



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Animal, Biología
Vegetal y Ecología

Área de Ecología

Avaliación do imposex en *Nassarius*
reticulatus (ano 2015)

Evaluación del imposex en *Nassarius*
reticulatus (año 2015)

Evaluation of imposex in *Nassarius*
reticulatus (year 2015)



Pedro Alfaya Herbello

Trabajo de fin de grado

Fecha de defensa: 29 de Xuño de 2015

Contenido

RESUMEN.....	1
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Bioincrustación y su prevención.....	2
1.2 El TBT.....	3
1.2.1 Características.....	3
1.2.2 Devenir en el medio marino.....	4
1.2.3 Bioacumulación y Toxicidad.....	5
1.2.4 Legislación.....	6
1.3 Imposex.....	7
1.4 <i>Nassarius reticulatus</i>	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	17
CONCLUSIONS.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18

RESUMEN

El imposex (*i.e.* la super-imposición de caracteres sexuales masculinos en hembras de gasterópodos marinos) en *Nassarius reticulatus* (L.) se considera como un biomarcador específico de la contaminación por TBT (del inglés tributylin), por lo que se utiliza en la Europa atlántica. Para el presente TFG se ha evaluado dicha cuestión en una población de la ría de A Coruña (San Antón), atendiendo principalmente al índice de la secuencia del vaso deferente (VDSI). A pesar de que la muestra recogida en Febrero de 2015 presenta un considerable nivel de imposex (VDSI= 1.74), se aprecia una clara reducción con respecto a evaluaciones anteriores realizadas en la misma localidad. Si bien esta mejoría ambiental debe ser consecuencia directa de la total prohibición del TBT en 2003, se piensa que su demora es en parte debida a la biología de la especie utilizada.

Palabras clave: imposex, *Nassarius reticulatus*, TBT, VDSI.

RESUMO

O imposex (*i.e.* a super-imposición de caracteres sexuais masculinos en femias de gasterópodos mariños) en *Nassarius reticulatus* (L.) considérase como un biomarcador específico da contaminación por TBT (do inglés tributylin), polo que se emprega na Europa atlántica. Para o presente TFG avalíouse dita cuestión nunha poboación da ría de A Coruña (San Antón), atendendo principalmente ao índice da secuencia do vaso deferente (VDSI). A pesar de que a mostra recollida en Febreiro de 2015 presenta un considerable nivel de imposex (VDSI= 1.74), pódese apreciar unha clara redución con respecto a avaliacións anteriores realizadas na mesma localidade. Se ben esta mellora ambiental debe ser consecuencia directa da total prohibición do TBT en 2003, pénsase que a súa demora é en parte debida á bioloxía da especie empregada.

Palabras clave: imposex, *Nassarius reticulatus*, TBT, VDSI.

SUMMARY

Imposex (*i.e.* the super-imposition of male sexual characters onto females of marine gastropods) in *Nassarius reticulatus* (L.) is considered a specific biomarker of tributylin (TBT) pollution, and it is so used in Atlantic Europe. Following previous works by the receiving group, this question has been re-assessed in a population from the ría of A Coruña (San Antón); the vas deferens sequence index (VDSI) has been mainly used. Despite the considerable level of imposex (VDSI= 1.74) in the sample collected in February 2015, the reduction with respect to previous values is clear. While this environmental improvement must be a direct consequence of the 2003 European total ban, it is thought that its delay is in part due to the biology of the species used.

Key words: imposex, *Nassarius reticulatus*, TBT, VDSI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bioincrustación y su prevención

La bioincrustación o *biofouling* es la adhesión y crecimiento de organismos en la superficie húmeda (normalmente sumergida) de objetos de origen antrópico. Inicialmente, tras el contacto con el agua, se forma una biopelícula o *biofilm* de adhesión de bacterias, diatomeas, protozoos y esporas de algas al que posteriormente se añaden organismos macroscópicos (como percebes, algas, hidroides, esponjas, poliquetos tubícolas y moluscos) que completan la comunidad.

La acumulación de estos organismos individualmente pequeños puede llegar a formar inmensas masas que alteran la eficiencia de las estructuras afectadas, ocasionando severas pérdidas económicas. Se estima que un *biofouling* de seis meses de desarrollo en un barco provoca un aumento de peso de 150 kg/m². El gasto de combustible puede aumentar hasta en un 40%, a lo que se deben sumar los costes derivados de la limpieza, pintura y pérdida de beneficios mientras el buque se encuentra fuera de funcionamiento (Albaina, 2011).

Para retrasar los procesos de *biofouling* se han desarrollado compuestos anti-incrustantes o *antifouling*, cuyo objetivo es formar una capa tóxica alrededor de la superficie de aplicación. Los sistemas *antifouling* más antiguos consistían en láminas de cobre dispuestas sobre la superficie de los cascos de madera. Posteriormente el cobre se sustituyó por plomo y, años más tarde (a pesar de que se mantuvo el uso de los sistemas anteriores), se añadieron tratamientos en forma líquida. Pero no fue hasta la década de 1960 cuando se empezaron a utilizar los compuestos organoestánicos como agente activo en las pinturas *antifouling* (Yebra *et al.*, 2004).

La efectividad de estos compuestos depende de la solubilidad y de la tasa de liberación del tóxico. La solubilidad afecta al tiempo durante el que el tóxico proporciona una protección adecuada, así cuanto más soluble sea el tóxico menor será el tiempo de protección efectiva. La tasa de liberación, por su parte, debe ser suficientemente alta como para proporcionar una protección efectiva pero sin acortar en exceso la vida de la cobertura y sin ocasionar efectos tóxicos excesivamente elevados.

1.2 El TBT

1.2.1 Características

Los compuestos organoestánnicos son compuestos artificiales en los cuales un átomo de estaño está unido a entre uno y cuatro componentes orgánicos vía enlaces covalentes C-Sn.

En el año 1852 el químico alemán Carl Jacob Löwig sintetizó el primer derivado orgánico de estaño, pero no sería hasta 1936 cuando se registraría comercialmente como agente estabilizador de polímeros sintéticos. Aún tuvieron que pasar casi dos décadas para que se reconocieran las propiedades biocidas de éstos compuestos. A partir de ahí, los polivalentes organoestánnicos se han convertido en los compuestos organometálicos de mayor uso, teniendo el 20% de sus aplicaciones un fin biocida (Bennett, 1996).

