

Jornada Técnica sobre Efectos de los Contaminantes en los Recursos Pesqueros y Marisqueros del Litoral Andaluz: Nuevas Metodologías Analíticas



Consejería de Agricultura y Pesca

**Jornada Técnica sobre
Efectos de los Contaminantes
en los Recursos Pesqueros y
Marisqueros del Litoral Andaluz:
Nuevas Metodologías Analíticas**

**Jornada Técnica sobre
Efectos de los Contaminantes en los Recursos Pesqueros y Marisqueros del
Litoral Andaluz: Nuevas Metodologías Analíticas**

© *Edita:* JUNTA DE ANDALUCÍA. **Consejería de Agricultura y Pesca**

© *Textos:* Varios.

Publica: Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación

Coordinadores: López Barea J., Gómez Ariza J.L. y Manzano Harriero C.

Colección: Congresos y Jornadas

Serie: Recursos Pesqueros

I.S.B.N.: 84-8474-053-6

Déposito Legal: SE-3088-2002

Maquetación e Impresión: Ideas Exclusivas y Publicidad

Jornada Técnica sobre Efectos de los Contaminantes en los Recursos Pesqueros y Marisqueros del Litoral Andaluz: Nuevas Metodologías Analíticas

Sevilla, 16 de Enero de 2001

Consejería de Agricultura y Pesca
Junta de Andalucía

Presentación

La realización de estudios sobre las perturbaciones ambientales que se producen en los caladeros y sus causas, constituye una de las principales iniciativas propugnadas por el Programa de Investigación del Plan de Modernización del Sector Pesquero Andaluz, documento que recoge un análisis y diagnóstico de la política pesquera a corto, medio y largo plazo.

Tanto la naturaleza de los recursos biológicos objetos de la actividad extractiva y de la comercialización pesquera, como el propio desarrollo de la acuicultura, muy sensible a la presión y degradación ambiental, hacen necesario impulsar la investigación sobre la contaminación marina y sobre la consiguiente negativa que aquella pueda ejercer sobre los recursos pesqueros y acuícolas.

El propio Plan de Modernización entiende que la realización de estos estudios permite prevenir los riesgos medioambientales y abordar la corrección de las perturbaciones producidas en el medio. Además, dichas medidas contribuyen a determinar las bases para la recuperación de las zonas afectadas y a mejorar la capacidad de predicción de impactos ambientales sobre los stocks.

En este contexto, la Consejería de Agricultura y Pesca viene llevando a cabo múltiples y diversas acciones de investigación pesquera y acuícola integradas en el Plan de Modernización del Sector Pesquero Andaluz, coordinadas a su vez con el Plan Andaluz de Investigación. En este programa los dos Centros de Investigación y Cultivo de Especies Marinas dependientes de la propia Consejería ocupan un lugar muy destacado, además de las Universidades andaluzas y otros organismos de investigación.

Precisamente, la Consejería de Agricultura y Pesca suscribió en 1999 un convenio tripartito con las Universidades de Huelva y Córdoba para la realización de dos estudios acerca de los efectos de contaminantes sobre los recursos pesqueros del litoral de Andalucía. Uno de los objetivos principales es evaluar los efectos de la contaminación sobre los recursos marisqueros y pesqueros, comparando técnicas convencionales de análisis con nuevas metodologías, desarrollando nuevos biomarcadores moleculares y evaluando su respuesta a la contaminación de litoral andaluz. Estas instituciones organizaron en enero de 2001, en Sevilla, la celebración de la *Jornada Técnica sobre Efectos de los Contaminantes en los Recursos Pesqueros y Marisqueros del Litoral Andaluz: Nuevas Metodologías Analíticas*, cuyos interesantes resultados hemos querido recoger en esta publicación. Los trabajos presentados muestran, además, la cooperación y el esfuerzo conjunto y continuando de las distintas entidades y laboratorios, para el control y seguimiento de la incidencia de la contaminación litoral y sus potenciales efectos sobre los recursos pesqueros, a fin de establecer las bases científicas y técnicas para la disminución de dicha incidencia.

A todos los participantes, mi reconocimiento y el ofrecimiento de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía para seguir avanzando en el tan necesario camino de la investigación, como herramienta decisiva para la defensa de nuestros recursos pesqueros.

Paulino Plata Cánovas
Consejero de Agricultura y Pesca

Prefacio

La actividad pesquera, de indudable significación social y económica en el ámbito de la franja litoral, se sustenta en la explotación de recursos naturales renovables, por lo que la investigación tiene una indudable importancia en su ordenación y planificación, como así queda recogido en el Plan de Modernización del Sector Pesquero Andaluz.

