

# EFECTOS DE LOS EFLUENTES DEL CENTRAL AZUCARERO DE CUMANACOA SOBRE LA CONDICIÓN FISIOLÓGICA Y BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN EN EL GASTERÓPODO *Pomacea glauca* (LINNÉ, 1758).

Daniel G. Belmar <sup>1</sup>\*, Mairin J. Lemus <sup>2</sup>, Julio C. Armas <sup>2</sup> y Clelia del V. Zapata <sup>1</sup>

(1) Dpto de Bioanálisis, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Calle Bolívar s/n, Cumaná, Venezuela.

(2) Dpto de Biología, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente, Calle Bolívar s/n, Cumaná, Venezuela.

(\*) Autor correspondiente: Email: [belmarlc@cantv.net](mailto:belmarlc@cantv.net)

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de las descargas del central azucarero de Cumanacoa sobre los parámetros hemogasodinámicos, electrolíticos, concentración de metalotioninas, actividad de la enzima glutatión peroxidasa e índice de condición fisiológica (ARN/ADN) en ejemplares de *Pomacea glauca*. Se evaluaron organismos provenientes de: a) la zona de descargas del central azucarero, b) zona no afectada por la descarga del efluente y c) organismos de la zona contaminada y depurados durante seis semanas en condiciones de laboratorio. Los ejemplares provenientes de la zona contaminada y depurados presentaron valores de pH significativamente superiores al control, producto de una disminución de la PCO<sub>2</sub> y un aumento en las concentraciones de bicarbonato. Los niveles de metalotioninas y glutatión peroxidasa aumentaron significativamente en el grupo contaminado con respecto a los grupos control y depurado, asociado posiblemente a los altos niveles de contaminantes como NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub>, hidrocarburos alifáticos y metales como Cu, Co, Ni, Zn, Cd y Fe. El índice de condición fisiológica ARN/ADN fue significativamente mayor en los organismos contaminados y depurados, producto factiblemente de una mayor cantidad de materia orgánica en suspensión.

Palabras clave: biomarcadores; contaminación; estrés oxidativo; *Pomacea glauca*; ASW, Venezuela.

## ABSTRACT

In the present study was evaluated the effect of the discharges of the sugar industry of Cumanacoa on the hemogasodynamic and electrolytic parameters, metallothioneins concentration, activity of the enzyme glutathione peroxidase and physiologic condition (ARN/ADN) index in *Pomacea glauca*. They were evaluated organisms from: a) the area of discharges of the sugar industry, b) area not affected by the discharge of the effluent and c) organisms of the contaminated zone and purified during six weeks under laboratory conditions. The organisms from the polluted and purified area presented values of pH significantly increased to the control, product of a decrease of the PCO<sub>2</sub> and an increase in the bicarbonate concentrations. The metallothioneins and glutathione peroxidase levels increased significantly in the polluted group with respect to the groups control and purified, associated possibly at the high levels of polluting agents like NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub>, alifatic hydrocarbons and metals like Cu, Co, Ni, Zn, Cd and Fe. The index of physiological condition ARN/ADN was significantly increased in the contaminated and purified organisms, product feasibly of a higher quantity of organic matter in suspension.

Key words: biomarkers; contamination; oxidative stress; *Pomacea glauca*; ASW, Venezuela.

Los efectos ecológicos y de salud asociados con la contaminación del medio acuático son de importancia nacional e internacional, sobre todo si no se cuenta con un adecuado tratamiento en lo que a desechos industriales se refiere. Los elementos contaminantes de estos desechos, tales como los metales y los compuestos orgánicos pueden distribuirse en la columna de agua y/o sedimentos, convirtiéndose en focos de contaminación química para los ecosistemas acuáticos (Dorworth, 2003). Algunos de estos químicos, tales como los metales pesados,

detergentes y pesticidas pueden ser fácilmente acumulados por la biota e incorporados a las cadenas tróficas, lo cual tiende a aumentar la concentración de estos elementos en los consumidores finales, dentro de los cuales se encuentra el hombre.

El uso de biomarcadores a niveles celulares o moleculares se ha propuesto como una herramienta sensible para la evaluación de los efectos biológicos causados por la contaminación del medio ambiente. Estos biomarcadores podrían

indicar si un organismo ha estado expuesto a contaminantes y la magnitud de la respuesta de los organismos podría estar asociada con la magnitud de los contaminantes presentes (Cajaville *et al.*, 2000).

