

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Ensayo para evaluar la toxicidad de contaminantes emergentes mediante el estudio de la capacidad filtradora de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)

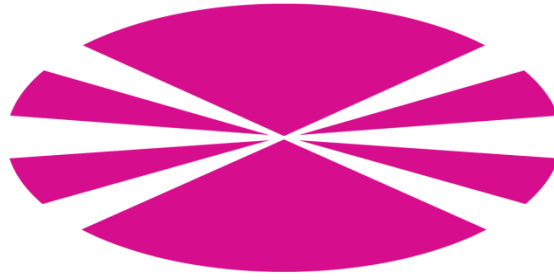
Ensaio para avaliar a toxicidade de contaminantes emerxentes mediante o estudo da capacidade filtradora de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)

Essay for assessing the toxicity of emerging pollutants through the study of the filtration rate of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)



Laura Pérez Herrera

Julio, 2019



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía

TRABALLO DE FIN DE GRADO

Dna. María José Servia García e Dna. Ángeles Cid Blanco autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Ensaio para avaliar a toxicidade de contaminantes emerxentes mediante o estudo da capacidade filtradora de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)” presentado por Laura Pérez Herrera para a súa defensa ante o tribunal calificador.

En A Coruña, a 17 de xullo de 2019

María José Servia García

Ángeles Cid Blanco

~ Si vas a dudar de algo, que sea de tus límites. ~

A ellos, ellas y él, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVO	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Muestreo	6
3.2. Aclimatación	6
3.3. <i>Corbicula fluminea</i>	7
3.4. Microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
3.5. Contaminantes	9
3.5.1. Florfenicol, 2,2-dicloro-N-[1-(flourometil)-2-hidroxi-2 (metilsulfonyl) fenil]etil]-[R-(R*,S*)]	[4 9
3.5.2. Bisfenol A, 2,2-bis-(4-hidroxifenil)-propano	9
3.6. Diseño experimental	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. Recta de calibración	12
4.2. Florfenicol.....	13
4.3. Bisfenol A	14
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA	21
7. ANEXO	26

RESUMEN

La presencia de contaminantes emergentes en el medio ambiente, tiene consecuencias perjudiciales para nuestros ecosistemas y efectos negativos sobre la salud humana y animal. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de evaluación de su toxicidad, como el uso de organismos indicadores de sus efectos. En este estudio se utiliza un bivalvo, *Corbicula fluminea*, para evaluar la potencial toxicidad y posibles efectos, sobre la misma, de la exposición a diferentes concentraciones de dos contaminantes emergentes en agua dulce, florfenicol (2´5, 5, 7´5 µg/L) y bisfenol A (30, 60 y 90 µg/L). Para ello se realizó un ensayo de filtración durante 2h, utilizando la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Los resultados muestran que el FLC no presenta efectos aparentes sobre la actividad de filtración ni sobre la salud de *C. fluminea*, al contrario que el BPA, que si presenta un efecto negativo sobre la tasa de filtración de los ejemplares y causa mortalidad, siendo estos efectos más notables a concentraciones mayores. Los resultados obtenidos sugieren que la tasa de filtración en *C. fluminea* podría ser un buen indicador de la toxicidad de contaminantes emergentes.

Palabras clave: *Corbicula fluminea*, bisfenol A, florfenicol, filtración, microalgas, toxicidad.

RESUMO

A presenza de contaminantes emerxentes no medio ambiente, teñen consecuencias prexudiciais para o noso ecosistema e efectos negativos sobre a saúde human e animal. Isto levou à procura de novos métodos de avaliación toxicolóxica, coma o uso de organismos indicadores dos seus efectos. No noso estudo emprégase un bivalvo, *Corbicula fluminea*, para avaliar a potencial toxicidade e os posibles efectos, sobre a mesma, da exposición de diferentes concentracións de dous contaminantes emerxentes en auga doce, florfenicol (2´5, 5, 7´5 µg/L) e bisfenol A (30, 60 y 90 µg/L). Para isto realizouse un ensaio de filtración durante 2h, utilizando a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Determinouse como o FLC non presenta efectos aparentes sobre a actividade da filtración nin sobre a saúde de *C. fluminea*, ao contrario que o BPA, que si presenta un efecto negativo sobre la taxa de filtración dos exemplares e causa mortalidad, sendo estos efectos mais notables a concentracions maiores. Os resultados obtidos suxiren que a taxa de filtración en *C. fluminea* poderia ser un bo indicador da toxicidade de contaminantes emerxentes.

Palabras clave: *Corbicula fluminea*, bisfenol A, florfenicol, filtración, microalgas, toxicidade.

ABSTRACT

The presence of emergent pollutants in the environment has damaging consequences for our ecosystems, as well as negative effects on human and animal health. This has led to finding new methods for evaluating its toxicity, such as the use of indicator organisms for its effects. In this study a bivalve, *Corbicula fluminea*, is used in order to evaluate potential toxicity and its possible effects caused by the exposure to different concentrations of two emergent pollutants, Florfenicol (2.5, 5, 7.5 µg/L) and Bisphenol A (30, 60 y 90 µg/L). To do this, a filtration test was performed over 2 hours, using the *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae. Results show that FFC does not show visible effects on either filtration or health on the *C. fluminea*, in contrast with BPA, which does show a negative effect on the filtration rate on the specimens and causes mortality. These effects are more significant the bigger the concentrations are. The results obtained suggest that the filtration rate on *C. fluminea* could be a proper indicator on toxicity in emergent pollutants.

Palabras clave: *Corbicula fluminea*, Bisphenol A, Florfenicol, filtration, microalgae, toxicity.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad las industrias producen grandes cantidades de contaminantes que son liberados al medio ambiente provocando consecuencias perjudiciales para nuestros ecosistemas y desencadenando efectos negativos sobre la salud humana y animal (Janet et al., 2012).

Utilizamos el término contaminante emergente para referirnos a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración (Janet et al., 2012). En la actualidad los contaminantes emergentes son objeto de estudio debido a que pueden encontrarse en distintos compartimentos ambientales (Damià et al., 2008). De aquí surge la necesidad de desarrollar diferentes métodos para su detección y evaluar los posibles efectos de su exposición sobre los organismos.

La detección de estos contaminantes puede ser difícil y costosa. Por ello se recurre a alternativas como el uso de organismos indicadores de contaminación, cuyo uso en aguas dulces en Europa comenzó a mediados del siglo XIX (Roldan, 2016). Entre los organismos empleados se encuentran los bivalvos, ya que además pueden ser usados como modelos para determinar los efectos de los contaminantes en el bentos debido a su capacidad filtradora y al cierre y apertura de sus valvas frente a condiciones adversas del medio (Branco et al., 2018).

En el presente estudio se propone la utilización de una especie de bivalvo dulceacuícola, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), para determinar la potencial toxicidad de algunos contaminantes emergentes, como son el bisfenol y el florfenicol.