En este plan, establecido por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía como herramienta esencial de planificación de la pesca andaluza para el periodo 1997-2003, se resalta la importancia que tiene la investigación científica y técnica en dicho proceso de modernización y racionalización, proponiendo, además de un plan específico de investigación sobre acuicultura marina, la puesta en marcha de un Programa general de Investigación sobre recursos, estructuras, industrias y mercados. En su conjunto, este programa operativo tiene los objetivos de recabar datos básicos y fiables sobre todos los asuntos relacionados con la actividad pesquera transferrir los resultados de los programas de investigación científica y desarrollo tecnológico a todos los agentes públicos y privados del sector pesquero andaluz.

Dentro de las medidas para contribuir a fundamentar la política pesquera andaluza, a corto, medio y largo plazo, planificando actividad de la pesca y la acuicultura en Andalucía, una de las principales iniciativas propugnadas por el Programa de Investigación del Plan de Modernización del Sector Pesquero Andaluz (como referente de las actuaciones de la Administración Autónoma andaluza en el sector pesquero durante el periodo 1997-2003), es la realización de estudios sobre las perturbaciones ambientales que se producen en los caladeros y sus causas incluyendo investigaciones conjuntas de las distintas Administraciones sobre los siguientes aspectos:

- Estudios sobre sistemas de control, alerta y vigilancia medioambiental.
- Estudios acerca de la presencia y riesgos de contaminación y medidas correctoras.
- Estudios sobre el impacto ambiental de las extracciones de arena para la regeneración de playas.
- Estudios sobre la regeneración de zonas dañadas de alto interés pesquero.
- Estudios sobre financiación de los proyectos de empresas ubicadas en el litoral andaluz que pretendan la modernización de los procesos de gestión de residuos.
- Determinación de índices de contaminación de aquellas zonas en las que se ejerce la actividad extractiva que se ven sometidas a alto riesgo medioambiental, por causas naturales o bien por causas antropogénicas.

El propio Plan de Modernización, en relación con sus objetivos, entiende que la realización de estos estudios permitirá prevenir los riesgos medioambientales y abordar la corrección de las perturbaciones producidas en el medio. Además, dichas medidas contribuirían a determinar las bases para la recuperación de las zonas afectadas y mejorar la capacidad de predicción de impactos ambientales sobre los stocks.

En este contexto, la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía viene preocupándose por la realización de estudios acerca de los efectos de la contaminación litoral sobre los recursos pesqueros y marisqueros y apoyando el desarrollo de métodos para su seguimiento y evaluación. Esta preocupación se ha concretado principalmente a través de su intervención en el Programa de control y seguimiento de zonas de

producción de moluscos bivalvos, que tiene como objetivo el cumplimiento de la obligatoriedad de realizar un control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las distintas zonas de moluscos bivalvos establecidos por la ley en el litoral andaluz.

Asumiendo como prioritarios estos objetivos de Plan de Modernización, desde su aprobación, la Consejería de Agricultura y Pesca viene llevando a cabo, múltiples y diversas acciones de investigación pesquera y acuícola integradas en el citado plan, intervenciones que enmarcan, a su vez, en un programa de actuaciones coordinado en el Plan Andaluz de Investigación. En este programa los dos Centros de Investigación y Cultivo de Especies Marinas dependientes de la propia Consejería ocupan un lugar muy destacado, además de las Universidades andaluzas y otros organismos o entidades dedicadas a la investigación e innovación tecnológica, que cooperan en distintas iniciativas de investigación y desarrollo pesquero y acuícola.

Las actuaciones que realiza la Consejería de Agricultura y Pesca en materia de investigación pesquera y acuícola se centran en tres campos o áreas fundamentales. Además de las áreas de Recursos Pesqueros y Acuicultura, en él área específica de Control de la Producción y la Calidad se efectúan controles sobre la calidad del medio marino, evaluando la incidencia de los distintos contaminantes y patologías sobre los recursos pesqueros y acuícolas, así como diversos estudios para mejorar la calidad y garantizar la identificación de los productos de la pesca y acuicultura andaluza.

Actualmente, el control de la calidad es una de las preocupaciones básicas en la producción y gestión de los recursos marinos y acuícolas. Su efectividad, depende de la actuación a tres niveles distintos. No cabe duda que el primer nivel es el medio marino, ya que el control de la calidad del agua y de las zonas donde habitan los seres vivos es fundamental para garantizar la calidad de los productos que llegan al consumidor.

