



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e
Ecoloxía

Área de Ecoloxía

AVALIACIÓN DO IMPOSEX DE *NASSARIUS RETICULATUS* EN MUGARDOS, RÍA DE
FERROL (ANO 2015)

EVALUACIÓN DEL IMPOSEX DE *NASSARIUS RETICULATUS* EN MUGARDOS, RÍA DE
FERROL (AÑO 2015)

EVALUATION OF IMPOSEX IN *NASSARIUS RETICULATUS* IN MUGARDOS, RIA OF
FERROL (YEAR 2015)



María del Carmen Núñez Rodríguez

Traballo de fin de grao de Bioloxía

Data de defensa: 29 de Xullo de 2015

Dirixido polo Dr. José Miguel Ruiz de la Rosa

Agradecementos

Desexo expresar o meu sincero agradecemento o meu titor, José Miguel Ruiz de la Rosa, sen o cal non sería posible a realización deste traballo. Moitas grazas pola túa axuda, paciencia, dedicación, comprensión e sobre todo por axudarme a aprender e compartir os teus coñecementos comigo.

Da mesma forma, agradezo a todo o persoal do Laboratorio de Ecoloxía por brindarme unha man cando foi preciso e por facer as horas de laboratorio mais entreteidas.

Aproveito para dalas grazas a todas as persoas que son un apoio constante: aos meus amigos e compañeiros de facultade cos que compartín cinco anos de carreira sen os cales non sería o mesmo; a eses amigos que a pesar de non ver todos os días sempre están presentes e, especialmente a miña familia, por confiar en min e concederme a oportunidade de chegar ata aquí.

Índice

Resumo	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. A problemática do <i>fouling</i>	7
1.2. O tributilo de estaño	8
1.2.1 Xeneralidades	8
1.2.2. Distribución no medio mariño	9
1.2.3. Efectos	9
1.2.4. Regulación	10
1.3. Imposex	11
1.4. <i>Nassarius reticulatus</i>	13
2. OBXETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Recollida de mostrás	15
3.2. Procesado dos animais	16
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIÓNS	23
7. BIBLIOGRAFÍA	24

Resumo

Debido a súa elevada correlación, a primeira medida biolóxica para a biomonitorización da contaminación por TBT (do inglés *tributyltin*) no medio mariño foi o estudo do imposex (*i.e.* superimposición dos caracteres sexuais masculinos nas femias de gasterópodos mariños). No presente TFG analizamos unha poboación do molusco *Nassarius reticulatus* (L.) do Castelo da Palma (Mugardos, ría de Ferrol, A Coruña) no ano 2015 prestando especial atención ao VDSI (do inglés *Vas Deference Sequence Index*). Os resultados mostran unha clara melloría nos últimos 15 anos (de VDSI= 4 no 2000 a VDSI= 1,5 no 2015) debido á total prohibición do uso do TBT a partir do ano 2003 e 2008 a nivel europeo e mundial, respectivamente. Non obstante, a persistencia do contaminante no sedimento mariño é elevada o que dificulta e ralentiza a recuperación do medio.

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

Resumen

Debido a su elevada correlación, la primera medida biológica para la biomonitorización por TBT (del inglés *tributyltin*) en el medio marino fue el estudio del imposex (*i.e.* superimposición de los caracteres sexuales masculinos en las hembras de gasterópodos marinos). En el presente TFG analizamos una población del molusco *Nassarius reticulatus* (L.) del Castillo de la Palma (Mugardos, ría de Ferrol, A Coruña) en el año 2015 prestando especial atención al VDSI (del inglés *Vas Deference Sequence Index*). Los resultados muestran una clara mejoría en los últimos 15 años (de VDSI= 4 en el 2000 a VDSI= 1,5 en el 2015) debido a la total prohibición del uso del TBT a partir del año 2003 y 2008 a nivel europeo y mundial, respectivamente. No obstante, la persistencia del contaminante en el sedimento marino es elevada lo que dificulta y ralentiza la recuperación del medio.

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

Summary

The first biological measure for biomonitoring *tributyltin* (TBT) in the marine environment was the study of imposex (*i.e.* the super-imposition of the male sexual characters onto females of marine gastropods) due to high correlation. In the present work we analyzed the population of *Nassarius reticulatus* (L.) from the Castelo da Palma (Mugardos, ría de Ferrol, A Coruña) in 2015, paying particular attention to VDSI, Vas Deference Sequence Index. The results show a clear improvement over the last 15 years (from VDSI= 4 in 2000 to VDSI= 1,5 in 2015) due to the total ban on the use of TBT (set in 2003 at the European level and in 2008 globally, respectively). However the persistence of the contaminant in the sediments is probably delaying environmental recovery.

Palabra clave: imposex, *Nassarius reticulatus*, TBT.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. A problemática do *fouling*

Os materiais somerxidos en auga acumulan nas súas superficies masas indesexadas de organismos vivos denominados *fouling*. Este fórmase mediante unha biopelícula ou *biofilm* de adhesión de bacterias, diatomeas e protozoos aos que se adhíren organismos macroscópicos como percebes, hidroides, esponxas, poliquetos tubícolas e moluscos (Omae, 2003). No medio mariño, este proceso de bioincrustación ou *biofouling* é moi frecuente nos cascos dos barcos, equipamento sonar, oleodutos e gasodutos; o incremento de peso provocado por esta adhesión leva consigo importantes perdas económicas (maior gasto en combustible, limpeza e pintura) nestas superficies (de Mora, 1996).

A anti-incrustación ou *antifouling* consiste na prevención ou eliminación do *fouling* (Omae, 2003). O obxectivo da maioría destes sistemas é a formación dunha capa tóxica ao redor das superficies somerxidas para repeler o asentamento dos organismos. A súa eficacia fundaméntase, principalmente, en dous factores: a solubilidade do composto no medio mariño e a taxa de liberación do tóxico. Da primeira depende inversamente o tempo de protección efectiva e a segunda debe ser axustada para non acurtar en exceso a duración da cobertura nin que os efectos tóxicos se eleven demasiado (Hoch & Schwesig 2004 en Albaina, 2011).

Algúns dos sistemas *antifouling* mais antigos consistían en láminas de cobre que recubrían a superficie de madeira dos barcos, substituídas posteriormente por chumbo. A evolución destas envolturas orixinou sistemas líquidos, como as pinturas anti-incrustantes ou *antifouling* cuxo principio activo foi cambiando ao longo do tempo (Yebra et al. 2004 en Albaina, 2011). As primeiras empregaban óxido cuproso, mercurio, xofre e arsénico, substituídas mais tarde, nos anos 1960s, por tributilo de estaño. Este composto acabou suplindo a maioría dos sistemas anteriores debido ás vantaxes que presentaba. Entre elas salienta a súa elevada toxicidade, o seu amplo espectro de acción (eficacia contra un gran número de organismos) e a ausencia de corrosión galvánica nos cascos de aluminio (Omae, 2003).