Corbicula fluminea (conocida comúnmente como almeja asiática), habita en el bentos, donde vive semienterrada en las capas superficiales del sedimento y se alimenta de fitoplancton (Baptista, 2012). Esto junto al hecho de que se trata de

una especie cosmopolita, sésil, de talla grande y fácil de recolectar son algunas de las características que la hacen idónea para ser utilizada como molusco bioindicador (Baptista, 2012; Llanes, 2002). Existen un total de seis especies invasoras del género *Corbicula* (Quiñonero et al., 2016), siendo *C. fluminea* considerada como una especie invasora a nivel mundial. Los factores que determinan dicha reputación son: su rápido crecimiento, temprana madurez sexual, corto periodo de vida, a su alta fecundidad y asociación con las actividades humanas (Rivas, 2013). Su expansión se remonta al año 1924 cuando se encontraron los primeros ejemplares en Norteamérica, dando comienzo a una rápida expansión. Entre 1965-1975 ya había alcanzado América del Norte extendiéndose finalmente en los años 80 a Europa, momento en el que las citas de *C. fluminea* en el continente empezaron a ser constantes. La primera referencia a este bivalvo en la Península Ibérica tiene lugar en 1980, en el estuario del río Tajo (Portugal) (Rivas, 2013). En 1989 colonizó el estuario del río Miño, una de las principales vías de entrada de las especies exóticas en Galicia (Rivas et al., 2010; Zamora et al., 2017), convirtiéndose en la especie bentónica dominante en términos de abundancia y biomasa (Sousa et al., 2008).

Actualmente se encuentra casi en la totalidad de las grandes demarcaciones hidrográficas ibéricas y está presente en toda América y gran parte de Europa (Zamora et al., 2017). Su invasión se debe sobre todo a actividades comerciales relacionadas con la acuariofilia y a la pesca deportiva entre otras (Rivas et al., 2010).

Dentro de los contaminantes emergentes podemos encontrar el bisfenol y el florfenicol. El uso del bisfenol se ha incrementado a lo largo de los años, llegando a convertirse en uno de los productos químicos producidos en mayor volumen en el mundo (3,8 millones de toneladas en 2006, ascendiendo en el 2009 a 5,16 millones de toneladas) (Barasona et al., 2017). Se emplea en la síntesis de plásticos de policarbonato y en las resinas epoxi, para la fabricación de biberones, botellas para agua, refrescos y para el recubrimiento interno de latas y otros contenedores de comida y bebidas (Bosch et al., 2016). Al lavar

éstos, el bisfenol se separa y se distribuye en el medio ambiente, motivo por el que se encuentra presente como contaminante ambiental en ríos y costas (hasta 56 µg/L según Corrales et al., 2015). Además, presenta una baja tasa de biodegradabilidad, y se bioacumula en la cadena trófica. Es un compuesto tóxico para el ser humano, ya que puede derivar en cánceres reproductivos, afectar a la fertilidad y otros problemas endocrinos relacionados (Serrano, 2017). También afecta a las branquias de animales acuáticos, provocando daños sobre las células de cloruro de los mismos (Barasona et al., 2017).

En junio de 2017, el BPA fue incluido por la agencia European Chemicals Agency (ECHA), de la Unión Europea, dentro de la lista de químicos altamente preocupantes debido a sus propiedades, y a que causa serios efectos en la salud humana (Barasona et al., 2017).

En el caso del florfenicol, este es utilizado en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones bacterianas (Becker, 2013), siendo uno de los antibióticos más utilizados. En 2009 representó más del 66% de los antibióticos empleados (Becker, 2013). Su función es inhibir la síntesis proteica de la célula bacteriana (Beltrán, 2012). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA), estipuló que la ingesta diaria admisible microbiología del florfenicol presente en la carne de animales para consumo humano es de 3 µg/kg (Mestorino, 2011).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es comprobar si se podría emplear *Corbicula fluminea* para evaluar la potencial toxicidad y posibles efectos, sobre la misma, de dos contaminantes emergentes en agua dulce, bisfenol A y florfenicol. Para ello se realizará un bioensayo basado en la disminución de la concentración de microalgas en suspensión de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, a lo largo de 2h, debido a la filtración por parte de las almejas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestreo

Se recolectaron ejemplares de almeja asiática (*Corbicula fluminea*) de diferentes tamaños. Estas muestras fueron recogidas en el río Mero, a la altura del aliviadero del embalse de Cecebre, en la provincia de A Coruña. Para ello se empleó una manga recolectora. Los ejemplares se encontraban en el bentos, sobre un sustrato arenoso, a una profundidad inferior a 30 cm. Posteriormente se transportaron al laboratorio en botes de plástico con agua del río, para su aclimatación y posterior tratamiento (Figura 1).



Figura 1: *Corbicula fluminea* en botes de plástico para su traslado al laboratorio (fotografía propia).

3.2. Aclimatación

La aclimatación tuvo una duración de siete días consecutivos. Durante toda la aclimatación los ejemplares permanecieron en bandejas, separados previamente por rango de tamaño: 10-14 mm, 15-19 mm, 20-24 mm, 25-30 mm (Figura 2). Se dispusieron en la cámara de cultivo a una temperatura de 18°C y un fotoperiodo de 12h - luz 12h oscuridad, con aireación continua, manteniendo estos parámetros durante todo el proceso. Fueron alimentadas en días consecutivos con 10 mL un cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*. Con el fin de conseguir una total adaptación al agua de grifo sin cloro por parte de los ejemplares, se hicieron reposiciones periódicas de agua, variando los

porcentajes entre agua de grifo sin cloro y agua de río. Así, el primer día las bandejas se llenaron con 1/3 de agua de grifo sin cloro y 2/3 de agua de río, de un total de 2 L. En la segunda reposición la proporción fue 2/3:1/3, y finalmente, en la última reposición, sólo se utilizó agua de grifo sin cloro. En cada reposición de agua se retiraron las bajas y se limpiaron las bandejas para retirar las heces.



Figura 2: *Corbicula fluminea* en bandejas para la aclimatación (fotografía propia).

3.3. *Corbicula fluminea*

El género *Corbicula* pertenece a la clase *Bivalvia*, subclase *Heterodonta*, orden *Veneroidea*, superfamilia *Corbiculoidea* y familia *Corbiculidae* (Jiménez, 2004). *C. fluminea* (Figura 3) es una especie hermafrodita, que alcanza su madurez sexual en su primer año de vida, presentando más de un periodo reproductivo a lo largo de su vida, siendo ésta de 2 a 3 años, y con generaciones solapadas. Su reproducción es por fecundación cruzada, aunque se ha observado que presenta diferentes estrategias reproductoras dependiendo de la población, (Zamora et al., 2017; Rivas, 2013).

Puede alcanzar un tamaño de entre 20-33 mm de alto y 22-36 mm de ancho en los adultos (Quiñonero et al., 2016). En este trabajo se utilizaron ejemplares de entre 10-15 mm.

Reside de forma natural en aguas dulces y estuarios del Sureste de Asia, África, India, islas del Pacífico y Australia (Pérez, 1990), prefiriendo zonas de

carácter lóxico y bien oxigenadas, con salinidades que no superen el 5%. Es intolerante a condiciones de hipoxia moderada y su rango de temperatura oscila entre los 2°C y los 36°C. Se trata de una especie bentónica, sésil que vive semienterrada en las capas superficiales del sedimento en fondos de grava fina o barro (Quiñonero et al., 2016; Zamora et al., 2017). Se alimenta de fitoplancton, filtrando grandes volúmenes de agua (cerca de 10 L/ almeja/día), siendo también capaz de recolectar material orgánico del sedimento (Baptista, 2012).



