

INFORME DE RESULTADOS do Estudo Integral Preliminar sobre as limitacións antropoxénicas á produción marisqueira na Ría de Arousa.

Miniproxecto 2: Transferencia trófica do Pb do reló (*Dosinia exoleta*) ao camarón (*Palaemon serratus*)

ECOTOX - 03/2015

Autores:

Coordinador -Ricardo Beiras

Responsable científica -Paula Sánchez Marín

Técnico de apoio– Pilar Feijoo

ÍNDICE DE CONTIDOS

1. Resumo	3
2. Antecedentes	3
3. Metodoloxía	3
3.1 Obtención de moluscos e preparación das dietas	3
3.2 Experimentos de transferencia trófica.....	4
3.3 Controis de calidade.....	5
3.4 Análises adicionais.....	5
3.5 Análisis de Pb en auga e nos organismos	5
4. Resultados e Discusión	6
4.1 Concentración de Pb nos moluscos e nas dietas.....	6
4.2 Concentración de Pb na auga e no camarón recién alimentado	6
4.3 Transferencia trófica do Pb ao camarón	7
5. Conclusións.....	9
5. Referencias bibliográficas	9

1. Resumo

O chumbo (Pb) acumúlase no ril do reló (*Dosinia exoleta*) en grandes cantidades en forma de gránulos, fracción que se espera que sexa pouco bioasimilable polos consumidores. Co obxecto de comprobar se o Pb presente no reló é asimilable, fíxose un experimento de transferencia trófica no que se alimentaron camaróns (*Palaemon serratus*) con 100 mg por día de reló durante 28 días. Adicionalmente outros camaróns alimentáronse cunha dieta libre de Pb (mexillón limpo) e cunha dieta cunha concentración de Pb alta pero que non se espera que estea en forma de gránulos (mexillón contaminado). Os resultados amosaron que os camaróns alimentados con reló ou con mexillón limpo case non acumularon Pb, mentres que os camaróns alimentados co mexillón contaminado si que acumularon moito Pb. Así pois, demostrouse que o Pb presente no reló non se transfire ao seu consumidor, o camarón *Palaemon serratus*.

2. Antecedentes

O reló (*Dosinia exoleta*) extraído en certos bancos das rías de Arousa e Pontevedra mostra dende hai anos contidos moi altos en Pb (Beiras e Sánchez Marín, 2006a,b), que se disparan en tallas superiores aos 40 mm (Beiras e Sánchez Marín, 2006c) chegando a exceder o límite legal de 1,5 mg/Kg peso fresco imposto polos Regulamentos 221/2002 e 1881/2006 da Comisión Europea, motivo polo que os individuos grandes deixaron de comercializarse. O motivo parece ser que esta especie presenta a peculiaridade de acumular o Pb en gránulos extracelulares no ril ao longo da súa vida (Darriba and Sánchez-Marín, 2013), polo que o contido en Pb aumenta coa talla de xeito exponencial (Sánchez-Marín and Beiras, 2008).

No presente estudo plantéxase a hipótese de que esta fracción do metal en forma de gránulos non é bioasimilable, e por tanto o seu consumo non representaría un risco para a saúde. Para contrastar esta hipótese, este traballo ten como obxectivo estudar a transferencia trófica do Pb do reló a un consumidor mariño desta especie, o camarón *Palaemon serratus*.

3. Metodoloxía

3.1 Obtención de moluscos e preparación das dietas

Os exemplares de *Dosinia exoleta*, procedentes do banco marisqueiro de Galiñeiro, foron proporcionados pola confraría de pescadores San Antonio de Cambados. Escolléronse

individuos de entre 40 e 50 mm de lonxitude, que se diseccionaron separándose o ril do resto dos tecidos brandos.

Obtivéronse mexillóns dunha batea na Ría de Arousa, de entre 40 e 50 mm de lonxitude. Varios deles foron expostos en laboratorio durante 48 h a 100 µg/L de Pb, co fin de obter mexillón contaminado con Pb para ofrecer aos camaróns. Trala exposición, os tecidos brandos foron separados das cunchas e mergullados en auga de mar filtrada durante 10 min, co fin de desorber o Pb adsorbido ás superficies externas do mexillón.

