

# Toxicidad de Metales Pesados en el Isópodo *Exosphaeroma gigas*, en el Canal Beagle, Tierra del Fuego

## INFORME TÉCNICO

Erica Giarratano <sup>1</sup>, Oscar Amín <sup>2,4</sup>,  
José Luis Esteves <sup>3,4</sup> y Mónica Noemí Gil <sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn

<sup>2</sup> Centro Austral de Investigaciones Científicas

<sup>3</sup> Centro Nacional Patagónico

<sup>4</sup> Fundación Patagonia Natural

### 1. OBJETIVO

El objetivo del trabajo realizado fue la evaluación en experimentos de laboratorio de dos respuestas subletales del Isópodo *Exosphaeroma gigas* expuesto durante 96 horas a cadmio, cobre y zinc.

Los ejemplares utilizados en los bioensayos fueron colectados manualmente en horas de bajamar en Bahía Golondrina (54°50' S 68°20' W), Canal Beagle (Tierra del Fuego) seleccionando esta especie por su distribución a lo largo del litoral marítimo costero adyacente a la ciudad que recibe aportes de metales pesados en el entorno de la Bahía Ushuaia (Amin, 1995 y Amin *et al.*, 1996).

Se evaluaron dos tipos de respuestas: fallas en la natación (ausencia de movimiento luego de un estímulo mecánico) y cambios en el cociente Oxígeno consumido: Amonio excretado en función de que ambos parámetros han sido descriptos como indicadores de daño en la exposición a metales pesados.

### 2. METODOLOGIA

#### 2. A. CONDICIONES GENERALES DE LOS EXPERIMENTOS

Se trabajó en una sala climatizada de una superficie cubierta aproximada de 12 m<sup>2</sup>. Esta sala posee un equipo de refrigeración con emisión automática de aire climatizado, lo que sumado a su construcción adiabática asegura el mantenimiento de la temperatura ambiente deseada durante el desarrollo íntegro de los ensayos. Por otra parte, también se cuenta con el control del fotoperíodo mediante la conexión al sistema de iluminación del laboratorio (tubos fluorescentes) de un temporizador que regula el suministro de luz a intervalos fijos.

Se siguieron los lineamientos generales recomendados para el desarrollo de bioensayos toxicológicos (APHA, 1995, Ward & Parrish, 1982). Debido a la capacidad operativa disponible, en todos los casos, el tipo de ensayo realizado fue el estático con renovación ("renewal test"), lo que implicó renovar todas las concentraciones y controles diariamente.

#### 2.B. PARÁMETROS ANALIZADOS

➤ *Concentración Efectiva 50 (CE50)*

Se expusieron 10 organismos por cada una de las concentraciones que se detallan a continuación: 20; 8,91; 4,17; 1,95; 0,91; 0,42 y 0,2 mg/l.

Se evaluó la toxicidad de los tres metales (Cd, Cu y Zn) considerando como indicador de daño la ausencia de movimiento.

Diariamente se contabilizó a los organismos que no respondían a un estímulo mecánico y se registró a aquellos que permanecían inmóviles, al tiempo que se removía a los organismos muertos.

Con esta información se pudo calcular la Concentración Efectiva 50, definida como aquella que causa la respuesta seleccionada al 50 % de la población en un tiempo determinado (en este caso 96 horas).

La CE50-96hs fue calculada de acuerdo al Método Probit (Finney, 1971) y la comparación entre ellas fue realizada considerando estadísticamente significativa aquellas en las que el cociente CE50 mayor/ CE 50 menor excede el límite del valor correspondiente al valor crítico establecido por APHA (1995).

#### ➤ *Consumo de Oxígeno: Excreción de Amonio (relación O: N)*

Se utilizaron 5 organismos por tratamiento en cámaras respirométricas individuales, mantenidas en flujo continuo de agua (suministrada por gravedad) libre de contaminante durante dos horas de aclimatación. Luego de ese período se tomó una muestra inicial de agua de las cámaras y posteriormente se cerraron las mismas por un período determinado de tiempo. Transcurrido el mismo se procedió a la apertura de las cámaras y se tomó una muestra final. En ambas muestras se midió el oxígeno disuelto y el amonio presente. El flujo de agua y el período durante el cual las cámaras permanecieron cerradas se ajustó teniendo en cuenta la relación tamaño del organismo-volumen de la cámara-concentración de oxígeno y osciló entre 30 a 50 minutos.