Éstos compuestos se emplean como desinfectantes y pesticidas en agricultura, en las pinturas *antifouling* y como agentes protectores en la conservación textil, de curtido, de madera y de roca, así como anti-fúngicos en sistemas de agua industrial (Fent, 1996). La toxicidad ejercida por los compuestos organoestánnicos sobre los seres vivos viene determinada por la parte catiónica de la molécula y se ve incrementada según aumenta el grado de alquilación, alcanzando su toxicidad máxima en los compuestos trialquilados (Bennett, 1996; Maguire, 1996). Además, la afinidad de éstos compuestos por un determinado taxón depende de la longitud de su cadena (Albaina, 2011). En 1985, con anterioridad a las restricciones sobre su uso, sólo para el control del *biofouling* se producían anualmente 4×10^4 t de estos compuestos (Alzieu, 1998). En 1996 la cifra ascendía a 5×10^4 t anuales (OECD en Albaina 2011).

Desde principios de los 1960 hasta mediados de los 2000 el tributilo de estaño (TBT del inglés tributyltin) fue considerado como el compuesto *antifouling* ideal debido a: (I) es un agente muy potente (se necesita una cantidad 5 - 10 veces inferior de TBT que de óxido cuproso (Cu_2O) para prevenir un crecimiento del mismo grado), (II) afectan a un amplio rango de especies, (III) no provocan corrosión galvánica en cascos de aluminio y (IV) son incoloros, permitiendo utilizar gran variedad de colores en la pintura (Omae, 2003).

1.2.2 Devenir en el medio marino

El TBT pasa directamente de las pinturas *antifouling* a la columna de agua, donde la degradación tiene lugar mediante dos procesos. El primero de ellos se trata de la hidrólisis de los enlaces covalentes C-Sn mediante la acción de la radiación solar. Esta ruta de degradación ocurre en la microcapa superficial de la columna de agua y es casi inexistente a mayor profundidad (de Mora, 1996). En segundo lugar, y quizás siendo la vía mayoritaria de eliminación, está la biodegradación que realizan las bacterias, hongos y algas. Esta ruta se encuentra favorecida por la luz (en su mayoría son organismos fotosintéticos) y se da sólo en aerobiosis y cuando existe una fuente de carbono secundaria; lo cual limita el proceso a la columna de agua y a la capa superficial del sedimento. La debutilación secuencial rinde dibutilestaño (DBT), monobutilestaño (MBT) y, finalmente, Sn (IV) inorgánico (Fig. 1). Al ir perdiendo grupos butilo se va incrementando la carga inorgánica y, por tanto, en cada etapa se reduce la toxicidad (Albaina, 2011). Existen numerosos factores que pueden influir en la degradación de este compuesto, como son: temperatura, intensidad de la luz, pH, salinidad y las comunidades microbianas particulares. Probablemente este último factor es el que más importancia tiene, mientras que los factores abióticos son menos influyentes si los comparamos con los procesos de degradación biológica. En consecuencia la vida media del TBT en agua comprende desde 1 semana hasta 2-4 meses en función de la temperatura y actividad biológica del medio (Barreiro *et al.*, 2004).

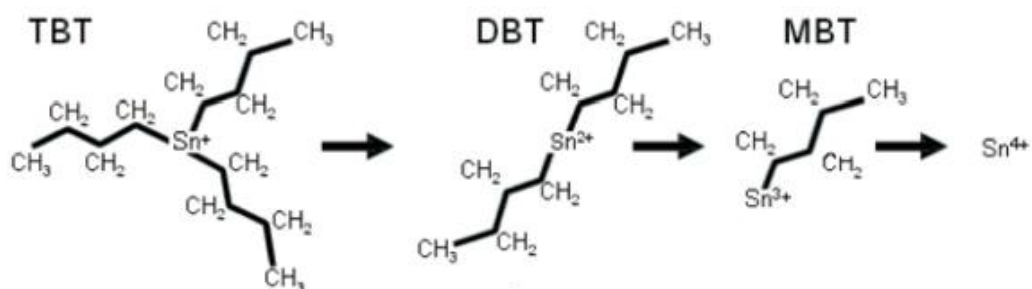


Figura 1- Debutilación secuencial del TBT (tomado de Cuevas *et al.*, 2011).

El TBT es un compuesto hidrófobo de carga positiva, características que facilitan su adsorción al material particulado en suspensión. Así, es retirado rápidamente de la columna de agua para acumularse en el sedimento a concentraciones muy variadas (desde < 0.2 ng/g peso seco hasta varios miles de ng/g peso seco) dependiendo de la proximidad de la fuente de contaminación. En el sedimento el TBT puede persistir durante años o incluso décadas (Barreiro *et al.*, 2004).

1.2.3 Bioacumulación y Toxicidad

La presencia de grupos alquilo ligados al átomo de estaño en el TBT incrementa sus propiedades lipófilas, y por tanto, su capacidad de bioacumulación en el tejido graso y en las bicapas lipídicas de organismos vivos (bacterias, fitoplancton moluscos, crustáceos y peces; Alzieu, 1996). La incorporación se produce por contacto directo y a través de la cadena alimentaria (Omae, 2003). Con respecto a su metabolismo y excreción, los compuestos hidrófobos suelen ser retenidos durante más tiempo y alcanzan una distribución más extendida debido a que son poco selectivos.

A su vez, el TBT incorporado resulta en múltiples efectos tóxicos. Los primeros efectos que se sospecharon estaban relacionados con el TBT se observaron en el cultivo de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) en la bahía de Arcachon (Francia) a mediados de 1970; concretamente se registraron malformaciones de la concha de los adultos y un fracaso en el desarrollo larvario que anuló la captación de semilla durante años (Alzieu, 1996). Un poco más tarde Smith (1981) también responsabilizó al TBT de las anomalías genitales de gasterópodos que denominó como imposex (ver sección 1.3 más abajo). A partir de ahí se realizaron multitud de estudios que describen los múltiples efectos tóxicos del TBT (Albaina, 2011).

En los seres humanos el TBT puede causar irritación en ojos y piel, pudiendo derivar en una dermatitis severa. No obstante, no se han encontrado efectos nocivos derivados de la ingesta directa de organismos que hayan estado expuestos al contaminante (Alzieu, 2000).

