

EFECTO DEL COBRE EN JUVENILES DE BIVALVOS (*Tivela mactroides*) PROVENIENTES DE AMBIENTES CON DIFERENTES NIVELES DE CONTAMINACIÓN

Vanessa Acosta¹ y César Lodeiros²

¹Departamento de Biología, Escuela de Ciencias. vacosta@sucre.udo.edu.ve

²Instituto Oceanográfico de Venezuela. clodeiro@sucre.udo.edu.ve

Universidad de Oriente. Cumaná 6101, Venezuela,

Resumen. Se evaluó el efecto del cobre en juveniles de *Tivela mactroides* provenientes de ambientes con diferentes niveles de contaminación. Se emplearon tres poblaciones de individuos juveniles (11±3 mm), provenientes de las localidades: Playa Güiria, Río Chico y Boca de Paparo, y se sometieron a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado (0; 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg.Cu L⁻¹) durante 96 h, para determinar la relación ARN/ADN del músculo. La concentración de 2 mg.Cu L⁻¹ se consideró letal en todas las poblaciones, mientras que en los tratamientos restantes los individuos de Playa Güiria presentaron la mayor supervivencia, incluyendo un 70% en la concentración de 1 mg.Cu L⁻¹; en esta concentración los organismos provenientes de Río Chico y Boca de Paparo no sobrevivieron. La dosis letal del 50% de la población fue 1,19 mg.Cu L⁻¹, 0,50 mg.Cu L⁻¹ y 0,30 mg.Cu L⁻¹ para Playa Güiria, Río Chico y Boca de Paparo, respectivamente. En las tres poblaciones se observó una disminución del índice ARN/ADN a medida que aumentó la concentración de cobre en el medio, la cual fue más evidente en los juveniles de Boca de Paparo y Río Chico, poblaciones que se encontraban en un estado de estrés dado su origen de medio ambiente contaminado. La relación ARN/ADN se puede considerar como un índice fisiológico adecuado que refleja la respuesta del estado metabólico que presenta un organismo como producto de perturbación ambiental por contaminación de metales pesados.

Palabras clave:

ARN/ADN, Bivalvo, cobre, contaminación, índice de condición, *Tivela mactroides*.

41

42 Acosta y Lodeiros [Bol. Centro Invest. Biol.

EFFECT OF COPPER IN JUVENILE BIVALVES (*Tivela mactroides*) OBTAINED FROM HABITATS WITH DIFFERENT LEVELS OF CONTAMINATION

Abstract. We evaluated the effect of copper in juvenile clams (*Tivela mactroides*) obtained from habitats with different levels of contamination. Three populations of juveniles (11±3.3 mm), obtained from Playa Güiria, Río Chico and Boca de Paparo, were exposed during 96 h to different concentrations of copper sulfate pentahydrate (0; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 mg Cu L⁻¹), to determine the RNA/DNA muscle index. The 2 mg Cu L⁻¹ concentrations were lethal in all populations, but in other treatments, the Playa Güiria organisms showed highest survival, including 70% at 1 mg Cu L⁻¹ concentrations. However, clams from Río Chico and Boca de Paparo did not survive at 1 mg Cu L⁻¹ concentrations. Lethal half-life doses in the population were 1.19 mg Cu L⁻¹, for Playa Güiria, 0.50 mg Cu L⁻¹ for Río Chico, and 0.30 mg Cu L⁻¹ for Boca de Paparo. In the three populations, the RNA/DNA index decreased with increasing copper concentrations, especially in juveniles from Boca de Paparo and Río Chico, which were already stressed due to their origin from contaminated environments. The RNA/DNA ratio can be considered an adequate physiological index that reflects responses to the metabolic state of an organism, due to environmental perturbations caused by heavy metal contamination.

Key words:

Bivalves, contamination, condition index, copper, RNA/DNA ratio, *Tivela mactroides*.

