



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Ensaio de filtración en *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) para evaluar a toxicidade de PCPs**

**Ensayo de filtración en *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) para evaluar la toxicidad de PCPs**

**Filtration assay in *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) for assessing the toxicity of PCPs**



**Nerea Novo Varela**

Xuño, 2019

*Directora Académica: Dra. María Ángeles Cid Blanco  
Codirectora: Dra. María José Servia García*



Facultade de Ciencias

## TRABALLO FIN DE GRAO

Dona Ángeles Cid Blanco e Dona María José Servia García autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Ensaio de filtración en *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) para avaliar a toxicidade de PCPs”, presentado por Nerea Novo Varela para a súa defensa ante o tribunal cualificador

En A Coruña a 19 de Xuño do 2019.

Fdo.: Ángeles Cid Blanco

Fdo.: María José Servia García

# ÍNDICE

<b>Resumo/Resumen/Abstract</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Obxectivo</b> .....	4
<b>3. Material e métodos</b> .....	5
3.1 Descrición da especie .....	5
3.2 Produtos de coidado persoal (PCPs) .....	6
3.3 Mostraxe de <i>C. fluminea</i> e aclimatación ás condicións de laboratorio .....	7
3.4 Cultivo das microalgas .....	7
3.5 Determinación da densidade celular .....	8
3.6 Deseño experimental.....	9
3.7 Determinación da mortalidade dos individuos.....	11
<b>4. Resultados</b> .....	11
4.1 Cálculo da taxa de filtración .....	11
4.2 Cuantificación da mortalidade de <i>C. fluminea</i> .....	14
<b>5. Discusión</b> .....	14
<b>6. a. Conclusións</b> .....	16
b. Conclusiones .....	16
c. Conclusions .....	16
<b>7. Bibliografía</b> .....	17
<b>Anexo I</b> .....	22

## RESUMO

Os produtos de coidado persoal (PCPs) son contaminantes emerxentes presentes de forma habitual nos medios acuáticos. Teñen efectos negativos para o ecosistema e a saúde humana actuando principalmente como disruptores endócrinos. Ademais adoitan ser bioacumulados en organismos como *Corbicula fluminea*, un bivalvo bentónico invasor e filtrador empregado frecuentemente como bioindicador de contaminación mediante biomarcadores moleculares. Neste traballo emprégase a inhibición da filtración como biomarcador, para testar os efectos tóxicos dos PCPs, cuantificándoa a través da porcentaxe de remoción de algas e a taxa de aclaramento per cápita ( $CR_{máx}$ ). A porcentaxe de remoción das algas foi do 100% nos primeiros 30 minutos, o que condicionou a  $CR_{máx}$  dos individuos. Aparentemente o TCS e a BP-4 non teñen efectos na taxa de filtración de *C. fluminea*, resultado que podería estar causado polo deseño do método experimental.

## RESUMEN

Los productos de cuidado personal (PCPs) son contaminantes emergentes presentes de forma habitual en los medios acuáticos. Tienen efectos negativos para el ecosistema y la salud humana actuando principalmente como disruptores endócrinos. Además suelen ser bioacumulados en organismos como *Corbicula fluminea*, un bivalvo bentónico invasor y filtrador empleado frecuentemente como bioindicador de contaminación mediante biomarcadores moleculares. En este trabajo se ha usado la inhibición da filtración como biomarcador, para testar los efectos tóxicos de los PCPs, cuantificándola a través del porcentaje de remoción de algas y la tasa de aclarado per cápita ( $CR_{máx}$ ). El porcentaje de remoción das algas fue del 100% en los primeros 30 minutos, lo que condicionó la  $CR_{máx}$  de los individuos. Aparentemente el TCS y la BP-4 no tienen efectos en la tasa de filtración de *C. fluminea*, resultado que podría estar causado por el diseño del método experimental.

## ABSTRACT

Personal care products (PCPs) are emerging contaminants commonly found in aquatic environments. They have negative effects for the ecosystem and human health acting mainly as endocrine disruptors. Moreover, they are usually bioaccumulated in organisms such as *Corbicula fluminea*, an invasive benthic bivalve and filter feeder

frequently used as a bioindicator of contamination by molecular biomarkers. In this work, the inhibition of filtration as a biomarker has been used to test the toxic effects of PCPs, quantifying it through the percentage of algae removal and the clearance rate per capita (CRmax). The percentage of removal of algae was 100% in the first 30 minutes, which conditioned the CRmax of the individuals. Apparently, the TCS and the BP-4 have no effects on the filtration rate of *C. fluminea*, a result that could be caused by the design of the experimental method.

**Palabras chave:** PCPs, triclosán, benzofenona-4, *Corbicula fluminea*, taxa de filtración.

**Palabras clave:** PCPs, triclosán, benzofenona-4, *Corbicula fluminea*, tasa de filtración.

**Keywords:** PCPs, triclosan, benzophenone-4, *Corbicula fluminea*, filtration rate.

# 1. INTRODUCCIÓN

Na última década os produtos de coidado persoal (PCPs, Personal Care Products) pasaron a formar parte dos contaminantes orgánicos emerxentes máis estendidos nos medios acuáticos (Bu *et al.*, 2013; Daughton e Ternes, 1999). Os PCPs inclúen diversas substancias químicas como medicamentos, fragancias, desinfectantes que se engaden a xabóns, pantallas solares, etc. (Boxall *et al.*, 2012). As principais vías de entrada destes compostos no medio ambiente son as augas residuais de procedencia urbana, industrial, agrícola ou hospitalaria (Xie *et al.*, 2019). Así, moitos fármacos non son totalmente degradados nos procesos de tratamento de augas (Daughton e Ternes, 1999), aparecendo nos medios acuáticos en concentracións que van desde ng/L a µg/L (Fick *et al.*, 2015). Ademais, moitos PCPs poden persistir no ecosistema incluso durante anos (Monteiro e Boxall, 2009). A presenza destes produtos mesmo en concentracións baixas pode ser perxudicial para o ecosistema e tamén para a saúde (Ashfaq *et al.*, 2017; Rico *et al.*, 2013). Por exemplo, hai evidencias de que os PCPs teñen efectos como disruptores endócrinos e tamén potencial carcinoxénico, teratoxénico e mutaxénico (Zhang *et al.*, 2015). Ademais estes compostos teñen a capacidade de ser bioacumulados en organismos a diferentes niveis tróficos (Kannan *et al.*, 2005).

