a niveles de organización biológica mayores (poblacional, comunitario, ecosistémico) (Markert 2007). Sin embargo, el perjuicio hallado a nivel sub-individuo no implica necesariamente un daño a nivel poblacional o comunitario. De esta manera, los estudios que abordan los efectos de la contaminación desde distintos niveles de organización biológica son útiles para ampliar el conocimiento acerca de los posibles mecanismos que subyacen a los daños ecológicos (Seabra Pereira et al. 2014). En particular, esto resulta interesante cuando los organismos estudiados son especies que muestran una respuesta positiva a la contaminación a nivel poblacional, ya que pueden aumentar su abundancia y, de esta forma, impactar en la biodiversidad de los ensambles de los que forman parte.

A los poliquetos se los considera uno de los mejores indicadores de disturbio ambiental (Pearson and Rosenberg 1978; Elías et al. 2021). *Boccardia proboscidea* Hartman 1940 es una especie que se utiliza como bioindicadora de contaminación orgánica a nivel global. Existen diversos estudios basados en respuestas a nivel poblacional que reflejan cómo varían diferentes parámetros poblacionales, tales como la abundancia (Llanos et al. 2021), la estructura de tallas (Voullioz 2016) y los patrones reproductivos (Jaubet et al. 2015) de *B. proboscidea* ante la exposición a la contaminación cloacal.

En el sudeste de la provincia de Buenos Aires se pueden encontrar al menos dos escenarios distintos de contaminación cloacal. Un primer escenario se ubica en Punta Carballido, 4 km al este de Puerto Quequén. Esta área presenta un efluente cloacal que vierte las aguas residuales generadas por casi 115400 habitantes de las ciudades de Necochea y Quequén (Censo INDEC 2010). El vertido se produce directamente sobre la zona intermareal sin tratamiento previo, y el volumen descargado es ~14000 m<sup>3</sup>/día (López Gappa et al. 1990). El intermareal en la zona de descarga se caracteriza por la presencia de arrecifes de *B. proboscidea* compuestos por cientos de miles de tubos de arena por metro cuadrado (Hines 2018) que modifican la estructura de toda la comunidad bentónica intermareal (Saracho-Bottero et al. 2020). El segundo escenario se ubica en la ciudad de Mar del Plata. Hasta diciembre del 2014, los residuos cloacales producidos por casi 600000 habitantes (Censo INDEC 2010) y cerca de 3 millones de turistas en verano (Bouvet et al. 2005) se vertían directamente al mar solo con un pre-tratamiento (Sánchez 2014). En 2009 comenzó la construcción del emisario submarino (ES), y durante ese período se registró la presencia de arrecifes del poliqueto invasor *B. proboscidea* en la zona circundante a la descarga. Como consecuencia, la comunidad bentónica intermareal fue modificada (Jaubet et al. 2011) y el desarrollo de arrecifes generó una disminución en los índices de riqueza, equitatividad y diversidad de la comunidad intermareal (Llanos et al. 2021). En diciembre de 2014 se inauguró oficialmente el ES, y a mediados de 2018, la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) (OSSE 2018). Con el ES en funcionamiento, los vertidos se descargan, luego de ser tratados (tratamiento primario), sobre el submareal, a 4 km de la

línea de costa. En consecuencia, se registró que la estructura de la comunidad bentónica intermareal está cambiando y está adquiriendo características propias de las comunidades de áreas no impactadas o con impacto intermedio (Cuello et al. 2019).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar respuestas bioquímicas (actividad de enzimas digestivas y relacionadas con el sistema antioxidante e inmune) y ecológicas (abundancia, talla y estructura poblacional) de *B. proboscidea* frente a distintos escenarios de contaminación cloacal y explorar la relación entre ellas. En base a lo expuesto, las hipótesis a evaluar fueron: 1) las respuestas bioquímicas y ecológicas de *B. proboscidea* son diferentes frente a los distintos escenarios de exposición ambiental a la contaminación cloacal, y 2) las respuestas bioquímicas se relacionan de forma positiva con las respuestas ecológicas en el área con descarga intermareal del efluente cloacal, mientras que en el área con descarga submareal las variaciones bioquímicas no implican una respuesta ecológica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de estudio y período de muestreo

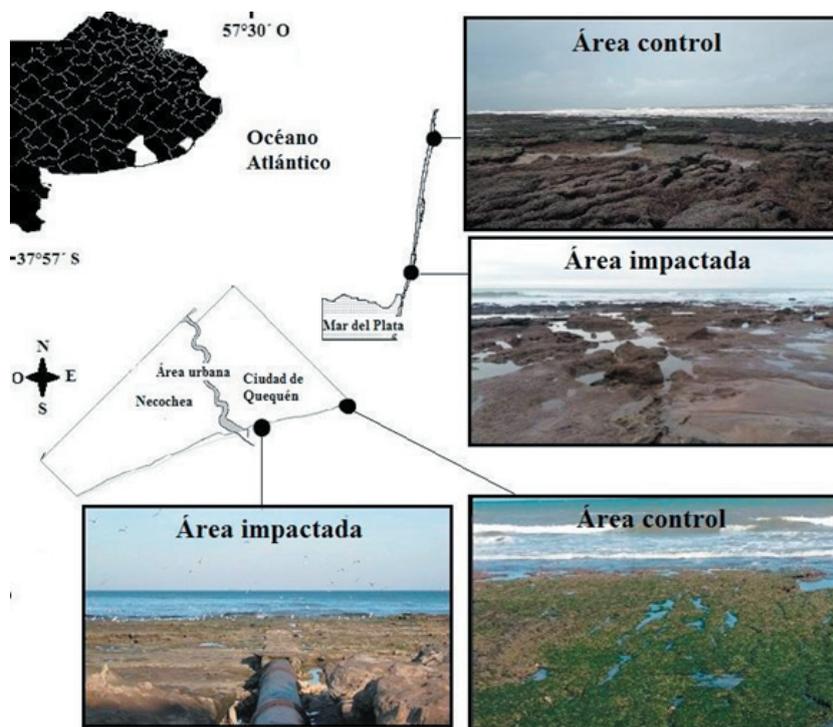
El muestreo de ejemplares de *B. proboscidea* se realizó en zonas intermareales de los partidos de Necochea y Gral. Pueyrredón entre octubre

y diciembre de 2019 dado que la población de esta especie alcanza picos reproductivos durante el período estival (Jaubet et al. 2015). Ambos intermareales están compuestos por plataformas de abrasión de loess consolidado y presentan similitud morfológica, geológica y biológica (ensamble de especies).