En lo que se refiere al estudio del medio marino debe señalarse que el control de la calidad de los productos pesqueros y acuícolas pasa por un estricto control de las condiciones del medio donde éstos habitan. En este sentido, como se ha señalado anteriormente, la Consejería de Agricultura y Pesca lleva a cabo un exhaustivo Programa de control y seguimiento de las condiciones sanitarias de las Zonas de Producción de Moluscos Bivalvos del litoral andaluz, establecido en la Orden de la Consejería de Agricultura y Pesca de 15 de julio de 1993, basado en el análisis periódico de diversos parámetros tanto el agua como de las especies objeto de pesca.

Respecto al citado programa de control y seguimiento de zonas de producción del litoral, debe destacarse que la Junta de Andalucía cuenta con competencias exclusivas en materia de marisqueo, y dentro de las mismas corresponde a la Consejería de Agricultura y Pesca efectuar el control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción de moluscos bivalvos, que se establece en la Directiva de Consejo 91/492/CEE, de 15 de julio de 1991, por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos, mientras que la Consejería de Salud desarrolla un "Programa de vigilancia y control higiénico-sanitario" en las lonjas y centros de depuración, expedición y transformación.

En esta dirección, se declararon las zonas de producción y protección o mejora de moluscos bivalvos, moluscos gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos de la Comunidad Autónoma de Andalucía, la cual ha sido modificada en varias ocasiones, la última de ellas en diciembre de 1998, en lo relativo a la relación de zonas de producción. Esta última modificación va en la dirección de aumentar el número de zonas de

producción, disminuyendo su tamaño, sin que suponga un incremento excesivo en el coste de control, habiendo pasado de 30 zonas en el año 1993 a las 44 actuales, de las cuales 33 están clasificadas como tipo A y las 11 restantes como tipo B.

En Andalucía, la práctica totalidad de la producción marisquera proviene de los bancos naturales que se distribuyen por todo el litoral, de donde es extraída por la flota de rastro remolcado, teniendo una importancia más reducida el marisqueo a pie y la acuicultura. La especie principal en valor de la producción es la chirla (*Chamelea gallina*), seguida del corruco (*Acanthocardia tuberculata*), la coquina (*Donax trunculus*), la almeja chocha (*Venerupis rhomboides*), la concha fina (*Callista chione*) y la vieira (*Pecten maximus*).

En relación con dicho programa de control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción de moluscos bivalvos debe reseñarse que, tras inicio, a través de los trabajos de seguimiento de las áreas marisqueras desarrolladas anteriormente por los CICEMS dependientes de la Consejería, a partir de 1996 se habilitó un laboratorio al efecto, ubicado en le CICEM "Agua del Pino" en Huelva, encomendándole la ejecución del programa a la Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía, S.A. (D-a-p).

Igualmente, cabe destacarse que dicho programa de vigilancia consta tanto de un muestreo de control como un muestreo de las zonas de producción:

- *Muestreo de control*: incluye muestreos del agua marina, para vigilar la variación del plancton tóxico y las condiciones oceanográficas, en la zona, así como sobre los moluscos, en los que se controla la posible contaminación por biotoxinas (PSP, DSP y ASP). En cada punto de muestreo se extrae una muestra de agua y/o de la especie indicadora con una prioridad quincenal, mensual o trimestral, dependiendo de la zona.

En los muestreos que implican recogida de moluscos se utilizan embarcaciones marisqueras de la zona, incluidas en el censo de la flota y provistas de los artes habituales en la misma. Existen cuatro equipos de muestreo, que se distribuyen a lo largo de las 44 zonas de producción. El transporte de la muestra hasta el laboratorio se lleva a cabo en caja especiales, provistas de acumuladores de frío, lo que garantiza un adecuada conservación.

Entre las medidas *in situ* y los controles analíticos, de laboratorio se obtiene información sobre los siguientes parámetros:

- Muestras de agua: turbidez, temperatura, salinidad, nutrientes (amonio, nitritos, nitratos, fosfatos y silicatos), fitoplancton tóxico, fitoplancton acompañante y microbiología (coliformes fecales).
 - Muestras de moluscos: Biotoxinas (PSP, DSP, ASP) microbiología (coliformes fecales, *Salmonella sp.* y *E. coli*) y química (metales pesados, radionucleidos, organohalogenados).
- *Muestreo intensivo*: se lleva a cabo en los puntos de muestreo de cualquier zona de producción en la que se detecten, en el muestro de control, valores de algún parámetro por encima de los admisibles. En este muestreo se incrementan las especies de moluscos controladas, así como la frecuencia y el número de puntos de muestreo.