Tanto os mexillóns limpos, como os mexillóns contaminados, o reló e os riles de reló foron partidos en fragmentos de uns 3-5 mm³ e conxelados para o seu posterior uso como dieta para os camaróns.

As dietas subministradas consistiron en mexillón limpo (Dieta 1), mexillón contaminado con Pb (Dieta 2) e unha dieta de reló na que se subministrou ril mais resto dos tecidos nunha proporción 1:2 (Dieta 3).

3.2 Experimentos de transferencia trófica

Os camaróns *Palaemon serratus* foron comprados á Confraría de Pescadores San Xosé (Cangas do Morrazo) e transportados vivos ao laboratorio, onde foron mantidos durante 3-4 días sen alimentar en circuíto aberto de auga de mar a 18 °C.

Os camaróns foron introducidos en vasos de precipitados de 1 L, de forma individual, e expostos durante 4 semanas a un circuíto aberto de auga de mar prefiltrada a 10 µm e a 18 °C de temperatura, cun caudal de $0.8 \pm 0.2 \text{ L min}^{-1}$. Os vasos de precipitados foron pechados na súa parte superior cunha malla de nylon de 80 µm de luz, para evitar tanto perdas de alimento coma que os camaróns escaparan do vaso.

Os camaróns foron divididos en tres grupos experimentais de 16 individuos cada un, e alimentados con cada unha das tres dietas respectivamente.

A cantidade de comida subministrada foi de 100 mg de peso fresco por día, que se subministrou dúas veces por semana, os Martes e Venres, 300 mg os Martes e 400 mg os Venres. Antes de cada subministro de alimento, recolleuse e pesouse o alimento sobrance da toma anterior (caso de haber algún). Tras 28 días nos que os camaróns foron alimentados un total de 8 veces, deixáronse 6 días máis sen alimentar, para que baleirasen o sistema dixestivo, diseccionáronse por separado o hepatopáncreas e o resto do camarón e se gardaron os tecidos en viais de polipropileno para a posterior dixestión e análise de Pb.

En cada alimentación, tomáronse adicionalmente 300 mg de cada tipo de dieta por duplicado para analizar posteriormente o seu contido en Pb.

3.3 Controis de calidade

Para comprobar que as dietas con Pb foron efectivamente inxeridas polos camaróns, aparte da comprobación visual, analizáronse tamén cinco individuos aos que se lles deu de comer 300 mg da Dieta 3, e que presentaban aínda comida no estómago, sen darlles tempo a defecar. Isto fíxose porque o ril de *D. exoleta* (cun alto contido en gránulos ricos en Pb) desfácese parcialmente na auga antes de ser inxerido, soltando parte dos gránulos. Para minimizar a perda de gránulos, o subministro da dieta 3 facíase en dúas fases, primeiro o ril, que era rapidamente inxerido na maioría dos casos, e logo o resto, que podía ficar na auga varias horas ata ser inxerido sen desfacerse.

Para comprobar se o Pb presente nas dietas podería disolverse na auga e ser asimilado polo camarón en forma disolta, colocáronse 300 mg de dieta 1, 2, ou 3 en 1 L de auga de mar en axitación durante 3 minutos. Pasado este tempo, deixouse sedimentar o alimento e tomouse unha mostra de auga para analizar o Pb disolto. A elección de 3 minutos fíxose tendo en conta o caudal de auga no circuíto experimental e o tempo de renovación da auga nos vasos de precipitados, que era de 1.45 min de media.

3.4 Análises adicionais

Adicionalmente analizouse a concentración de Pb en mostras homoxenizadas de tecido liofilizado de reló e ameixa babosa (*Venus corrugata*) do Galiñeiro e de mexillón recollido nun lugar contaminado: Porto de Vigo, pantalán da curva de San Gregorio, en Bouzas. Para elo liofilizáronse e homoxenizáronse os tecidos brandos de 12 individuos de cada bivalvo, e se analizou o Pb en tres réplicas de 500 mg de tecido seco.