En Quequén (partido de Necochea) se tomaron muestras donde desemboca el efluente cloacal (Punta Carballedo;  $38^{\circ}34'05''$  S -  $58^{\circ}42'22''$  O; de aquí en adelante, llamada área 'Quequén impactada': QQ i). El área control se ubicó 4 km al norte del área impactada (Costa Bonita;  $38^{\circ}33'00''$  S -  $58^{\circ}38'00''$  O; área 'Quequén control': QQ c). En Mar del Plata (partido de Gral. Pueyrredón), se tomaron muestras del intermareal donde actualmente funciona el emisario submarino ( $37^{\circ}56'2''$  S -  $57^{\circ}31'54''$  O; área 'Mar del Plata impactada': MdP i) y en una playa ubicada 8 km al norte del mismo (área 'Mar del Plata control': MdP c) (Figura 1).

### Medición de variables ambientales

Al momento de coleccionar las muestras de organismos se registró el pH, oxígeno disuelto y salinidad en agua de mar mediante un equipo multiparamétrico AQUARED AP 5000. Se realizaron 3 mediciones al azar en el límite inferior de la plataforma intermareal de cada área de muestreo. Por otro lado, se tomaron



**Figura 1.** Localización de los sitios de muestreo en la provincia de Buenos Aires. Partido de Necochea; área impactada: QQ i (donde se ubica el efluente cloacal) y área control: QQ c (Costa Bonita). Partido de General Pueyrredón; área impactada: MdP i (1-1.2 km al sur del efluente) y área control: MdP c (8 km al norte del efluente).

**Figure 1.** Location of the sampling sites in Buenos Aires province. Necochea; impacted area: QQ i (where the sewage effluent is located) and control area: QQ c (Costa Bonita). General Pueyrredón; impacted area: MdP i (1-1.2 km south of the effluent) and control area: MdP c (8 km north of the effluent).

3 muestras aleatorias de sedimento (10-30 g) en la zona media-inferior del intermareal. El porcentaje de materia orgánica total (MOT) fue determinado por el método de calcinación (Byers et al. 1978).

#### *Obtención y procesamiento de muestras para análisis bioquímicos*

En cada área de muestreo se tomaron de forma aleatoria 3 *pooles* de poliquetos (N=15-20) mediante espátula. Las muestras fueron tamizadas en el laboratorio a través de una malla de 0.5 mm y los organismos de *B. proboscidea* retenidos fueron inmediatamente separados bajo una lupa binocular (LEICA WILD M3Z) y conservados a -20 °C. Luego, las muestras fueron homogeneizadas con agua destilada sobre hielo y centrifugadas durante 30 minutos a 10000 g y 4 °C. El sobrenadante fue extraído y conservado a -20 °C hasta su análisis.

En todos los homogenatos obtenidos se realizó la determinación de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La actividad de proteasas alcalinas fue determinada según García-Carreño (1992), con azocaseína al 0.5% como sustrato, disuelta en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8. Siguiendo a Nolasco Soria et al. (2018) se realizó la determinación de la actividad de lipasas en microplacas, con  $\beta$ -naftil caprilato (20mM en DMSO) como sustrato. La actividad amilasas fue determinada según Vega Villasante et al. (1999) a través de la hidrólisis de almidón (1% p/v en *buffer* Tris). La determinación de la actividad de fenoloxidasa (FO) fue determinada de acuerdo a Palmer et al. (2011) utilizando L-DOPA como sustrato. La actividad de las pirogalol peroxidasas fue evaluada siguiendo la metodología de Lamela et al. (2005). La determinación de la actividad de amilasas y pirogalol peroxidasas se realizó sólo en las muestras obtenidas en Quequén, ya que el volumen de homogenato obtenido de las muestras de Mar del Plata fue insuficiente para realizar todas las mediciones. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado con dos blancos. Todas las actividades enzimáticas fueron medidas mediante un espectrofotómetro de microplacas SPECTROstar Nano BMG LABTECH. Los valores obtenidos para las actividades de proteasas alcalinas, lipasas, amilasas y fenoloxidasa se presentan como  $\text{abs}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ . Por otra parte, los valores obtenidos para la actividad de las

pirogalol peroxidasas son expresados como  $\text{delta abs}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ .

#### *Obtención y procesamiento de muestras para análisis ecológico*

En cada área de muestreo se tomaron en forma aleatoria 3 unidades muestrales (UM) en rocas intermareales independientes, por medio de un cilindro plástico de PVC (*core*) de 10 cm de diámetro. Cada muestra fue conservada con agua de mar en frascos de plástico y fijadas con una solución de formaldehído (5%) hasta su posterior análisis.

Cada UM fue tamizada a través de una malla de 0.5 mm. Luego, los organismos de *B. proboscidea* retenidos fueron separados, medidos y cuantificados. Debido a la alta fragilidad de los especímenes, es muy común que durante la colecta y manipulación de las muestras los mismos se rompan o se corten. Por lo tanto, para poder estimar el número total de setígeros de los individuos rotos se utilizó el modelo de regresión obtenido por Vouilloz (2016). El mismo utiliza la medida del ancho del quinto setígero (segmento más ancho con respecto al resto del cuerpo) para estimar el largo (en número de setígeros) del individuo roto. Por lo tanto, se midió el ancho del quinto setígero de todos los individuos. De esta manera, se obtuvo el largo total de cada individuo. Todas las mediciones fueron realizadas bajo lupa binocular (LEICA WILD M3Z) con ocular micrométrico (aumento: 40x). Posteriormente, a cada individuo se lo clasificó por clase de edad en larva, juvenil y adulto siguiendo el modelo de Gibson (1997). Las larvas presentan hasta 16 setígeros, los juveniles entre 17 a 45 setígeros y los adultos más de 45 setígeros.

#### *Análisis de datos*

Para determinar si existen diferencias en las variables ambientales, la actividad enzimática de las enzimas proteasas, lipasas y fenoloxidasa, la densidad (individuos/m<sup>2</sup>) y las tallas (largo) de *B. proboscidea* entre las áreas de muestreo se realizaron ANOVAs. Las áreas de muestreo fueron utilizadas como niveles del factor. Para las enzimas amilasas y peroxidasas (registradas solo en Quequén), se aplicó una prueba t de Student para muestras independientes. Ambas pruebas se realizaron luego de corroborar los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (prueba de Levene) (Zar 1999). Cuando el análisis fue significativo,

se evaluaron las diferencias entre áreas con una prueba *a posteriori* de Tukey. En los casos en que las variables no cumplieron con los supuestos de normalidad u homocedasticidad, se las transformó aplicando raíz cuadrada (Zar 1999). Si las variables transformadas aun no hubieran cumplido los supuestos de normalidad u homocedasticidad, se aplicó un método no paramétrico. Para todos los análisis se consideró un nivel de significancia de 0.05 y se utilizó el software R, versión 3.6.2 (R Core Team 2020).

Para analizar qué tipo de clases de edad (larva, juvenil, adulto) fue la más frecuente en cada área de estudio se realizó una tabla de contingencia de dos vías: 'sitio' y 'clase de edad'. Las diferencias fueron evaluadas por medio de una prueba de Chi-cuadrado (Zar 1999).