Así, se concluye que los moluscos son el grupo más sensible a la contaminación por TBT, observándose la malformación de la concha de las ostras y el imposex en gasterópodos a concentraciones inferiores a 1 ng/L (Barreiro *et al.*, 2001). En el caso concreto que nos ocupa en este TFG, el TBT puede ser absorbido por la superficie de la cabeza y del pie de los gasterópodos, así como a través de las vías respiratorias o mediante ingestión. El compuesto se almacena en el músculo pedal, en el conjunto de la branquia y osfradio, en la unidad gónada-estómago-glándula digestiva y en el riñón (Stroben *et al.*, 1992a; Pope, 1998). La enzima que regula la detoxificación es la monooxigenasa de función mixta (Alzieu, 1996), presente en la glándula digestiva. Esta enzima tiene una actividad limitada y, en consecuencia, la eliminación del TBT es lenta (Stroben *et al.*, 1992b; de Mora, 1996; Pope, 1998).

1.2.4 Legislación

El TBT se dijo que era la sustancia más tóxica que jamás se ha vertido al medio marino de forma deliberada (Albaina, 2011). Además, casi la totalidad de la bibliografía coincide en que su uso en las pinturas anti-incrustantes de los barcos es la responsable de que se haya convertido en un problema a nivel mundial. Las medidas tomadas para reducir la liberación de ésta sustancia al medio marino se han visto, siempre, rodeadas de polémica, debido a las numerosas ventajas económicas y ambientales que se le atribuyen (de Mora, 1996).

Francia fue el primer país en tomar medidas para reducir la concentración de TBT en sus aguas. Tras vincular la muerte de larvas y malformaciones en adultos de *Crassostea gigas* con la alta concentración del contaminante en la Bahía de Arcachon en 1982, se prohibió el compuesto en barcos de menos de 25 m de eslora (Alzieu, 2000). A partir de entonces, diversos países tomaron medidas de forma individual para reducir la liberación de TBT al medio marino. Posteriormente, en 1989, la Comunidad Europea (CE) estableció una prohibición parcial similar de su uso y comercialización (Directiva 89/677/CEE en Albaina, 2011). Los organoestánicos quedaron prohibidos para barcos de eslora menor o igual a 25 m, material de piscicultura o conchicultura y aparejos sumergidos; y su comercio quedó restringido a usuarios profesionales y sólo en envases de volumen mayor o igual a 20 l (Albaina, 2011).

Sin embargo, estas regulaciones sólo tuvieron efecto en algunas aguas costeras, debido a que el tráfico marítimo de grandes barcos (mayores de 25 m de eslora) no se veía afectado por dichas normativas. Así, no fue hasta el año 2003 cuando se impuso la prohibición total de aplicación o reaplicación del compuesto en los barcos que operaban en aguas comunitarias y en todos los barcos pertenecientes a la CE (Directiva 2002/62/CE en Albaina, 2011). Unos años después, en el 2008, entró en vigor una prohibición total, pero esta vez global, por medio de la Convención para el Control de Sistemas Nocivos Anti-incrustantes (AFS) de la Organización Marítima Internacional (IMO) (Sousa *et al.*, 2014).

Las restricciones del uso del TBT han ido conduciendo al descenso en la concentración de organoestánicos en el agua, sedimentos y biota, además de favorecer la recuperación de las poblaciones afectadas. El problema de estas restricciones es que hay una gran incertidumbre sobre qué efecto tendrán, a largo plazo, los compuestos utilizados como alternativa al TBT. En este sentido, algunos autores consideran como prematura la prohibición del TBT, ya que todavía no se ha demostrado si la eficacia de las alternativas es similar económica y ambientalmente, ni cuáles serán sus efectos a largo plazo (de Mora, 1996).

1.3 Imposex

El ser humano es responsable de la producción y transformación de miles de compuestos químicos. Algunos de éstos compuestos poseen la capacidad de imitar o favorecer la acción de ciertas hormonas pudiendo, de esta manera, alterar el balance hormonal de los organismos y ocasionar efectos deletéreos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). A éstos compuestos se les conoce como disruptores endocrinos y se han vuelto omnipresentes en el medio marino, e incluyen, entre otros, a los compuestos organoestánicos.

La masculinización inducida por el TBT en los gasterópodos es el ejemplo más claro de disrupción endocrina en invertebrados ligada a un contaminante (Mathiessen & Gibbs, 1998). A pesar de que se han realizado un elevado número de ensayos sobre el tema, aún no se conoce con exactitud el mecanismo bioquímico por el que el TBT ejerce su acción disruptora. No obstante, actualmente hay cuatro líneas de investigación en marcha: (I) la ruta de síntesis de las hormonas esteroideas, (II) el proceso de excreción de testosterona, (III) el mecanismo de neurotransmisión peptídica y (IV) la transcripción de genes para el desarrollo del sistema reproductor masculino, teoría que no son necesariamente incompatibles (Albaina, 2011).

Smith (1981) definió el imposex, en 1971, como la super-imposición de caracteres genitales masculinos (como pene y vaso deferente) en hembras no parasitadas de gasterópodos marinos. En algunas especies de gasterópodos, el imposex presenta una correlación clara y positiva con la concentración de TBT en el medio. Así, nos permite cuantificar la contaminación por TBT en un determinado lugar, evaluando el grado de desarrollo del imposex en una muestra de individuos del mismo (Barreiro *et al.*, 2001).

Este fenómeno ha sido registrado en más de 200 especies (Shi *et al.*, 2005), pero sólo unas pocas han sido estudiadas en profundidad y utilizadas como bioindicadores de la presencia de TBT en el ambiente. Entre ellas destacan *Nucella lapillus* (L.) y *Nassarius reticulatus* (L.), especies ampliamente utilizadas en las que el imposex se considera un biomarcador de TBT recomendable a lo largo de toda la costa europea. La primera es un prosobránquio que se alimenta de pequeños mejillones y bellotas de mar (Richard & Gary, 2005). Sin embargo, su uso como bioindicador está limitado ya que no habita en zonas sin sustrato rocoso, zonas con baja salinidad o zonas altamente contaminadas por TBT (Barreiro *et al.*, 2004). Para estos casos la segunda especie (*Nassarius reticulatus*) es una buena alternativa ya que habita en fondos blandos y tiene mayor tolerancia a aguas salobres que *Nucella lapillus* (Fretter & Graham, 1994).