O tributilo de estaño chegou a converterse case no único composto empregado nas pinturas anti-incrustantes, dedicando o 70% da súa produción mundial nelas e abarcando o 70-80% da flota mercante (Champ 2000 en Albaina, 2011).

1.2. O tributilo de estaño

1.2.1. Xeneralidades

Os organoestánnicos son compostos organometálicos de orixe antrópico constituídos por un átomo de estaño unido, mediante enlaces covalentes, a entre un ou catro constituíntes orgánicos (EPA, 2003). O primeiro composto desta natureza sintetizouno o químico alemán Carl Jacob Löwig en 1852; sen embargo, o estudo das súas propiedades biocidas foi lento, sendo recoñecidas un século mais tarde, ao redor de 1960, momento no cal os organoestánnicos se converteron nos compostos organometálicos de maior uso (Bennett, 1996).

O tributilo de estaño ou tributilestannano (TBT, do inglés tributyltin) é un composto triorganoestánnico formado por un átomo de estaño unido, mediante enlaces covalentes, a tres compoñentes orgánicos, grupos butilo (EPA, 2003).

A alta toxicidade dos organoestánnicos débese a súa parte catiónica, de forma que a maior grao de alquilación, maior toxicidade, acadando o seu máximo nos estannanos trialquilados como o TBT. A medida que este se degrada da lugar a compostos menos alquilados e, polo tanto, menos tóxicos (Fig. 1.) (Bennett,1996).

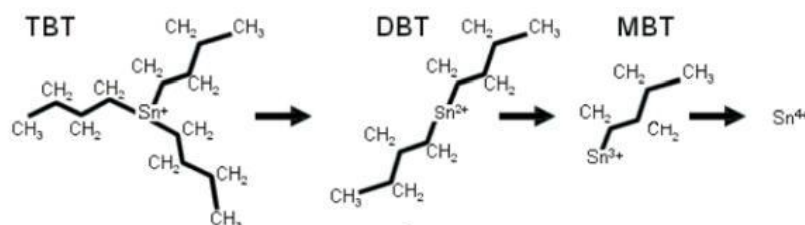


Figura 1. Representación da estrutura química e da debutilación secuencial do tributilo de estaño (TBT) a di- e mono- butilestaño (DBT e MBT respectivamente). (Tomado de Cuevas et al., 2011).

Ademais da alta toxicidade, presentan un alto poder funxicida, bactericida, alxicida e insecticida polo que se empregou en sectores moi diversos como a preservación da madeira, papel, téxtil, pel, sistemas de auga industrial e industria cervexeira (de Mora, 1996; EPA, 2003).

O TBT caracterízase por ser un composto hidrófobo, pouco soluble en auga. Non obstante, existen unha gran variedade de factores que poden alterar este parámetro como o potencial de redución, o pH, a temperatura, a luz, a forza iónica e a cantidade e composición da materia orgánica disolta (Hoch & Schwesig 2004 en Albaina, 2011).

1.2.2. Distribución no medio mariño

O TBT presente no medio mariño procede da lixiviación das superficies somerxidas previamente tratadas con pinturas anti-incrustantes elaboradas con tributilo de estaño (Maguire 1996 en Albaina, 2011).

Despois da lixiviación, este composto disólvese na columna de auga onde comeza a degradarse, principalmente pola acción de organismos fotosintéticos aerobios como bacterias, fungos e algas (biodegradación) pero tamén pola acción dos raios do sol (de Mora, 1996; EPA, 2003). A persistencia do TBT neste compartimento é relativamente curta (degrádase rapidamente), cunha vida media entre 6 días a varios meses (EPA, 2003).

Debido ao seu carácter hidrófobo, outra parte do TBT adhírese ao material particulado en suspensión e precipita, pasando a formar parte do sedimento. A degradación neste compartimento é mais lenta que na columna de auga, cunha vida media entre 1 a 9 anos (de Mora, 1996). Estes sedimentos compórtanse como sumidoiros de TBT a longo prazo, debido a alta estabilidade e baixa degradación que neles se produce. Sen embargo, tamén poden actuar como emisores deste composto debido a procesos naturais (e. g. movemento de organismos infaunais,bioturbación) ou antrópicos (e. g. dragados portuarios) que poden resuspender os contaminantes á columna de auga (Langston & Pope 1995 en Albaina, 2011).

O TBT converteuse así nun composto ubicuo, presente nos últimos anos tanto en áreas cunha alta densidade de barcos como en zonas de costa aberta, afastadas dos portos emisores (Gibbs & Bryan, 1996; Alzieu, 2000).

1.2.3. Efectos

O estudo dos posibles efectos que este composto podía causar no medio mariño comezou con dous casos xa paradigmáticos no campo da ecotoxicoloxía mariña. O primeiro foi a crise da industria ostreícola en Francia, nos anos 1970s. Na Baía de *Arcachon* observouse a ausencia de desenvolvemento larvario da ostra xaponesa *Crassostrea gigas* (Thunberg) e a presenza de malformacións nas cunchas dos individuos adultos. Anos mais tarde confirmouse, mediante diversos estudos de campo e de laboratorio, a relación entre estes acontecementos e a presenza, cada vez maior, de TBT no medio mariño (Alzieu et al., 1980).

O segundo suceso foi o descubrimento de anomalías no aparato xenital de gasterópodos mariños observadas por primeira vez ao redor de 1970 en varias especies. Este proceso denominouse imposex (Smith, 1971) (ver sección 1.3) e comprobouse, unha

década mais tarde, mediante estudos de campo e de laboratorio, que estas malformacións eran debidas a presenza de TBT no medio mariño (Smith, 1981).

A partir desto, realizáronse multitude de estudos exhaustivos sobre os posibles efectos que este composto provocaba nos organismos non diana. Entre eles salientan cambios na composición faunística das comunidades bentónicas e descenso do crecemento de mexillóns (EPA, 2003), redución das poboacións de poliquetos e anfípodos bentónicos (UN 2006 en Albaina, 2011) e inmunosupresión en peixes bentónicos e mamíferos mariños (IMO, 2002). Salienta tamén a capacidade de bioacumularse nos tecidos dos organismos debido ao seu carácter hidrófobo. Almacénase así no tecido graxo e nas bicapas lipídicas de bacterias, fitoplactón, moluscos, crustáceos e peixes, incrementando o rango de distribución deste composto (Alzieu, 1996).

En canto ao estudos dos efectos que o TBT podía causar no ser humano, observouse a presenza de compostos butilestánnicos na sangue e no fígado, podendo producir irritación dos ollos ou dermatite severa por contacto de compostos organoestánnicos (Alzieu, 1996).