Para determinar la relación entre las respuestas bioquímicas, ecológicas y las variables ambientales se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Zar 1999). De este análisis se obtuvo, además, la matriz de correlación entre todas las variables. La significancia del modelo factorial (o la extracción de los factores) fue evaluada por medio de la prueba KMO (Kaiser, Meyer y Olkin) y la prueba de esfericidad de Bartlett con un nivel de significancia de 0.05 (Wold et al. 1987).

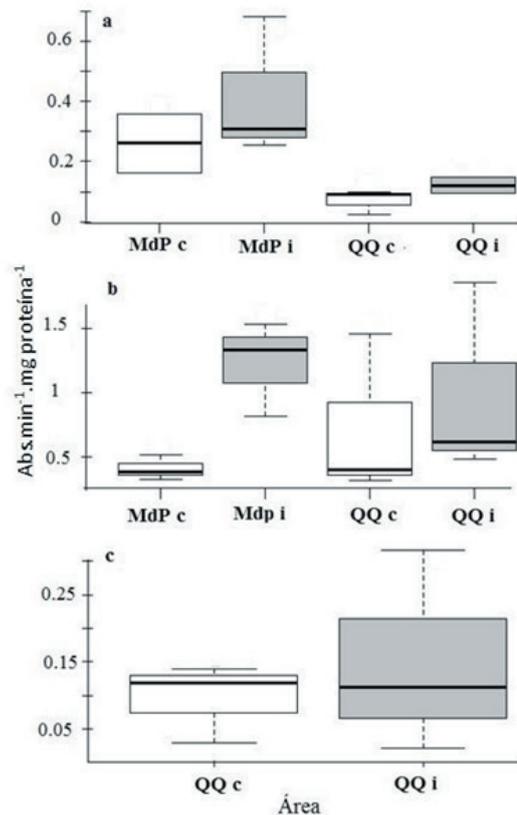
## RESULTADOS

### Caracterización ambiental de las áreas de estudio

La media aritmética ( $\pm$ SEM) de las variables utilizadas para la caracterización ambiental se observan en la Tabla 1. Con respecto a la salinidad, no hubo diferencias entre las áreas (Kruskal-Wallis:  $P>0.05$ ). El menor valor de pH se registró en el área impactada de Quequén ( $8.18\pm 0.04$ ) y fue diferente al área control de Quequén (Tukey:  $P<0.05$ ). Dentro del sitio Mar del Plata no hubo diferencias en el pH. Por otro lado, se observaron diferencias en los valores de pH entre el área control de Mar del Plata y el área impactada y control de Quequén y entre el área impactada de Mar del Plata y Quequén (Tukey:  $P>0.05$ ). Los valores de oxígeno disuelto mostraron diferencias entre el área control de Quequén y el resto de las áreas (Tukey:  $P<0.05$ ), presentando este área el valor más alto registrado ( $9.88\pm 0.23$  mg/L). Por último, no se detectaron diferencias en la MOT entre las áreas (ANOVA:  $F=1.07$ ; g.l.=3;  $P>0.05$ ).

### Respuestas bioquímicas

Respecto a las enzimas digestivas, no se detectaron diferencias en la actividad de las proteasas alcalinas entre las áreas de estudio (ANOVA:  $F=3.07$ ; g.l.= 3;  $P>0.05$ ) (Figura 2a). La actividad de las lipasas tampoco difirió significativamente entre las áreas en ambos sitios (ANOVA:  $F=1.31$ ; g.l.=3;  $P>0.05$ ), aunque se observa una tendencia hacia mayores valores en las áreas impactadas (Figura 2b). En cuanto a la actividad de amilasas, no se encontró diferencias entre el área impactada y control de Quequén (prueba de t:  $P>0.05$ ) (Figura 2c). Por otra parte, la actividad de la fenoloxidasasa fue significativamente mayor



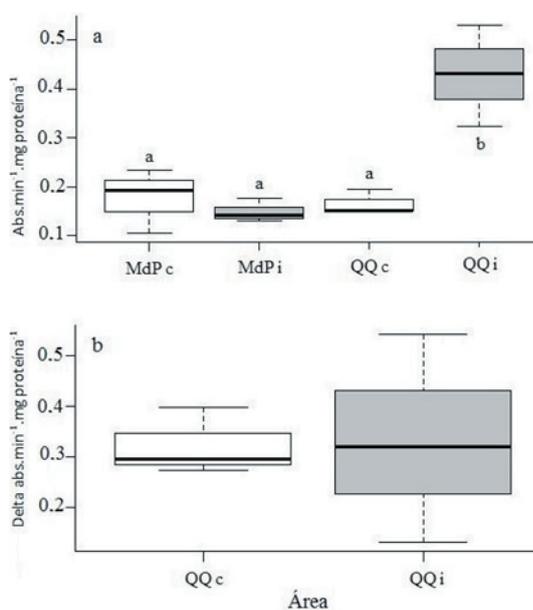
**Figura 2.** Actividad de proteasas alcalinas (a), lipasas (b) y amilasas (c) en las áreas de muestreo Mar del Plata control (Mdp c), Mar del Plata impactada (Mdp i), Quequén control (QQ c) y Quequén impactada (QQ i). El borde superior e inferior de las cajas corresponden al 25%-75% percentil, la línea en el interior de las cajas indica la mediana y las líneas verticales representan máximos y mínimos.

**Figure 2.** Alkaline proteases (a), lipases (b) and amylases activities (c) in the sampling areas Mar del Plata control (Mdp c), Mar del Plata impacted (Mdp i), Quequén control (QQ c) and Quequén impacted (QQ i). The upper and lower edges of the boxes correspond to the 25%-75% percentile, the line inside the boxes indicates the median, and the vertical lines represent maximums and minimums.

**Tabla 1.** Variables ambientales determinadas en las áreas de muestreo. QQ c: Quequén control; QQ i: Quequén impactada; MdP c: Mar del Plata control; MdP i: Mar del Plata impactada. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de una variable ( $P<0.05$ ).

**Table 1.** Environmental variables determined in the sampling areas. QQ c: Quequén control; QQ i: Quequén impacted; MdP c: Mar del Plata control; MdP i: Mar del Plata impacted. Different letters indicate significant differences within a variable ( $P<0.05$ ).