El gasterópodo *Pomacea glauca* es una de las especies de caracoles predominantes en el oriente de Venezuela, donde el habitáculo con agua permanente permiten a esta especie crecer más y lograr densidades de población significativas (Donnay y Beissinger, 1993). En muchas ocasiones estos organismos son tomados como fuente principal o adicional de proteínas en la dieta diaria de los habitantes de la zona.

Todos estos planteamientos anteriormente descritos, representan una base para el estudio de las respuestas fisiológicas de *Pomacea glauca* como organismo bioindicador de contaminación. El propósito general de este trabajo es evaluar los efectos de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa sobre la condición fisiológica y los biomarcadores de contaminación en éste gasterópodo. Los datos sobre la actividad acidobásica, electrolítica, niveles de metalotioninas y glutatión peroxidasa e índice de condición fisiológica ARN/ADN de la presente investigación, pueden ser tomados como una base importante para establecer nuevas estrategias para controlar las descargas de los efluentes industriales, domésticos o comerciales en las márgenes de los cuerpos de agua dulce.

### Área de estudio

La recolección de los ejemplares de *P. glauca* utilizados en esta investigación se realizó en los caseríos de Río Guasdua (zona donde descarga el central azucarero de Cumanacoa) y San Lorenzo, sector La Acequia (zona que no está influenciada por los efluentes contaminados), ubicados entre 5 - 10 Km de Cumanacoa, en el Municipio Montes del estado Sucre, Venezuela. Ambos caseríos se encuentran ubicados en la zona de longitud 63,9 y latitud 10,2 aproximadamente, con una altitud que varía entre 245 - 260 m.s.n.m., entre las cuencas media y alta del río Manzanares.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron tres grupos de *P. glauca* de veinte ejemplares cada uno, cuyo tamaño y edad promedio fueron de 4,5 cm de diámetro y ocho meses. El grupo 1, que fue colectado en un área influenciada directamente por los residuos en el

sitio del vertedero, el grupo 2, que sirvió como control, se recolectó en un área sin la influencia de las descargas de efluentes provenientes del central azucarero de Cumanacoa y el grupo 3, se tomó del sitio donde se vierten los residuos de los efluentes contaminantes y se colocó durante seis semanas en recipientes con agua libre de contaminantes.

Para conocer de los parámetros acidobásicos e iónicos, se tomaron muestras de hemolinfa por punción directa de la cavidad pericárdica con jeringas heparinizadas. Las mediciones ácido básicas se realizaron en un microanalizador de pH y gases sanguíneos marca Corning, modelo Rapidlab 238 de lectura digital, el cual consta de electrodos sensibles de pH, PO<sub>2</sub> y PCO<sub>2</sub> que permiten calcular a través de circuitos computarizados las concentraciones sanguíneas de los iones bicarbonato, CO<sub>2</sub> total y exceso de base, entre otros. Luego, se procedió a centrifugar las muestras para valorar los electrolitos sodio, potasio y cloruro en un sistema semiautomático de electrodos ion-selectivos, marca BioCare y modelo Biolyte 2000, que usa un sistema de microcomputadora para cuantificar estos analitos.

Para obtener las metalotioninas se disecó en frío 1g de tejido hepático de la especie, se homogeneizó en frío con 3ml de buffer tris-HCl 20 mmol/l y 500 mmol/l de sacarosa a un pH de 8,6, que contiene 6 mmol/l de leupeptina, 0,5 mmol/l de PMSF (fenilmetil-sulfóxido) y β-mercaptoetanol (0,01%). Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 30 000g durante 20 minutos a 4°C, para luego mezclar el sobrenadante obtenido con 1mg de ARN y 40 µl de HCL al 37% más tres volúmenes de etanol frío (87%). Esta mezcla se mantuvo a 20°C por una hora, se centrifugó a 6 000g durante 10 minutos y fue secado bajo una atmósfera de nitrógeno. Seguidamente, el precipitado fue resuspendido en 150µl de NaCl 250 mmol/l y 150µl de una mezcla de HCl 1M y 4mM de EDTA. Luego, fueron agregados 4,2 ml de NaCl 2M que contiene 0,43 nM de DTNB buferizado con Na-fosfato 0,2 M a pH 8,0. Finalmente se centrifugó la muestra a 3000g durante 5 min y se conservó el sobrenadante hasta la posterior cuantificación de la concentración de metalotioninas por un método espectrofotométrico a 412 nm y de la actividad de la glutatión peroxidasa por inmunoensayo.