INTRODUCCIÓN

El rápido desarrollo industrial ha originado una fuerte degradación de los ecosistemas marinos, incluyendo los recursos pesqueros, de los cuales dependen las comunidades humanas ubicadas en las zonas litorales. Los bioensayos de toxicidad constituyen un mecanismo para evaluar la calidad de las aguas superficiales afectadas por las descargas de agentes contaminantes, principalmente por compuestos metálicos que causan fuertes impactos en los ecosistemas acuáticos. Estas pruebas se han desarrollado y estandarizado por agencias internacionales de protección ambiental (Del Valls y Conradi 2000). Los organismos más utilizados en este tipo de estudios, bajo condiciones controladas de laboratorio, son los moluscos bivalvos; principalmente los mejillones, las ostras, las almejas y las vieiras (Hiss *et al.* 1996), los cuales se han descrito como bioindicadores estándares de contaminación.

Vol. 38, 2004] *Efecto del cobre en Tivela mactroides* 43

Los índices bioquímicos constituyen valiosas herramientas, de los programas de monitoreo ambiental, para estimar los posibles impactos producidos por ciertos contaminantes, los cuales permiten determinar cambios metabólicos y fisiológicos producidos en los organismos bajo situaciones estresantes. La relación ARN/ADN se ha utilizado, en los bivalvos, para evaluar la tasa de crecimiento instantáneo (Nuseti y Morales 1988, Martínez *et al.* 1992, Mayrand *et al.* 1994), la sensibilidad ante factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de alimento (Lodeiros *et al.* 1996, Bracho *et al.* 1999, Viñoles *et al.* 2000). También se ha empleado como un indicador bioquímico y fisiológico ante la presencia de metales pesados (Acosta y Lodeiros 2001, Acosta *et al.* 2002).

El cobre (Cu) es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos; sin embargo, las concentraciones de este metal se han incrementado, en el ambiente marino, debido a fuentes antropogénicas, causando efectos deletéreos en la biota (Gallardo 1984). Estos efectos se han evaluado mediante el empleo de bioensayos de laboratorio.

La almeja o guacuco (*Tivela mactroides*) constituye un recurso alimenticio y sustento económico importante para las poblaciones costeras de Venezuela. Esta especie presenta una serie de características, que le permiten su uso como bioindicador de contaminación, entre éstas se encuentran: la resistencia para vivir en ambientes dinámicos (litorales de alta energía), la capacidad de soportar amplios rangos de temperatura y de salinidad, la amplia distribución geográfica, la facilidad para ser colectada durante todo el año. Además se cuenta con suficiente información sobre su biología y se han realizado ensayos de toxicidad con un adecuado manejo en el laboratorio (Acosta 2001).

En Venezuela, los estudios sobre los efectos agudos y crónicos de metales en los organismos marinos son escasos, a pesar de su importancia para establecer criterios de calidad del agua y predecir el riesgo ecológico en la biota. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto del cobre en juveniles de *Tivela mactroides* provenientes de ambientes con diferentes niveles de contaminación, utilizando el índice de ARN/ADN como medida para evaluar su condición fisiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Los ejemplares de *Tivela mactroides* se colectaron de playas con diferentes niveles de contaminación. Playa Güiría, estado Sucre, Venezuela (10° 45' 55" LN y 63° 20' 55" de LE) no muestra indicios de perturbación ambiental (Acosta *et al.* 2002); mientras que Río Chico (10° 23' LN y 65° 58' LO) y Boca de Paparo, estado Miranda, Venezuela (10° 23' LN y a 65° 56' de LO) presentan contaminación biológica, orgánica e inorgánica (MARNR 1985, Leal 1995, Jaffé *et al.* 1995, Acosta *et al.* 2002).

ENSAYOS DE TOXICIDAD AL Cu

Se seleccionaron 10 organismos juveniles (11±3,3 mm), procedentes de cada playa, para evaluar la condición fisiológica de las tres poblaciones. Los individuos se colocaron, por triplicado, en contenedores de 10 L de capacidad, y se expusieron durante 96 horas a diferentes concentraciones de cobre (0, 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg.Cu L⁻¹), preparadas a partir de una solución patrón de sulfato de cobre pentahidratado. Se colocó, como sedimento estándar, arena limpia y esterilizada a 180 °C en cada contenedor. Los organismos, se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22±1 °C), salinidad (36‰), pH (7,8 ± 2) y bajo un ambiente de saturación de oxígeno (>90%) durante un periodo de aclimatación de 5 días y el tiempo de duración del experimento.