Figura 3: *Corbicula fluminea*, vista desde distintas posiciones (fotografía propia).

3.4. Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

En este trabajo se empleó como alimento de *C. fluminea* la especie de microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 4). Esta es una microalga verde unicelular, perteneciente a la familia *Chlamydomonadaceas*, móvil, con dos flagelos anteriores y su tamaño ronda los 20 μ de largo y 10 μ de ancho (Harris, 2009). Habita de forma natural en aguas continentales.



Figura 4: *Chlamydomonas reinhardtii* escala 5 μ m (fuente: <http://www.protisten.de>).

Esta microalga se utiliza mucho en investigación biológica debido a su fácil cultivo, a su crecimiento rápido, posibilidad de inducir la reproducción sexual y porque es haploide y su genoma ha sido secuenciado (Esperanza et al., 2015).

3.5. Contaminantes

3.5.1. Florfenicol, 2,2-dicloro-N-[1-(fluorometil)-2-hidroxi-2 (metilsulfonil) fenil]etil]-[R-(R*,S*)]

El FLC pertenece al grupo de los fenicoles, antibacterianos de origen sintético derivados del ácido dicloroacético (Beltrán 2012). Está formado por una sulfona, un alcohol secundario, un compuesto organofluorado, un compuesto organoclorado y una carboxamida secundaria siendo su fórmula general $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ (Figura 5). Es un producto que se absorbe rápidamente y se distribuye a los tejidos y fluidos corporales (Matzner, 2012), pudiendo alcanzar concentraciones relativamente elevadas hasta varias horas después de su administración. Los residuos pueden afectar la calidad higiénica y nutritiva, así como al olor, aroma y textura de los alimentos (Mestorino, 2011).

El valor de ingesta diaria tolerable es de 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Mestorino, 2011). Los valores utilizados en este trabajo fueron 2'5, 5 y 7'5 $\mu\text{g}/\text{L}$ FLC.

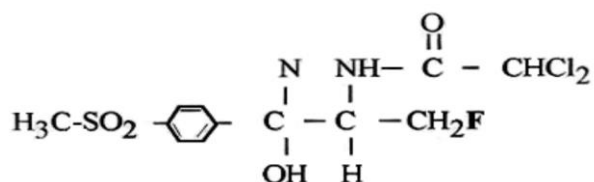


Figura 5: estructura molecular florfenicol (Beltrán, 2012).

3.5.2. Bisfenol A, 2,2-bis-(4-hidroxifenil)-propano

El BPA forma parte del grupo de compuestos disruptores endocrinos. Está formado por dos anillos fenólicos que se unen a través de un grupo acetona, su fórmula general es $Y(C_6H_5O)_2$ (Serrano, 2017) (Figura 6).

El valor de ingesta diaria tolerable es de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día (Barasona et al., 2017). Nosotros utilizamos cantidades de 30, 60 y 90 $\mu\text{g}/\text{L}$ BPA.

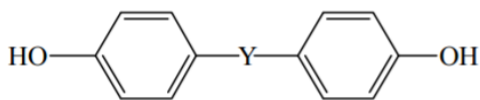


Figura 6: estructura molecular del bisfenol A (Serrano, 2017).

3.6. Diseño experimental

El método utilizado en este estudio se basa en la disminución de la concentración de partículas en suspensión (microalgas) a lo largo del tiempo debido a la filtración por parte de las almejas (Branco et al., 2018).

Antes de la experiencia se construyó una recta de calibración, entre la densidad óptica y la densidad celular de microalgas, donde $y = 6.4149x$, siendo el rango de absorbancias ($\lambda = 530\text{nm}$) entre 0 y 1,2 en el que la recta se ajusta a un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9965$. Esta se elaboró a partir de diluciones seriadas de un cultivo de microalgas de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*. Se recogieron muestras de las diferentes diluciones y se introdujeron en un espectrofotómetro que permitió obtener las concentraciones representativas de la densidad celular junto con su nivel de absorbancia. Esto nos aporta un marco al que se deben ajustar correctamente los datos experimentales. Así mismo nos permite un conteo rápido y preciso de las células sin tener que recurrir al conteo en microscopio.

Para llevar a cabo los distintos ensayos, previamente se preparó una solución stock de BPA y FLC en eppendorf estériles, en los cuales una vez pesada la cantidad adecuada de contaminantes se vertieron diluyéndolos en metanol.

Para realizar el bioensayo, 24h antes se apartaron 200 individuos de entre 10-15 mm a un recipiente con 500 mL de agua de grifo sin cloro. Se calculó el alimento para ajustarlo a 500.000 células/mL de la microalga *C. reinhardtii*. El recipiente se situó en la cámara de cultivo bajo las condiciones descritas anteriormente.

Trascurridas las 24h sometimos a los individuos a diferentes concentraciones de los contaminantes BPA y FLC, los cuales se vertieron en el agua para observar si la presencia de estos influía en la tasa de filtración y/o en el estado de las almejas, en base a muestras tomadas en diferentes intervalos de tiempo, comparando estos resultados con una réplica control.

Para determinar los potenciales efectos tóxicos sobre los ejemplares de ambos contaminantes, se prepararon cuatro matraces con 160 mL de agua de grifo sin cloro y metanol, en 3 de ellos se añadió la cantidad de contaminante a estudiar: BPA (30, 60 y 90 µg/L), FLF (2´5, 5, 7´5 µg/L) y el matraz restante constituyó el control (0 µg/L contaminante). A partir de cada matraz se hicieron tres réplicas de 50 mL (Figura 7), obteniendo un total de 9 matraces para cada contaminante más 3 matraces control. En cada uno de estos se introdujeron 5 almejas. Se dispusieron los matraces en la cámara de cultivo en las condiciones descritas anteriormente. Se calculó el alimento para ajustarlo a 500.000 células/mL y transcurridos 60min vertimos en cada matraz 4´23 mL de cultivo de *C. reinhardtii*. Este momento lo denominamos tiempo 0. Se tomaron muestras de 5mL de cada una de las réplicas. De cada réplica sacamos 3 mL, repartidos en 3 cubetas con 1 mL cada una. Estas se disponen en el espectrofotómetro, el cual nos proporciona un valor de absorbancia (medido a 530nm) y la concentración de microalgas presentes en cada muestra. Las mediciones se repitieron cada 30 minutos durante 2h.

Una vez trascurridas las 2h se dejaron las almejas en la cámara bajo las mismas condiciones, hasta el día siguiente, momento en el que comprobamos mortalidad.