Las fases iniciales del imposex se desarrollan a concentraciones de TBT inferiores a 1ng/L, que son fáciles de alcanzar incluso en zonas alejadas de la fuente de contaminación (Barreiro *et al.*, 2004). Se ha demostrado que existe un gradiente espacial, de forma que el grado de imposex disminuye conforme nos alejamos de la fuente de contaminación, pero debido a que el TBT puede inducir el imposex a bajas concentraciones, su área de influencia es muy grande, pudiendo llegar a afectar a una ría entera. Numerosos estudios han logrado demostrar la relación causa-efecto entre la concentración de TBT y el grado de imposex (Barreiro *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.* 2009).

Así, el imposex constituye una evidencia clara de la presencia de TBT en el medio y, además puede indicarnos el estado de contaminación del medio gracias a la relación entre el contaminante concreto (TBT) y la respuesta biológica específica que produce (Alzieu, 2000). Es por estos motivos por los que en el 2003 la Convención OSPAR (Tratado para la Vigilancia y Protección del medio marino del Atlántico Nordeste) puso en marcha un Programa de Monitorización Coordinada

(CEMP) que establece la obligatoriedad de medir las concentraciones de TBT en el sedimento (Albaina, 2011) y, además, exige la evaluación del imposex. Esto es todo un hito porque es la primera vez que se establece como medida obligada de vigilancia marina una medida biológica. Para esta monitorización la OSPAR provee de una Guía de Monitorización de Efectos Biológicos Específicos para las cinco especies modelo existentes hasta el momento (OSPAR 2008 en Albaina, 2011): *Nucella lapillus*, *Nassarius reticulatus*, *Buccinum undatum*, *Neptunea antiqua* y *Littorina littorea*. Así, utilizando *Nucella lapillus* como referencia principal, se evalúa la calidad del medio según unas clases (Assessment class) definidas por el imposex registrado en las especies consideradas (Fig. 2).

Assessment class	<i>Nucella</i> VDSI	<i>Nassarius</i> VDSI	<i>Buccinum</i> PCI	<i>Neptunea</i> VDSI	<i>Littorina</i> ISI
A	< 0.3			< 0.3	
B	0.3 - <2.0	< 0.3 ¹	< 0.3 ¹	0.3 - <2.0	< 0.3 ²
C	2.0 - < 4.0	0.3 - <2.0	0.3 - <2.0	2.0 - <4.0 ³	
D	4.0 - 5.0	2.0 - 3.5	2.0 - <4.0		0.3 - < 0.5
E	>5.0 ⁴	> 3.5 ⁴	4.0 ⁴		0.5 - 1.2
F					> 1.2

Figura 2- Tabla de clases de evaluación del imposex en 5 especies modelo (tomado de OSPAR 2008 en Albaina, 2011).

Se supone que el rango de distribución y hábitat de estos organismos cubren la totalidad de la geografía sobre la cual la Convención es aplicable. Asimismo, las especies presentan diferentes sensibilidades al tóxico, quedando garantizada la detección y control de los niveles de TBT a lo largo de un amplio rango de concentraciones. Por otra parte, *N. lapillus*, *N. reticulatus* y *N. antiqua* poseen la ventaja adicional de no estar explotadas económicamente, evitando así, la alteración antrópica de su distribución, abundancia o estructura poblacional y de esta manera se previenen los sesgos debidos a causas antrópicas en los resultados de las monitorizaciones (OSPAR 2008 en Albaina, 2011).

1.4 *Nassarius reticulatus*

Nassarius reticulatus es un molusco gasterópodo marino del grupo de los prosobranquios neogasterópodos (Fig. 3). Está presente en fondos arenosos y fangosos, desde el intermareal hasta 40 m de profundidad (Rato *et al.*, 2006). Es una especie carroñera, aunque en caso de necesidad los adultos pueden vivir a costa de detritus y resistir periodos de inanición de hasta cinco meses (Pope, 1998). Los individuos pasan la mayor parte del tiempo enterrados en el sustrato, a través del cual asoma únicamente el sifón (Eriksson & Tallmark 1974), durante la bajamar o durante el día. Sólo abandonan este estado si, tras un periodo prolongado de ayuno, detectan la presencia de alimento (Crisp, 1978). Sin embargo, se ha observado que las señales químicas procedentes de cadáveres de individuos conoespecíficos suprimen la atracción quimiotáctica (Davenport y Moore, 2002). Además, *N. reticulatus* es una especie longeva capaz de alcanzar los 15 años de edad (Tallmark, 1980).

Clasificación taxonómica.

Filo	Mollusca
Clase	Gastropoda
Subclase	Prosobranchia
Orden	Neogastropoda
Familia	Nassariidae
Género	<i>Nassarius</i>
Especie	<i>Nassarius reticulatus</i> (Linnaeus 1758)

Figura 3- Clasificación taxonómica de *Nassarius reticulatus* (tomado de Albaina, 2011)

N. reticulatus es una especie gonocórica (presenta separación de sexos) y fertilización interna. Durante el periodo de reposo sexual la mayor parte de las estructuras reproductoras son poco patentes mientras que durante la época de reproducción el aparato reproductor está completamente desarrollado. Este consta, en machos, de una gónada de color naranja brillante que ocupa toda la extensión de la glándula digestiva, una vesícula seminal convolucionada, una glándula prostática, un pene situado bajo el tentáculo derecho y un vaso deferente que pone en contacto los dos últimos órganos (Barroso *et al.*, 2005). Las hembras poseen un ovario pardo (formando el conjunto gónada-glándula digestiva, como ocurre en machos), un oviducto recto y estrecho, una glándula del albumen, una glándula de la cápsula (blanca y voluminosa), una glándula de secreción de la cubierta de la cápsula (rosada y de menor tamaño que la anterior), un gonoporo o vulva y, finalmente, una glándula oscura de ingestión de esperma (Fretter & Graham, 1994).