Vol. 38, 2004] *Efecto del cobre en Tivela mactroides* 45

En cada uno de los contenedores se colocaron embudos plásticos con múltiples orificios, en posición invertida y semienterrados, conectando aireadores para permitir que los embudos funcionaran como filtros succionadores de la materia orgánica liberada por los organismos. Al final del experimento se determinó la supervivencia mediante el recuento de los organismos vivos. Se consideró un organismo muerto aquel que mostrara ausencia del cierre de las valvas en respuesta refleja a un estímulo mecánico producido con una varilla de vidrio. Se utilizó el método Logit para determinar dosis letal al 50% (DL50) (Rodríguez y Esclapés 1995).

ÍNDICE ARN/ARN

La respuesta fisiológica de los bivalvos sobrevivientes se determinó a través del índice de condición de ARN/ADN, de acuerdo a la metodología de Canino y Calderone (1995). Se extrajo el músculo aductor (10 mg) de cada juvenil, y se maceró el tejido en viales eppendorf de 1,5 mL, hasta formar un homogeneizado. A cada vial se le añadió 100 µL de

solución de sarcosina (1%), mezclando con un agitador eléctrico por 30 minutos, se dejó reposar y se agitó nuevamente durante media hora adicional. Luego se agregó 900 μL de buffer (TRIS-EDTA) y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. A cada muestra, por duplicado, se le colocó 10 μL del sobrenadante en tubos de borosilicato (12×75 mm), añadiendo 400 μL del buffer. Para la determinación del ARN se añadió 500 μL de la solución de bromuro de etidium, mientras que en el caso del ADN se emplearon 500 μL de reactivo de Hoechst. Las lecturas de ambos ácidos nucleicos se realizaron a longitudes de onda de 490 nm, y para la estimación, por extrapolación de las concentraciones, se establecieron curvas patrones para el ARN y ADN. Para esto se tomaron 200 μL de la solución estándar de ADN y de ARN y se colocaron en un tubo de borosilicato, el cual contenía previamente 300 μL de solución buffer (TRIS-EDTA), y a partir del cual se realizaron diluciones seriadas de 250 μL .

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar diferencias del índice de condición y de la supervivencia de las poblaciones al final del experimento. En los casos donde existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó la prueba a posteriori de Scheffe ($p < 0,05$). Previamente la data se transformó en arcocoseno, a objeto de normalizarla y siguiendo las recomendaciones de Zar (1984).

46 Acosta y Lodeiros [Bol. Centro Invest. Biol.

RESULTADOS

SOBREVIVENCIA AL Cu

La población de *T. mactroides*, proveniente de Playa Güiria, presentó la mayor sobrevivencia. En el tratamiento sin exposición al Cu todos los organismos sobrevivieron. Los individuos de Río Chico y Boca de Paparo evidenciaron mortalidad en todas las concentraciones, mientras que en los correspondientes a Playa Güiria esta variable se registró a partir de 1 mg.Cu L⁻¹ (77%), Fig. 1. La mortalidad a la concentración de 2 mg.Cu L⁻¹ fue total a las 24 h en todas las poblaciones.

La dosis subletal del cobre varió en las diferentes poblaciones. La DL50 de los juveniles de Playa Güiria fue 1,19 mg Cu L⁻¹, obtenida por interpolación no lineal entre 1,0 y 2,0 mg.Cu L⁻¹, lo que muestra un mayor intervalo de resistencia al cobre, con respecto a los juveniles procedentes de Río Chico y Boca de Paparo. Los organismos de Río Chico presentaron una DL50 de 0,50 mg.Cu L⁻¹ con límites inferior y superior de confiabilidad al 95% de 0,10 y 3,42 mg.Cu L⁻¹, respectivamente, lo cual sugiere que las concentraciones menores a 0,5 mg.Cu L⁻¹ pueden ser consideradas subletales.