3.5 Análises de Pb en auga e nos organismos

Os tecidos foron secados (48 h, 70 °C) e dixeridos con ácido nítrico e auga osixenada seguindo o protocolo descrito en Sánchez-Marín e Beiras (2008). O Pb mediuse por ICP-MS. Usouse o material de referencia ERM-CE278k para comprobar a eficiencia na dixestión e a exactitude no análise. O porcentaxe de recuperación do Pb foi do 94%.

Os análises en auga de mar foron realizados por voltamperometría de redisolución anódica, usando o método das adicións estándar.

4. Resultados e Discusión

4.1 Concentración de Pb nos moluscos e nas dietas

A concentración de Pb medida en ameixa babosa recollida no mesmo banco que o reló é moito menor que a concentración no reló (0.11 vs $8 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco (ps); Táboa 1), o que evidencia o xa sabido de que a alta concentración de Pb no reló é algo característico desta especie e non indica unha alta contaminación por Pb na zona.

A concentración de Pb en mexillón recollido nun dos lugares mais contaminados por Pb na ría de Vigo é inferior á do reló (2.8 vs $8.0 \mu\text{g g}^{-1}$ ps; Táboa 1). Ante a dificultade de obter mostras naturais doutro bivalvo cunha concentración de Pb tan elevada coma a do reló, decidimos expor mexillóns a Pb no laboratorio para aumentar a súa concentración de Pb ate o nivel da dieta de reló.

Táboa 1. Concentración de Pb en mostras homoxenizadas de reló, ameixa e mexillón.

Mostra	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps)
<i>D. exoleta</i> (Galiñeiro)	8.0 ± 0.5 (n = 3)
<i>V. corrugata</i> (Galiñeiro)	0.11 ± 0.01 (n = 3)
<i>M. galloprovincialis</i> (Bouzas-San Gregorio)	2.84 ± 0.05 (n = 3)

A táboa 2 amosa as concentracións de Pb nas tres dietas ofrecidas aos camaróns, expresadas en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmido (ph). Vese que as concentracións de Pb nas dietas 2 e 3 son similares.

Táboa 2. Concentración de Pb nas dietas ofrecidas aos camaróns no experimento de transferencia trófica.

Mostra	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$ ph)
Dieta 1 - Mexillón limpo	0.16 ± 0.08 (n = 12)
Dieta 2 - Mexillón contaminado	17 ± 7 (n = 12)
Dieta 3 - reló (ril + resto)	15 ± 2 (n = 15)

4.2 Concentración de Pb na auga e no camarón recién alimentado

A concentración de Pb na auga que estivo en contacto coas dietas 1 e 3 estivo por debaixo do límite de detección ($< 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$). A auga en contacto coa dieta 2 durante 3 minutos amosou unha concentración de Pb algo superior ($1.3 \mu\text{g L}^{-1}$). Esa cantidade de Pb corresponde a un 25% do Pb que se subministró na dieta, que parece que se perde á auga por desorción e

solubilización dende os tecidos. A posibilidade de que este Pb disolto sexa responsable da acumulación de Pb observada nos camaróns alimentados coa dieta 2 é moi baixa pois o tempo de renovación da auga é de 1.5 min, e ademais os camaróns comen a dieta polo xeral rapidamente (en menos de 1 h) polo que a exposición dos camaróns a este Pb disolto sería durante un tempo moi breve (2 h por semana como máximo).

Os camaróns alimentados con dieta 3 e analizados coa comida aínda no estómago amosaron concentracións de Pb moi altas ($7 \mu\text{g g}^{-1}$ ps de media), representando entre un 16% e un 100% do Pb que se estimou que comeran, o que demostra que unha boa parte do Pb na dieta 3 foi efectivamente inxerido polos camaróns.

4.3 Transferencia trófica do Pb ao camarón

Os resultados do experimento de transferencia trófica se amosan na Táboa 3 e Figura 1. Pódese observar que os camaróns collidos na Ría de Vigo (Inicial) teñen unha concentración de Pb moi baixa ($0.024 \mu\text{g g}^{-1}$ ps). Tras ser mantidos durante 28 días no laboratorio e alimentados con mexillón limpo (dieta 1) a concentración de Pb nos camaróns triplícase ($0.078 \mu\text{g g}^{-1}$ ps), quizais debido a transferencia trófica do Pb presente na dieta 1 ou a acumulación de Pb vía disolta por contaminación nos circuitos e tubarias das instalacións de auga de mar. En todo caso, este aumento non é moi elevado, e chama a atención ver que é o mesmo que amosan os camaróns que foron alimentados coa dieta 3 (reló), que presentaba unha cantidade Pb cen veces maior.