Para investigar las concentraciones de ARN, ADN, proteínas totales se pesó 30 mg de tejido húmedo del pié muscular que fue homogeneizado en frío por 1 min en 800 µl de NaCl 1 mol/l. Las homogeneizaciones se realizaron utilizando para

ello un aparato Eberbach modelo 2355 a 400 g, para luego ser transferidos a tubos de ensayo (75 x 12 mm) con pipetas Pasteur y centrifugados a 3000 g durante 30 min a 4,0 °C. Se tomaron alícuotas de 100 µl del sobrenadante por duplicado para ser analizadas por ensayo fluorométrico para las concentraciones de ARN y ADN y por espectrofotometría para las concentraciones de proteínas totales por el método de Bradford y el índice ARN/ADN se calculó matemáticamente.

Las variables fueron analizadas a través de la aplicación de un análisis de varianza de una vía con el propósito de establecer variaciones entre los valores experimentales obtenidos para los tres grupos estudiados. Las variables que resultaron significativas fueron tratadas con la prueba *a posteriori* de Dunnet (Sokal y Rohlf, 1989).

## RESULTADOS

En la [Tabla 1](#) se pueden observar las características geográficas, fisicoquímicas y de composición orgánica de los cuerpos de agua donde se realizó el muestreo de los organismos contaminados y controles. En la misma se puede observar una gran diferencia entre las dos zonas en cuanto a la composición química y orgánica se refiere, destacándose principalmente la contaminación química de la zona donde continuamente son vertidos los efluentes del central azucarero, demostrada por las concentraciones de metales, nitratos, nitritos, fosfatos e hidrocarburos alifáticos.

Las variaciones de los valores promedio de pH, PCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, metalotioninas, glutatión peroxidasa e índice ARN/ADN se pueden observar en la [Tabla 2](#) y en las [Figs. 1 y 2](#). En las mismas se pueden notar diferencias significativas para los niveles del pH (Fs: 42,96), PCO<sub>2</sub> (Fs: 11,44) y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fs: 46,48) en la hemolinfa en los tres grupos estudiados, así como en los niveles de las metalotioninas (Fs: 54,92) y de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Fs: 2,98) en el hepatopáncreas de los caracoles. Además, también se muestran diferencias significativas para el índice de condición fisiológica ARN/ADN (Fs: 4,94) entre los grupos de gasterópodos estudiados.

## DISCUSIÓN

Un aumento del pH en la hemolinfa del grupo de caracoles contaminados y depurados se debe posiblemente a la disminución en los valores de la PCO<sub>2</sub>, hecho evidenciado mayormente en el grupo

expuesto a contaminación de su medio ambiente. Igualmente, este grupo pudo aumentar su metabolismo basal, y como consecuencia el aumento en la actividad pulmonar y branquial y, por ende, el aumento en la eliminación respiratoria de CO<sub>2</sub> hacia el medio ambiente, evidenciando de esta forma un desplazamiento hacia la izquierda de la ecuación de equilibrio acidobásico. Por otra parte, nuestros resultados evidencian que, aunque en estos organismos existen mecanismos fisiológicos responsables de la estabilidad del medio interno, la activación de los mismos no fue suficiente para mantener estable los niveles del pH hemolinfático, producto del efecto de la contaminación orgánica e inorgánica evidente en los cuerpos de agua de la zona de muestreo.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del agua de la zona influenciada por los efluentes del central azucarero (zona contaminada) y de la zona sin contaminación.

Característica	Zona contaminada	Zona no contaminada
NH <sub>4</sub> (µmol/l)	28,94	3,66
NO <sub>2</sub> (µmol/l)	3,49	0,22
N. Total (µmol/l)	119,0016	54,7098
PO <sub>4</sub> (µmol/l)	4,12	1,23
P. Total (µmol/l)	8,59	2,39
Coli tot log (NMP)	5	4
H. Alifáticos (mg/l)	1,3	0,7178
Co total (µg/l)	34,6982	22,0370
Cr total (µg/l)	29,3103	27,4074
Cu total (µg/l)	4,5257	2,2222
Mn total (µg/l)	145,4741	28,1481
Ni total (µg/l)	23,9224	13,8888
Zn total (µg/l)	48,4913	42,2222
Cd total (µg/l)	20,8333	15,3750
Fe total (µg/l)	234,0	135,125

Con frecuencia las alteraciones del equilibrio acidobásico se observan asociadas con diversos estados patológicos de cualquier organismo terrestre o acuático. El mantenimiento de un pH constante en un organismo es de gran importancia, debido a que las modificaciones provocan una alteración de las funciones enzimáticas, de la incorporación y regulación celular de los metabolitos y de la captación y liberación de oxígeno (Brenner *et al*, 1987).