En base a las mediciones obtenidas se calculó la proporción de algas eliminadas (Ec 1) y la tasa de eliminación máxima per cápita (Ec 2).

$$\text{Ec 1.} \quad \text{eliminación de algas (\%)} = 100 - \frac{V \cdot (C_i - C_f) - V(B_i - B_f)}{V \cdot C_i}$$

$$\text{Ec 2.} \quad \text{tasa de eliminación máx. per cápita (mL min}^{-1}\text{clam}^{-1}) = \frac{V}{n \cdot \Delta t} \cdot \ln \frac{C_i}{C_f}$$

Donde V corresponde al volumen de prueba (50 mL); C_i y C_f representan la concentración de microalgas inicial y final respectivamente; B_i y B_f corresponden a la tasa inicial y final en el tratamiento control respectivamente; n indica el número de almejas en el recipiente ($n=5$); Δt periodo de tiempo correspondiente (0 a 120 min).

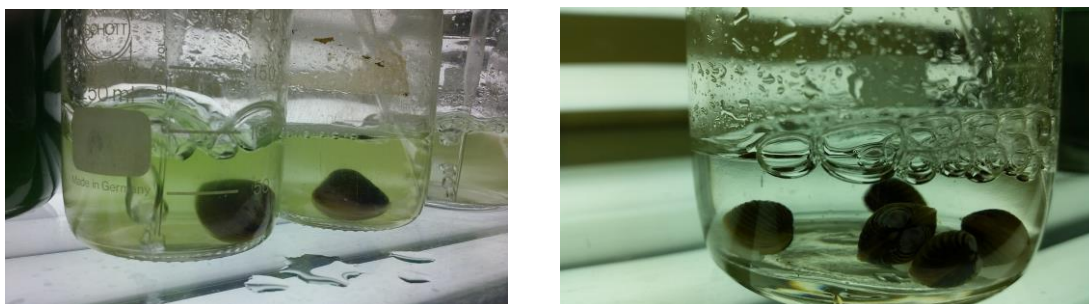


Figura 7: *Corbicula fluminea* en las réplicas de ensayo (fotografía propia).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Recta de calibración

Dado que en el diseño experimental se planteó hacer estimas del número de células microalgales que quedan en el medio cada 30 minutos, el recuento al microscopio de estas células resultaba imposible. Por ello, se realizaron medidas de absorbancia a 530 nm de alícuotas de cultivos de microalgas con una densidad celular conocida, con el fin de obtener una recta de calibrado que nos permitiera estimar el número de células a partir de medidas espectrofotométricas, ya que estas medidas son mucho más rápidas.

La recta de calibrado nos aportó un marco al que se deben ajustar los datos experimentales, siendo $y=6.4149$ y $R^2=0.9965$ (Figura 8). Así, las muestras recogidas en cada tiempo, analizadas en el espectrofotómetro, nos dan un conjunto de concentraciones y absorbancias en base a la recta fijada, donde a mayor absorbancia mayor es la concentración celular.

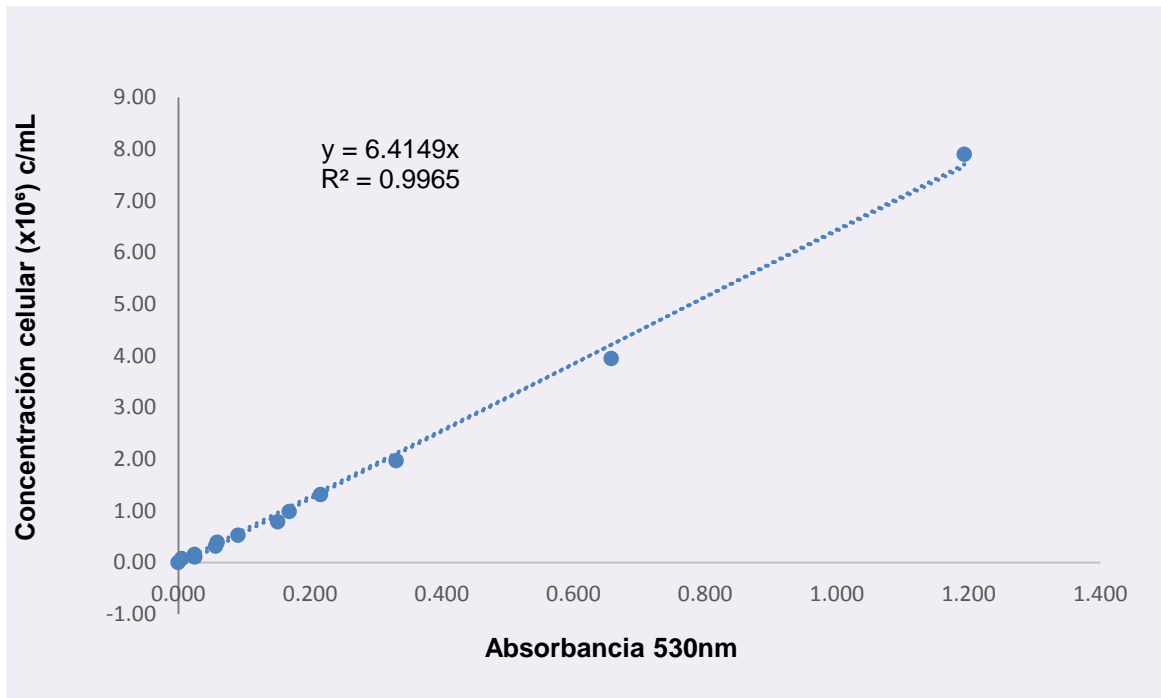


Figura 8: Recta de calibración establecida entre la densidad óptica ($\lambda=530\text{nm}$) y la densidad celular de la especie de microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.2. Florfenicol

En el momento de verter el alimento se hizo un seguimiento visual del experimento, donde se vio que la gran mayoría de las almejas se abrían. En las mismas se observó cómo a lo largo del proceso, el agua adquiría una tonalidad transparente, siendo plena en la primera media hora en todas las réplicas.

En la experiencia con FLC los datos obtenidos no fueron relevantes, ya que después de 30 minutos de haber alimentado a las almejas, todas las células de *Chlamydomonas reinhardtii* habían sido consumidas en todas las concentraciones ensayadas, además del control. El FLC se emplea en acuicultura como antibacteriano a concentraciones variables debido a la resistencia que adquieren las bacterias al mismo (Espinosa, 2012). Esto pudo conllevar a que las concentraciones utilizadas en esta experiencia (2'5, 5, 7'5 $\mu\text{g/L}$) no fueran significativas ni acarrearan ningún problema aparente sobre las almejas. Encontramos referencias que hablan de la utilización de cloranfenicol (análogo del tiamfenicol al igual que el FLC) en criaderos de bivalvos a

concentraciones entre 0.25-8 mg/L sin efectos sobre los ejemplares (FAO, 2007).

La exposición a otros fármacos como ibuprofeno, carbamazepina, novobiocina o tamoxifeno a concentraciones de 0´1, 1, 5, 10, 15, 50 µg/L, si supone un perjuicio sobre *C. fluminea* provocando daños en el ADN y alteración en rutas metabólicas (Aguirre, 2015). Otros autores referencian como la exposición al paracetamol, durante cortos periodos a una concentración de 30´98 µg/L, provoca alteraciones significativas en el estado redox celular de la almeja (Pinto et al., 2011).