Algúns bivalvos, como *Corbicula fluminea*, son empregados con frecuencia como biomonitores para a detección e cuantificación da contaminación por fármacos e PCPs nos medios acuáticos (Brandão *et al.*, 2014). *C. fluminea* é un bivalvo de auga doce, bentónico e de tamaño mediano, que vive nas interfaces auga-sedimento (Fan *et al.*, 2018). A súa cuncha é triangular redondeada, con costelas concéntricas e con coloración entre amarela e negra (Prezant e Tan-Tiu, 1985). É un organismo orixinario de Asia, África e Australia que se expandiu masivamente por todo o mundo (Rosa *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2008), quedando catalogado como un dos 100 peores organismos invasores no proxecto DAISIE (2008). En Europa está considerada unha especie exótica invasora que causa impactos negativos para os bivalvos autóctonos (Sousa *et al.*, 2008) dende 1980, cando foi rexistrada por primeira vez en Francia e Portugal, mais aínda se descoñece o vector de entrada (Mouthon, 1981). En Galicia está presente alomenos nos ríos Miño, Sil, Deva e Mero (Lois, 2010).

É un organismo que se alimenta por filtración, nun proceso no que están involucradas principalmente as branquias (Jørgensen, 1996). Non é un proceso selectivo, polo que pode filtrar algas, bacterias e partículas presentes na columna de auga (Foe e Knight, 1986). A filtración é sensible a estímulos externos e isto afecta á apertura e peche das válvulas (Jørgensen, 1996). Ten a capacidade de acumular diferentes contaminantes durante a filtración, o que lle confire un gran potencial para detectar contaminacións ambientais (Chen *et al.*, 2012). Debido a esta característica foi elixida para realizar este estudo, ademais da facilidade para mantelas no laboratorio e as reducidas restricións éticas sobre a súa manipulación. Con todo, presenta como desventaxa o feito de ser máis tolerante que outros bivalvos a factores de estrés (Bidwell *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2015).

A apertura e peche das válvulas é unha resposta defensiva para evitar factores de estrés como os contaminantes (Doherty *et al.*, 1987; Jou *et al.*, 2009). Neste estudo empregouse como biomarcador, que aquí definimos como calquera cambio nunha resposta biolóxica provocado pola exposición ou o efecto tóxico dos produtos químicos no medio ambiente (Peakall, 1994), a inhibición da alimentación nas ameixas.

## 2. OBXECTIVO

O obxectivo deste traballo é estudar o potencial biomarcador do comportamento de filtración da ameixa asiática, *Corbicula fluminea*, ante a exposición a dous contaminantes emerxentes, o triclosán e a benzofenona-4. Para elo analizouse como parámetro de resposta aos contaminantes a taxa de filtración do animal mediante a porcentaxe de remoción de algas e a taxa de aclaramento per cápita ( $CR_{m\acute{a}x}$ ).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrición da especie

O xénero *Corbicula* pertence á clase Bivalvia, subclase Heterodonta, orde Veneroidea, superfamilia Corbiculoidea e familia Corbiculidae (Vaught, 1989). *Corbicula fluminea* foi descrita por Müller en 1774 como *Tellina fluminea* pero tras sucesivas revisións pasou a formar parte do xénero *Corbicula*.

É un bivalvo eulamelibranquio con cuncha redondeada, chegando aproximadamente aos 40 mm de lonxitude media aínda que non adoitan superar os 25 mm (Aguirre e Poss, 1999). Está composta por dúas válvulas equiláteras convexas, articuladas pola rexión dorsal. A cuncha está cuberta por un periostraco amarelo, negro ou verde, ornamentado con costelas concéntricas moi marcadas (**Fig. 1**), que proporcionan información sobre a idade dos individuos. Na parte interna da cuncha (**Fig. 2**) aprécianse as impresións da inserción dos músculos adutores, un marcado seno paleal e a charnela heterodonta.



**Figura 1.** Morfoloxía externa da cuncha na que se aprecian as costelas concéntricas do periostraco. Fotografía da autora.



**Figura 2.** Morfoloxía interna da cuncha na que se observan as impresións musculares e o seno paleal. Fotografía da autora.

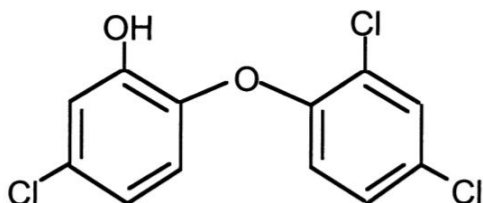
Esta especie pode desenvolverse en hábitats de estuario, lagos e correntes de auga, aínda que amosa preferencia por augas doces de corrente rápida, ben oxixenadas e con baixa salinidade. O seu mecanismo de dispersión natural é deixarse arrastrar polas correntes, mais sospéitase que a súa forte dispersión como especie invasora está relacionada con actividades humanas como o transporte en embarcacións, o uso como cebo de pesca ou o comercio para acuarofilia (McMahon, 2000).

É un organismo que se alimenta por filtración manifestando taxas de filtración variables que poden ser moi elevadas, entre 300 – 2500 L/h (McMahon e Bogan, 2001).

*C. fluminea* é unha especie iterópara con xeracións que se solapan. É hermafrodita presentando simultaneamente gametos masculinos e femininos (Jiménez, 2004). O rápido crecemento, a madurez sexual a idades temperás, a alta fecundidade e o ciclo de vida curto son características que dotan a esta especie dun elevado potencial invasor, sendo capaz de colonizar hábitats moi diversos (Araujo *et al.*, 1993).