	Salinidad (ups)	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)	MOT (%)
QQ c	34.5±0.29	8.18±0.04 <sup>nd</sup>	9.88±0.23 <sup>a</sup>	1.53±0.27
QQ i	36.2±1.85	7.84±0.09 <sup>b</sup>	8.03±0.40 <sup>b</sup>	2.78±1.57
MdP c	34.2±0.18	8.48±0.01 <sup>c</sup>	8.14±0.03 <sup>b</sup>	1.57±0.19
MdP i	34.7±0.05	8.42±0.06 <sup>cd</sup>	8.11±0.12 <sup>b</sup>	1.42±0.13



**Figura 3.** Actividad de fenoloxidasas (a) y pirogalol peroxidasas (b) en las áreas de muestreo Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impactada (MdP i), Quequén control (QQ c) y Quequén impactada (QQ i). Los bordes superior e inferior de las cajas corresponden al 25%-75% percentil, la línea en el interior de las cajas indica la mediana y las líneas verticales representan máximos y mínimos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

**Figure 3.** Phenoloxidase (a) and pyrogallol peroxidases (b) activities in the sampling areas Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impacted (MdP i), Quequén control (QQ c) and Quequén impacted (QQ i). The upper and lower edges of the boxes correspond to the 25%-75% percentile, the line inside the boxes indicates the median, and the vertical lines represent maximums and minimums. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

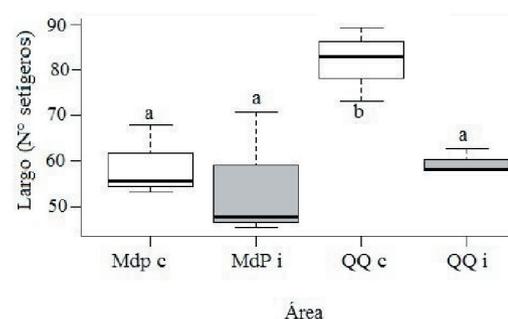
en el área impactada de Quequén (ANOVA:  $F=13.01$ ;  $g.l.=3$ ;  $P<0.05$ ) (Figura 3a). La actividad de la pirogalol peroxidasas no difirió entre el área impactada y control de Quequén (prueba de  $t$ :  $P>0.05$ ) (Figura 3b).

#### Respuestas ecológicas

Se midió un total de 2764 individuos de *B. proboscidea*. El largo promedio de los individuos en Quequén fue  $60\pm 13.13$

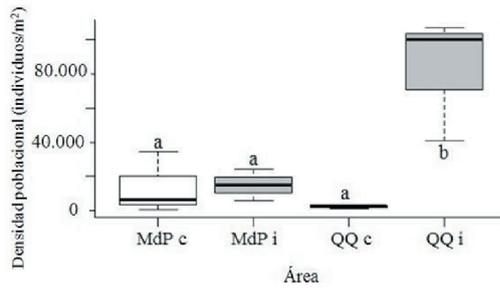
setígeros (área impactada; máx=119, min=31) y  $81\pm 17.7$  setígeros (área control; máx=131, min=35); mientras tanto, en Mar del Plata, el largo promedio fue  $50\pm 15.15$  setígeros (área impactada; máx=105, min=16) y  $55\pm 11$  setígeros (área control; máx=91, min=23). El largo de los individuos varió significativamente entre las áreas. Los ejemplares colectados en el área control de Quequén fueron más largos que los colectados en el resto de las áreas (ANOVA:  $F=5.4$ ;  $g.l.=3$ ;  $P<0.05$ ) (Figura 4).

La densidad poblacional de *B. proboscidea* fue significativamente diferente entre el área impactada de Quequén y las demás áreas (ANOVA:  $F=9.34$ ;  $g.l.=3$ ;  $P<0.05$ ) (Figura 5), alcanzando una densidad media de  $82735\pm 36299$  individuos/ $m^2$ . La menor densidad poblacional fue encontrada en el área control de Quequén, con una media de  $2564\pm 1049$  individuos/ $m^2$ .



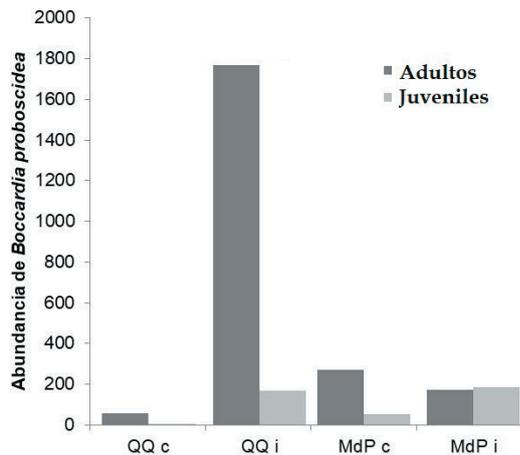
**Figura 4.** Largo (n° setígeros) de *B. proboscidea* en las áreas de muestreo Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impactada (MdP i), Quequén control (QQ c) y Quequén impactada (QQ i). Los bordes superior e inferior de las cajas corresponden al 25%-75% percentil, la línea en el interior de las cajas indica la mediana y las líneas verticales representan máximos y mínimos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

**Figure 4.** Length (n° setigers) of *B. proboscidea* in the sampling areas: Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impacted (MdP i), Quequén control (QQ c) and Quequén impacted (QQ i). The upper and lower edges of the boxes correspond to the 25%-75% percentile, the line inside the boxes indicates the median and the vertical lines represent maximums and minimums. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).



**Figura 5.** Densidad poblacional de *B. proboscidea* en las áreas de muestreo Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impactada (MdP i), Quequén control (QQ c) y Quequén impactada (QQ i). Los bordes superior e inferior de las cajas corresponden al 25%-75% percentil, la línea en el interior de las cajas indica la mediana y las líneas verticales representan máximos y mínimos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Figure 5.** Population density of *B. proboscidea* in the sampling areas: Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impacted (MdP i), Quequén control (QQ c) and Quequén impacted (QQ i). The upper and lower edges of the boxes correspond to the 25%-75% percentile, the line inside the boxes indicates the median, and the vertical lines represent maximums and minimums. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Figura 6.** Abundancia de adultos y juveniles de *B. proboscidea* ( $n^\circ$  de individuos/unidad muestral) en las áreas de muestreo Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impactada (MdP i), Quequén control (QQ c) y Quequén impactada (QQ i).

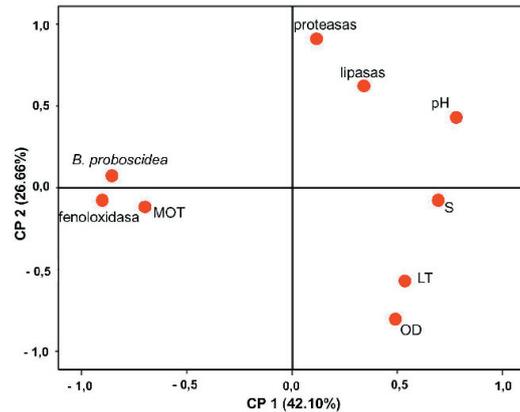
**Figure 6.** Abundance of adults and juveniles of *B. proboscidea* (number of individuals/sample unit) in the sampling areas: Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impacted (MdP i), Quequén control (QQ c) and Quequén impacted (QQ i).