Debido a sus características biológicas *N. reticulatus* es una especie especialmente adecuada para la biomonitorización de la contaminación por TBT. Al vivir en el intermareal blando y tener una distribución amplia permite la elaboración de una extensa red de muestreos que cubre satisfactoriamente el medio estuárico (Fretter & Graham, 1994). Además, su desarrollo indirecto (con una fase larvaria planctónica larga; Tallmark, 1980) y la tolerancia a los cambios de salinidad posibilitan el mantenimiento de sus poblaciones a nivel local, independientemente del nivel de contaminación ambiental. Por otra parte, la relativa tolerancia al TBT (Stroben *et al.*, 1992a; Barreiro *et al.*, 2001) implica unos índices de imposex que progresan desde concentraciones bajas del compuesto hasta cantidades ambientales considerables.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es evaluar el nivel de contaminación de una localidad de la ría de A Coruña (San Antón) a través de una medida biológica (imposex). Los datos obtenidos serán comparados con los de años anteriores para ver cómo ha variado el nivel de contaminación en los últimos 17 años.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares fueron recogidos en el mes de Febrero a mano en el intermareal del castillo de San Antón (ría de A Coruña, Fig. 4), utilizando el método del cebo, ya que esta especie responde con movimientos quimiotácticos a la presencia de alimento. Durante los tres días siguientes se mantuvieron en agua de mar para su depuración. Este procedimiento es necesario para realizar análisis químicos con los que se mide la concentración de TBT, DBT y MBT en los tejidos. Esto es debido a que los individuos tienen que eliminar el contaminante que no haya sido bioconcentrado, es decir, aquella porción del contaminante que no haya traspasado el epitelio. Por ejemplo, si realizamos la medición sin haber pasado por una etapa de depuración podemos cometer el error de medir también el tóxico que se encuentra en el estómago, que no está bioconcentrado, ya que el lumen estomacal se considera una prolongación del medio externo. En el presente estudio no se han realizado estas mediciones.



Figura 4- A) Localización del punto de muestreo (tomado de Google Maps); B) Foto del Castillo de San Antón (tomada de Google Imágenes)

Para evaluar el imposex primero sedamos a los individuos con una disolución de cloruro de magnesio ($MgCl_2$ al 7%). Una vez sedados, comenzamos midiendo la altura (shell height, H) y apertura (aperture of the shell, A) de la concha (Fig. 5) utilizando un calibre electrónico de aproximación 0.01 mm.



Después, rompemos la concha con la ayuda de un torno y determinamos el sexo de los individuos con la ayuda de una lupa binocular. A los machos se les distingue por la presencia de una vesícula seminal convolucionada (Fig. 6), mientras que las hembras se identifican por la presencia de una glándula oscura de ingestión de esperma (Fig. 7).

Figura 5- Medidas de altura y apertura de la concha de *Nassarius reticulatus* (tomado de Cuevas *et al.*, 2011).

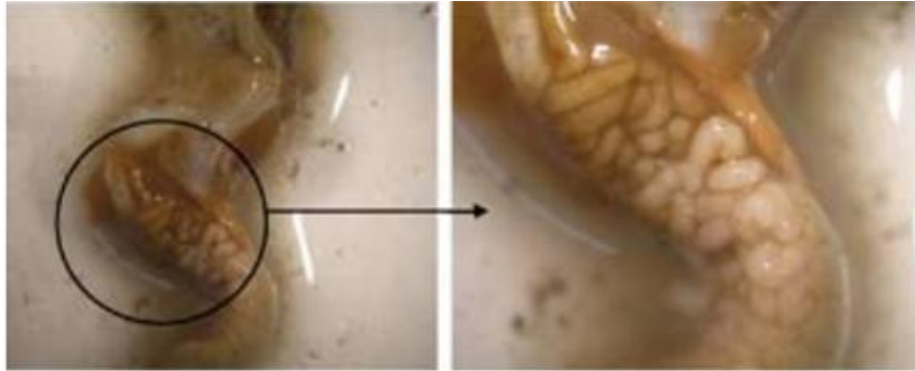


Figura 6- Apariencia externa de la vesícula seminal convolucionada de un macho de *Nassarius reticulatus* (tomado de Cuevas *et al.*, 2011)



Figura 7- Apariencia externa de la glándula de la cápsula de una hembra de *Nassarius reticulatus* (tomado de Cuevas *et al.*, 2011)

Por último, utilizando el calibre nuevamente, medimos la longitud del pene (LP) en los machos y en las hembras que lo presenten.

Para evaluar el grado de desarrollo del imposex utilizamos tres índices: el porcentaje de incidencia (%I), el índice del tamaño relativo del pene (RPLI, del inglés relative penis length index) y el índice de la secuencia del vaso deferente (VDSI, del inglés vas deferens sequence index) (Albaina, 2011).

El porcentaje de incidencia representa el porcentaje de hembras que muestran imposex a cualquier nivel de desarrollo en una población: $\%I = (\text{número de hembras con algún signo de imposex} / \text{número de hembras total}) \times 100$. El RPLI expresa la longitud del pene de las hembras con respecto a la longitud del pene de los machos en una población: $RPLI = (\text{longitud media del pene de hembras}) / (\text{longitud media del pene de machos}) \times 100$ (Albaina, 2011).

Para la evaluación del VDS se establecen 5 etapas de desarrollo del imposex, ponderadas de 0 a 4, en función del grado de formación del vaso deferente y del pene, siguiendo el modelo propuesto por Stroben *et al.*, 1992b:

- Estadio VDS 0: hembra normal no afectada.
- Estadio VDS 1: individuos con un pene rudimentario bajo el tentáculo ocular derecho o una pequeña sección distal del vaso deferente.
- Estadio VDS 2: individuos con pene y un vaso deferente cuya longitud no es mayor a la mitad de la distancia entre la base del pene y el poro genital.
- Estadio VDS 3: individuos con pene y un vaso deferente cuya longitud supera la mitad de la distancia entre la base del pene y el poro genital.
- Estadio VDS 4: individuos con pene y un vaso deferente completo desde la base del pene hasta la altura del poro genital.

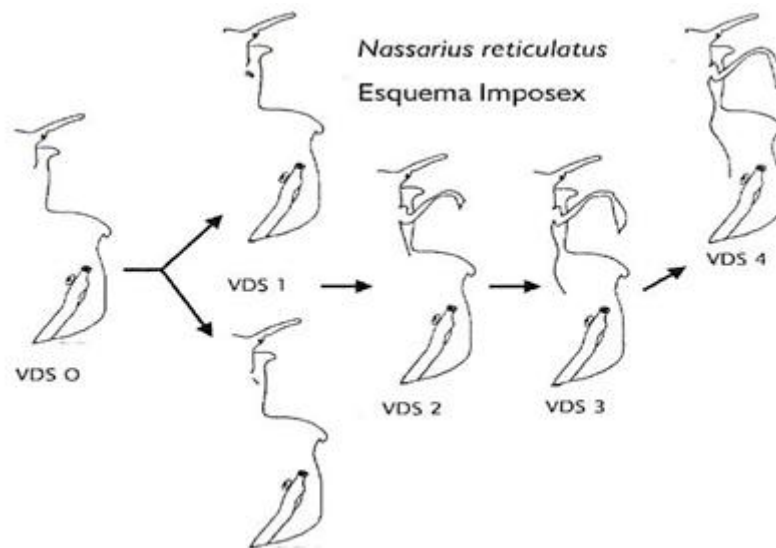


Figura 8- Esquema de los niveles de VDS en *Nassarius reticulatus* (tomado de Albaina, 2011).