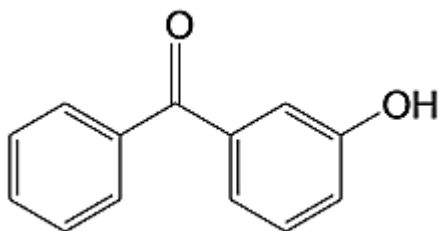
### 3.2 Produtos de coidado persoal (PCPs)

O triclosán (TCS; 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol) é un axente antimicrobiano de amplo espectro empregado en xabóns, dentífricos, cremas, desodorantes, roupa deportiva, zapatos, etc. (Singer *et al.*, 2002). É un composto aromático clorado (**Fig. 3**) con grupos éter e fenol, hidrolíticamente estable, pouco volátil e hidrofóbico (López-Ávila *et al.*, 1980). O TCS bloquea a biosíntese de lípidos (Mcmurry *et al.*, 1998) e estudos recentes suxiren que ten potencial androxénico e antiestroxénico (Gatidou, 2007). Podería afectar a organismos diana e a outros organismos do medio fluvial (Wilson *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Estrutura química do triclosán (Schweizer, 2001).

A benzofenona-4 (BP-4; 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona-ácido sulfónico) é un dos filtros UV máis empregados nos produtos para a protección da pel (De Laurentiis *et al.*, 2013). É un composto aromático (**Fig. 4**) que mostra potencial como disruptor da actividade endocrina e tamén xenotoxicidade (Zhang *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Estrutura química da benzofenona-4 (Zhao *et al.*, 2013).

### 3.3 Mostraxe de *C. fluminea* e aclimatación ás condicións de laboratorio

Os exemplares de *C. fluminea* foron recollidos no río Mero, no aliviadero da presa de Cecebre (A Coruña, 43°17'32.2" N 8°18'20.1" W) (**Fig. 5**). A mostraxe realizouse nunha zona pouco profunda do río, e cun trueiro as ameixas foron recollidas do sedimento (**Fig. 6**). Despois foron transportadas ao laboratorio en auga do propio río.



**Figura 5.** Zona do río Mero na que se fixo a mostraxe. Fotografía da autora.



**Figura 6.** Recollida de ameixas co trueiro. Fotografía da autora.

No laboratorio as ameixas foron seleccionadas nun rango de tamaño antero-posterior entre 10-14 mm. Para a súa aclimatación os animais mantivéronse en corentena durante unha semana cun cambio de auga progresivo, cada 48 horas, entre auga de río e auga de billa sen cloro. O primeiro día a relación foi 2/3 de auga de río e 1/3 de auga de billa sen cloro; aos dous días cambiouse a auga nunha proporción inversa, 2/3 de auga de billa e 1/3 de auga de billa sen cloro; e o último cambio de auga na corentena fíxose engadindo só auga de billa sen cloro. Ademais permaneceron con osixenación constante e a unha temperatura de 18°C, e cun ritmo de luz-escurecemento de 12-12 horas. Foron alimentadas con microalgas da especie *Chlamydomonas reinhardtii* cada 48 horas, nunha concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL.

### 3.4 Cultivo das microalgas

A cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard empregada foi a CCAP 11/32A mt<sup>+</sup>, obtida da Colección de Cultivos de Algas e Protozoos do Laboratorio Mariño de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

*C. reinhardtii* é unha microalga verde unicelular, doceacuícula, de aproximadamente 10 µm de diámetro, con dous flaxelos e con reprodución sexual (Harris *et al.*, 2001).

*C. reinhardtii* foi cultivada en medio TAP (Tris-Acetate-Phosphate) estéril en cámaras de cultivo con condicións controladas de luz e temperatura (**Fig. 7**), mantendo unha temperatura constante de  $18\pm 1^\circ\text{C}$  e unha intensidade lumínica de  $68,25 \text{ km fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  proporcionada por luces LED, cun ciclo de 24 h de períodos luz-escurecemento (12 h de luz-12h de escuridade).



**Figura 7.** Cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* en medio TAP. Fotografía da autora.

### 3.5 Determinación da densidade celular

Para cuantificar a densidade celular do cultivo de microalgas proporcionado como alimento, obtivéronse diferentes alícuotas do cultivo puro, que se fixaron con lugol debido a que *C. reinhardtii* é móbil por flaxelos. Os recontos das células realizáronse cun microscopio de contraste de fases e utilizando unha cámara de reconto de tipo Neubauer.

As limitacións temporais do ensaio impediron a determinación da densidade microalgal de cada réplica mediante este método de reconto, polo que, co obxectivo de facilitar as medicións, estabrecese unha correlación entre a densidade celular e a absorbancia a 530 nm, obtendo unha recta de calibrado cun axuste lineal  $r^2= 0,9966$  (**Fig. 8**). Esta recta de calibrado permitiunos calcular a densidade celular en cada tratamento a partir dos seus datos de absorbancia dun xeito moi rápido.