4.3. Bisfenol A

Se hizo un seguimiento visual del experimento, donde se vio que en el momento de verter el alimento algunas almejas se abrían, mientras que otras permanecían cerradas. Esto se pudo deber a que la apertura y cierre en bivalvos se ve influenciada por un mecanismo de respuesta ante condiciones de estrés ambiental (Milanesi, 2015). La mayoría de los individuos abiertos pertenecían a las réplicas control. En las mismas se observó cómo, a lo largo del proceso el agua adquiría una tonalidad transparente, siendo más acusada a medida que pasaba el tiempo. Esta no fue tan significativa en BPA 30 µg/L, en el cual el medio continuó con un tono verde a lo largo de todo el proceso. En las concentraciones superiores del contaminante, 60 y 90 µg/L, no se apreció ninguna variación en la coloración de las réplicas.

En la figura 9 se muestra la variación de la concentración de microalgas a lo largo del experimento en las diferentes réplicas. Se aprecia como en el control la disminución en la concentración de microalgas es inmediata, desde el tiempo 0, en comparación a las réplicas que presentan contaminante. En la primera media hora la bajada es más intensa, alcanzando una asíntota en los siguientes tiempos, hasta que a los 90 minutos alcanza el 0.

En la concentración de 30 $\mu\text{g/L}$ de BPA no se aprecia una disminución significativa hasta los 90 minutos, momento en el que la concentración disminuye y parece que se estanca. En las concentraciones de 60 y 90 $\mu\text{g/L}$ del contaminante, las diferencias son pequeñas por lo que fue preciso calcular otros parámetros para verificar si serían representativas.

Estudios anteriores demuestran el efecto directamente proporcional negativo con el aumento de la concentración del BPA sobre la actividad celular en *Nannochloropsis gaditana* (Torres, 2015) o sobre la actividad metabólica de *Tetraselmis suecica* (Lorenzo, 2018). Cantidades superiores a 5 mg/L de BPA, provocan en diferentes especies de microalgas marinas rupturas en la pared celular que conllevan a la pérdida de orden de sus orgánulos, su estructura y su color (Torres, 2015; Lorenzo, 2018).

Las microalgas presentan cierta capacidad de adaptación a condiciones adversas (Romero, 2014). En nuestro estudio el ensayo tiene una duración de 120 minutos lo que causa un efecto más agudo del contaminante sobre las microalgas, ya que no tienen tiempo de adaptarse a las nuevas condiciones (Lorenzo, 2018). Así, la presencia de BPA pudo influir en la calidad de las células de *C. reinhardtii*, conllevando a la disminución de la filtración por parte de las almejas.

Para confirmar estos datos se calculó el porcentaje de eliminación de microalgas (Ec 1) y la tasa de eliminación per cápita (Ec 2).

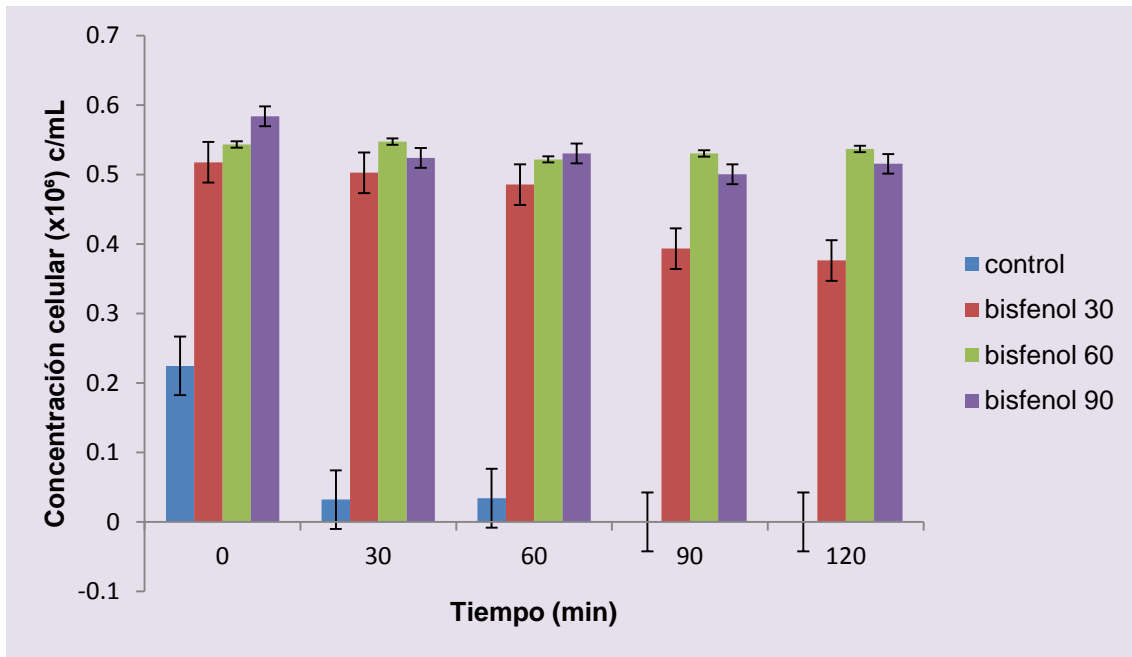


Figura 9: Densidad en mililitros de *Chlamydomonas reinhardtii* en presencia de las diferentes concentraciones de BPA (30, 60 y 90 $\mu\text{g/L}$) y en el control a lo largo del tiempo, a partir de los datos obtenidos en el espectrofotómetro.

La figura 10 muestra el porcentaje de microalgas eliminado por cada grupo de almejas en cada tiempo respecto a la concentración inicial, y corrobora lo observado en la figura 9. Así, en el control la filtración fue inmediata, alcanzando el porcentaje eliminado el 55%. Tras este muestreo, la intensidad de filtrado se redujo paulatinamente, pero continuó eliminando en la primera media hora el 85% del alimento total, habiendo consumido en una hora la totalidad de las microalgas. Diniz (2008) establece en su trabajo que *C. fluminea* es capaz de filtrar un volumen de agua cerca de 10 L/día/almeja, partiendo de este dato y sabiendo que tenemos 5 almejas por muestra, coincide con la retirada del 100% de las algas en menos de una hora.

La retirada de microalgas no es tan notable en las almejas expuestas al contaminante. En el BPA 30 $\mu\text{g/L}$, las almejas respondieron más tarde, comenzando el filtrado a los 30 minutos, aunque de forma muy ligera, eliminando el 3% de las microalgas. A los 90 minutos la filtración se intensificó, alcanzando una asíntota que continuó hasta el final del periodo de 120 minutos, lo que eliminó al final de la experiencia el 26% del total de las microalgas. En las concentraciones de 60 y 90 $\mu\text{g/L}$ de BPA, no existe retirada, filtrando 0%

del alimento total. Una disminución del 95% en la tasa de filtración se refleja en el trabajo de Oliveira et al. (2018), ante la exposición de *C. fluminea* a microplásticos durante 8 días. Esto se debe a la acumulación en el tracto digestivo de los microplásticos, lo que provoca una sensación de saciedad al animal, o a la acumulación de los mismos en las branquias.