La determinación de oxígeno disuelto se realizó mediante el uso de un oxímetro YSI ® modelo 5100, mientras que la concentración de amonio se calculó por medio de la técnica del Indofenol (Strickland y Parson, 1972).

La relación O:N fue calculada de acuerdo a Mazuayd y Conover (1988), la cual se calcula de la siguiente manera:

1. Para obtener el dato de Oxígeno se debe multiplicar los  $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{gr}^{-1}$  X 62,5 (que resulta de dividir 1000/16) en donde 1000 es para convertir de miligramos a microgramos y 16 es el número atómico del oxígeno.

2. Para  $\text{NH}_3$  se multiplica  $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{gr}^{-1}$  X 58,9 (el contenido de nitrógeno en la molécula de  $\text{NH}_3$  es de 82,4 % y el peso atómico del N es 14, el resultado de esta razón multiplicado por 1000 da 58,9)

Finalmente se realiza el cociente de los valores obtenidos respectivamente.

### 3. RESULTADOS

#### ➤ *Concentración Efectiva 50 (CE50)*

Los valores estimados de CE50-96hs. y las comparaciones respectivas pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores estimados de CE50-96 horas (expresados en mg/l) y comparación entre los metales ensayados (\*\* indica diferencias significativas, NS: no significativo).

Tóxico	CE50 (mg/l) y límite de	Comparación CE50
--------	-------------------------	------------------

	confianza 95%	
Cobre	2,34 (1,85 – 2,99)	Zn / Cu : 4,31 **
Cadmio	10,78 (8,44 – 14,35)	Cd / Cu: 4,597 **
Zinc	10,11 (7,67 – 14,24)	Cd / Zn: 1,066 NS

➤ *Consumo de Oxígeno: Excreción de Amonio (relación O:N)*

Los resultados obtenidos sobre el consumo de oxígeno, la excreción de amonio y la relación O:N se presentan en las Figuras 1 a; b y c, respectivamente. Debido a la alta dispersión presentada en algunos de los resultados los mismos deben ser considerados de carácter preliminar y por lo tanto se ha desestimado en esta etapa realizar pruebas estadísticas sobre éstos. Sin embargo algunas tendencias pueden ser señaladas, por ejemplo:

El consumo de oxígeno disminuye con el aumento de la concentración de Cadmio y Zinc, pero aumenta a mayor concentración de Cobre. Los valores máximos de consumo se registran en Zn; 0,42 mg/l (2,96 mg/h/g) y el mínimo en Cd 1,95 mg/l (0,597 mgO<sub>2</sub>/h/g), siendo el consumo de los organismos control de 1,9 mgO<sub>2</sub>/h/g)

La excreción de amonio aumenta en los organismos expuestos a la menor concentración de Cadmio (12,81 µat-N/L), mientras que para los demás tratamientos los valores obtenidos resultaron similares entre sí y, en todos los casos, menores al control (14,52 µat-N/L).

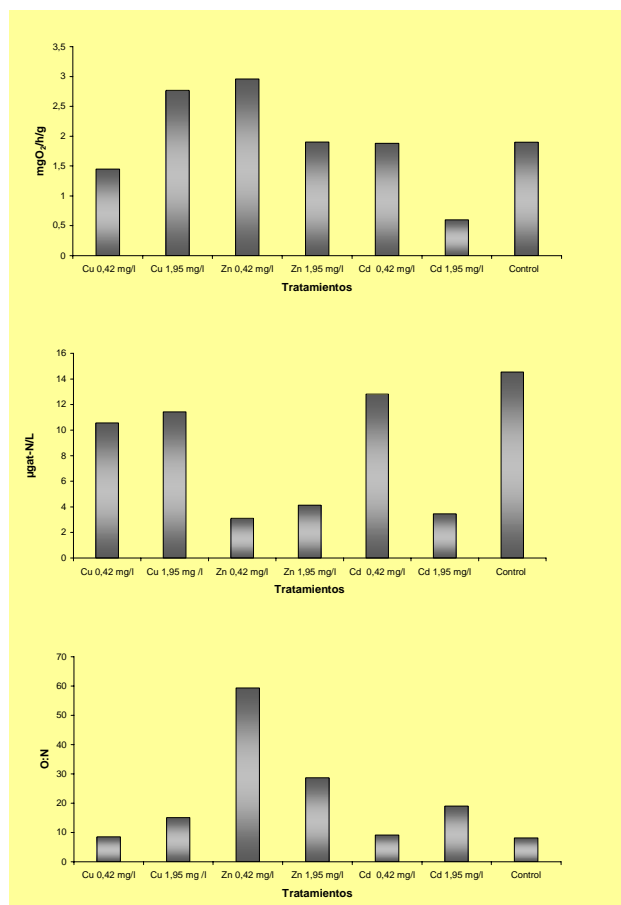


Figura 1. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y relación O:N (a, b y c respectivamente) en *E. gigas* expuesto 96 horas a Cd, Cu y Zn.