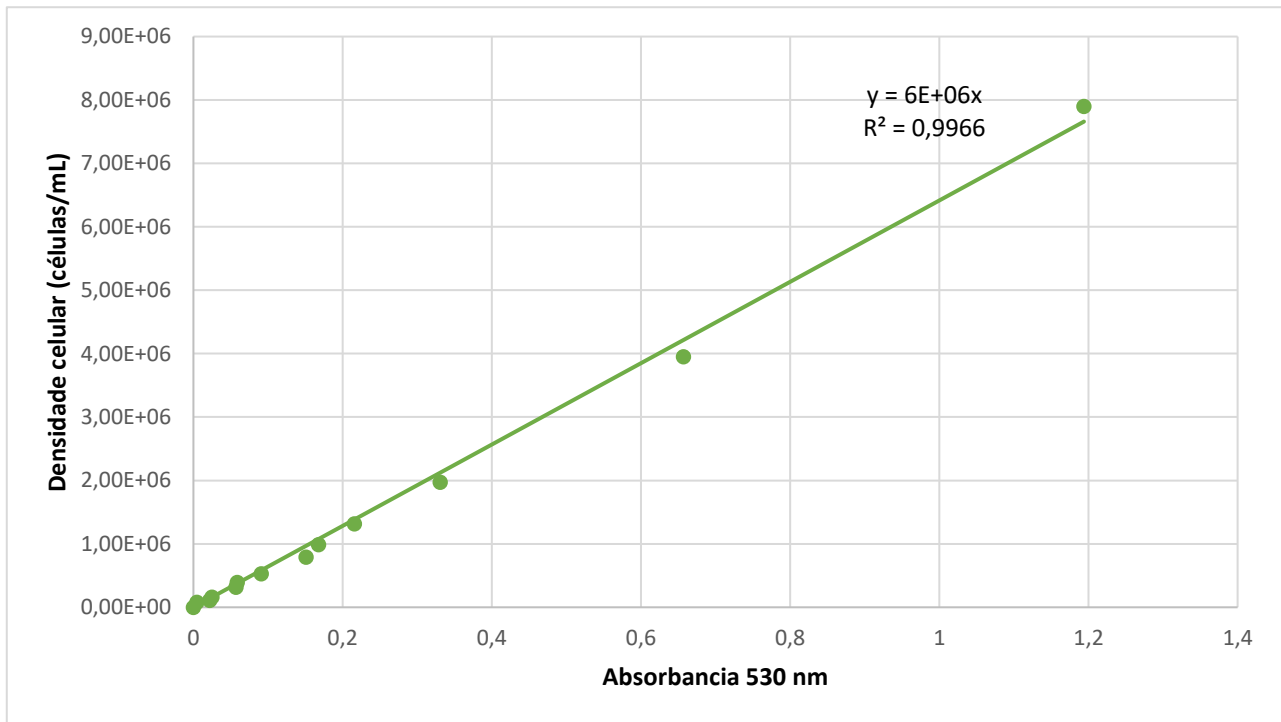


Figura 8. Recta de calibrado densidade celular-absorbancia.

### 3.6 Deseño experimental

Este traballo dividiuse en dúas partes: unha parte previa de illamento dos individuos de *C. fluminea* para o experimento e unha segunda parte na que se testaron os efectos tóxicos do triclosán e a benzofenona-4 sobre *C. fluminea*.

Así, dos exemplares en corentena separáronse 130 individuos de 10-14 mm nun bote con 500 mL de auga de billa declorada e foron alimentados con microalgas nunha concentración final de  $5 \times 10^6$  células/mL. Mantivéronse nas mesmas condicións de cultivo citadas anteriormente. Transcorrido este tempo preparáronse frascos de 50 mL para levar a cabo o experimento.

As concentracións de exposición ao triclosán foron: 0,2 mg/L; 0,4 mg/L e 0,6 mg/L. As concentracións de exposición á benzofenona-4 foron: 30 mg/L; 60 mg/L e 90 mg/L (a preparación dos stocks dos contaminantes atópase pomenorizada no **Anexo I**). Ademais establecéronse dous controis, C1: sen contaminante, con microalgas e ameixas e C2: sen ameixas pero con contaminante e microalgas. O control C2 dispúxose para descartar a interacción entre o contaminante e as microalgas, este control permitiu determinar que a desaparición das algas nos recipientes experimentais se produciu exclusivamente polo comportamento de alimentación das ameixas, xa que non se observaron efectos negativos



nas algas ao estar expostas unicamente aos contaminantes nas súas diferentes concentracións.

Fíxéronse tres réplicas de cada concentración e tres réplicas de cada un dos controis nos frascos de 50 mL, nos que se introduciron 5 individuos dos que quedaron illados 24 horas antes e mantivéronse con aireación constante (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Individuos empregados para o ensaio de filtración. Fotografía da autora.

Para os ensaios de filtración, os frascos deixáronse durante unha hora na cámara a 18°C para que os animais se aclimatasen. Tras este tempo engadíuselle cultivo de microalgas a cada frasco nunha concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL, momento no cal ( $t=0$ ) se tomou a primeira mostra para a posterior determinación espectrofotométrica da súa densidade microalgal. Proseguíuse co mesmo procedemento tomando mostras de 5 mL cada 30 minutos durante 2 horas. Decidiuse non alongar o ensaio máis de 2 horas porque a partir dese tempo as ameixas comezan a incrementar a produción de pseudofeces que poden interaccionar coas lecturas de absorbancia (Castro *et al.*, 2018).

Mediuse por triplicado a absorbancia a 530 nm de cada unha das réplicas ensaiadas, determinando posteriormente a densidade celular media de cada concentración de contaminante e do control mediante a recta de calibrado (**Fig. 8**).

A taxa de filtración dos animais cuantificouse como a porcentaxe de remoción de algas ao longo do tempo e como a taxa de aclarado máximo ( $CR_{\text{máx}}$ ) per cápita:

- $\text{Remoción de algas (\%)} = 100 - \frac{V \cdot (C_i - C_f) - V \cdot (B_i - B_f)}{V \cdot C_i}$

- $CR_{\text{máx}} \text{ per cápita (mL min}^{-1} \text{ individuo}^{-1}) = \frac{V}{n \cdot \Delta t} \cdot \ln \frac{C_i}{C_f}$

onde **V** é o volume testado (50 mL); **C<sub>i</sub>** e **C<sub>f</sub>** son as densidades celulares iniciais e finais dos tratamentos con contaminante a diferentes concentracións; **B<sub>i</sub>** e **B<sub>f</sub>** son as densidades celulares iniciais e finais no control C1; **n** é o número de individuos presente en cada tratamento (n=5) e **Δt** é o período de tempo transcorrido ao longo do ensaio (Castro *et al.*, 2018).