Tabla 2. Resumen estadístico del análisis de varianza simple aplicado a los niveles de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en la hemolinfa de los tres grupos de *P. glauca*. n: número total de muestras; X: media; S: desviación estándar; Sx: error estándar; Fs: Fisher, ns: no significativo.

Parámetro	Grupos	n	intervalo	X	S	Sx	Fs
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	Contaminado	20	64,11 – 67,86	66,0	7,0188	1,3319	0,96 ns
	Control	20	61,56 – 65,34	63,45	4,2609	1,3319	
	Depurado	20	63,31 – 67,09	65,20	5,0221	1,3319	
K <sup>+</sup> (mmol/l)	Contaminado	20	2,36 – 2,60	2,48	0,4384	0,088	0,33 ns
	Control	20	2,32 – 2,60	2,45	0,4439	0,088	
	Depurado	20	2,42 – 2,67	2,55	0,3471	0,088	
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	Contaminado	20	53,49 – 57,01	55,25	5,8479	1,246	1,51 ns
	Control	20	52,53 – 56,06	54,3	6,0112	1,246	
	Depurado	20	50,49 – 54,01	52,25	5,3002	1,246	

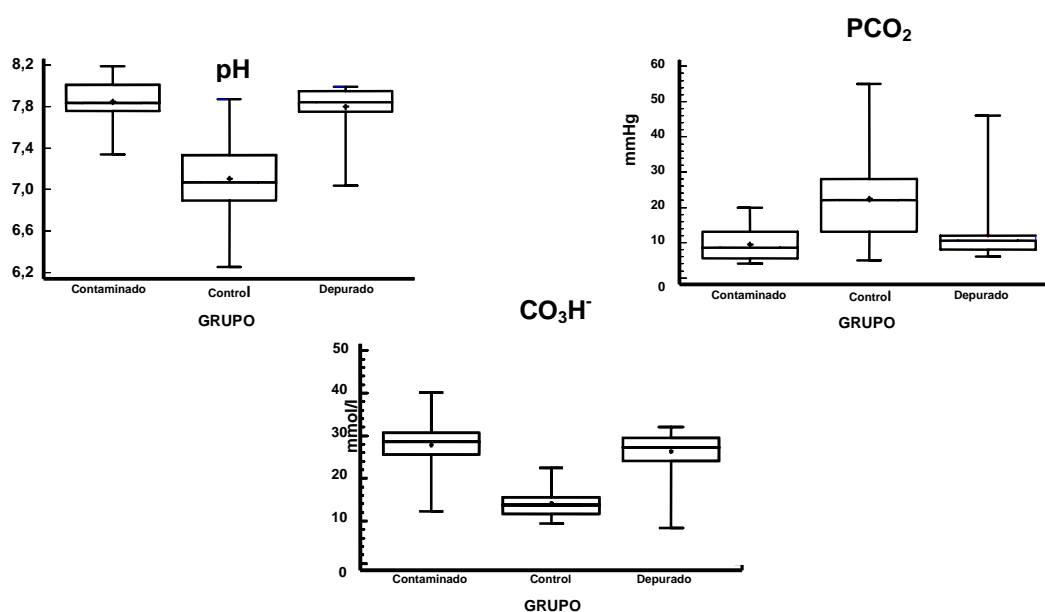


Fig. 1. Valores promedio de pH, PCO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la hemolinfa de *P. glauca* provenientes de las zonas de descarga de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa (grupo contaminado), de la zona no influenciada por las descargas (control) y depurados en condiciones de laboratorio controladas.

También se puede observar que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de electrolitos para los grupos estudiados, hecho que puede ser explicado porque éstos iones son reabsorbidos o secretados en cualquier organismo según sea necesario para regular su concentración y para regular tanto la carga osmótica como el pH de la hemolinfa. En 1999, Jordan y Deaton estudiaron la osmorregulación en el gasterópodo *Pomacea bridgesi* y argumentaron que los caracoles de agua dulce poseen una menor capacidad para aumentar el contenido de aminoácidos y de electrolitos comparada con la de

bivalvos de agua dulce, en respuesta a la variación del pH intracelular.