Resultados similares se describieron en el trabajo de Branco et al. (2018), donde la exposición de *C. fluminea* durante 120 minutos, ante diferentes sustancias como pesticidas y metales entre otros, provocan un cierre de las valvas disminuyendo la filtración de las almejas.

En vista de la utilización de *C. fluminea* para evaluar la toxicidad de varios contaminantes, investigadores han desarrollado una serie de modelos matemáticos para mejorar los resultados, basados en el ritmo de apertura y cierre de las valvas en función de la cantidad de contaminación y el tiempo de exposición de las almejas a metales presentes en el agua (Guo, 2018).

La presencia del BPA no influye únicamente en la tasa de filtración. Estudios reflejan como el BPA tiene efectos negativos sobre el desarrollo embrionario y larvario en *Mytilus galloprovincialis* (Fabbri, 2014), y presenta genotoxicidad en *Perna viridis* (Juhel, 2017).

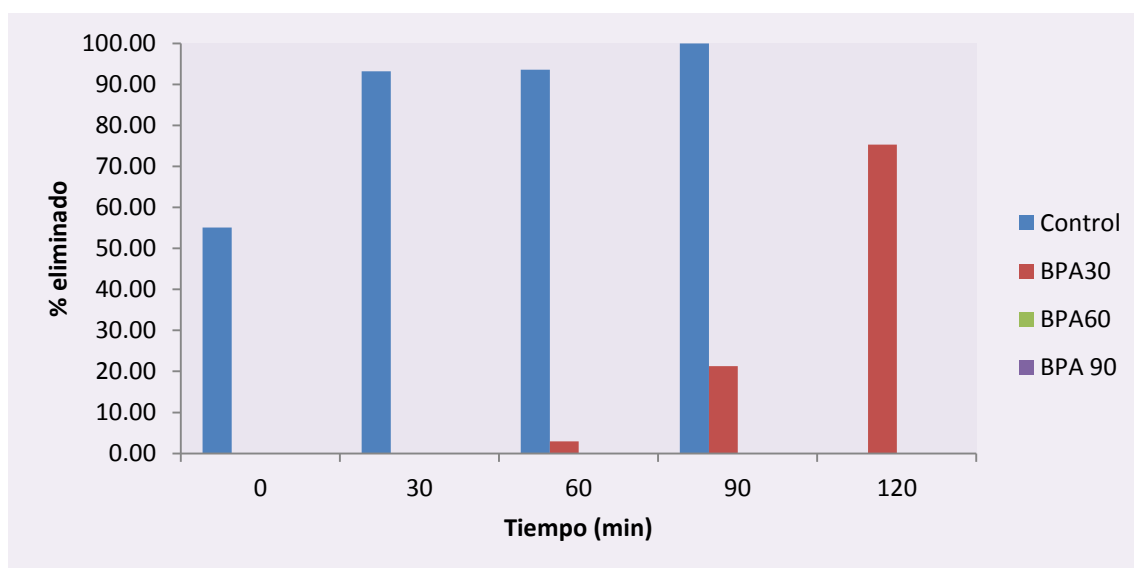


Figura 10: Porcentaje eliminado de microalgas a lo largo del tiempo en los diferentes tratamientos con BPA, respecto a la concentración inicial 500000 c/mL.

Los valores calculados de la tasa de eliminación máxima per cápita se representan en la figura 11, en la cual se observan únicamente los valores para el control. Esto se debe a que la filtración por individuo en las demás réplicas es muy baja o nula. En la bibliografía, los resultados fueron variables en función del tamaño de los ejemplares, donde la tasa de eliminación máxima per cápita de microalgas va en aumento con la talla de las almejas, siendo 2 mL/min/almeja, en las almejas de entre 15-19 mm y 6 mL/min/almeja, en las de 25-30 mm (Branco et al., 2018). La tasa de filtración presenta una relación directa con el tamaño de los bivalvos, siendo esta mayor cuanto mayor sea el tamaño de los mismos, (refleja Rojas y Roper (2002) en la especie *Mytilopsis sallei* y Milanesi, (2015) en otra especie de bivalvo, *Diplodon parallelipedon*). En nuestro estudio utilizamos individuos de entre 10-15 mm. Esto podría explicar las menores tasas de filtración halladas. Futuras investigaciones serían necesarias para determinar si el tamaño reducido podría ser indicativo de una mayor vulnerabilidad ante la exposición a la contaminación.

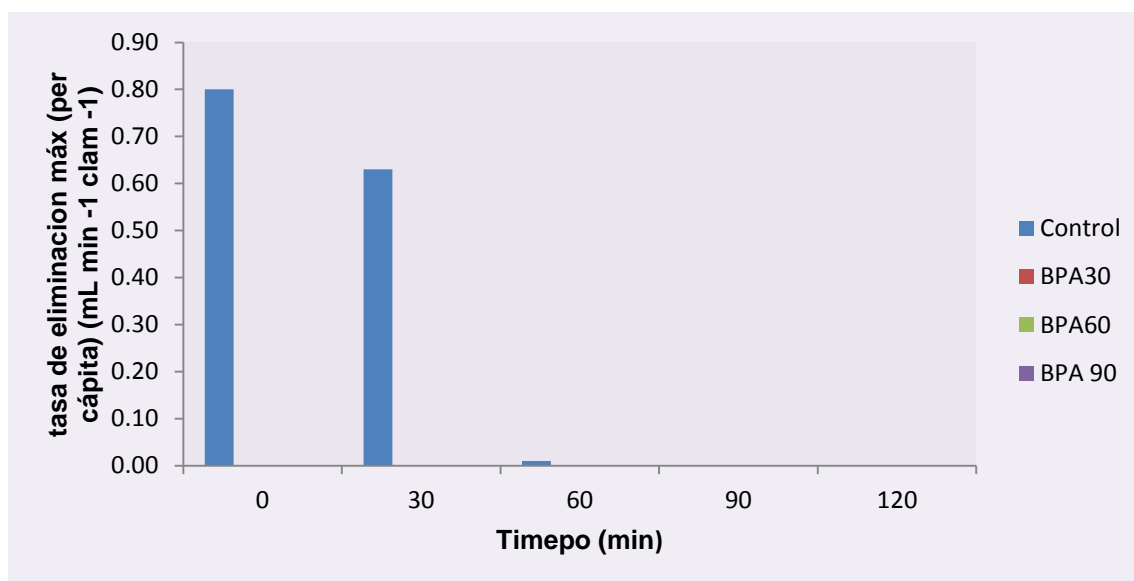


Figura 11: Tasa de eliminación máxima per cápita (mL/min/almeja) frente al tiempo en las diferentes réplicas del bioensayo.

La mortalidad hallada tras dejar a los individuos durante 24 horas en el medio fue nula en las réplicas control, aumentando a medida que las concentraciones de BPA son mayores, siendo el porcentaje de mortalidad del 13%, 47% y 87%

en cada una de las concentraciones respectivamente, tal como se refleja en la figura 12.

No se utilizó ningún método para evaluar la salud de los individuos, por lo que es desconocida la causa de las bajas, ya que se podría deberse a la presencia de BPA o a una muerte natural. Otros trabajos reflejan cómo la exposición a otros contaminantes no provoca la mortalidad de los individuos de *C. fluminea*, como el de Oliveira et al. (2018), en el que las almejas son expuestas durante 8 días a microplásticos y mercurio o el de Pinto, (2011), en el que registran la influencia del paracetamol a corto y largo plazo.