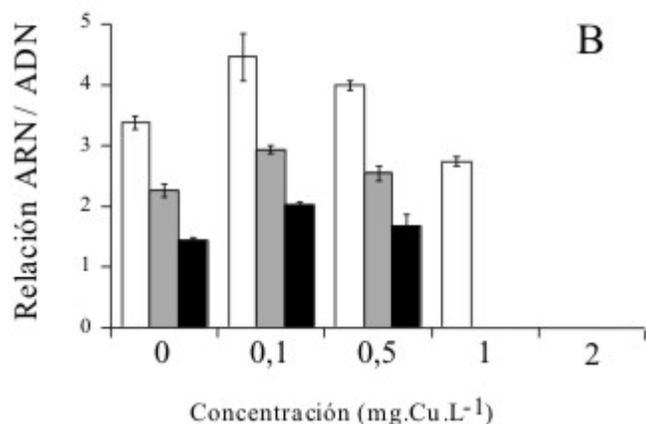
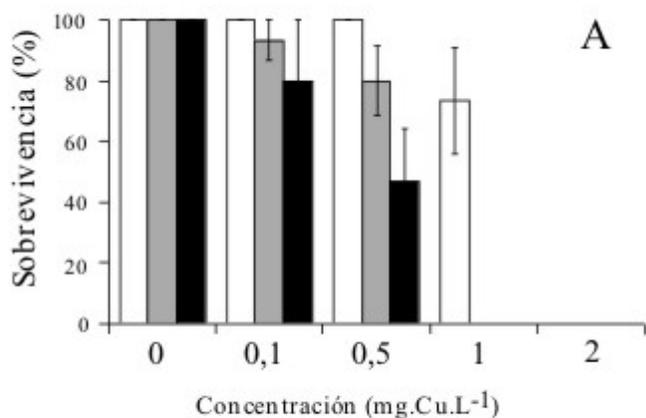
No obstante, para los individuos de Boca de Paparo se obtuvo una DL50 de 0,30 mg.Cu L⁻¹ con límites inferior y superior de confiabilidad al 95% de 0,03 y 2,40 mg.Cu L⁻¹, respectivamente, sugiriendo que la dosis subletal para esta población es menor.

ÍNDICE ARN/ARN

El índice de ARN/ADN se afectó en forma proporcional al aumentar la concentración de cobre, revelando diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre las poblaciones. Los juveniles de Playa Güiria, presentaron los mayores índices de ARN/ADN en todos los tratamientos (generalmente > 3), seguidos por los de Río Chico (< 3) y Boca de Paparo (< 2) (Fig. 2). Sin embargo, los organismos no expuestos al metal (grupo control) registraron concentraciones de ARN/ADN, menores en comparación a los grupos expuestos a niveles bajos de cobre (0,5 y 0,1 mg.Cu L⁻¹).

Vol. 38, 2004] Efecto del cobre en *Tivela mactroides* 47

□ Playa Güiria ■ Río Chico ■ Boca de Paparo



48 Acosta y Lodeiros [Bol. Centro Invest. Biol.

DISCUSIÓN

Los individuos procedentes de Playa Güiria presentaron la mayor resistencia al metal, lo cual se reflejó en la alta supervivencia y los niveles de ARN/ADN, en contraste con los correspondientes a los organismos de Río Chico y Boca de Paparo, mostrando una respuesta con respecto al grado de contaminación de las localidades estudiadas.

La concentración de 2,0 mg.Cu L⁻¹ se consideró extremadamente letal, debido a que los organismos pertenecientes a las tres poblaciones no sobrevivieron a las 96 h de exposición.