El VDSI se obtiene calculando la media de los estados VDS de la muestra.

4. RESULTADOS

En el muestreo recogimos 73 individuos: 54 hembras y 19 machos. Los resultados obtenidos de la medición, determinación del sexo (S, f= hembra y m= macho) y evaluación del imposex están resumidos en la siguiente tabla:

H (mm)	A (mm)	S	LP (mm)	VDS	H (mm)	A (mm)	S	LP (mm)	VDS
27,01	14,38	f	-	1	28,27	14,28	f	0,38	2
23,52	12,57	m	10,87	0	29,46	14,07	f	2,31	2
21,21	11,16	m	11,23	0	21,9	12,31	m	10,79	0
28,29	14,53	f	-	1	25,3	12,66	f	5,37	3
26,86	13,53	f	-	1	22,71	11,22	f	1,15	3
27,9	14,27	f	-	1	26,55	13,58	f	1,63	1
28,31	13,73	f	-	0	20,99	10,58	m	14,41	0
26,67	13,7	f	-	1	27,73	13,49	m	15,84	0
22,23	10,9	f	-	0	27,27	14,3	f	-	2
22,44	10,87	f	2,05	2	26,14	12,53	f	0,25	4
29,05	15,14	f	0,77	2	28,67	14,04	f	1,37	4
29,5	14,95	f	0,57	1	28,69	14,74	f	1,18	2
26,34	12,13	f	0,47	4	25,81	13,11	f	0,55	4
24,36	12,58	f	-	0	25,58	13,67	f	1,3	3
24,88	12,81	f	2,04	2	24,42	12,17	m	19,6	0
30,08	15,08	f	1,72	1	26,55	12,75	f	3,78	3
20,13	9,26	m	6,98	0	22,61	10,84	m	9,81	0
26,52	12,42	f	-	1	28,44	14,45	f	1,18	2
23,7	11,54	m	10,05	0	28,02	13,59	f	1,63	2
25,95	12,86	f	1,64	2	24,91	12,14	m	10,83	0
24,61	13,08	f	-	2	19,01	10,49	m	10,07	0
26,95	13,62	f	1,13	3	23,21	11,72	m	14,36	0
26,76	13,97	f	-	0	24,39	11,83	f	2,38	1
22,5	11,28	f	1,59	2	25,03	12,16	f	0,59	2
27,01	12,96	f	-	0	25,57	13,83	f	0,58	2
20,81	10,6	f	-	0	23,46	10	f	1,2	2
20,66	10,06	m	12,56	0	24,79	12,27	f	0,6	1
28,97	14,24	f	-	0	27,29	12,97	f	3,25	3
27,01	14,07	f	-	0	26,73	13,78	f	0,52	1
24,3	12,56	m	10,11	0	26,48	14	m	26,35	0
26,32	13,03	f	0,57	2	23,8	12,59	f	2,08	4
21,76	11,64	f	2,02	4	24,26	11,29	m	11,85	0
26,56	14,35	f	1,13	2	19,92	11,12	f	-	0
23,74	12,38	f	-	0	23,17	10,11	m	8,88	0
25,67	12,93	f	2,52	2	21,83	11,07	f	1,49	2
26,96	13,46	f	4,58	2	24,59	11,77	m	17,25	0
					26,21	12,75	m	16,56	0

Tabla 1- Medidas tomadas en los ejemplares recolectados (para significado de los índices ver texto).

En machos la longitud del pene ha oscilado entre 6.98 y 26.35 mm (con una media de 13.07 ± 4.55 mm), mientras que en hembras el rango ha sido más estrecho (de 0.25 a 5.37 mm) y el tamaño medio mucho menor (4.62 ± 1.15 mm).

Con los datos obtenido podemos calcular el porcentaje de incidencia (%) en la población, que es del 81.48%, el RPLI es el 12% y el VDSI es 1.74. En el siguiente gráfico (Fig. 9) se muestran las frecuencias observadas de los distintos estados de VDS.

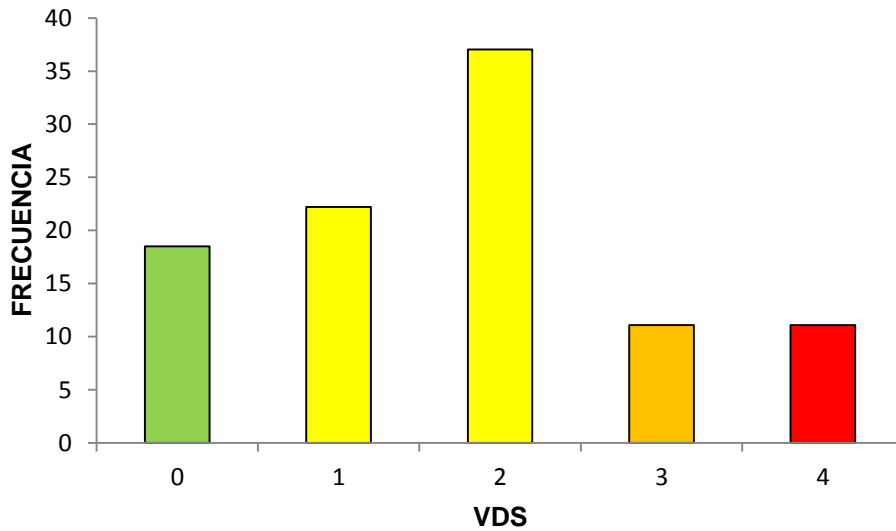


Figura 9- Diagrama de frecuencias de los valores de VDS obtenidos.

5. DISCUSIÓN

A lo largo de la última década el grado de imposex ha ido disminuyendo en toda la costa gallega gracias a las medidas adoptadas desde 1989 (año en el que se prohibió el uso y comercialización parcial del TBT en Europa) y que acabaron con la prohibición total del TBT en el año 2003 (Albaina, 2011).