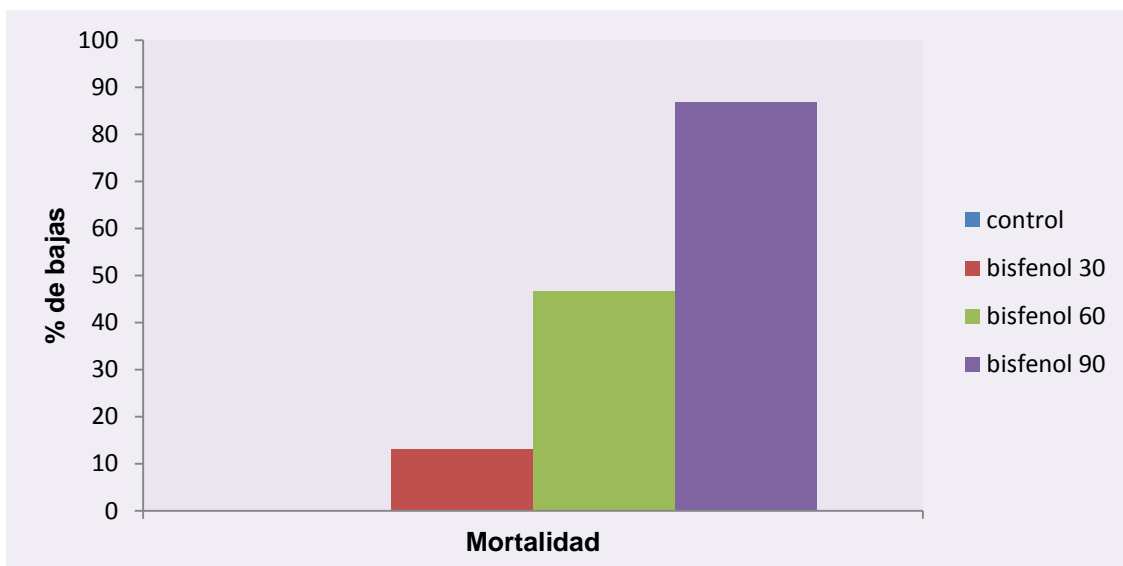


Figura 12: Porcentaje de mortalidad en las distintas concentraciones de BPA tras 24 horas

5. CONCLUSIONES

La tasa de filtración de *C. fluminea* podría ser utilizada para evaluar la potencial toxicidad de compuestos químicos emergentes.

El FLC no presenta efectos aparentes sobre la filtración ni en el estado de *C. fluminea*.

El BPA presenta un efecto negativo sobre la tasa de filtración de los ejemplares de *C. fluminea*, siendo esta mayor a concentraciones mayores.

Se cree que la exposición a BPA podría provocar la mortalidad de los individuos, observándose un mayor número de bajas en las concentraciones más altas.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE MARTÍNEZ, G. V.; DELVALLS, A. T.; MARTÍN DÍAZ, M. L. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 120: 142-154.

BAPTISTA CARREIRA DOS SANTOS H. M. *An integrative study of the effects of exposure to arsenic in Corbicula fluminea (Müller, 1744)*. Directores: Mario Emanuel Campos de Sousa Diniz; José Luis Capelo Martínez. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, Departamento de Química Física, 2012.

BARASONA CARMONA, M. I. *Estudio de los efectos del bisfenol A como disruptor endocrino en la regulación iónica en Zebrafish (Danio rerio), a través del estudio de células adenohipofisarias y branquiales*. Directoras: M^a Rosario Moyano Salvago; Ana M^a Molina López. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense. 2017.

BELTRÁN GONZÁLEZ, A.E. *Protocolo de validación para la metodología analítica del florfenicol en HPTLC*. Ociel R. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Director: Muñoz Fariña. Universidad Austral de Chile. Departamento de Ciencias Agrarias. 2012.

BOSCH, R. J.; QUIROGA, B.; MUÑOZ MORENO, C.; OLEA HERRERO, N.; ARENAS, M^a. I.; GONZÁLEZ SANTANDER, M.; REVENTÚN, P.; ZARAGOZA, C.; ARRIBA, G.; SAURA, M. El bisfenol A: un factor ambiental implicado en el daño nefrovascular. *Nefrología*, 2016, 36(1): 5-9.

BRANCO CASTRO, B.; SILVA, C.; MACÁRIO, I. P. E.; OLIVEIRA, B.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, J. L. Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Müller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology*, 2018, 196: 25-34.

DAMIA BARCELÓ, L; LÓPEZ DE ALDA, M^a. J. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes* [en línea]. Barcelona: Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC, 2008. [Consulta: 20 marzo 2019] <<http://elaguapotable.com/Contaminaci%C3%B3n%20y%20calidad%20qu%C3%ADm%20del%20agua-los%20contaminantes%20emergentes.pdf>>.

DINIZ, M. S.; SANTOS, H. M.; COSTA, PM.; PERES, I.; COSTA, M. H.; ALVES, S.; CAPELO MARTINEZ, J. L. Effects of exposure to arsenic in *Corbicula fluminea*: Evaluation of the histological, histochemical and biochemical responses. *Ciencias Marinas*, 2008, 34(3): 307-316.

ESPERANZA, M.; SEOANA, M.; RIOBOO, C.; HERRERO, C.; CID, A. *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquatic Toxicology*, 2015, 165: 64-72.

ESPINOSA PLASCENCIA, A; BERMÚDEZ ALMADA, M^a. C. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Estudios Sociales*, 2012, 2: 221-232.

FABBRI, R.; MONTAGMA, M.; BALBI, T.; RAFFO, E.; PALUMBO, F.; CANESI, L. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 2014, 99: 1-8.

GUO, X; FENG, C. Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in Surface wáter and sediment. *Science of the Total Environment*, 2018, 631-632: 56-70.

HARRIS, E. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. 2^a ed. Kidlington: Academic Press, 2009, 9780123708748.

JANET GIL, M.; SOTO, A. M.; USMA, J. I; GUTIÉRREZ, O. D. *Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. Producción + Limpia*, 2012, 7(2): 52-73.

JIMÉNEZ BRAVO, S. *Biología reproductora, desarrollo larvario y dinámica poblacional de Corbicula fluminea (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) en el río Miño (Pontevedra, España)*. Directores: M^a Ángeles Ramos Sánchez; Rafael Araujo Armero. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Zoología y Antropología Física. 2004.

JUHEL, G.; BAYENE, S.; GOH, C.; KIT LEE, W.; KELLY, B. C. Use of a suite of biomarkers to assess the effects of carbamazepine, bisphenol A, atrazine, and their mixtures on Green mussels, *Perna Viridis*. *Environmental Toxicology and Chemistr*, 2017, 36(2): 429-441.

LLANES BAEZA, C. A. Evaluación de los mejillones *Mytilopsis sallei* (Recúz) y *Brachidontes exustus* (Linné) como bioindicador de materia orgánica en la bahía de Chetumal, México. *Universidad y Ciencia*, 2002, 18(35).