1.2.4. Regulación

O TBT considerouse a substancia mais tóxica introducida no medio mariño de xeito deliberado (de Mora, 1996). Ante esta situación, leváronse a cabo rápidas medidas legislativas que sempre estiveron en controversia debido as vantaxes económicas e ambientais do composto (de Mora, 1996; IMO, 2002; Omae, 2003).

A primeira medida legislativa levouse a cabo en Francia, en 1982, debido ao impacto económico da industria ostreícola; prohibindo a aplicación de TBT en barcos de menos de 25 metros de eslora, imposición que foi secundada por moitos outros países desenvolvidos (Alzieu, 2000).

A nivel europeo, as restricións comezaron coa implantación en 1989 da Directiva Europea (Dir 89/677/CEE; EC, 1989) que prohibía o uso de organoestánnicos en barcos de eslora menor ou igual a 25 metros, en material de piscicultura e aparellos somerxidos así como a comercialización exclusiva ao persoal profesional en envases superiores a 20 litros. Esta directiva tivo unha gran relevancia, observándose certa recuperación nalgúns estuarios e rexións de costa aberta. Non obstante, continuaba a preocupación debido a que o emprego de TBT nas pinturas anti-incrustantes seguía sendo legal na flota mercante, a mais importante (IMO, 2002; Ruiz, 2010). Por este motivo implantouse unha nova Directiva Europea en 2003 (Dir 2002/62/CE; EC, 2002) que prohibía completamente a aplicación ou

reaplicación de TBT en barcos operativos nas augas comunitarias e en tódolos barcos pertencentes á Unión Europea, UE. Esta medida comezou o 1/1/2003, cunha moratoria de cinco anos, co fin de eliminar a súa presenza no medio mariño (EC, 2002).

A nivel mundial, a Organización Marítima Internacional (IMO), implantou un conxunto de medidas lexislativas similares ás Europeas, trala ratificación da Convención para o Control dos Sistemas Nocivos Anti-incrustantes (AFS, do inglés *Anti-fouling System Convention*). Esta Convención entrou en vigor o ano 2008 (cunha moratoria de cinco anos) despois de ser aprobada por un mínimo de 25 estados cuxa suma representase, polo menos, o 25% do tonelaxe bruto mundial do TBT. As medidas propostas, ademais, tamén prohibían o emprego de TBT nas pinturas anti-incrustantes naqueles barcos que se desprazasen por augas propiedade dos países asinantes da Convención. Salienta tamén a impunidade dos buques de guerra, auxiliares da armada ou os pertencentes ao Estado, exentos das medidas propostas pola AFS (IMO, 2002).

Cabe salientar a importancia da actividade que a IMO e a Convención para a Protección do Medio Ambiente Mariño do Atlántico Nororiental (OSPAR) levaron a cabo para acadar o obxectivo proposto pola Directiva Europea de 2002 e a nivel mundial en 2008. Algunhas destas medidas foron: a anterior Convención AFS implantada pola IMO e a inclusión do TBT nunha lista de acción prioritaria da Unión Europea (EC 2001 en Albaina, 2011) e da OSPAR (OSPAR 2004 en Albaina, 2011) para cesar as emisións, descargas ou perdas do TBT cara o medio mariño. Salienta tamén o Programa de Monitorización Coordinada (CEMP) da OSPAR que se encarga de monitorizar os niveis ambientais de TBT no sedimento e o grao de imposex mediante os *Criterios de Evaluación Ambiental* (EACs) e a Guía de Monitorización de Efectos Biolóxicos Específicos, respectivamente. Dende a implantación destas Directivas, observouse un descenso nas concentracións de butilestánnicos na auga, sedimentos e organismos, diminuíndo tamén os efectos nestes, como o grao de imposex observado nos moluscos (OSPAR, 2011).

1.3. Imposex

O imposex foi definido como a superimposición dos caracteres sexuais masculinos (incluíndo o pene e/ou vaso deferente) nas femias de gasterópodos mariños non parasitados (Smith, 1971). Este proceso, maiormente irreversible, pode chegar a comprometer a capacidade reprodutiva das femias, provocando procesos de extinción poboacional (Gibbs & Bryan, 1996). Nas poboacións naturais, este fenómeno só se manifesta baixo a presenza de compostos organometálicos como o TBT (Albaina, 2011). Ademais caracterízase polo seu comportamento dose-resposta, é dicir, o desenvolvemento

do imposex depende da concentración ambiental destes compostos. Por este motivo, estudando o imposex, estudamos tamén a contaminación por organoestánicos no medio mariño (biomonitorización), principalmente por TBT (Gibbs & Bryan, 1996).

O imposex é o mellor exemplo de campo dun fenómeno mais amplo denominado disrupción endocrina. Este proceso consiste na alteración do sistema hormonal dalgúns organismos provocado por certas substancias chamadas disruptores endocrinos. O mecanismo bioquímico polo cal o TBT actúa como tal disruptor continúa sendo unha incógnita a pesar dos múltiples estudos realizados (Mathiessen & Gibbs, 1998).

O termo imposex foi aplicado por primeira vez no gasterópodo *Nassarius obsoletus* (Say), especie coa que se realizaron os estudos concluíntes sobre este fenómeno, tanto de laboratorio (causa-efecto) como de campo (frecuencia en poboacións) (Smith, 1981). Posteriormente, Bryan & Gibbs (1996) realizaron estudos similares con *Nucella lapillus* (L.) que concluíron a responsabilidade do contaminante no declive poboacional deste gasterópodo. Ademais, esta segunda especie foi a primeira empregada nos estudos de biomonitorización da contaminación por TBT (mediante o estudo do imposex) debido a súa ampla distribución xeográfica. Está presente tanto na costa oriental e occidental do océano Atlántico (especie anfiatlántica), habitando no intermareal rochoso. Salienta a súa elevada sensibilidade ao TBT, desenvolvendo anomalías a partir de 1 ng Sn/L (Gibbs et al., 1988).

A partir dos estudos realizados con *N. lapillus* rexistráronse mais de 200 especies con esta patoloxía (Shi et al., 2005). Sen embargo, só unhas poucas foron empregadas como bioindicadoras da contaminación por TBT. Entre elas, en Europa, salientan *Nucella lapillus* (L.), *Nassarius reticulatus* (L.), *Neptunea antiqua* (L.), *Buccinum undatum* (L.) e *Littorina littorea* (L.). Estas cinco especies son as que se empregan no Programa de Monitorización Coordinada (CEMP) da OSPAR debido a que o seu rango de distribución e o seu hábitat cobren case a totalidade da xeografía sobre a cal a Convención é aplicable. Ademais, difiren na sensibilidade ao tóxico abarcando así a detección e control dun amplo rango de concentracións. Salienta a falta de interés comercial polas especies *N. antiqua*, *N. lapillus* e *N. reticulatus* evitando así alteracións antrópicas da súa distribución, abundancia ou estrutura poboacional e previndo os sesgos provocados por estas nos resultados das monitorizacións (OSPAR, 2008).