La distribución de las clases de edad fue diferente entre las áreas de muestreo (prueba de  $\chi^2$ : 439.17; g.l.=3;  $P < 0.05$ ). En el área impactada de Quequén se registró el mayor valor de individuos adultos ( $N=1769$ ), mientras que la mayor cantidad de juveniles fue registrada en el área impactada de Mar del

Plata ( $N=185$ ). Un dato a destacar es que no se encontraron larvas en las áreas de muestreo (Figura 6).

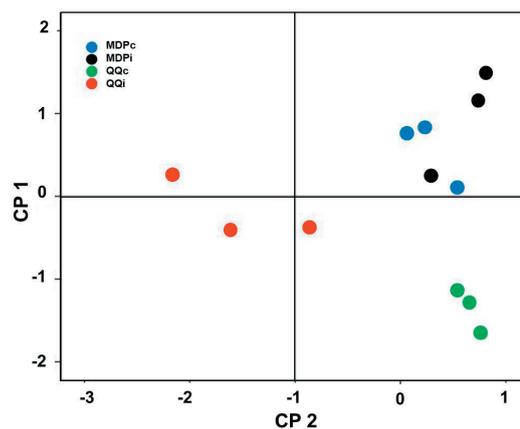
### Relación entre las respuestas bioquímicas, biológicas y las variables ambientales

El ACP muestra que el porcentaje de varianza explicado por los dos primeros ejes



**Figura 7.** Biplot de los dos primeros componentes del ACP representando las variables bioquímicas, ecológicas y ambientales. S: salinidad; LT: largo total; OD: oxígeno disuelto; MOT: materia orgánica total.

**Figure 7.** Biplot of the first two components of the PCA representing the biochemical, ecological and environmental variables. S: salinity; LT: total length; OD: dissolved oxygen; MOT: total organic matter.



**Figura 8.** Biplot de los dos primeros componentes del ACP y las áreas de muestreo Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impactada (MdP i), Quequén control (QQ c) y Quequén impactada (QQ i).

**Figure 8.** Biplot of the first two components of the PCA and the sampling areas: Mar del Plata control (MdP c), Mar del Plata impacted (MdP i), Quequén control (QQ c) and Quequén impacted (QQ i).

**Tabla 2.** Matriz de correlación ( $R^2$ ) entre las variables ambientales y respuestas a diferentes niveles de organización biológica. Los valores en negrita indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). FO: fenoloxidasa; S: salinidad; OD: oxígeno disuelto; L: largo total del cuerpo; MOT: materia orgánica total.

**Table 2.** Correlation matrix ( $R^2$ ) between environmental variables and responses at different levels of biological organization. Values with bold indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). FO: phenoloxidase; S: salinity; OD: dissolved oxygen; L: total body length; MOT: total organic matter.

Correlación	Densidad <i>B. proboscidea</i>	Proteasas	Lipasas	FO	S	pH	OD	L	MOT
Densidad <i>B. proboscidea</i>	1	-0.1	-0.2	<b>0.6</b>	<b>-0.6</b>	<b>-0.8</b>	-0.5	-0.5	0.3
Proteasas	-0.1	0.41	1	<b>0.6</b>	-0.2	-0.06	0.4	<b>-0.6</b>	-0.3
Lipasas	-0.2	0.26	<b>0.6</b>	1	-0.2	0.2	0.4	-0.2	0.06
FO	<b>0.6</b>	0.01	-0.2	-0.2	1	<b>-0.5</b>	<b>-0.7</b>	-0.3	-0.4
S	<b>-0.5</b>	0.02	-0.06	0.2	-0.5	1	<b>0.6</b>	0.4	0.1
pH	<b>-0.8</b>	0	0.4	0.4	<b>-0.7</b>	<b>0.6</b>	1	0.05	0.01
OD	-0.5	0.05	<b>-0.7</b>	-0.2	-0.3	0.4	0.05	1	<b>0.7</b>
L	-0.5	0.05	-0.3	0.06	-0.4	0.1	0.01	<b>0.7</b>	1
MOT	0.3	0.17	-0.1	-0.2	<b>0.9</b>	-0.3	-0.5	-0.1	-0.3

es del 69.77% (41.93% eje 1 y 27.84% eje 2). Las variables que más contribuyeron en la formación del primer componente fueron la actividad de fenoloxidasa, la densidad de *B. proboscidea*, el pH y la materia orgánica total. En este eje (CP 1) se observa que la densidad de *B. proboscidea*, la actividad de fenoloxidasa y la materia orgánica total aumentan hacia el área impactada de Quequén, mientras que el pH aumenta hacia el área control de Quequén (Figuras 7 y 8). Las variables materia orgánica total y densidad de *B. proboscidea* presentaron una correlación lineal positiva con la actividad de fenoloxidasa ( $P < 0.05$ ) (Tabla 2). Por otro lado, las variables con mayor contribución para el componente 2 (CP 2) fueron la actividad de proteasas, la actividad de lipasas, el oxígeno disuelto y el largo del cuerpo. En este eje se observa que el largo del cuerpo y el oxígeno disuelto aumentan hacia el área control de Quequén y la actividad de las proteasas y lipasas aumenta hacia el área impactada de Mar del Plata (Figuras 7 y 8). Ambos componentes mostraron una clara separación entre los sitios de estudio. A su vez, el área impactada de Quequén es diferente a su área de referencia. Por el contrario, ambas áreas de Mar del Plata no mostraron un claro patrón de separación (Figura 8).

## DISCUSIÓN

El presente estudio analiza la relación entre respuestas bioquímicas y ecológicas de *Boccardia proboscidea* ante la contaminación por efluentes cloacales. Se estudiaron dos escenarios distintos de exposición ambiental a la contaminación cloacal: el vertido directo y sin tratamiento de los efluentes a la costa

(vertido intermareal) y el vertido mediante emisario submarino (4 km mar adentro) con tratamiento primario (vertido submareal). El uso de biomarcadores y de indicadores ecológicos permitió analizar de manera integral los efectos de la contaminación cloacal a diferentes niveles de organización biológica (sub-individuo, individuo, población).

El análisis de las respuestas a nivel sub-individuo en organismos expuestos a condiciones ambientales adversas es una herramienta útil para detectar daños tempranos en poblaciones y comunidades (Wu et al. 2005; Galloway 2006; Jemec et al. 2009). En los invertebrados marinos se demostró que la actividad de las enzimas digestivas presenta una gran plasticidad según las condiciones ambientales, por lo que se las utiliza como biomarcadores de diferentes tipos de contaminación (Dedourge-Geffard et al. 2013; Charron et al. 2015). Sin embargo, la información disponible respecto a la respuesta de estas enzimas a la contaminación por efluentes cloacales es escasa. En un estudio previo realizado en Quequén se encontró que la actividad media de proteasas alcalinas y lipasas en el cirripedio *Balanus glandula* fue mayor en los organismos colectados en sitios cercanos a la descarga de aguas residuales (Laitano et al. 2018). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró un patrón claro que indique el efecto del efluente cloacal en las actividades de las proteasas alcalinas, lipasas y amilasas en *B. proboscidea*. Considerando que hay poca evidencia de las respuestas de enzimas digestivas de invertebrados marinos a la contaminación por efluentes cloacales y que la respuesta ante cualquier estresante

varía entre especies (Cotou et al. 2013), sería interesante estudiar estos biomarcadores en otras especies.