Por otro lado, en estrecha colaboración con distintos laboratorios y centros universitarios, por parte de la Consejería también se realizan sobre los efectos de los con-

taminantes sobre los organismos marinos y nuevas formas de detección de los mismos, así como diversos ensayos de detoxificación en especies afectadas por procesos contaminantes. Estos estudios tienen como objetivo aportar una información básica a tener en cuenta a la hora de establecer nuevas áreas de cultivos marinos, tanto a mar abierto como en zonas litorales, además de garantizar la calidad de los productos pesqueros y acuícolas, ya que en unos mercados cada vez más competitivos, la viabilidad de la pesca y la acuicultura andaluza pasa indefectiblemente por una decidida apuesta por la calidad de productos. Sin embargo, aunque la protección del medio marino sea una necesidad manifiesta y reconocida por todos, igualmente es evidente que la contaminación del mar continúa de forma progresiva, y este proceso solamente puede ser minimizado mediante la decidida actuación de las Administraciones y la colaboración de todos.

En esta dirección, la Consejería de Agricultura y Pesca suscribió en 1999 un convenio tripartito con las Universidades de Huelva y Córdoba para la realización de dos estudios acerca de los efectos de contaminantes sobre los recursos pesqueros del litoral de Andalucía.

En el primero de ellos, denominado *Efectos del Accidente de Aznalcóllar sobre los Recursos Pesqueros del Estuario del Guadalquivir*, financiado por la Consejería de Agricultura y Pesca, el objetivo general es el investigar los posibles efectos sobre algunas especies pesqueras representativas del estuario del Guadalquivir de los contaminantes liberados por la presa de Aznalcóllar, para esclarecer su persistencia y sus efectos sobre otros componentes de las cadenas tróficas. El estudio se consideraba más allá de una mera evaluación medioambiental, por lo que se centra en especies que tienen un marcado interés comercial, formando parte de pesquerías, o en reconocida explotación acuícola.

Cabe destacar que este estudio se plantea los siguientes objetivos concretos:

- i) Distribución de los contaminantes en especies químicas de diferente potencial tóxico en especies pesqueras del estuario del Guadalquivir.
- ii) Efectos biológicos de los contaminantes sobre distintas especies pesqueras del estuario.

Se han seleccionado cuatro especies presentes en el último tramo del Guadalquivir.

- Se estudian dos moluscos bivalvos, chirla (*Ch. gallina*) y coquina de fango (*Scrobicularia plana*), bien representados en la zona y que además permiten realizar experimentos de transplante para investigar la velocidad de captación y eliminación de contaminantes.
- Además pretende estudiar un crustáceo, el camarón (*Palaemonetes varians*), que se sitúa en la base de la cadena trófica y, además, dada su importancia socioeconómica en la zona afectada, por lo que los efectos del vertido sobre esta especie podrían magnificarse al bioacumularse en las especies que se alimentan de ella.
- De todas las peces presentes en la zona afectada, se ha escogido el lenguado (*Solea senegalensis*), cuya escasa movilidad, vida bentónica y hábitos alimenticios le hacen mucho más sensible a la posible contaminación de la zona de estudio por distintos compuestos de metales pesados.

La distribución de los contaminantes en distintas especies químicas y sus efectos biológicos se estudiarán con dos tipos de aproximaciones:

- i) Variación temporal (una vez al mes) de los parámetros estudiados en las especies seleccionadas del estuario (chirla, coquina de fango, camarón y lenguado), en comparación con las mismas especies en zonas de referencia.
- ii) Experimentos de trasplantes. Ejemplares de las especies señaladas, procedentes de zonas de referencia, se trasplantan a puntos del estuario, para estudiar la evolución de los distintos parámetros analizados tras exponerlos *in situ* a los contaminantes del vertido.

Por otro lado, respecto a la especiación de contaminantes, aunque ya se han realizado estudios sobre la composición química de los vertidos de Aznalcóllar y la evolución de tales contaminantes en aguas y animales expuestos a ellas, aún no se ha estudiado exhaustivamente su distribución entre distintas especies químicas. Conviene señalar que tales estudios poseen importantes repercusiones socioeconómicas y para la salud pública, dada las extraordinarias diferencias que hay entre la toxicidad de distintas especies químicas. El presente estudio examina la especiación de varios metales presentes en el vertido, como As, Se, Hg y Sb.