A OSPAR estableceu clases de avaliación en función do Índice da Secuencia do Vaso Deferente (VDSI, do inglés *Vas Deferens Sequence Index*) (Táboa 1, ver tamén sección 3.2. mais abaixo) para cada unha destas especies de gasterópodos co obxectivo de que todas elas acadasen un nivel óptimo de calidade ambiental (EcoQO, do inglés *Ecological*

Quality Objective; OSPAR, 2008). Cada especie presenta diferentes límites debido á distinta sensibilidade que mostran ao TBT. As dúas primeiras clases de avaliación, (A e B) representan os niveis óptimos desexados, mentres que as clases restantes indican niveis cada vez mais contaminados; considérase e agárdase que co tempo e a aplicación da lexislación, a calidade do medio mariño evolucione das clases mais vermellas ás mais verdes (OSPAR, 2008).

Táboa 1. Táboa das clases de avaliación do imposex das 5 especies modelo según a OSPAR. (Tomado de OSPAR, 2008). Abreviaturas: **(VDSI)** Índice da Secuencia do Vaso Deferente; **(ISI)** Índice de Intersexo, do inglés *Intersex Index*; **(PCI)** Índice de clasificación do pene, do inglés *Penis Classification Index*.

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

1.4. *Nassarius reticulatus*

Nassarius reticulatus é un molusco gasterópodo mariño do grupo dos prosobranquios neogasterópos (Táboa 2). É unha especie eurioica que habita nos fondos fangosos e areosos do intermareal brando de toda a costa do Atlántico, chegando a penetrar no Mediterráneo (Fretter & Graham, 1994). É unha especie carroñeira, aínda que en caso de necesidade, os adultos poden vivir a base de detritus (Pope 1998 en Albaina, 2011); pasa a maior parte da súa vida enterrada no substrato, a través do cal asoma unicamente o sifón (Eriksson & Tallmark, 1974). Só abandonan este estado se, despois dun período prolongado de xaxún, detectan a presenza de alimento (Crisp 1978 en Albaina, 2011). É unha especie lonxeva, podendo acadar os 15 anos de idade (Tallmark, 1980).

Táboa 2. Clasificación taxonómica de *Nassarius reticulatus*. (Tomado de Albaina, 2011).

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

É unha especie gonocórica (presenta separación de sexos), fertilización interna e desenvolvemento indirecto. A fecundación adoita ter lugar en febreiro, período durante o cal todas as estruturas reprodutoras están completamente desenvolvidas, a diferenza das demais épocas. Neste período, o aparato xenital dos machos está formado por unha gónada laranxa brillante situada ao lado da glándula dixestiva, unha vesícula seminal convolucionada, unha glándula prostática, un pene baixo o tentáculo dereito e un vaso deferente que une aos dous órganos anteriores (Barroso et al., 2005). En canto ao das femias, está constituído por un maior número de glándulas chamadas paleais (a de secreción, a do albúmen e a da cápsula de cor branca e voluminosa). Tamén teñen un ovario pardo, un oviduto recto, unha bolsa amarela escura de inxestión do esperma e un gonoporo ou vulva (Fig. 2.) (Fretter & Graham, 1994).

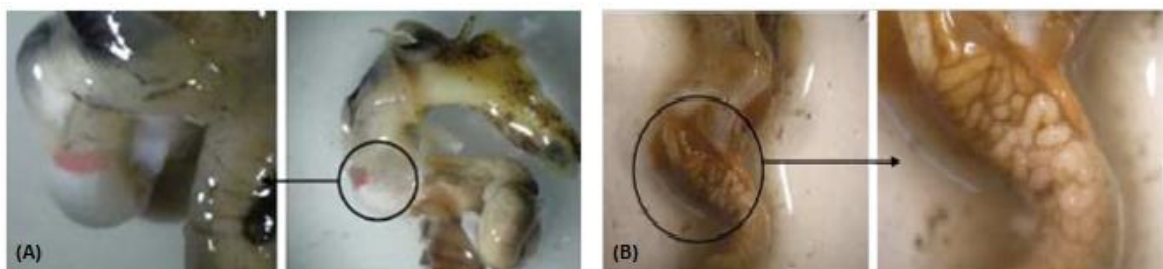


Figura 2. (A) Aparencia externa da cápsula da glándula dunha femia de *Nassarius reticulatus* e (B) aparencia externa da vesícula seminal dun macho de *Nassarius reticulatus*. (Tomado de Cuervas et al., 2011).

Actualmente esta especie é unha das mais empregada nos estudos de biomonitorización da contaminación por TBT debido as súas características biolóxicas. O seu hábitat e a súa ampla distribución permiten realizar unha extensa rede de mostraxes, cubrindo satisfactoriamente o medio estuárico (Fretter & Graham, 1994). Ademais, a relativa tolerancia ao TBT leva consigo que os índices de imposex progresen dende concentración baixas (dende 1 ng Sn/L) ata cantidades ambientais considerables (Barreiro et al., 2001).

2. OBXECTIVOS

A vista do exposto, o obxectivo xeral do presente traballo é avaliar o efecto que o TBT provoca actualmente nos gasterópodos mariños mediante a análise do grao de imposex en *Nassarius reticulatus* nunha localidade da ría de Ferrol (o Castelo da Palma, Mugardos) e establecer a evolución temporal desta medida ao longo dos últimos 15 anos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Recollida de mostras

O lugar escollido para o presente estudo sitúase na ría de Ferrol, concretamente nunha pequena praia baixo o Castelo da Palma (Mugardos, A Coruña, España) (Fig. 3.). A data (o 19 de Febreiro de 2015 ás 11:00h da mañá) escolleuse premeditadamente concorde co calendario de mareas, coincidindo con mareas vivas e, a hora da mostraxe con mareas baixas, condicións óptimas para esta mostraxe. Ademais tamén concorda coa época de reprodución e fecundación e, polo tanto, co aparato reprodutor completamente desenvolvido.