Por otro lado, la actividad de la enzima fenoloxidasa en *B. proboscidea* fue más alta en el área impactada de Quequén. Diversas investigaciones registraron tanto una sobreexpresión significativa de los genes que codifican para la profenoloxidasa (forma inactiva de la fenoloxidasa) (Luna-González et al. 2013) como un aumento significativo de la actividad de la fenoloxidasa (Mydlarz and Harvell 2007; Castro et al. 2018) en invertebrados expuestos a organismos patógenos. Dado que en el área impactada de Quequén se vierten continuamente las aguas residuales sobre la zona intermareal sin tratamiento previo, la carga de microorganismos potencialmente patógenos en el ambiente es elevada (Becherucci et al. 2018; Saracho-Bottero et al. 2020). Por lo tanto, la mayor actividad de esta enzima en *B. proboscidea* del área impactada de Quequén, estaría indicando una respuesta inmune acrecentada por la contaminación cloacal.

En este contexto, considerando que el desencadenamiento de la respuesta inmune incrementa la producción de ROS, sería esperable que los individuos de *B. proboscidea* del área impactada de Quequén también se encuentren ante procesos de estrés oxidativo. Múltiples estudios evidencian un incremento de las defensas antioxidantes, tanto moleculares como enzimáticas, en invertebrados marinos expuestos a contaminación por aguas residuales (Galloway and Depledge 2001; Machado et al. 2014; Zanette et al. 2015). Por otro lado, existen evidencias de que condiciones de hipoxia aumentan las actividades de la catalasa, glutatión peroxidasa y el nivel de peroxidación lipídica en invertebrados (Vidal et al. 2002). Sin embargo, la actividad de las pirogalol peroxidases en *B. proboscidea* no presentó diferencias entre el área impactada y control de este sitio (Quequén). Aunque no se haya encontrado un indicio de estrés oxidativo a partir de estos resultados, no puede descartarse que los individuos estén bajo dicha condición, ya que para hacerlo sería necesario contar con la medición de múltiples biomarcadores.

Las respuestas a nivel individual y poblacional de los efectos de la exposición a la contaminación cloacal también se utilizan para evaluar el estado de salud de un ambiente.

A los poliquetos se los considera indicadores biológicos de la calidad ambiental del medio marino a nivel global (Elías et al. 2021). Los cambios en la densidad poblacional de estos organismos pueden dar indicios de las condiciones en las que se encuentra un ambiente o ecosistema (Goodsell et al. 2009; De la Ossa Carretero 2011). En particular, *B. proboscidea* prolifera en ambientes con un aporte excesivo de materia orgánica generado por efluentes cloacales (Jaubet et al. 2011; Garaffo et al. 2015; Saracho-Bottero et al. 2020). En el presente estudio, el área impactada de Quequén presentó la mayor densidad poblacional de *B. proboscidea*, y este resultado coincide con el estudio de Saracho-Bottero et al. (2020). La densidad poblacional de una especie, así como el crecimiento individual (talla), depende de muchos factores ecológicos sinérgicos; entre ellos, la disponibilidad de alimento, el espacio, las condiciones ambientales locales y el tipo de interacciones (intra e interespecíficas), entre otros (Paine 1994). En el caso de *B. proboscidea*, tanto el aumento en su abundancia como el crecimiento de la longitud corporal estarían presumiblemente ligados a la disponibilidad de alimento (Surugiu and Feunteun 2008; Voullioz 2016) y al espacio disponible. Por otro lado, el área impactada de Mar del Plata presentó menor densidad poblacional de *B. proboscidea* que el área impactada de Quequén. Estos resultados indicarían que el ambiente intermareal circundante a la descarga cloacal mediante emisario submarino se encuentra en plena transición hacia una mejoría de la calidad ambiental, como sugirieron Cuello et al. (2019).

Con respecto a la estructura poblacional de *B. proboscidea*, el área control de Quequén mostró una proporción menor de individuos adultos, pero de mayor talla. Esto se podría relacionar con un menor estrés ambiental en esta área, por lo que los individuos crecerían en longitud a pesar de que los recursos disponibles limiten su densidad poblacional (en este caso, sin un aporte continuo de alimento). Por el contrario, el área impactada de Quequén tuvo una mayor proporción de individuos adultos, pero de menor talla que el área control. Esto indicaría que ante la exposición a un ambiente físico contaminado, los individuos limitarían su crecimiento individual pese a contar con un suministro continuo de alimento, y aumentan su reproducción para asegurar la descendencia y la colonización del espacio. La presencia de adultos de menor talla también podría deberse a la alta densidad poblacional encontrada.

Por otro lado, además de la disponibilidad de alimento, la alta abundancia de *B. proboscidea* en áreas impactadas con efluentes cloacales intermareales se relaciona con su estrategia reproductiva (Jaubet et al. 2015). Esta especie presenta poecilogonía, un tipo de desarrollo embrionario basado en la producción de más de un tipo de puesta/descendencia dentro de una misma especie (Giard 1905). Las puestas de *B. proboscidea* incluyen polimorfismo larval, es decir, dos tipos de larvas: planctotróficas (larvas que se alimentan de plancton) y adelfofágicas (larvas que se alimentan de huevos no fecundados o de larvas hermanas y que eclosionarán como juveniles bentónicos). De esta manera, la especie asegura la dispersión de las larvas a nuevos hábitats y la construcción de poblaciones locales simultáneamente en el tiempo (a partir de una misma puesta) (Blake and Kudenov 1981). Con este tipo de reproducción, la especie garantiza una alta tasa de colonización (característica típica de especies oportunistas). En el presente estudio no se encontraron larvas en los sitios de estudio; sin embargo, estudios previos informan una gran abundancia de larvas y juveniles en sitios con alto grado de disturbio (Jaubet et al. 2015; Vouilloz 2016; Hines 2018). La estructura poblacional hallada (sin huevos ni larvas) se podría relacionar con poblaciones formadas sobre todo por adultos que aún no maduraron o en etapas tardías de reproducción (todas las larvas ya desarrolladas a juveniles y adultos). Si bien los muestreos de este estudio se realizaron en época del pico reproductivo de la especie (primavera y principios de verano), los ejemplares adultos colectados en todas las áreas no evidenciaron madurez sexual, por lo que la segunda opción sería la más probable.