Los resultados arrojados para la enzima glutatión peroxidasa (GPx) pueden ser explicados por la presencia de distintos tipos de xenobióticos (orgánicos e inorgánicos) en los efluentes vertidos en los cuerpos de agua que constituyen el medio ambiente del grupo de caracoles contaminados, entre los cuales se encuentran distintos tipos de metales, hidrocarburos alifáticos, nitratos y fosfatos, entre otros. La presencia de estos elementos contaminantes crea un estrés oxidativo

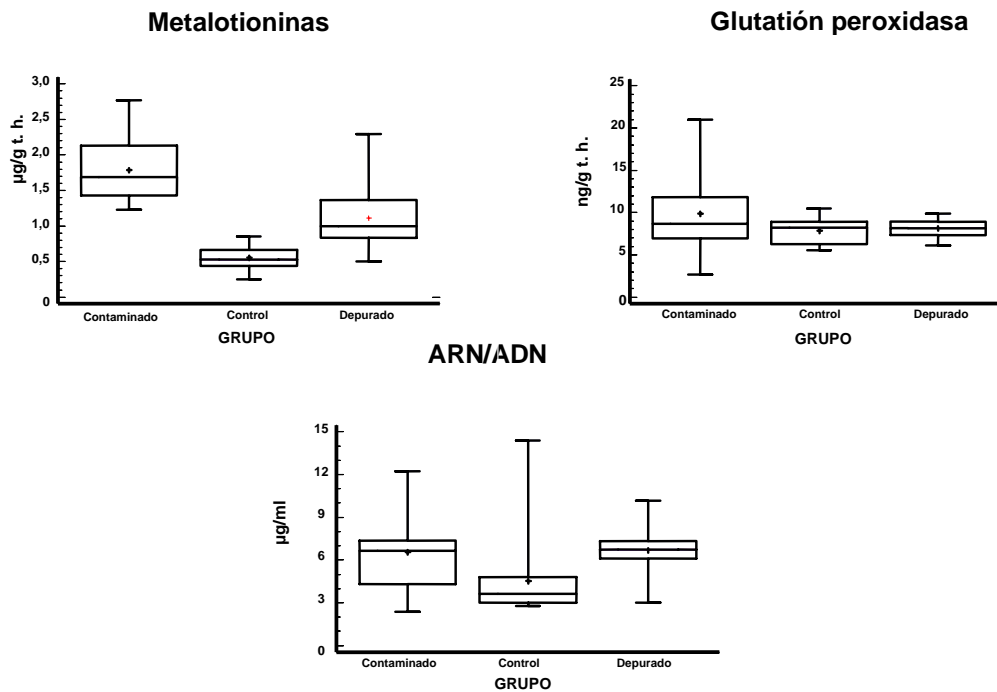


Fig. 2. Valores promedio de metalotióninas, glutatión peroxidasa e índice de condición fisiológica ARN/ADN en el hepatopáncreas y músculo de *P. glauca* provenientes de las zonas de descarga de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa (grupo contaminado), de la zona no influenciada por las descargas (control) y depurados en condiciones de laboratorio controladas.

en estos organismos, que a su vez aumenta la producción de radicales libres e inducen respuestas adaptativas de componentes del sistema antioxidante, entre las cuales está el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa, enzima citosólica que puede reducir los peróxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes, para así reducir y evitar el daño que pueden causar los radicales libres a las membranas celulares (Di Giulio *et al.*, 2001), tal como es el caso en nuestra investigación. Además, otros estudios han comprobado que los niveles de actividad de esta enzima dependen de otros factores como el pH, siendo el rango donde se mostró el máximo de actividad entre 7,0 y 8,5 (Kutlu y Susuz, 2004), lo que concuerda con los valores de este parámetro encontrados en la hemolinfa de los caracoles analizados en este estudio.

El aumento en la concentración de las metalotióninas (MTs) en el grupo de organismos contaminados, indica que existe una mayor

inducción de la producción de estas proteínas enlazadoras de metales en el tejido del hepatopáncreas de los ejemplares de *Pomacea glauca* provenientes de la zona contaminada.

Se han realizado estudios *in vitro* que sugieren que las metalotióninas participan en la defensa celular contra la acción de los radicales libres, lo que les confiere propiedades detoxificantes durante el aumento de la producción de estos agentes oxidantes, producto de la contaminación química de su medio ambiente, lo que podría explicar, en parte, el aumento de sus niveles en el tejido hepático de estos organismos.