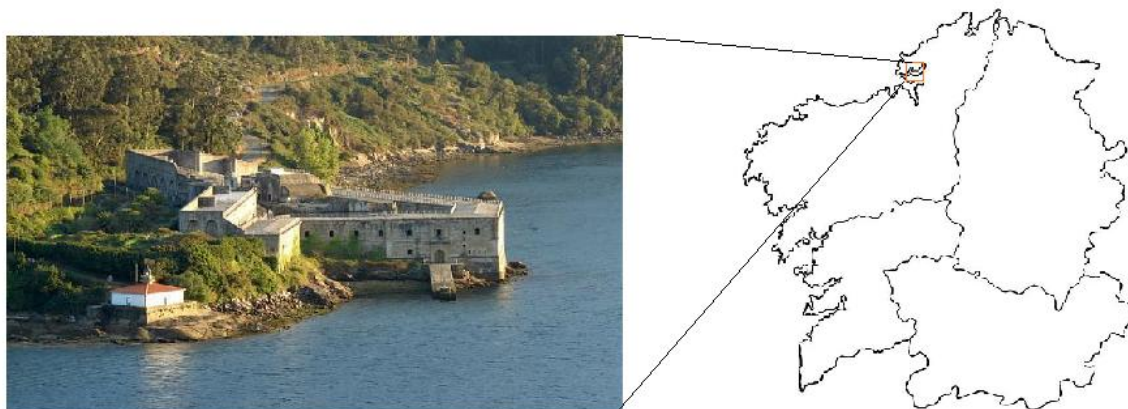


Figura 3. Localización do punto de mostraxe, ao carón do Castelo da Palma, Mugardos, ría de Ferrol. (Tomado de www.concellodemugardos.org).

Para a mostraxe dos individuos empregamos cebos formados por mexillóns (recollidos e esmagados no momento) distribuídos por toda a liña de baixa mar, evitando as zonas de maior incidencia á mar aberto. Cada punto mostrado foi sinalizado cunha baliza e separado 10 metros do seguinte. Tras colocar os cebos, observamos o desterro dos *N. reticulatus* para alimentarse destes.

Recadamos 70 exemplares escollendo os de maior tamaño e os que presentaban dentes na súa cara interna, asegurándonos así que eran exemplares adultos e, polo tanto, con aparato reprodutor completamente desenvolvido. Estas mostras gardáronse nun bote de polietileno, no interior dunha neveira, para manter unhas condicións de temperatura e humidade adecuadas durante o seu transporte ata o laboratorio da Facultade de Bioloxía de A Coruña. Neste, colocamos as mostras nun acuario provisto de auga de mar (35‰ de salinidade) procedente do *Aquarium Finisterrae* de A Coruña para a súa depuración (tanto do aparato dixestivo como das partículas adheridas á superficie corporal) seguindo o protocolo que se leva a cabo para as análises químicas, aínda que neste caso no se realizasen. Durante a depuración das mostras (mínimo 48 horas) contrólase a calidade da auga, cambiándoa se é preciso, en función da súa turbidez.

3.2. Procesado dos animais

Comezamos anestesiando aos individuos para evitar calquera movemento, facilitando así o estudo morfolóxico tanto externo como interno. Para isto, somerxémolos nunha solución de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) ao 7% en auga destilada, no interior de cubetas. Despois dunha hora, cos caracois xa durmidos, procedemos ao estudo morfolóxico externo medindo a altura (*Shell height*, H) e a apertura da cuncha (*Aperture of the shell*, A) coa axuda dun calibre dixital, aproximándoo ata centésimas de milímetro (Fig. 4.).

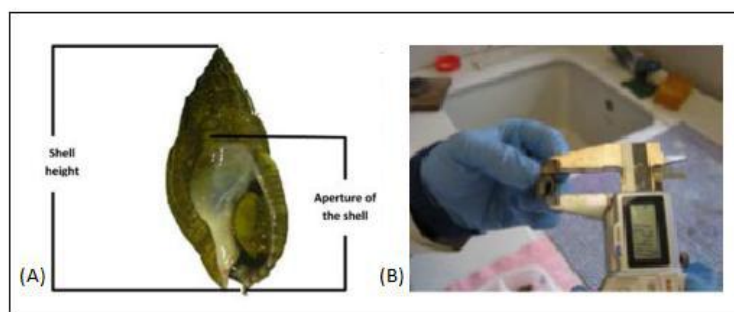


Figura 4. (A) Medidas da altura e da apertura da cuncha de *Nassarius reticulatus*. (B) Exemplo medindo a lonxitude da cuncha de *Nassarius reticulatus* con calibre dixital. (Tomado de Cuevas et al., 2011).

O estudo morfolóxico interno comeza retirando con coidado a cuncha, coa axuda dun torno. Unha vez separada, e coa axuda dun microscopio óptico, cortamos a parte superior do manto, o teito, para observar mellor as estruturas xenitais. Despois de diferenciar as glándulas reprodutoras, explicadas anteriormente, sexamos ao animal. Finalmente, medimos a lonxitude do pene (LP) de ambos sexos coa axuda dun calibre dixital e estudamos detalladamente o aparato xenital das femias para determinar o grao de imposex.

O grao de imposex determinouse en función de tres parámetros diferentes:

- **Porcentaxe de incidencia (%I):** porcentaxe de femias que mostran imposex a calquera nivel de desenvolvemento nunha poboación; %I = (número de femias con algún signo de imposex / número de femias total) x 100 (Bryan et al. 1986 en Albaina, 2011).
- **Índice da Lonxitude Relativa do Pene (RPLI, do inglés *Relative Penis Length Index*):** expresa a lonxitude do pene (LP) das femias con respecto ao LP dos machos. En concreto, $RPLI = (\text{lonxitude media do pene das femias}) / (\text{lonxitude media do pene dos machos}) \times 100$ (Huet et al. 1992 en Albaina, 2011). Este parámetro é un indicador moi informativo, sobre todo a concentracións ambientais de TBT elevadas, debido a que dificilmente se satura (Stroben et al., 1992).
- **Índice da Secuencia do Vaso Deferente (VDSI, do inglés *Vas Deferens Sequence Index*):** este parámetro fai referencia ao valor medio da Secuencia do Vaso Deferente (VDS, do inglés *Vas Deferens Sequence*) nas femias afectadas dunha poboación. A diferenza do anterior, este índice acadará os seus valores máximos a concentracións ambientais de TBT non tan elevadas, sendo tamén un indicador moi eficaz. Como mencionamos anteriormente, emprégase para avaliar o grao de imposex na maioría das especies modelo da OSPAR (EACs, [OSPAR, 2008](#)). Ademais, cada unha presenta un número determinado de estadios en función deste índice; no caso de *Nassarius reticulatus* presenta cinco diferentes (Barreiro et al. 2001 en Albaina, 2011; ver Fig. 5.).

Estadio 0: femia normal, non afectada.

Estadio 1: femias cun pene rudimentario baixo o tentáculo ocular dereito ou unha pequena sección distal do vaso deferente.

Estadio 2: femias cun pene y vaso deferente cuxa lonxitude non é maior á metade de distancia entre a base do pene e o poro xenital.

Estadio 3: femias cun pene e vaso deferente cuxa lonxitude supera a metade da distancia entre a base do pene e o poro xenital.

Estadio 4: femias cun pene e vaso deferente completo, dende a base do pene ata a altura do poro xenital, según o criterio establecido pola OSPAR.