Táboa 3. Concentración de Pb no camarón (media \pm desv. est. (n)) en $\mu\text{g g}^{-1}$ ps

Mostra	Pb no hepato.	Pb no resto	Pb no camarón
Inicial	0.033 ± 0.019 (16)	0.024 ± 0.008 (16)	0.024 ± 0.007 (16)
Final Dieta 1-mexillón limpo	0.33 ± 0.19 (15)	0.074 ± 0.047 (13)	0.078 ± 0.049 (13)
Final Dieta 2-mexillón contaminado	7.4 ± 4.4 (15)	0.73 ± 0.47 (16)	0.86 ± 0.55 (15)
Final Dieta 3-reló (ril+resto)	0.43 ± 0.21 (16)	0.053 ± 0.036 (16)	0.058 ± 0.036 (16)

Isto demostra que a maior parte do Pb presente na dieta 3 non é bioasimilable polo camarón. Ao contrario, os camaróns alimentados coa dieta 2 si que amosaron un aumento importante na concentración de Pb nos seus tecidos ($0.86 \mu\text{g g}^{-1}$ ps) comparados coa concentración inicial ($0.024 \mu\text{g g}^{-1}$ ps), e que foi unhas 10 veces superior á concentración de Pb no camarón

alimentado con dieta 1 ou 3. Isto demostra que o Pb presente na dieta 2 si que é alo menos parcialmente bioasimilable polo camarón.