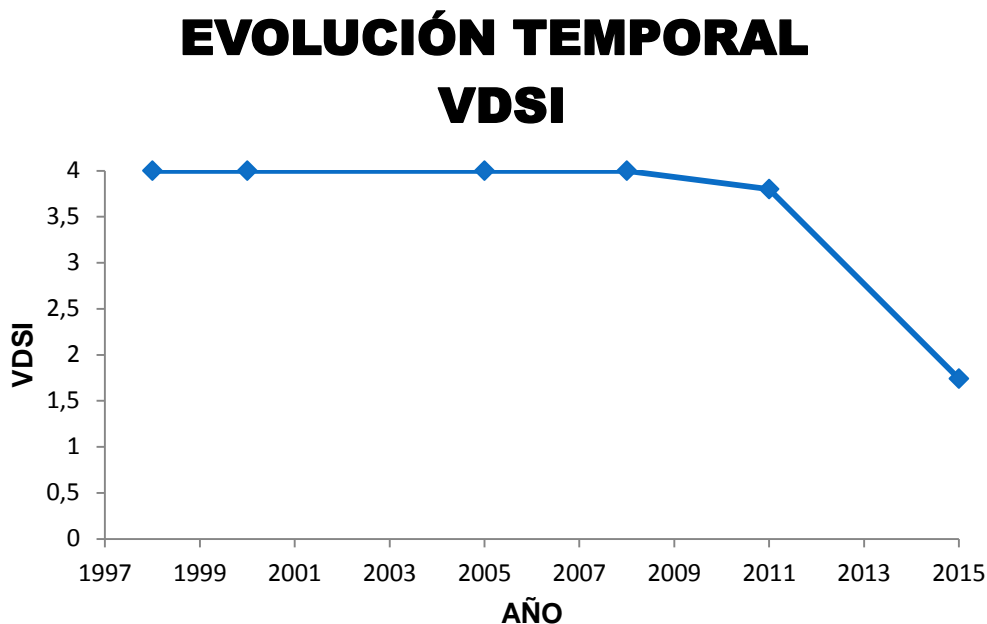


Figura 10- Evolución temporal del VDSI en San Antón.

En la Figura 10 vemos la evolución temporal del VDSI desde 1998 hasta 2015. En ella se muestra que el imposex se mantuvo en niveles máximos hasta el 2011 (VDSI= 3.8, JM Ruiz pers.comm.), año en el que empiezan a ser visibles los signos de recuperación. Pero no es hasta el 2015 (26 años después de la primera prohibición parcial a nivel europeo) cuando se pueden ver claramente los síntomas de mejoría (VDSI= 1.74).

El elevado nivel de alteración durante la última década se debe a que la localidad de estudio se encuentra en la ría de A Coruña, una de las tres más contaminadas de Galicia junto con Vigo y Ferrol (Barreiro *et al.*, 2004). Así, hasta el año 2003 se mantuvo el aporte del contaminante ya que, hasta entonces sólo las embarcaciones menores a 25 metros de eslora, material piscícola y elementos sumergidos tenían prohibido el uso del TBT (Albaina, 2011). Al ser, la localidad de muestreo, una zona de paso hacia el puerto de A Coruña, aún existía tráfico de grandes barcos a los que no les afectaba la legislación. Por otro lado, los efectos provocados por el TBT son irreversibles (Stroben *et al.*, 1992a). Además hay que tener en cuenta la biología de la especie utilizada y las características del contaminante. En primer lugar, *N. reticulatus* es una especie muy longeva que puede vivir hasta 15 años, por lo tanto necesita largos periodos de tiempo para que se produzca la renovación de la población y así poder reflejar las condiciones medioambientales contemporáneas. En segundo lugar, como ya se ha comentado en el apartado 1.2.2, el TBT puede persistir durante años o décadas en el sedimento. Como *N. reticulatus* pasa la mayor parte del tiempo enterrado en el sedimento y puede vivir a costa de detritus en caso de necesidad, puede seguir incorporando contaminante aunque el aporte a la columna de agua haya cesado. Así, se explican los altos niveles de los efectos de la contaminación aún después de la prohibición total del TBT.

El hecho más destacable reflejado en estos datos es la necesidad de largos periodos de tiempo para poder apreciar la recuperación de una zona. En 1989, la Comunidad Europea impuso la prohibición parcial al uso del TBT, pero esta medida no tuvo el efecto deseado ya que el nivel de imposex se mantuvo en los valores más altos registrados. Sin embargo, tras la prohibición total en 2003, si se puede apreciar un descenso en los niveles de imposex. La recuperación comenzó a hacerse patente en el 2011 (8 años después), pero no es hasta el 2015 que se puede observar una evidencia innegable de recuperación. Es decir, han hecho falta 12 años sin, en teoría, aportes exógenos de TBT para poder ver síntomas claros de recuperación.

La recuperación de la población puede ser la consecuencia de que ésta se encuentre en pleno proceso de renovación, es decir, puede que aquellos individuos que pasaron su etapa de desarrollo durante los periodos de mayor uso del TBT estén comenzando a desaparecer y los individuos jóvenes (con una menor concentración de TBT en sus tejidos) comiencen a ser mayoritarios en la población. De cualquier forma, la reducción del grado de imposex es un claro síntoma de recuperación, e indica que las normas adoptadas para evitar los efectos nocivos del TBT son efectivas.

Además, durante el muestreo, encontramos algunos individuos de la especie *Nucella lapillus* (incapaz de vivir en zonas muy contaminadas), de la que no se había registrado su presencia en la última década. También cabe destacar la ausencia de hembras estériles, que sólo aparecen en zonas con elevadas concentraciones de TBT y un elevado nivel de imposex. Así, estos hechos reafirman la evidente recuperación de la costa gallega.

A pesar de estos indicios de recuperación el porcentaje de hembras afectadas sigue siendo muy alto (81.48%), pero la gravedad de los efectos es considerablemente menor.

CONCLUSIONES

Gracias a la elevada relación entre la concentración de TBT y el nivel de imposex, se reconoció por primera vez la utilidad de una medida biológica para el control de la contaminación.

El nivel de imposex en la costa gallega ha sufrido una reducción considerable en la última década gracias a la aplicación de una prohibición total del uso del TBT a nivel europeo en 2003 y, posteriormente a nivel global (2008). Han sido necesarios 12 años, desde la primera de las prohibiciones, para poder confirmar la recuperación de la costa. El retraso en los resultados de las medidas tomadas se debe a la acción de diversos factores de índole legislativo, biológico y químico.