A partir de 0,5 mg.Cu L⁻¹ comenzó a disminuir, en mayor proporción, el índice de ARN/ADN y la sobrevivencia de los juveniles de Río Chico (78,88%) y Boca de Paparo (43,33%). Sin embargo, en esta concentración, los organismos de Playa Güiria, a pesar de que presentaron cierta disminución del índice de ARN/ADN no manifestaron mortalidad alguna. Estos resultados sugieren que la concentración de 0,5 mg.Cu L⁻¹ es cercana a una concentración umbral donde comienza a afectar el metabolismo básico de los juveniles de *T. mactroides*. La DL50 obtenida para los individuos de Playa Güiria (1,19 mgCu L⁻¹) soportan la hipótesis antes señalada.

El mayor índice de ARN/ADN se obtuvo a 0,1 mg.Cu L⁻¹, probablemente como producto de una respuesta antitóxica, la cual estuvo acompañada por la síntesis de proteínas. Lo antes mencionado puede sustentarse con los menores niveles de ARN/ADN reflejados por los organismos del grupo control. Este comportamiento también se ha observado en otros bivalvos tropicales como *Lima scabra* (Gómez *et al.* 1998), *Perna viridis* (Acosta y Lodeiros 2001, Narváez *et al.* 2002), y las ostras *Saccostrea cucullata*, *Crassostrea lugubri* y *C. belcheri* (Elfwing y Tedengren 2002). Se ha sugerido un aumento de la síntesis de proteínas (ARN) como respuesta al incremento del metal, a concentraciones no estresantes, como producto del metabolismo para la captación del metal o una posible estrategia de respuesta relativa a la exposición del cobre, activando sustancias antitóxicas tales como la formación de complejos proteicos (metalotioninas), para atrapar el excedente del xenobiótico presente dentro del organismo (Yang y Thompson 1996, Mount y Stephan 1997). En este sentido, es necesario realizar estudios de activación enzimática relativas a la síntesis de proteínas, con especial referencia a la formación de metalotioninas en concentraciones subletales de cobre en bivalvos en función de verificar las hipótesis antes señaladas.

CONCLUSIONES

El incremento de la concentración de cobre en el medio disminuye el índice de ARN/ADN y la supervivencia, lo cual revela el efecto que ejerce este metal sobre el metabolismo fisiológico de los juveniles de *Tivela mactroides*.

La relación ARN/ADN se puede considerar como un índice fisiológico adecuado que refleja la respuesta del estado metabólico que presenta un organismo como producto de la perturbación ambiental por contaminación.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y el programa de becas de Postgrado del FONACIT por el financiamiento otorgado para realizar esta investigación, y a M. Núñez y A. Antón por la colaboración técnica prestada.

LITERATURA CITADA

ACOSTA V. 2001. Estado Fisiológico de poblaciones del guacuco *Tivela mactroides* (Born, 1778- Bivalvia: Veneridae) en dos ambientes con diferentes grados de contaminación. Tesis M. Sc. en Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Venezuela, 60 pp.

ACOSTA V. y C. LODEIROS. 2001. Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN y la relación ARN/ADN en el músculo abductor. Rev. Científica FCV-LUZ. Vol XI (6): 485-490.

50 *Acosta y Lodeiros* [Bol. Centro Invest. Biol.

ACOSTA V., C. LODEIROS., W SENIOR y G. MARTÍNEZ. 2002. Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales de los litorales de Playa Güiría (Estado Sucre), Boca de Paparo y Río Chico (Estado Miranda), Venezuela. Interciencia, 27 (12): 686-690.

BRACHO M., M. SEGNINI., I. VIÑALES y K. CHUNG. 1999. Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Mytilidae) medido por la relación ARN/ADN. Reunión 29 Asociación Laboratorios Marinos del Caribe. Cumaná, Venezuela. 83 pp.

CANINO M. y E. CALDERONE. 1995. Modifications and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acids and contents of fish larvae. Fish. Bull. 93: 15-65.

DEL VALLS T. y M. CONRADI. 2000. Avances en ecotoxicología marina: comparación entre tests de laboratorio y estudios *in situ* para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. Ciencias Marinas. 26 (1): 39-64.