### 3.7 Determinación da mortalidade dos individuos

As ameixas permaneceron expostas aos contaminantes durante 24 horas e, transcorrido este tempo foron retiradas para comprobar o seu estado e determinar a mortalidade dos individuos. A mortalidade foi testada mediante unha estima visual do estado das cunchas, considerando mortas ás ameixas coas válvulas abertas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cálculo da taxa de filtración

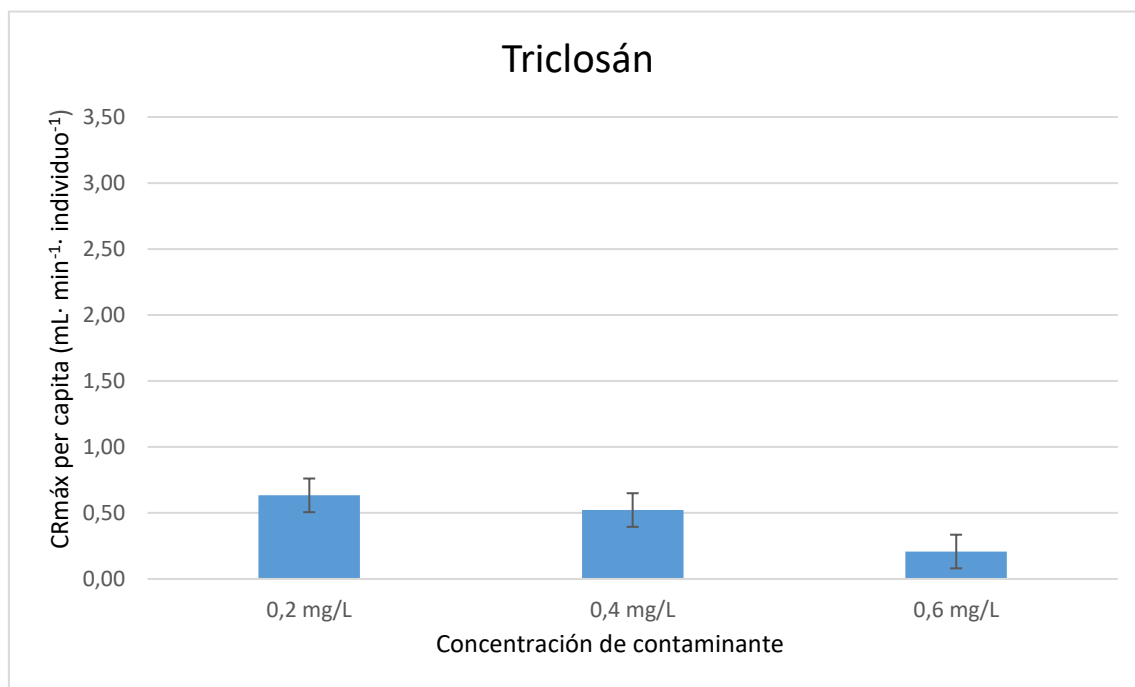
Como se sinalou anteriormente, a taxa de filtración dos animais foi avaliada mediante a determinación da porcentaxe de remoción de algas ao longo do tempo e como a taxa de aclarado máximo ( $CR_{\text{máx}}$ ) per cápita.

As ameixas comezaron a filtrar tan pronto como lles foi proporcionado o alimento e eliminaron unha gran proporción de algas nos primeiros 30 minutos. Tras realizar os cálculos pertinentes decidiuse ter en conta unicamente os datos relativos aos 30 primeiros minutos do ensaio debido a que neste tempo as ameixas foron capaces de eliminar practicamente o 100% das algas presentes nos recipientes tanto ao ser expostas a triclosán como a benzofenona-4.

Aparentemente non se observan diferencias entre contaminantes, xa que as ameixas eliminaron por filtración case o 100% das algas presentes no medio nos primeiros 30 minutos, cando foron expostas a triclosán e tamén a benzofenona-4.

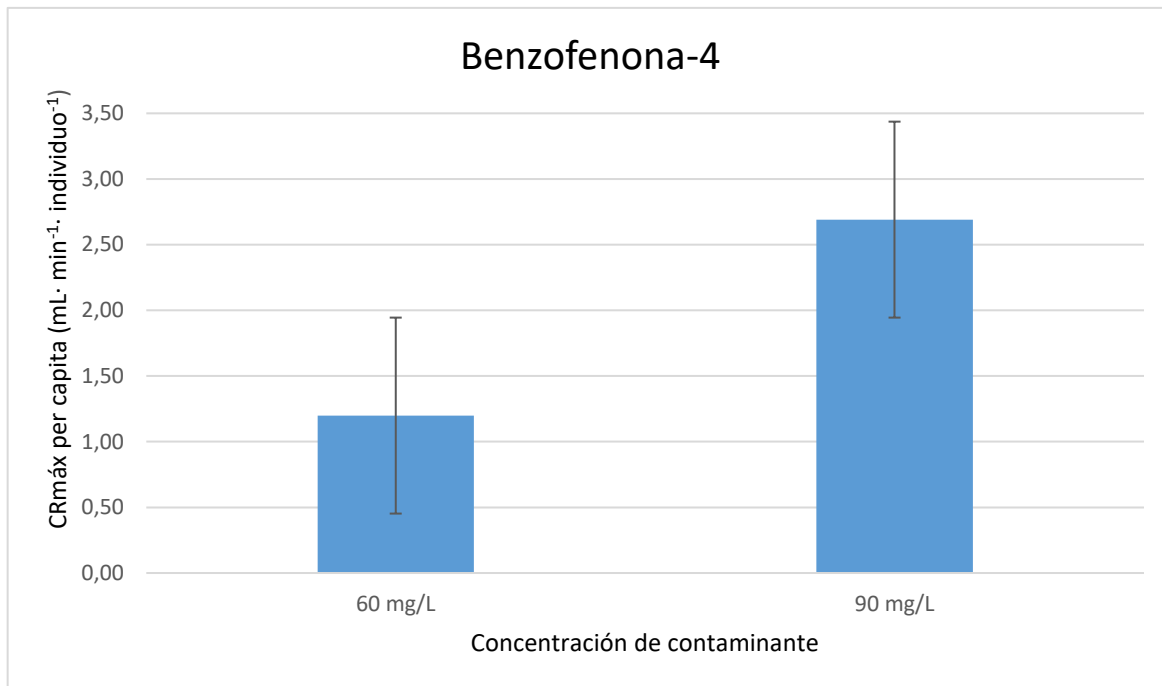
A magnitude da concentración parece non afectar tampouco ao comportamento de alimentación das ameixas. As diferentes concentracións de triclosán (0,2 mg/L; 0,4 mg/L e 0,6 mg/L) e benzofenona-4 (30 mg/L; 60 mg/L e 90 mg/L) non teñen efectos inhibitorios na filtración xa que as ameixas son capaces de retirar case a totalidade das algas en 30 minutos.