#### 4. DISCUSION

##### ➤ Concentración Efectiva 50 (CE50)

La mortalidad en los controles de agua, de todos los ensayos realizados fue cero al finalizar las 96 horas de exposición, lo que permitió la aceptabilidad de los ensayos.

La tendencia en orden creciente de toxicidad entre los metales estudiados fue: cobre > zinc ≥ cadmio.

La misma tendencia en cuanto a la toxicidad relativa fue encontrada para larvas de *Lithodes santolla* (Amin, 1995, Amin *et al.* 2003 en prensa), así como también en otras especies como el copépodo *Tropocyclops prasinus mexicanus* (Lalade y Pinel-Alloul, 1986) y *Uca pugilator* (Wies et al 1992). Del mismo modo en términos relativos el cobre resultó significativamente mas tóxico en el pez *Patagonototen cornúcula*, especie que desova en ambientes costeros del Canal Beagle, similares al área habitada por la especie aquí estudiada.

Otros efectos subletales como la inhibición en la regeneración de apéndices y la muda en general han sido descriptos para diferentes tipos de tóxicos y especies de crustáceos. Entre los efectos subletales estudiados también se encuentran fallas en la actividad natatoria, las cuales han sido descriptas y seleccionadas como parámetro de daño, como por ejemplo en larvas nauplii del *Balanus improvistus* expuestas a cobre (Lang et. al 1980)

Las concentraciones en las cuales se observaron efectos sobre la actividad natatoria fueron mayores a aquellas en las que se detectaron retrasos o inhibición en la muda de larvas de *L. santolla* (Amin 1995, Amin *et al.* 2003 en prensa), así como también en larvas del cangrejo *Chasmagnathus granulata* (Sanchez *et al.*, 1999) y del copépodo adulto *Tisbe battagliai* (Hutchinson *et al.*, 1994), por lo que las concentraciones de riesgo para esta especie resultan sensiblemente superiores.

➤ *Consumo de Oxígeno: Excreción de Amonio (relación O:N)*

Si bien el consumo de Oxígeno es una medida indirecta de la condición fisiológica de los organismos, la respuesta a la exposición a los metales produce efectos diversos. Por ejemplo el Cd y el Zn producen un aumento significativo del consumo de O<sub>2</sub> en el camarón *Panaeus setiferus* (Vanegas, 1997) pero en el caso del Cadmio específicamente se ha reportado que éste puede inhibir el metabolismo (Depledge, 1984, Gaudi *et al.* 1991). Tales discrepancias pueden estar relacionadas a las diferentes etapas de acción del cadmio: la primera etapa incrementa la demanda de ATP, considerando a este incremento una respuesta adaptativa, mientras que la segunda etapa (de intoxicación severa) disminuye la tasa respiratoria debido a la incapacidad del organismo de responder a las demandas del incremento de ATP que finalmente lo conduce a la muerte (Vanegas, 1997).

Spicer y Weber (1991) sugieren que la disminución de la tasa respiratoria por efecto de los metales (como ocurre en algunos casos en esta especie) se debe al deterioro estructural de la superficie de la branquia y a la inhibición de enzimas involucradas en la cadena respiratoria, mientras que el incremento en el metabolismo podría estar asociado a una mayor demanda energética debido alteraciones en el mecanismo iónico provocado por estresores, entre ellos los metales pesados (Pequeux, 1995).

Algunas de estas posibles respuestas podrán ser evaluadas en el futuro, contemplando el estudio de enzimas como ATPasa a diferentes combinaciones de concentraciones salinas y de metales.