ELFWING T. y M. TEDENGREN. 2002. Effects of copper on the metabolism of three species of tropical oysters, *Saccostrea cucullata*, *Crassostrea lugubris* and *C. belcheri*. Aquaculture 204: 157-166.

GALLARDO V. 1984. Revisión actualizada a 1983 de la contaminación marina proveniente de fuentes terrestres en la región del Pacífico Sud-Este (Colombia, Chile, Ecuador y Perú). Rev. CPPS 14:19-174.

GÓMEZ J., M. SEGNINI y M. FUENTES. 1998. Efecto del cobre sobre la condición fisiológica de *Lima scabra*, medida por la razón ARN/ADN. Scientia (Panamá) 13 (1): 27-34.

HISS E., R. BEIRAS, M. SEAMAN, N. PAGANO y N. TRIEFF. 1996. Sublethal and lethal toxicity of aluminum industry effluents to early stages of the *Crassostrea gigas* Oyster. Environ. Contam. Toxicol. 30 (3): 335-339.

JAFFE R., I. LEAL, J. ALVARADO, P. GARDINALI y J. SERICANOS. 1995. Pollution effects of the Tuy River on the central Venezuelan coast: Anthropogenic organic compounds and heavy metals in *Tivela mactroides*. Mar. Poll. Bull. 30 (12): 820-825.

LEAL I. 1995. Contaminación por hidrocarburos, metales pesados y compuestos organoclorinados en el Litoral barloventeño y Morrocoy. Tesis M. Sc. Dpto. Química. Universidad Simón Bolívar, Venezuela. 129 pp.

Vol. 38, 2004] *Efecto del cobre en Tivela mactroides* 51

LODEIROS C., R. FERNÁNDEZ, A. BONMATI, J. HIMMELMAN y K. CHUNG. 1996. Relation of RNA/DNA ratios to growth for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture. Mar. Biol. 126: 245-251.

MARNR. 1985. Estudio de la influencia del Río Tuy en el Litoral Barloventeño. Serie de Informes Técnicos. DGSIIA/IT/159.

MARTÍNEZ G., M. TORRES, E. URIBE, M. DÍAZ y H. PÉREZ. 1992. Biochemical composition broodstock and early juvenile chilean scallops, *Argopecten purpuratus* Lamarck, held in two different environments. J. Shellfish. Res. 11 (2): 307-313.

MAYRAND E., J. PELLEIN-MASSICOTE y B. VINCENT. 1994. Small scale variability of chemical indices of growth in *Mya arenaria* (L.) J. Shellfish. Res. 13 (1):199-205.

MOUNT D. y C. STEPHAN. 1997. Method for establishing acceptable toxicant limits for fish-malthion and the butoxyethanol ester of 2,4-D Tnas. Amfish. Soc. 96: 185-193.

NARVÁEZ N., V. ACOSTA, M. LEMUS y C. LODEIROS. 2002. Efecto del cadmio en juveniles del mejillón verde *Perna viridis* (Bivalvia: Mitylidae) medido por la concentración ADN, ARN y el índice ARN/ADN en el músculo abductor. LII. Conv. Anual. AsoVAC. 60 p.

NUSETTI O. y D. MORALES. 1988. Crecimiento de algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L. 1758): Composición de ARN, relación ARN/ADN y reservas energéticas. Act. Cient. Venez. 39: 289-293.

RODRÍGUEZ J. y M. ESCLAPÉS. 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas (INTEVEP-PDVSA). Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente, 76 pp.

VIÑALES I., M. SEGNINI., M. BRACHO y K. CHUNG. 2000. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae), según el coeficiente ARN/ADN. Rev. Biol. Trop. 48 (I): 159-170.

YANG M. y J. THOMPSON. 1996. Binding of endogenous copper and zinc to cadmium-Induced metal-binding proteins various tissues of *Perna viridis*. Environ. Contam. Toxicol. 30 (2): 267-273.

ZAR J. 1984. Biostatistical analysis. (2 ed). Prentice- Hall, Inc., New Jersey. 120 pp.