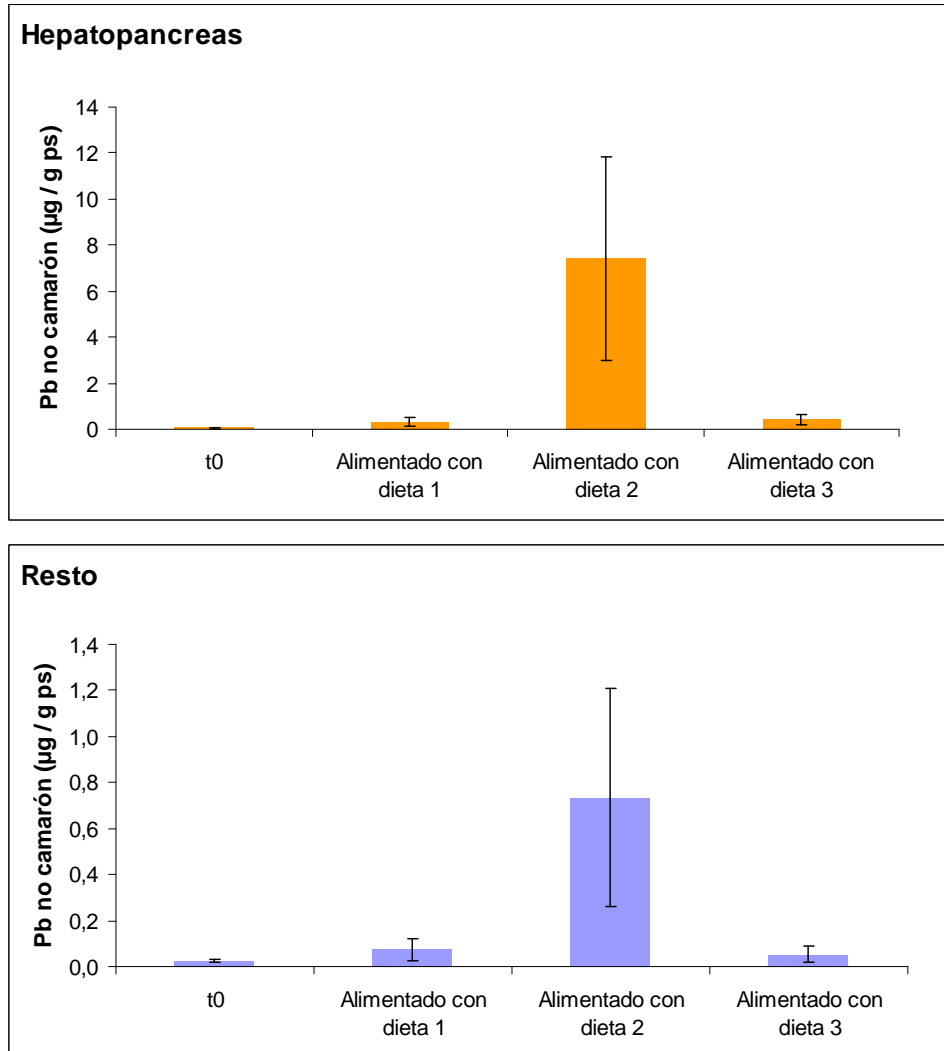


Figura 1. Concentración de Pb no hepatopáncreas e no resto de tecidos de camaróns (*Palaemus serratus*) recollidos na Ría de Vigo (t0) e alimentados durante 28 días con 100 mg de peso húmido por día con dieta 1 (mexillón limpo), dieta 2 (mexillón contaminado con Pb) e dieta 3 (mestura de ril + resto de tecidos de reló nunha proporción 1:2). Representase a media \pm desv. est. ($n = 13-16$ individuos).

A Figura 1 amosa as concentracións de Pb no hepatopáncreas e no resto dos tecidos do camarón nos distintos tratamentos. É de subliñar o feito de que a concentración de Pb no hepatopáncreas sexa entre 4 e 10 veces superior á concentración de Pb no resto do corpo, o que demostra que o camarón acumula o Pb preferentemente neste órgano. No camarón

salvaxe, sen embargo, a concentración de Pb no hepatopáncreas e no resto dos tecidos é similar.

5. Conclusións

O Pb presente no reló non é bioasimilable ou é moi pouco bioasimilable polos camaróns. Camaróns alimentados durante 28 días cunha mestura de ril e resto de tecidos de reló cunha concentración de 17 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ ph amosaron a mesma bioacumulación de Pb que camaróns alimentados con mexillón limpo con tan só 0.16 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ ph. En contraste os camaróns alimentados con mexillón contaminado por Pb sí acumularon cantidades relevantes deste metal.

Isto apunta a que o consumo de reló non representa dende o punto de vista do seu contido en Pb un perigo para a saúde, debido probablemente á peculiar forma de bioacumulación do Pb en forma de gránulos non dixeribles, característica de *Dosinia*. Nembargantes, dadas as diferenzas evidentes entre o sistema dixestivo do camarón e do ser humano, sería aconsellable realizar este estudo con mamíferos, ou alternativamente/complementariamente realizar unha dixestión *in vitro* simulando a dixestión humana para comprobar se a eficiencia de asimilación do Pb contido nas concrecións do ril do reló é tan baixa para mamíferos coma para o camarón.

6. Referencias bibliográficas

- Beiras, R., Sánchez Marín, P., 2006a. Análise de chumbo en *Dosinia exoleta* (reló) en catro bancos marisqueiros da Ría de Arousa. Informe Técnico.
- Beiras, R., Sánchez Marín, P., 2006b. Análise de chumbo en *Dosinia exoleta* (reló) en dous bancos marisqueiros da Ría de Pontevedra. Informe Técnico.
- Beiras, R., Sánchez Marín, P., 2006c. Estudio do contido en chumbo en relación coa talla nun banco marisqueiro de *Dosinia exoleta* (reló) da Ría de Arousa. Informe Técnico.
- Darriba, S. and Sánchez-Marín, P., 2013. Lead accumulation in extracellular granules detected in the kidney of the bivalve *Dosinia exoleta*. *Aquat. Living Resour.* 26: 11-17.
- Sánchez-Marín, P. and Beiras, R., 2008. Lead concentrations and size dependence of lead accumulation in the clam *Dosinia exoleta* from shellfish extraction areas in the Galician Rías (NW Spain). *Aquat. Living Resour.* 21: 57-61.