En canto á taxa de aclarado máximo ( $CR_{m\acute{a}x}$ ) per cápita volveuse a ter en conta só o período de tempo que comprendía os primeiros 30 minutos (**Fig. 10 e 11**) debido a que tras ese tempo xa non había algas no medio.



**Figura 10.** Taxa  $CR_{m\acute{a}x}$  per cápita cando as ameixas son expostas a diferentes concentracións de triclosán durante 30 minutos.





**Figura 11.** Taxa  $CR_{máx}$  per cápita cando as ameixas son expostas a diferentes concentracións de benzofenona-4 durante 30 minutos.

A taxa de aclaramento per cápita fai referencia á cantidade de mL que cada individuo é capaz de filtrar por minuto. O método experimental presenta limitacións en canto á determinación da densidade celular, xa que se realiza cuantificando a densidade óptica da mostra, circunstancia que ten consecuencias no cálculo da  $CR_{máx}$  per cápita xerándose un resultado incoherente na concentración 30 mg/mL no caso da benzofenona-4, polo que este dato non se tivo en conta.

Sen ter en conta este resultado obsérvanse potenciais diferenzas entre os contaminantes. Percíbese unha menor taxa de aclaramento per cápita no triclosán, na que o valor máximo acada  $0,63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{individuo}^{-1}$ , con respecto á benzofenona-4, na que o valor máximo é  $1,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{individuo}^{-1}$ .

Analizando cada contaminante por separado, no caso do triclosán apréciase un descenso na  $CR_{máx}$  a medida que aumenta a concentración de contaminante, dándose o valor máximo  $0,63 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{individuo}^{-1}$ , na concentración máis baixa de triclosán, 0,2 mg/mL.

De forma oposta a  $CR_{máx}$  aumenta a medida que aumenta a concentración de contaminante, dándose o valor máximo  $1,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{individuo}^{-1}$  na concentración máis alta de benzofenona-4, 90 mg/mL.

## 4.2 Cuantificación da mortalidade de *C. fluminea*

Os contaminantes empregados non tiveron ningunha consecuencia letal para as ameixas en ningunha das concentracións testadas. Todos os individuos experimentais sobreviviron ao período de ensaio e ás 24 horas de exposición ao TCS e á BP-4.

## 5. DISCUSIÓN

*C. fluminea* é un bivalvo comunmente empregado como biomonitor para a detección e cuantificación da contaminación, pero xeralmente estes estudos focalízanse nas respostas bioquímicas da ameixa tras a exposición a fármacos (Aguirre-Martínez *et al.*, 2015), pesticidas (Beltran e Pocsidio, 2010; Ramos *et al.*, 2012), ou metais (Bigot *et al.*, 2011; Diniz *et al.*, 2007). O estudo dos efectos provocados polos PCPs e outros contaminantes emerxentes aínda está en vías de desenvolvemento.

Os biomarcadores analizados máis frecuentemente son de tipo molecular, como por exemplo os considerados por Aguirre-Martínez (2015): actividade da etoxiresorufina O-deetilasa (EROD), actividade da glutatión reductasa (GR), a peroxidación lipídica (LPO), danos no ADN, actividade de glutatión peroxidasa (GPX) ou a actividade da glutatión S-transferasa (GST).

A inhibición da filtración en *C. fluminea* por mor dos contaminantes emerxentes como un mecanismo de defensa mediante a apertura e peche das válvulas (Jørgensen, 1996) é un biomarcador pouco empregado ata a data, coñecéndose poucos ensaios ao respecto.

De acordo coa bibliografía existente (Jou *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2003) este comportamento defensivo é un criterio a ter en conta para desenvolver ensaios coa finalidade de caracterizar avaliacións ambientais.

Neste ensaio a filtración cuantificouse mediante un protocolo que estima a porcentaxe de remoción de algas ao longo do tempo e a taxa de eliminación de algas per cápita,  $CR_{máx}$ , seguindo o método experimental empregado por Castro *et al.* (2018).

Observouse unha elevada variabilidade nos valores de  $CR_{máx}$ , dende  $0,21 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{individuo}^{-1}$  no triclosán ata  $1,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{individuo}^{-1}$  na benzofenona-4. Esta variación nos valores concorda coa descrita na literatura, que van dende 0,7 a  $342 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

individuo<sup>-1</sup> (Haines, 1979; Buttner e Heidinger, 1981; Way *et al.*, 1990). A maior discrepancia que amosan os nosos resultados teñen relación co feito de que *C. fluminea* é un dos bivalvos filtradores máis potentes (Sylvester *et al.*, 2005). Esta discordancia pode deberse a diferentes factores.

O protocolo experimental amosa grandes limitacións que poden condicionar a obtención dos resultados. Por unha parte, a toma de mostras con varias réplicas de cada frasco de ensaio incorpora unha limitación temporal para a determinación da densidade microalgal, imposibilitando a cuantificación desta mediante reconto ao microscopio. Por este motivo simplificouse o procedemento adoptando un método de cuantificación por densidade óptica, no que se correlacionou a densidade celular coa absorbancia a 530 nm. Este sistema de medición presenta como ventaxa a axilización do ensaio pero ten como gran inconveniente a posibilidade de estimar mal a densidade celular real, xa que se basea no uso dunha recta de regresión a partir dos datos de absorbancias.

Outro punto a ter en conta é o número de individuos experimentais cos que se levou a cabo o ensaio. Noutros traballos (Castro *et al.*, 2018) engadiron un único exemplar en cada frasco de experimentación. Neste ensaio foron 5 os individuos presentes por frasco, circunstancia que puido interferir na taxa de filtración, e como consecuencia isto puido causar a eliminación do 100% das microalgas nos primeiros 30 minutos do ensaio.