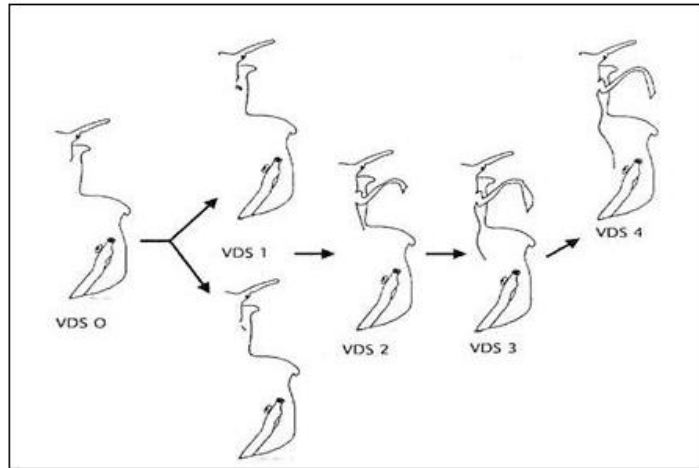


Figura 5. Esquema dos cinco estadios da Secuencia do Vaso Deferente (VDS) de *Nassarius reticulatus* (L.). (Tomado de Albaina, 2011).

4. RESULTADOS

Os resultados das análises da nosa poboación de *Nassarius reticulatus* recóllense na Táboa 3. Nela observábase un ratio de sexos ao redor do 50%, onde do total dos 70 individuos mostrados, 39 son femias e 31 machos. Do total das femias, 34 delas mostraban algún grao de imposex (%I dun 87,5%). En canto ao RPLI obtivemos un 6,9 o que nos indica unha gran diferenza entre a lonxitude do pene dos machos e o das femias. Por último, o VDSI acadou un valor de 1,5, valor que, según a OSPAR, se corresponde coa Categoría C, preto (pero aínda por enriba) do nivel de calidade ambiental óptimo (EcoQO) que se pretende acadar.

Táboa 3. Resultados das análises da poboación de *Nassarius reticulatus* mostrados en Mugardos, 2015. Abreviaturas: **(nf)** número de femias; **(H)** Altura da cuncha; **(A)** Apertura da cuncha; **(LP)** Lonxitude do Pene; **(VDS)** Secuencia do Vaso Deferente; **(VDSI)** Índice da Secuencia do Vaso Deferente e **(nm)** número de machos; **(máx)** máximo; **(mín)** mínimo **(SD)** Desviación típica.

nf	H	A	LP	VDS	nm	H	A	LP	VDS
1	22,37	12,61	1,43	1	1	20,34	11,72	12,35	-
2	22,51	25,21	0,25	2	2	21,85	12,87	10,04	-
3	22,56	12,11	-	0	3	22,00	10,85	13,40	-
4	23,43	13,33	0,97	2	4	22,40	11,62	11,52	-
5	23,67	13,13	2,34	3	5	23,26	12,50	9,59	-
6	24,10	13,79	0,48	2	6	23,30	12,12	9,26	-
7	24,24	12,78	0,68	2	7	23,30	13,01	14,84	-
8	24,92	14,11	1,50	2	8	23,66	11,81	11,60	-
9	24,97	12,60	-	1	9	23,92	13,36	12,48	-
10	25,01	13,09	1,83	2	10	24,25	12,76	6,95	-
11	25,47	12,79	0,99	2	11	24,58	14,03	12,82	-
12	25,50	14,18	0,92	2	12	24,59	13,92	7,99	-
13	25,54	13,75	1,03	2	13	24,66	12,58	7,62	-
14	25,67	14,89	2,07	2	14	24,67	13,05	10,33	-
15	25,79	14,56	0,54	1	15	24,82	14,06	13,67	-
16	25,94	12,68	1,32	2	16	24,85	12,09	10,98	-
17	25,99	13,67	0,74	2	17	24,87	13,30	12,10	-
18	26,06	14,13	0,89	1	18	24,92	13,34	11,68	-
19	26,08	13,98	0,11	2	19	25,13	12,31	14,21	-
20	26,09	13,53	-	0	20	25,24	12,76	8,36	-
21	26,10	13,91	0,62	2	21	25,30	12,34	12,21	-
22	26,12	13,43	0,65	1	22	25,56	12,67	12,64	-
23	26,24	13,83	-	1	23	25,78	13,33	14,07	-
24	26,42	13,54	1,70	2	24	25,84	11,64	13,60	-
25	26,45	14,71	-	0	25	26,06	13,48	13,38	-
26	26,48	14,56	0,24	2	26	26,47	13,03	13,87	-
27	26,48	13,86	1,54	2	27	26,62	14,46	11,95	-
28	26,55	15,74	0,91	3	28	26,72	13,46	6,61	-
29	26,67	11,71	-	1	29	27,11	14,42	13,02	-
30	26,74	13,35	-	2	30	27,25	14,70	13,11	-
31	26,78	14,43	4,78	3	31	27,80	13,20	8,62	-
32	27,24	13,27	0,12	1					
33	27,32	12,72	-	1					
34	27,36	14,16	-	0					
35	27,42	13,85	-	1					
36	28,77	13,94	1,00	1					
37	29,03	14,94	1,17	2					
38	29,57	15,08	-	1					
39	30,02	15,56	-	0					
máx.	30,02	25,21	4,78	3	máx.	27,8	14,70	14,84	-
mín.	22,37	11,71	0,11	0	mín.	20,34	10,85	6,61	-
media	25,99	14,03	0,79	1,5 (vdsi)	media	24,74	12,92	11,44	-
S.D.	1,74	2,04	0,92	0,82	S.D.	1,69	0,92	2,31	-

Estudando mais pormenorizadamente a nosa poboación de femias de *Nassarius reticulatus*, observamos que a maioría delas, o 70%, desenvolveron pene. En canto ao VDSI podemos observar unha clara predominancia de femias cun VDSI de 2, seguida por un VDSI de 1, 0 e, finalmente, 3 (Fig. 6.).

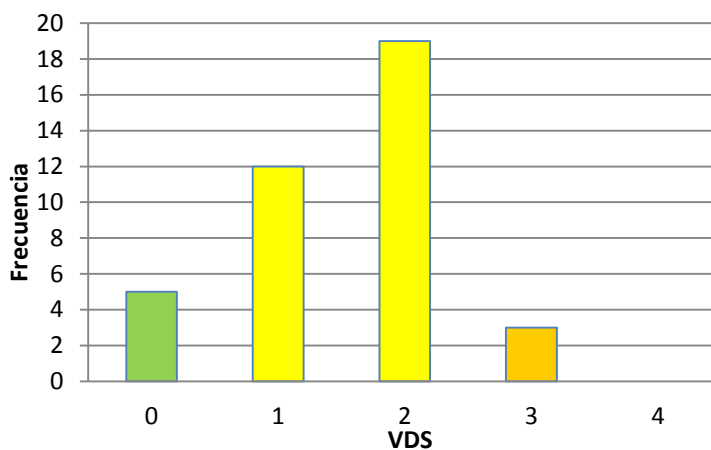


Figura 6. Representación gráfica da frecuencia de femias de *N. reticulatus* cun determinado grao de VDS. Mugar dos, 2015.