LORENZO RODRIGUEZ, M^a. M. *Efectos del contaminante bisfenol A, a distintas temperaturas, sobre la microalga marina Tetraselmis suecica*. Directora: Ángeles Cid Blanco. Trabajo Fin de Grado. Universidad de A Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular. 2018.

MESTORINO, N.; DANIELE, M.; ERRECALDE, J. O. Residuos tisulares de florfenicol tras su administración oral en pollos parrilleros. *Veterinaria Cuyana*, 2011, 6: 27-33.

MILANESI CAMEJO, M^a. P. *Ensayos agudos con Erodona mactroides Bosc, 1801 (Bivavia) del Río de la Plata, Uruguay: sobrevivencia frente a cambios de salinidad y evaluación de tasas de filtración*. Director: Diego Lercari. Licenciatura en ciencias biológicas. Universidad de la República Uruguay. 2015.

OLIVEIRA, P.; ANTÃO BARBOZA, L. G.; BRANCO, V.; FIGUEIREDO, N.; CARVALHO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 164: 155-163.

PÉREZ QUINTERO, J.C. Primeros datos sobre la presencia de *Corbicula fluminea* Müller (*Bivalvia*, *Corbiculidadae*) en España. I Biometría. *Scientia*, 1990, 16(1): 175-182.

PINTO BRANDAO, F.; PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F.; NUNES, B. The Impact of Paracetamol on Selected Biomarkers of the Mollusc Species *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology*, 2014, 29(1): 74-83.

QUIÑONERO SALGADO, S.; LÓPEZ SORIANO, J. El género *Corbicula fluminea* Mühlfeld, 1811 (*Corbiculidae: Bivalvia*) en el bajo Ebro (NE de la península Ibérica). *Nemus*, 2016, 6: 9-33.

RIVAS RODRIGUEZ, S. *Biología y ecología del bivalvo invasor Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (*Mollusca, Bivalvia, Veneroidea*) en el tramo internacional del río Miño (Galicia, España). Director: Fernando Cobo Gradín. Grado de doctor en Biología. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Zoología y Antropología Física, 2013.

RIVAS, S.; VIEIRA LANERO, R.; SERVIA, M. J.; BARCA, S.; COUTO, M. T.; SÁNCHEZ, J.; SILVA, S.; GÓMEZ SANDE, P.; MORQUECHO, C.; LAGO, L.; COBO, F. *Evolución temporal, vectores y distribución de las especies exóticas dulceacuícolas de la parte española del Baixo Miño* [en línea], enero 2010, p. 20-30. [Consulta: 28 mayo 2019] <
http://www.usc.es/export9/sites/webinstitucional/gl/servizos/ehec/artigos_cientificos_pdf/Simposio_vila_nova_cerveira/01_Evolucixn_temporalx_vectores_y_distribucixn_de_las_especies_exxticas.pdf>

ROJAS ORTEGA, E. G.; ROPERO GUEVARA, R. *Evaluación de la tasa de filtración y de respiración biológica de Mytilus sallei (Recluz, 1849) (Bivalvia: Dreisiseinidae) en el acuario Mundo Marino, Rodadero, Santa Marta*. Director: Aminta Jauregui. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Departamento de Ingeniería y Recursos Naturales. 2002.

ROLDÁN-PÉREZ. G. *Los macroinvertebrados como bioindicadores de la calidad del agua: cuatro décadas de desarrollo en Colombia y Latinoamérica*. [en línea]. Colombia: Universidad Católica de Oriente, 2016. [Consulta: 20 marzo 2019] <<https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/335/208>>.

ROMERO LÓPEZ, J. *Adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos emergentes: aplicaciones*. Directores: Victoria López Rodas; Eduardo Costas Costas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Producción Animal I. 2014.

RONALDO, S.; Rufino, M.; Gaspar, M.; Antunes, C.; Guilhermino, L. Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho Estuary, Portugal. *InterScience*. 2008, 18: 98-110.

SERRANO GARCÍA, M^a. I. *Determinación de bisfenol A en agua: optimización y validación del método analítico*. Director: Ana Domínguez Vidal; M^a José Ayora Cañada. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Jaén. Departamento de Ciencias Experimentales. 2017.

TORRES MAROÑO, S. *Efecto del bisfenol A, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga marina Tetraselmis suecica*. Directora: Ángeles Cid Blanco. Trabajo Fin de Grado. Universidad de A Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular. 2015.

ZAMORA MARÍN, J. M. Establecimiento de la almeja asiática *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) en la cuenca del río Segura (SE Península Ibérica). *Ail*, 2017.

7. ANEXO

Tabla 1: Datos de concentración celular ($\times 10^6$) c/mL obtenidos en el espectrofotómetro en las diferentes réplicas con FLC a lo largo del tiempo.

tiempo	0	30	60	90	120
contaminante	[microalgas]				
control	0.3464	0	0	0	0
FLC 2'5	0.3272	0	0	0	0
FLC 5	0.4148	0	0	0	0
FLC 7'5	0.2245	0	0	0	0

Tabla 2: Datos de concentración celular ($\times 10^6$) c/mL obtenidos en el espectrofotómetro en las diferentes réplicas con BPA a lo largo del tiempo.

tiempo	0	30	60	90	120
contaminante	[microalgas]				
control	0.2245	0.0321	0.0342	0	0
BPA 30	0.5175	0.5025	0.4854	0.3934	0.3763
BPA 60	0.5431	0.5474	0.5217	0.5303	0.5367
BPA 90	0.5838	0.5239	0.5303	0.5004	0.5153

Tabla 3: Datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro en las diferentes réplicas con FLC a lo largo del tiempo.

Tiempo	0	30	60	90	120
Cont	Absorbancia				
control	0.054	0.001	0	0	0
FLC 2'5	0.051	0	0	0	0
FLC 5	0.065	0	0	0	0
FLC 7'5	0.035	0	0	0	0

Tabla 4: Datos de absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro en las diferentes réplicas con BPA a lo largo del tiempo.

Tiempo	0	30	60	90	120
Cont	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Control	0.035	0.005	0.005	0	0
BPA 30	0.081	0.078	0.076	0.061	0.059
BPA 60	0.085	0.085	0.081	0.083	0.084
BPA 90	0.091	0.082	0.083	0.078	0.08

Tabla 5: porcentaje eliminación de microalgas en las diferentes muestras con BPA a lo largo del tiempo.

Tiempo	0	30	60	90	120
Cont.	% eliminado				
Control	55	93	94	100	0
BPA30	0	0	3	21	75
BPA60	0	0	0	0	0
BPA 90	0	0	0	0	0

Tabla 6: Tasa de eliminación máxima per cápita (mL/min/almeja) de las microalgas en las diferentes muestras con BPA a lo largo del tiempo.

Tiempo	0	30	60	90	120
Cont.	Tasa eliminación máx. per cápita				
Control	0.80	0.63	0.01	0	0
BPA30	0.00	0	0	0	0
BPA60	0.00	0	0	0	0
BPA90	0.00	0	0	0	0