Debido á presenza de máis individuos e á toma de mostras en periodos de 30 minutos as ameixas foron capaces de retirar gran cantidade de algas ao inicio do ensaio. Tomando de novo como referencia o traballo de Castro *et al.* (2018) outra das posibles causas que puido repercutir nos resultados obtidos foi o intervalo de tempo no que se tomaron as mostras, xa que neste caso o facían cada 10 minutos, proporcionando así unha maior cantidade de datos coa que estimar a porcentaxe de remoción e a  $CR_{m\acute{a}x}$ .

Outra posible explicación a esta resposta anómala en *C. fluminea*, que non detivo o seu comportamento filtrador ante a exposición a contaminantes, é que a ameixa pode estar adaptada á presenza destes compostos (TCS e BP-4) nas zonas nas que se atopa distribuída como organismo invasor.

## **6. a. CONCLUSIÓNS**

A metodoloxía experimental empregada neste traballo debe ser revisada para poder determinar de forma fiable os efectos de diferentes contaminantes sobre a ameixa asiática.

Os contaminantes testados, triclosán e benzofenona-4, non induciron ningún efecto tóxico en *Corbicula fluminea* en ningunha das concentracións ensaiadas, resultado que pode non ser realista debido ás limitacións que presenta o protocolo experimental empregado.

## **6. b. CONCLUSIONES**

La metodología experimental empleada en este trabajo debe ser revisada para poder determinar de forma fiable los efectos de diferentes contaminantes sobre la almeja asiática.

Los contaminantes testados, triclosán y benzofenona-4, no indujeron ningún efecto tóxico en *Corbicula fluminea* en ninguna de las concentraciones ensayadas, resultado que puede no ser realista debido a las limitaciones que presenta el protocolo experimental empleado.

## **7. c. CONCLUSIONS**

The experimental methodology used in this work should be reviewed in order to reliably determine the effects of different contaminants on the Asian clam.

The pollutants tested, triclosan and benzophenone-4, did not induce any toxic effect on *Corbicula fluminea* in any of the tested concentrations, a result that may not be realistic due to the limitations of the experimental protocol used.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Martínez, G. V., DelValls, A. T., & Martín-Díaz, M. L. (2015). Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicology and environmental safety*, 120, 142-154.
- Aguirre, W., & Poss, S. G. (1999). Non-indigenous species in the Gulf of Mexico Ecosystem: *Corbicula fluminea* (Muller, 1774). *Gulf States Marine Fisheries Commission (GSMFC)*.
- Araujo, R., Moreno, D., & Ramos, M. (1993). The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. *Am Malacol. Bull.*, 10: 39-49.
- Ashfaq, M., Khan, K. N., Rehman, M. S. U., Mustafa, G., Nazar, M. F., Sun, Q., ... Yu, C. P. (2017). Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 31-39.
- Beltran, K. S., & Pocsidio, G. N. (2010). Acetylcholinesterase activity in *Corbicula fluminea* Mull., as a biomarker of organophosphate pesticide pollution in Pinacanauan River, Philippines. *Environmental monitoring and assessment*, 165(1-4), 331-340.
- Bidwell, J. R., Farris, J. L., & Cherry, D. S. (1995). Comparative response of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and the Asian clam, *Corbicula fluminea*, to DGH/QUAT, a nonoxidizing molluscicide. *Aquatic Toxicology*, 33(3-4), 183-200.
- Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L., & Rodius, F. (2011). Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: transcriptional and histochemical studies. *Environmental toxicology*, 26(6), 623-632.
- Boxall, A. B., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D. J., Choi, K., Hickmann, S., ... Ankley, G. T. (2012). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?. *Environmental health perspectives*, 120(9), 1221-1229.
- Brandão, F. P., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Nunes, B. (2014). The impact of paracetamol on selected biomarkers of the mollusc species *Corbicula fluminea*. *Environmental toxicology*, 29(1), 74-83.
- Bu, Q., Wang, B., Huang, J., Deng, S., & Yu, G. (2013). Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: a review. *Journal of hazardous materials*, 262, 189-211.
- Buttner, J. K., & Heidinger, R. C. (1981). Rate of filtration in the Asiatic clam, *Corbicula fluminea*. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 74(3-4), 13-18.

- Castro, B. B., Silva, C., Macário, I. P. E., Oliveira, B., Goncalves, F., & Pereira, J. L. (2018). Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (OF Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology*, 196, 25-34.
- Chen, W. Y., Jou, L. J., Chen, S. H., & Liao, C. M. (2012). A real-time biomonitoring system to detect arsenic toxicity by valve movement in freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology*, 21(4), 1177-1187.
- DAISIE European Invasive Alien Species Gateway, 2008. *Corbicula fluminea* [WWW Document]. (7 de xuño de 2019). <http://www.europe-aliens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=53281>.
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental health perspectives*, 107(suppl 6), 907-938.
- De Laurentiis, E., Minella, M., Sarakha, M., Marrese, A., Minero, C., Mailhot, G., ... Vione, D. (2013). Photochemical processes involving the UV absorber benzophenone-4 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulphonic acid) in aqueous solution: reaction pathways and implications for surface waters. *Water research*, 47(15), 5943-5953.
- Diniz, M. S., Santos, H. M., Costa, P. M., Peres, I., Costa, M. H., & Capelo, J. L. (2007). Metallothionein responses in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after exposure to trivalent arsenic. *Biomarkers*, 12(6), 589-598.
- Doherty, F. G., Cherry, D. S., & Cairns, J. (1987). Valve closure responses of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. *Hydrobiologia*, 153(2), 159-167.
- Fan, X., Wang, C., Wang, P., Hu, B., & Wang, X. (2018). TiO<sub>2</sub> nanoparticles in sediments: Effect on the bioavailability of heavy metals in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of hazardous materials*, 342, 41-50.
- Fick, J., Lindberg, R. H., Fång, J., Magnér, J., Kaj, L., & Brorström-Lundén, E. (2015). Screening 2014: Analysis of pharmaceuticals and hormones in samples from WWTPs and receiving waters.
- Foe, C., & Knight, A. (1986). Growth of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) fed artificial and algal diets. *Hydrobiologia*, 133(2), 155-164.
- Gatidou, G., Thomaidis, N. S., Stasinakis, A. S., & Lekkas, T. D. (2007). Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1138(1-2), 32-41.