5. DISCUSIÓN

O tributilo de estaño chegou a converterse na substancia máis tóxica introducida deliberadamente no medio mariño (de Mora, 1996). A súa ampla distribución e o elevado número de especies non diana afectados por este composto, incluído o ser humano, foron os factores desencadeantes da implantación de medidas legislativas para diminuír e cesar as emisións de TBT ao medio mariño. Un dos métodos máis comúns para monitorizar a contaminación por TBT é o estudo do grao de imposex en distintas especies de gasterópodos mariños entre as que cabe salientar *Nassarius reticulatus*, o obxecto de estudo deste TFG ([OSPAR, 2008](#)).

O grupo de Ecotoxicoloxía da Universidade de A Coruña leva monitorizando os niveis de imposex de *N. reticulatus* ao longo de toda a costa galega dende 1998 (Barreiro et al. 2001 en Albaina, 2011). Nestas campañas diferenciouse entre áreas con portos importantes (PI), portos menores (SPI) e rexións afastadas destes (FR) presentando cada unha delas diferentes graos de imposex e, polo tanto, de contaminación por TBT (Fig.9.) (Barreiro et al. 2001 en Albaina, 2011).

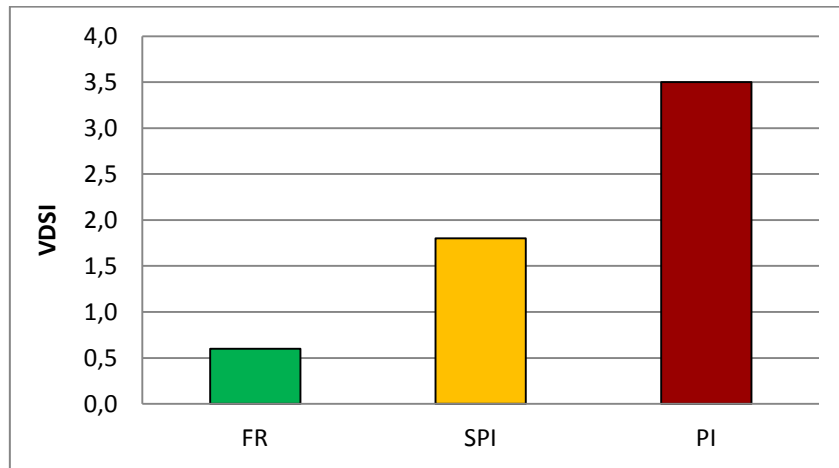


Figura 9. Representación gráfica do índice VDSI de *Nassarius reticulatus* nas diferentes rexións mostradas ao longo da costa de Galicia no ano 2008. Abreviaturas: **(FR)** rexións afastadas das rías; **(SPI)** rías sen portos importantes e **(PI)** rías con portos importantes.

Os valores de VDSI mais elevados correspóndese coas rexións PI, onde se engloba a nosa localidade, o Castelo da Palma (Mugardos). Non obstante, esta presenta niveis incluso niveis superiores (VDSI en 1998-2000 nos PI= 3,5 e VDSI en Mugardos= 4), motivo polo cal os estudos de monitorización na nosa localidade serán moito mais informativos que noutras rexións da costa galega.

No Castelo da Palma (Mugardos) as campañas comezaron no ano 2000, o que nos permite avaliar a evolución temporal do grao de imposex deste molusco nos últimos 15 anos. O Porcentaxe de Incidencia acadou valores máximos en todas as campañas agás na última, ano 2015, reducíndose ata un 87,5%. O RPLI marcou o seu máximo histórico no primeiro estudo (2000), descendendo escalonadamente nas seguintes campañas; sen embargo, o VDSI (no que están basados os criterios EACs da OSPAR) só mostra claros signos de recuperación nas dúas últimas campañas (2011 e 2015, Fig. 8.).

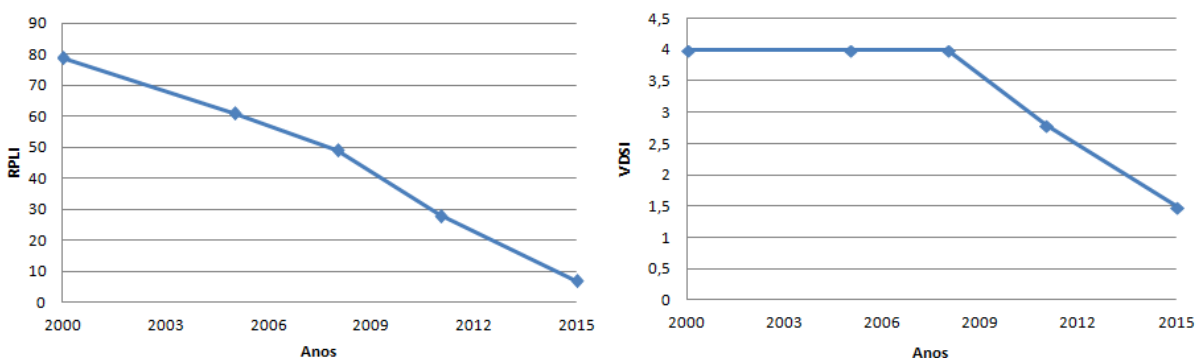


Figura 8. Representación gráfica da evolución temporal do RPLI e VDSI das poboacións de *Nassarius reticulatus* no Castelo da Palma, Mugardos, ao longo dos últimos 15 anos.

A primeira campaña de mostraxe (ano 2000) corresponde coa Directiva Europea de 1989 (Dir 89/677/CEE; EC, 1989); a eficacia desta normativa non foi a agardada debido, principalmente, á súa falta de cumprimento, pero tamén pola presenza de embarcacións de eslora superior a 25 metros e que, polo tanto, podían empregar legalmente pinturas con TBT. En 2003-2008 implantouse unha lexislación (tanto a nivel europeo como mundial) que debeu marcarlo cese das emisións de TBT e o comezo da recuperación no medio mariño.

Non obstante, se ben o RPLI descende relativamente rápido, o VDSI (EACs, OSPAR) non comeza a diminuír ata que se implanta a Directiva mundial no ano 2008; non obstante, actualmente (7 anos despois de dita normativa) aínda non acadou a clase de avaliación óptima determinadas pola OSPAR. Isto débese á alta estabilidade e persistencia do TBT nos sedimentos mariños (entre 1 e 9 anos), os cales poden actuar como sumidoiros a longo prazo primeiro, pero tamén como emisores do contaminante despois se este se resuspende mediante procesos naturais ou antrópicos; o que leva consigo que os portos sexan puntos quentes de TBT debido a súa emisión a longo prazo (Albaina, 2011). Neste caso, a renovación das augas é crucial. Comparando a nosa localidade, situada nunha zona de paso, con Maniños (ao carón do Castelo da Palma, pero bastante mais ao interior da ría de Ferrol) observamos que a alta renovación das augas da primeira comparada ca segunda supón niveis de imposex menores en todas as campañas de monitorización levadas a cabo dende o ano 2000 (Albaina, 2011).