El principal hallazgo obtenido en este estudio fue que la variación en la actividad de la enzima fenoloxidasa podría tener implicancias en las poblaciones de *B. proboscidea*. Tanto la densidad de esta especie como la materia orgánica total en sedimentos se correlacionaron positivamente con los niveles de actividad de esta enzima hacia

el área impactada de Quequén. Como se mencionó antes, la fenoloxidasa forma parte del sistema inmune de invertebrados, y estudios previos demostraron que organismos con bajas actividades de esta enzima son más susceptibles a enfermedades (Palmer et al. 2011). Becherucci et al. (2018) estudiaron la comunidad intermareal alrededor de la descarga cloacal de Quequén y mostraron la dominancia de *B. proboscidea* acompañada por altos valores de materia orgánica en los sedimentos y altos valores de enterococos fecales. Por lo tanto, es probable que *B. proboscidea* mantenga su sistema inmune estimulado para sostener sus altas densidades en el sitio impactado por el efluente cloacal en Quequén.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio sugieren que la exposición al efluente cloacal intermareal sin tratamiento previo induciría cambios a nivel fisiológico en los individuos de *Boccardia proboscidea*, reflejados por la alta actividad de la enzima fenoloxidasa, la que, a su vez, muestra una correlación positiva con la densidad poblacional. Así, la actividad de esta enzima podría ser un biomarcador de alerta temprana de efectos adversos para la comunidad, ya que se demostró ampliamente que altas densidades de esta especie conllevan a un detrimento de la diversidad en la comunidad intermareal que habita. Por lo tanto, el estudio de otros biomarcadores del sistema inmune y a nivel comunitario resultan de interés para evaluar si a partir de los primeros se podría predecir el deterioro de estos ecosistemas.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo fue realizado con fondos presupuestarios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica ANPCyT en el marco de dos PICTs del FONCyT (PICT 0121/17-IR Laitano MV y PICT 2237/18-IR Jaubet ML) y del proyecto EXA 870/18 otorgado por la Universidad Nacional de Mar del Plata.

## REFERENCIAS

- Amiard-Triquet, C., and B. Berthet. 2015. Individual biomarkers. Pp. 153-182 en C. Amiard-Triquet, J. C. Amiard and C. Mouneyrac (eds.). Aquatic Ecotoxicology. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00007-3>.
- Becherucci, M. E., M. L. Jaubet, M. S. Bottero, E. N. Llanos, R. Elías, et al. 2018. Rapid sewage pollution assessment by means of the coverage of epilithic taxa in a coastal area in the SW Atlantic. Science of the Total Environment 628: 826-834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.024>.
- Benedetti, M., M. E. Giuliani, and F. Regoli. 2015. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. Annals of the New York Academy of Sciences

- 1340:8-19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12698>.
- Blake, J. A., and J. D. Kudenov. 1981. The Spionidae (Polychaeta) from southeastern Australia and adjacent areas, with a revision of the genera. *Memoirs of the National Museum of Victoria* 39:171-280. <https://doi.org/10.24199/j.mmv.1978.39.11>.
- Bouvet, Y., R. P. Desse, P. Morell, and M. D. C. Villar. 2005. Mar del Plata (Argentina): la ciudad balnearia de los porteños en el Atlántico suroccidental. *Investigaciones Geográficas* 36:61-80. <https://doi.org/10.14198/INGEO2005.36.02>.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Byers, S., C. Mills, and P. Stewart. 1978. Comparison of methods of determining organic carbon in marine sediments, with suggestions for a standard method. *Hydrobiologia* 58(1):43-47. <https://doi.org/10.1007/BF00018894>.
- Castro, J. M., V. A. Bianchi, M. M. Pascual, C. Almeida, A. Venturino, et al. 2018. Immune and biochemical responses in hemolymph and gills of the Patagonian freshwater mussel *Diplodon chilensis*, against two microbiological challenges: *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Journal of Invertebrate Pathology* 157:36-44. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.005>.
- Charron, L., O. Geffard, A. Chaumot, R. Coulaud, A. Jaffal, et al. 2015. Consequences of lower food intake on the digestive enzymes activities, the energy reserves and the reproductive outcome in *Gammarus fossarum*. *PLoS ONE* 10(4):1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125154>.
- Cotou, E., C. Tsangaris, and M. Henry. 2013. Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site. *Environmental Science and Pollution Research* 20(3):1812-1822. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1150-3>.
- Cuello, G. V., E. N. Llanos, G. V. Garaffo, and M. L. Jaubet. 2019. Emisario submarino de Mar del Plata (Argentina): ¿Cómo impactó su construcción en la comunidad bentónica intermareal? *Ecología Austral* 29(1):28-40. <https://doi.org/10.25260/EA.19.29.1.0.771>.
- De la Ossa Carretero, J. A. 2011. Evaluación del vertido de aguas residuales urbanas sobre hábitats de fondos blandos. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. Alicante. España. Pp. 221.
- Dejourge-Geffard, O., L. Charron, C. Hofbauer, V. Gaillet, F. Palais, et al. 2013. Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97:139-146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.016>.
- Elías, R., N. Méndez, P. Muniz, R. Cabanillas, C. Gutiérrez-Rojas, et al. (2021). Los poliquetos como indicadores biológicos en Latinoamérica y el Caribe. *Marine and Fishery Sciences* 34(1):37-107. <https://doi.org/10.47193/mafis.3412021010301>.
- Galloway, T. S., and Depledge, M. H. 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10(1):5-23. <https://doi.org/10.1023/A:1008939520263>.
- Galloway, T. S. 2006. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* 53(10-12):606-613. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.013>.
- Gao, Y., H. Xu, L. Li, and C. Niu. 2020. Immune defense parameters of wild fish as sensitive biomarkers for ecological risk assessment in shallow sea ecosystems: A case study with wild mullet (*Liza haematocheila*) in Liaodong Bay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 194:110337. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110337>.
- Garaffo, G. V., M. L. Jaubet, M. A. Sánchez, E. N. Llanos, E. A. Vallarino, et al. 2015. Modelling the influence of environmental and weather factors on the density of the invader polychaete *Boccardia proboscidea*. *Marine Ecology* 37(6):1256-1265. <https://doi.org/10.1111/maec.12307>.
- García-Carreño, F. L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 103(3):575-578. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(92\)90373-Y](https://doi.org/10.1016/0305-0491(92)90373-Y).
- Giard, A. 1905. La Poecilogonie. Pp. 617-646 in *Comptes Rendus 6<sup>th</sup> Congress International Zoology*, Berne.
- Gibson, G. D. 1997. Variable development in the spionid *Boccardia proboscidea* (Polychaeta) is linked to nurse egg production and larval trophic mode. *Invertebrate Biology* 116(3):213-226. <https://doi.org/10.2307/3226898>.
- Goodsell, P. J., A. J. Underwood, and M. G. Chapman. 2009. Evidence necessary for taxa to be reliable indicators of environmental conditions or impacts. *Marine Pollution Bulletin* 58(3):323-331. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.10.011>.
- Hines, E. 2018. Salud ambiental de playas rocosas en distintos partidos de la Provincia de Buenos Aires. Tesis de grado. Universidad Nacional de Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina. Pp. 83.
- Jaubet, M. L., M. A. Sánchez, M. S. Rivero, G. V. Garaffo, E. A. Vallarino, et al. 2011. Intertidal biogenic reefs built by the polychaete *Boccardia proboscidea* in sewage-impacted areas of Argentina, SW Atlantic. *Marine Ecology* 32(2):188-197. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2010.00415.x>.
- Jaubet, M. L., G. V. Garaffo, E. A. Vallarino, and R. Elías. 2015. Invasive polychaete *Boccardia proboscidea* Hartman, 1940 (Polychaeta: Spionidae) in sewage-impacted areas of the SW Atlantic coasts: morphological and reproductive patterns. *Marine Ecology* 36(3):611-622. <https://doi.org/10.1111/maec.12170>.
- Jemec, A., D. Drobne, T. Tišler, and K. Sepčić. 2009. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research* 17(3):571-581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>.
- Laitano, M. V., M. Díaz-Jaramillo, Y. E. Rodríguez, E. Ducós, and H. O. Panarello. 2018. Linking stable isotopes and