Anderson *et al.* (1999), realizaron estudios en los hemocitos de una especie de ostra y sugirieron que una de las funciones de las metalotióninas es proteger al organismo contra el estrés oxidativo mediante el barrido de especies reactivas del oxígeno, comprobando que las metalotióninas de los hemocitos de *Crassostrea virginica* interactúan con los radicales libres.

Con respecto a los valores del índice ARN/ADN, los grupos de caracoles contaminados y depurados presentaron los niveles más altos, y como este índice representa un indicador sensible de la condición nutricional de un organismo, se puede afirmar que el grupo de caracoles contaminados tuvo más biodisponibilidad de alimento debido a la mayor cantidad de materia orgánica en suspensión en su medio ambiente, hecho que puede ser explicado por la ubicación geográfica del sitio de recolección, las condiciones climatológicas, las condiciones fisicoquímicas del agua. También se han realizado estudios que demuestran la relación entre la tasa de crecimiento de un organismo y el tiempo de acumulación de metales pesados, basados en que la concentración de metales es expresada en  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo. Por otra parte, se puede observar que el grupo de caracoles depurados posee una concentración de metalotioninas baja y un índice ARN/ADN alto en comparación con el grupo control, lo que sugiere una depuración de los niveles de metales en estos organismos, demostrando la gran eficiencia del poder de detoxificación y excreción de metales traza en ellos. Resultados similares fueron obtenidos por Leung *et al.*, (2001), comprobando que las bajas concentraciones de metales en organismos que crecen rápidamente pueden no sólo ser debidas al efecto dilución-tejido, si no también a la capacidad de detoxificación y excreción de estos metales.

Se concluye que el efecto contaminante de los efluentes del central azucarero de Cumanacoa causa alteraciones en los niveles hemolinfáticos pH,  $\text{PCO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$ , hepatopancreáticos de metalotioninas y glutatión peroxidasa y musculares de ARN/ADN en el grupo de *P. glauca* perteneciente a la zona influenciada del río Manzanares. Además, todas estas diferencias encontradas entre los valores medios de los parámetros bioquímicos, fisiológicos y biomarcadores analizados para los tres grupos de caracoles son producto de la alteración de los diferentes mecanismos metabólicos encargados de mantener la homeostasis de estos organismos, donde la contaminación química de los cuerpos de agua en las zonas de muestreo ha logrado de alguna manera crear un desbalance que afecta estos parámetros en el grupo de gasterópodos contaminados.

#### AGRADECIMIENTOS:

Se agradece a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta

investigación, especialmente al personal de profesores, técnicos y estudiantes de los laboratorios donde fueron realizadas las diferentes determinaciones.

#### REFERENCIAS

- Anderson, R., K. Pate and G. Roesijadi (1999): Oyster metallothioneins as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Developmental and Comparative Immunology*. 23:443-449.
- Brenner, B., F. Coe and F. Reitor (1987): *Renal Physiology in Health and Disease*. Editorial W.B. Saunders, Co. Philadelphia. 180 pp.
- Cajaraville, M., M. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete and A. Viarengo (2000): The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247: 295-311.
- Di Giulio, R., W. Benson, B. Sanders y P. Van Veld (2001): Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (G.M. Rand, ed.), 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis, Washington DC, EEUU, pp: 523-552.
- Donnay, T. and S. Beissinger (1993): Apple snail (*Pomacea dolioides*) and freshwater crab (*Dilocarcinus dentatus*) population fluctuations in the llanos of Venezuela. *Biotropica*. 25: 206-214.
- Dorworth, L. (2003): Understanding contaminated sediments: bioavailability of contamination. *Water Issues and Concerns* 1:1-4.
- Jordan, P. and L. Deaton (1999): Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 122(A): 199 - 205.
- Kutlu, M. and F. Susuz (2004): Biochemical properties of glutathione peroxidase in *Gammarus pulex*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73: 432-436.
- Leung, K., I. Morgan, R. Wu, T. Lau, J. Svavarsson and R. Turnes (2001): Growth rate as a factor confounding the use of the dogwhelk *Nucella lapillus* as biomonitor of heavy metal contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 221: 145-159.
- Sokal, R. y J. Rohlf (1989): *Biometría, Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Editorial H. Blume. Madrid, España. 832 pp.

Aceptado: 14 de agosto del 2007