El efecto de los metales sobre la excreción nitrogenada también es contradictoria y muchas veces está relacionada con otras condiciones del experimento, como la alimentación, como en el caso del anfípodo *Leptomysis linguivura* (Gaudy *et al.* 1991). En el caso de los copépodos *Pseudocalanus sp.* y *Calanus sp.* el Cu no modifica la tasa de excreción, si bien la alimentación se ve disminuida.

En cualquier caso, y dado que la degradación proteica en los crustáceos se realiza en el hepatopáncreas, existe un acuerdo general que la alteración en el metabolismo de excreción está intrínsecamente relacionada con la bioacumulación de metales en el hepatopáncreas y la alteración que los mismos producen a funciones del catabolismo de proteínas como a la inhibición de sistemas enzimáticos relacionados a la formación de amonio (Gaudy *et al.* 1991).

Finalmente los valores de O:N se ubican en los indicados para organismos que realizan catabolismos estrictos de proteínas (Mazyaud y Conover, 1988) y organismos que se encuentran teóricamente en condiciones de estrés (Abel y Axiak, 1991). Es importante señalar que, si bien son evidentes ciertas alteraciones metabólicas en respiración y excreción, la integración de resultados en la relación atómica O:N no aparece, al menos en estos primeros datos, como un indicador sensible del efecto tóxico de los metales estudiados, fundamentalmente por los valores hallados en el grupo control y el valor no esperado de Zinc 0,42 mg/l.

## 5. Bibliografía

Abel P.D. y V. Axiak, 1991. (eds) Ecotoxicology and the Marine Environment. Ellis Horwood Books in aquaculture and fisheries support: 263 pp

Amin O., 1995. Toxicidad para invertebrados marinos de algunos metales pesados detectados en la zona costera próxima a Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. Tesis Doctoral UBA:141 pp.

Amin, O.; L. Ferrer and J. Marcovecchio, 1996. Heavy metal concentrations in littorals sediments from the Beagle Channel, Tierra del Fuego, Argentina. In: Env. Monitoring and Assessment 41: (3) 219-231

Amin O.; L. Comoglio and E. Rodríguez. 2003. Toxicity of Cadmium, Lead and Zinc to Larval Stages of *Lithodes santolla* (Decapoda- Anomura) Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 71 (3): en prensa

APHA (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Depledge M., 1984. Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* L.) exposed to heavy metal pollution. Comp Biochem. Physiol. 78 C (2):445-459

Finney D.J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 333 p.

Gaudy, R. J.P. Guerin and P. Keranbrum. 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: Mysidacea). Mar Biol. 109:493-501

Hutchinson T., T.D. Williams & G.J. Eales, 1994. Toxicity of Cadmium, Hexavalent Chromium and Cooper to Marine Fish Larvae (*Cyprinodon variegatus*) and Copepods (*Tisbe battagliai*). Marine Environ. Research 38:275-290.

Lalande M. & B Pinel-Alloul, 1986. Acute toxicity of cadmium, cooper, mercury and zinc to *Tropocyclops prasinus mexicanus* (Cyclopoida, Copepoda) from three Quebec lakes. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol 5: 95-102.

Lang W.H., R.B. Forward, Jr. D.C: Miller and M. Marcy 1980. Acute toxicity and sublethal behavior effects of copper on barnacle nauplii (*Balanus improvisus*). Mar. Biology, 58: 139-145

Mazuayd P. & R.J. Conover, 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. Mar Ecol. Prog Ser, 45: 289-302.

Pequex, A.1995. Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol. 15 (1):1-60

Sanchez M. V., G. Nicoloso, L. López Greco y E. Rodríguez, 1999. Toxicidad letal aguda de cadmio y cobre para el primer estadio larval del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). VIII Congreso Latinoamericano de Cs del Mar, Trujillo, Perú. 880-881.

Spicer, J.R and R.E. Weber. 1991. Respiratory impairment in crustaceans and mollusks due to exposure to heavy metals. Comp Biochem. Physiol. 100 C (3): 556-563

Strickland, J.D.H. Y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can. 125, 185 pp

Vanegas Perez, R.C.1997. Efectos subletales del cadmio y Zinc en el camarón blanco *Penaeus setiferus*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. 118p

Ward G.S. & PR Parrish. 1982. Manual of methods in aquatic environment research. Part 6. Toxicity Test. FAO. Fisheries Technical Papers 185: 23 p.

Weis J.S., A Cristini & K. Ranga Rao. 1992. Effects of Pollutants on Molting and Regeneration in Crustaceans. American Zoology 32: 495-500.