- biochemical responses in *Balanus glandula* under sewage influence. *Marine Pollution Bulletin* 127:505-511. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.036>.
- Lamela, R. E. L., R. Silveira Coffigny, Y. C. Quintana, and M. Martínez. 2005. Phenoloxidase and peroxidase activity in the shrimp *Litopenaeus schmitti*, Pérez-Farfante and Kensley (1997) exposed to low salinity. *Aquaculture Research* 36(13):1293-1297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01344.x>.
- Llanos, E. N., M. A. Saracho-Bottero, M. L. Jaubet, G. V. Garaffo, E. Hines, et al. 2021. The boom-bust dynamic of the invader *Boccardia proboscidea* mediated by sewage discharge: the response of the intertidal epilithic community in the Southwest Atlantic. *Marine Pollution Bulletin* 164:112045. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112045>.
- Lomartire, S., J. C. Marques, and A. M. Gonçalves. 2021. Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. *Ecological Indicators* 122:107207. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107207>.
- López Gappa, J., A. Tablado, and N. H. Magaldi. 1990. Influence of sewage pollution on a rock intertidal community dominated by the mytilid *Brachidontes rodriguezii*. *Marine Ecology Progress Series* 63:163-175. <https://doi.org/10.3354/meps063163>.
- Luna-González, A., J. T. Moreno-Herrera, Á. I. Campa-Córdova, H. A. González-Ocampo, J. A. Fierro-Coronado, et al. 2013. Immune response and gene expression of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by microbial immunostimulants. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41(5):898-907. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue5-fulltext-10>.
- Machado, A. A. D. S., C. M. Wood, A. Bianchini, and P. L. Gillis. 2014. Responses of biomarkers in wild freshwater mussels chronically exposed to complex contaminant mixtures. *Ecotoxicology* 23(7):1345-1358. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1277-8>.
- Markert, B. 2007. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21:77-82. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.015>.
- Muniz, P., P. da Cunha Lana, N. Venturini, R. Elías, E. Vallarino, et al. (2013). Un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos. Pp. 1-131. Universidad de la República, Montevideo.
- Mydlarz, L. D., and C. D. Harvell. 2007. Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 146(1):54-62. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.005>.
- Nolasco Soria, H., F. Moyano-López, F. Vega Villasante, A. del Monte-Martínez, D. Espinosa-Chaurand, et al. 2018. Métodos de actividad de lipasa y fosfolipasa para organismos marinos. *Lipasas y fosfolipasas* 139-167. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_7).
- OSSE. 2018. URL: [osmgp.gov.ar/osse/?s=+EDAR](https://osmgp.gov.ar/osse/?s=+EDAR).
- Paine, R. T. 1994. *Marine rocky shores and community ecology: An experimentalist's perspective*. Fourth volume. Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, Germany.
- Palmer, C. V., J. C. Bythell, and B. L. Willis. 2011. A comparative study of phenoloxidase activity in diseased and bleached colonies of the coral *Acropora millepora*. *Developmental and Comparative Immunology* 35(10):1098-1101. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.04.001>.
- Pearson, T. H., and R. Rosenberg. 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 16:229-311.
- Salomão, A. L. S., R. A. Hauser-Davis, and M. Marques. 2020. Critical knowledge gaps and relevant variables requiring consideration when performing aquatic ecotoxicity assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 203:110941. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110941>.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: [R-project.org](https://www.R-project.org/).
- Sánchez, M. A. 2014. Aplicación de un diseño BACI para la evaluación de impacto antrópico mediante poliquetos indicadores y la estructura de la comunidad intermareal de *Brachidontes rodriguezii*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina. Pp. 206.
- Saracho-Bottero, M. A., M. L. Jaubet, E. N. Llanos, M. E. Becherucci, R. Elías, et al. 2020. Spatial and temporal variability on the macrobenthic community as a consequence of the effect of urban sewage. *Marine Pollution Bulletin* 156:111189. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111189>.
- Seabra Pereira, C. D., D. M. S. Abessa, R. B. Choueri, V. Almagro-Pastor, A. Cesar, et al. 2014. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Marine Environmental Research* 96:118-126. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.002>.
- Surugiu, V. and M. Feunteun. 2008. The structure and distribution of polychaete populations influenced by sewage from the Romanian Coast of the Black Sea. *Analele Stiintifice ale Universitatii 'Al. I. Cusa' Iasi, s. Biologie Animala* 54:177-184.
- Tili, S., and C. Mouneyrac. 2021. New challenges of marine ecotoxicology in a global change context. *Marine Pollution Bulletin* 166:112242. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112242>.
- Vega Villasante, F., I. Fernández, R. M. Preciado, M. Oliva, D. Tovar, et al. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863 (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Bulletin of Marine Science* 65(1):1-9.
- Vidal, M. L., A. Bassères, and J. F. Narbonne. 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 132(1):93-104. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00051-0).

- Voullioz, M. 2016. Distribución espacio-temporal de las clases de edad del poliqueto invasor *Boccardia proboscidea* Hartman, 1940 en la zona del efluente cloacal de la ciudad de Mar del Plata (Argentina). Tesis de grado. Universidad Nacional de Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina. Pp. 41.
- Wold, S., K. Esbensen, and P. Geladi. 1987. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2:37-52. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9).
- Wu, R. S., W. H. Siu, and P. K. Shin. 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12):623-634. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.016>.
- Zanette, J., J. M. Monserrat, and A. Bianchini. 2015. Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: pollution and seasonal effects. *Marine Environmental Research* 103:74-79. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.11.001>.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fifth edition. Prentice-Hall: Upper Saddle River, NJ, USA.