- Haines, K. C. (1979). The use of *Corbicula* as a clarifying agent in experimental tertiary sewage treatment process on St. Croix, US Virgin Islands. In *75. Proc. 1 st Corbicula Symp. Texas Christian Univ. Res. Found* (pp. 166-1).
- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual review of plant biology*, *52*(1), 363-406.
- Jørgensen, C. B. (1996). Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series*, *142*, 287-302.
- Jou, L. J., Chen, W. Y., & Liao, C. M. (2009). Online detection of waterborne bioavailable copper by valve daily rhythms in freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental monitoring and assessment*, *155*(1-4), 257-272.
- Kannan, K., Reiner, J. L., Yun, S. H., Perrotta, E. E., Tao, L., Johnson-Restrepo, B., & Rodan, B. D. (2005). Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere*, *61*(5), 693-700.
- Liao, C. M., Jou, L. J., & Chen, B. C. (2005). Risk-based approach to appraise valve closure in the clam *Corbicula fluminea* in response to waterborne metals. *Environmental Pollution*, *135*(1), 41-52.
- Liao, C. M., Jau, S. F., Chen, W. Y., Lin, C. M., Jou, L. J., Liu, C. W., ... Chang, F. J. (2008). Acute toxicity and bioaccumulation of arsenic in freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology: An International Journal*, *23*(6), 702-711.
- Lois, S. (2010). New records of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in Galicia (Northwest of the Iberian Peninsula): Mero, Sil and Deva rivers. *Aquatic Invasions*, *5* (Suppl 1), S17-S20.
- López-Ávila, V., & Hites, R. A. (1980). Organic compounds in an industrial wastewater. Their transport into sediments. *Environmental Science & Technology*, *14*(11), 1382-1390.
- Mcmurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, *166*(2), 305-309.
- Monteiro, S. C., & Boxall, A. B. (2009). Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *28*(12), 2546-2554.
- Mouthon, J. (1981). Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula* (*Bivalvia*, *Corbiculidae*) originaire d'Asie. *Basteria*, *45*(4/5), 109-116.
- Oliveira, P., Lopes-Lima, M., Machado, J., & Guilhermino, L. (2015). Comparative sensitivity of European native (*Anodonta anatina*) and exotic (*Corbicula fluminea*) bivalves to mercury. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *167*, 191-198.

- Peakall, D.W., (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 55-60.
- Prezant, R. S., & Tan-Tiu, A. (1985). Comparative shell microstructure of North American *Corbicula* (Bivalvia: Sphaeriacea). *The Veliger*, 27(3), 312-319.
- Ramos, A. S., Gonçalves, F., Antunes, S. C., & Nunes, B. (2012). Cholinesterase characterization in *Corbicula fluminea* and effects of relevant environmental contaminants: a pesticide (chlorfenvinphos) and a detergent (SDS). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47(6), 512-519.
- Rico, A., Phu, T. M., Satapornvanit, K., Min, J., Shahabuddin, A. M., Henriksson, P. J., ... & Van den Brink, P. J. (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412, 231-243.
- Rosa, I. C., Pereira, J. L., Gomes, J., Saraiva, P. M., Gonçalves, F., & Costa, R. (2011). The Asian clam *Corbicula fluminea* in the European freshwater-dependent industry: a latent threat or a friendly enemy? *Ecological Economics*, 70(10), 1805-1813.
- Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS microbiology letters*, 202 (1), 1-7.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., & Pillonel, L. (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental science & technology*, 36 (23), 4998-5004.
- Sousa, R., Antunes, C., & Guilhermino, L. (2008). Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 44, No. 2, pp. 85-94).
- Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juarez, A., & Cataldo, D. (2005). Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia*, 534(1-3), 71-80.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., & Massabuau, J. C. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(4), 914-920.
- Vaught, K. C. (1989). A classification of the living Mollusca Melbourne, FL: *American Malacologists*.



- Way, C. M., Hornbach, D. J., Miller-Way, C. A., Payne, B. S., & Miller, A. C. (1990). Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Canadian Journal of Zoology*, 68(1), 115-120.
- Wilson, B. A., Smith, V. H., deNoyelles, F., & Larive, C. K. (2003). Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environmental science & technology*, 37(9), 1713-1719.
- Xie, H., Hao, H., Xu, N., Liang, X., Gao, D., Xu, Y., ... Wong, M. (2019). Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 659, 230-239.
- Zhang, Q., Ma, X., Dzakpasu, M., & Wang, X. C. (2017). Evaluation of ecotoxicological effects of benzophenone UV filters: Luminescent bacteria toxicity, genotoxicity and hormonal activity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 142, 338-347.
- Zhang, J., Zhang, J., Liu, R., Gan, J., Liu, J., & Liu, W. (2015). Endocrine-disrupting effects of pesticides through interference with human glucocorticoid receptor. *Environmental science & technology*, 50(1), 435-443.
- Zhao, H., Wei, D., Li, M., & Du, Y. (2013). Substituent contribution to the genotoxicity of benzophenone-type UV filters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 95, 241-246.

## ANEXO I: PREPARACIÓN DOS STOCKS DE CONTAMINANTES

### Triclosán

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$x \cdot 80 \mu\text{L} = 0,6 \text{ mg/L} \cdot 160000 \mu\text{L}$$

$$x = 1,2 \text{ mg/L}$$

Pésanse 0,0024 g en 2000  $\mu\text{L}$  de metanol

Concentración (mg/L)	$\mu\text{L}$ contaminante	$\mu\text{L}$ metanol
0 (control 1)	0	25
0,2	8	17
0,4	17	8
0,6	25	0

### Benzofenona-4

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$x \cdot 80 \mu\text{L} = 90 \text{ mg/L} \cdot 160000 \mu\text{L}$$

$$x = 180 \text{ mg/L}$$

Pésanse 0,018 g en 100  $\mu\text{L}$  de metanol

Concentración (mg/L)	$\mu\text{L}$ contaminante	$\mu\text{L}$ metanol
0 (control 1)	0	25
30	8	17
60	17	8
90	25	0