El caso que se trata en este TFG tiene una gran relevancia, ya que afecta a un grupo de animales muy importante desde el punto de vista ecológico y refleja la dificultad que supone eliminar un compuesto del medio marino. Es un caso que debe tomarse como ejemplo para darse cuenta de que se debe regular de una forma mucho más exhaustiva el vertido de compuestos tóxicos en el medio marino.

CONCLUSIONS

Thanks to the high relation that exists between TBT concentration and the level of imposex, it was recognized by the first time the usefulness of a biological measurement to monitoring pollution.

The level of imposex in the Galician coast has suffered a noteworthy reduction during de last decade thanks to the total ban of the use of TBT, firstly in Europe and afterwards at global level (2008). Twelve years have been required since the first of the bans to be able to verify the recovery of the coast. The delay of the results from the restrains it is a consequence of the action of many legislative, biological and chemical facts.

The case deal with in this TFG has a high relevance because it affects to an ecologically important group of animals and reflects how much difficult is the elimination of a toxic compound from the sea. This is a case that should be a good example to realize that the regulation must be stronger with the spill of these compounds to the sea.

BIBLIOGRAFÍA

- Albaina, N. (2011). *Biomonitorización de contaminación por TBT y genética poblacional en Nassarius reticulatus (L) y N. nitidus (Jeffreys) en el NE Atlántico*. (Tesis doctoral). Dpto. Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología – Facultad de Ciencias (Universidade da Coruña).
- Alzieu, C. (1996). Biological effects of tributyltin on marine organisms. In: de Mora, S.J. (ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 167-211.
- Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean Coast Manage* **40**:23-36.
- Alzieu, C. (2000). Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* **9**: 71-76.
- Barreiro, R., González, R., Quintela, M. & Ruiz, J.M. (2001). Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. *Marine Ecology Progress Series* **218**: 203–212.
- Barreiro, R., Quintela, M. y Ruiz, J.M. (2004). TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Ecosistemas* **13** (3): 13-29.
- Barroso, C.M., Moreira, M.H. & Bebianno, M.J. (2002) Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series* **230**: 127–135.
- Barroso, C.M., Moreira, M.H. & Richardson, C.A. (2005). Age and growth of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, NW Portugal. *J Mar Biol Ass UK* **85**: 151-156.
- Bennett, R.F. (1996). Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: de Mora, S.J. (ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 21-61.
- Crisp, M. (1978). Effects of feeding on the behaviour of *Nassarius* species (Gastropoda: prosobranchia). *J Mar Biol Assoc UK* **58**: 659-669.
- Cuevas, N., Larreta, J., Rodríguez, J.G. & Zorita, I. (2011). A visual guideline for the determination of imposex in *Nassarius reticulatus* and *Nassarius nitidus*. *Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia*, **18** (7): 134-152.
- de Mora, S.J. (1996). The tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. In: de Mora, S.J. (ed) Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 1-20.
- Davenport, J. y Moore, P.G. (2002). Behavioural responses of the netted dogwhelk *Nassarius reticulatus* to olfactory signals derived from conspecific and nonconspecific carrion. *J Mar Biol Assoc UK* **82**: 967-969.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. & Gore, A.C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endo Rev* **30**(4):293-342.
- Eriksson, S. & Tallmark, B. (1974). The influence of environmental factors on the diurnal rhythm of the prosobranch gastropod *Nassarius reticulatus* (L.) from a non-tidal area. *Zoon* **2**: 135-142.

- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol* **26**:1-117.
- Fretter, V. & Graham, A. (1994). British prosobranch molluscs: their functional anatomy and ecology. Ray Society, London, UK.
- Maguire, R.J. (1996) The occurrence, fate and toxicity of tributyltin and its degradation products in fresh water environments. In: de Mora, S.J. (ed). Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 95-138.
- Mathiessen, P. y Gibbs, P.E. (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(1): 37–43.
- Omae, I. (2003). Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl Organomet Chem* **17**:81-105.
- OSPAR (2008) JAMP Guidelines For Contaminant-specific Biological Effects Monitoring. Ref No 2008-9. www.ospar.org. En: Albaina Balerdi, Naiara. (2011). *Biomonitorización de contaminación por TBT y genética poblacional en *Nassarius reticulatus* (L) y *N. nitidus* (Jeffreys) en el NE Atlántico*. (Tesis doctoral). Dpto. Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología – Facultad de Ciencias (Universidade da Coruña).
- Pope, N. (1998). The bioavailability of sediment-bound tributyltin (TBT). PhD Thesis. University of Plymouth, UK.
- Rato, M., Sousa, A., Quintã, R., Langston, W.J. & Barroso, C. (2006). Assessment of inshore/offshore tributyltin pollution gradients in the Northwest Portugal continental shelf using *Nassarius reticulatus* as a bioindicator. *Environ Toxicol Chem* **25**:3213-3220.
- Richard, C.B. & Gary, J.B. (2005) *Invertebrados* (2ª ed.). Interamericana, Madrid.
- Rodríguez, J.G., Tueros, I., Borja, A., Franco, J., García, J.I., Garmendia, J.M., Muxika, I., Sariago, C. y Valencia, V. (2009). Butyltin compounds, sterility and imposex assessment in *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), prior to the 2008 European ban on TBT antifouling paints, within Basque ports and along coastal areas. *Continental Shelf Research* **29**: 1165–1173.
- Shi, H., Huang, C.J., Zhu, S.X., Yu, X.J. & Xie, W.Y. (2005). Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Mar Ecol Prog Ser* **304**: 179-189.
- Smith, B.S. (1981). Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *J Appl Toxicol* **1**:15-21.
- Sousa, A.C.A., Pastorinho, M.R., Takahashi, S. & Tanabe, S. (2014). History on organotin compounds, from snails to humans. *Environ Chem Lett* **12**: 117–137.
- Stroben, E., Oehlmann, J. & Fioroni, P. (1992a). Comparaison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Mar Biol* **114**: 289-296.
- Stroben, E., Oehlmann, J. & Fioroni, P. (1992b) The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Mar Biol* **113**: 625-636.

- Tallmark, B. (1980). Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda: Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Mar Ecol Prog Ser* **3**: 51-62.
- Yebra, D.M., Kiil, S. & Dam-Johansen, K. (2004) Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coatings* **50**:75-104.