Salienta tamén certas características da especie modelo coa que se realizan estes estudos de monitorización. *Nassarius reticulatus* habita nos sedimentos, presentando unha relación directa entre o grao de imposex e os niveis de contaminación por TBT. Non obstante, debido a que o imposex é un proceso irreversible e esta especie pode chegar a vivir 15 anos, os individuos recolectados nas campañas de monitorización poden ser individuos adultos que mostren niveis de imposex provocados por concentracións de TBT anteriores. A recuperación que se observa na nosa localidade pode ser debida, en parte, a renovación da poboación, de xeito que os actuais e menores niveis de contaminación son reflexo da maior proporción de individuos mais xóvenes.

6. CONCLUSIÓNS

A directa relación dos niveis de imposex coas concentracións de TBT no medio mariño foron os responsables do recoñecemento do estudo deste fenómeno como medida para a biomonitorización desta contaminación.

Os estudos de imposex realizados ao longo de toda a costa galega confirman un descenso importante do nivel de contaminación por TBT. O motivo principal desta melloría foi a completa prohibición do seu emprego a nivel europeo y mundial (2003 e 2008).

O presente estudo reflexa a dificultade que supón eliminar un contaminante do medio ambiente. Por isto debería tomarse como exemplo para a regulación presente e futura doutros vertidos de compostos tóxicos no medio mariño.

6. CONCLUSIONES

La directa relación de los niveles de imposex con las concentraciones de TBT en el medio marino fueron los responsables del reconocimiento del estudio de este fenómeno como medida para la biomonitorización de esta contaminación.

Los estudios de imposex realizados a lo largo de toda la costa gallega confirman un descenso importante del nivel de contaminación por TBT. El motivo principal de esta mejoría fue la completa prohibición de su empleo a nivel europeo y mundial (2003 y 2008).

El presente estudio refleja la dificultad que supone eliminar un contaminante del medio ambiente. Por esto se debería tomar como ejemplo para la regulación presente y futura de otros vertidos de compuestos tóxicos en el medio marino.

6. CONCLUSIONS

The direct relationship between imposex levels and TBT concentrations in the marine environment promoted the study of this phenomenon as a biomonitoring tool.

Imposex studies along the Galician coast confirm an important reduction in the level of TBT pollution. The main reason for this improvement was the complete ban on its use in Europe and at global level (2003 and 2008).

This study reflects the difficulty of removing a contaminant from the environment. Therefore, it should be taken as an example for the present and future regulation of other toxic compounds that may be dumped into the marine environment.

7. BIBLIOGRAFÍA

Albaina, N. (2011). Biomonitorización de contaminación por TBT y genética poblacional en *Nassarius reticulatus* (Linneo) 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., Thibaud, Y., Heral, M., Boutier, B. (1980). Evaluation des Risques dus a l'emploi des Peintures Anti-Salissures Dansales Zones Conchylicoles. *Revue des Travaux de L'Institut des Peches Maritimes*, 44: 305- 348.

Alzieu, C. (1996). Biological effects of tributyltin on marine organisms. En: de Mora, S.J. (Eds.) *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (pp. 167-211). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

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.

Barroso, C.M., Moreira, M.H., Richardson, C.A. (2005). Age and growth of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, NW Portugal. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 85: 151-156.

Bennett, R.F. (1996). Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. En: de Mora, S.J. (Eds.), *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (pp. 21-61). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

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. En de Mora, S.J. (Eds.), *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (pp. 1-20). United Kingdom: Cambridge University Press.

EC, (1989). Directiva 89/677/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1989, por la que se modifica por octava vez la directiva 76/769/CEE relativa a la aproximación de las

disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. *Diario oficial L*, 398: 19-23.

EC, (2002). Directiva 2002/62/CE de la Comisión, de 9 de julio de 2002, por la que se adapta al progreso técnico por novena vez el anexo I de la Directiva 76/769/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (compuestos organoestánicos). *Diario oficial L*, 183: 58-59.

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.

Fretter, V. & Graham, A. (1994). British prosobranch molluscs: their functional anatomy and ecology. Ray Society, London, UK.

Gibbs, P.E. & Bryan, G.W. (1996). TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. En: de Mora, S.J. (Eds.), *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (pp. 212-236). United Kingdom: Cambridge University Press.

Gibbs, P.E., Pascoe, P.L., Burt, G.R. (1988). Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 68: 715-731.

Mathiessen, P. & 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. *Applied Organometallic Chemistry*, 17: 81-105.

Ruiz, J.M., Díaz, J., Albaina, N., Couceiro, L., Irabien, J.A., Barreiro, R. (2010). Decade-long monitoring reveals a transient distortion of baseline butyltin bioaccumulation pattern in gastropods. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 931-934.

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. *Marine Ecology Progress Series*, 304: 179-189.

Smith, B.S. (1971). Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 39: 377-378.

Smith, B.S. (1981). Reproductive anomalies in stenoglossan snails related to pollution from marinas. *Journal of Applied Toxicology* 1: 15-21.

Stroben, E., Oehlmann, J., Fioroni, P. (1992). Comparaison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Marine Biology*, 114: 289-296.

Tallmark, B. (1980). Population dynamics of *Nassarius reticulatus* (Gastropoda: Prosobranchia) in Gullmar Fjord, Sweden. *Marine Ecology Progress Series*, 3: 51-62.

REFERENCIAS WEB

Concello de Mugardos. (2015). *Concello de Mugardos*. Consultado el 22 de Xuño de 2015, en <http://www.concellodemugardos.org>

EPA (Environmental Protection Agency) (2003). *Aquatic life quality criteria for Tributyltin (TBT)*. Consultado o 25 de Xuño de 2015, en <http://www.epa.gov/>

IMO (International Maritime Organisation) (2002). *Anti-fouling systems*. Consultado o 25 de Xuño de 2015, en <http://www.imo.org/>

OSPAR. (2008). *JAMP Guidelines For Contaminant Specific Biological Effects Monitoring. Ref. Nº 2008-9*. Consultado o 25 de Xuño de 2015, en <http://www.ospar.org/>

OSPAR. (2011). *Convenio Internacional sobre el Control de los Sistemas Antiincrustantes Perjudiciales en los Buques*. Consultado o 25 de Xuño de 2015, en <http://www.ospar.org/>