Con respecto al segundo estudio, denominado *Efectos de la Contaminación sobre los Recursos Marisqueros del Litoral Andaluz: Desarrollo de Nuevas Metodologías Analíticas*, cofinanciado con Fondos Feder asignados a las Universidades de Córdoba y Huelva (convocatoria Regiones Objetivos 1 y 2), el proyecto se propone alcanzar los siguientes objetivos:

- i) Evaluación inicial de la contaminación en zonas de producción, examinando contaminantes requeridos por las legislaciones actuales española y europea y otros que las técnicas de análisis actuales permiten estimar.
- ii) Evaluar los efectos de la contaminación sobre los recursos marisqueros, comparando técnicas convencionales de análisis con nuevas metodologías más sensibles ya desarrolladas y de validez demostrada.
- iii) Desarrollar nuevos biomarcadores moleculares y evaluar su respuesta a la contaminación del litoral andaluz, para proponer el uso rutinario de los que resulten más eficientes.
- iv) Desarrollar nuevos procedimientos analíticos para tratamiento de las muestras, extracción y especiación de los contaminantes presentes en ellas.
- v) Estudiar las cinéticas de acumulación y eliminación de contaminantes modelo en moluscos comerciales mediante experimentos en condiciones controladas, que calibren las respuestas de los biomarcadores a episodios de contaminación.
- vi) Desarrollar nuevos métodos de extracción, determinación y especiación de contaminantes que contengan arsénico y selenio.
- vii) Seguimiento estacional de la contaminación en zonas del litoral andaluz usando las nuevas metodologías y protocolos desarrollados en el proyecto.
- viii) Evaluación de los resultados para proponer nuevos protocolos para la evaluación y el seguimiento de la contaminación litoral y sus repercusiones pesqueras y marisqueras. La aplicación de los nuevos biomarcadores y métodos de evaluación de contaminantes que se desarrollarán en el presente proyecto convertirán a los Centros participantes en laboratorios de referencia en cuanto a la contaminación de moluscos bivalvos.

A los efectos de control se están estudiando zonas de producción de bivalvos que pueden verse afectadas por contaminantes ambientales. El litoral de Huelva recibe de

los ríos Oriel y Tinto metales derivados de la minería y plaguicidas de la agricultura intensiva desarrolladas en esa zona. La desembocadura del Guadalquivir también contiene metales, plaguicidas y contaminantes orgánicos, debido a la gran superficie drenada por este río en cuya cuenca se asientan importantes ciudades, se desarrolla intensa actividad agrícola con amplio uso de agroquímicos, y cuenta además con un importante tejido industrial y otros sectores que podrían provocar incidentes medioambientales muy importantes. El litoral oriental de Almería presenta ciertos metales -Cd, Pb-, quizás debido a una pasada actividad minera, y podría verse afectado en un futuro medio por el uso masivo de plaguicidas en una zona de actividad agrícola intensiva.

Las tres áreas mencionadas cuentan con un bivalvo bioindicador, la chirla (*Ch. gallina*). En las mismas zonas se muestran además otros bivalvos -berberecho (*Cerastoderma edule*), coquina (*Donax spp.*) y coquina de fango (*S. plana*), lo que permitirá realizar comparaciones entre distintas especies.

Para una evaluación global de los contaminantes se muestrean diversos puntos de los litorales de Huelva, Cádiz, Málaga y Almería en los que se miden los contenidos de distintos metales, compuestos organoestánicos, hidrocarburos, PCBs y plaguicidas organoclorados, en aguas, sedimentos y bivalvos.

En paralelo se determinan los contenidos de contaminantes en tejidos de animales y los biomarcadores moleculares de contaminación, comparando la validez de ambos parámetros. Los contaminantes se analizan midiendo en bivalvos los siguientes compuestos:

- i) Metales: se analizan los niveles de Cu, Cd, Pb, Hg y Cr, se determinan los organoestánicos y arsenicales y la distribución de metales entre sus diferentes especies químicas.
- ii) Plaguicidas: se analizarán los niveles de p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, lindano (g-HCH) y hexaclorobenceno (HCB), indicadores de contaminación por compuesto agroquímicos.
- iii) PCBs: se analizarán los siguientes: 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180, presentes todos en el Aroclor 1254, quizás la mezcla más usada con fines industriales.
- iv) PAHs: se analizarán los más usados como indicadores de contaminación: fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno y benzo(g,h,i)perileno.

También se estudia la respuesta de biomarcadores de contaminación ya establecidos, para lo cual se aplicarán a la chirla como biomarcadores:

- actividades de determinadas enzimas antioxidativas y detoxificadoras.
- análisis de daños oxidativos en biomoléculas.
- la activación de arilaminas.
- análisis del contenido de metalotioneínas.

Además se ensayan otros biomarcadores. Los efectos bioquímicos de los organo-Sn se evaluarán midiendo la inhibición de la colina-acetil transferencia y la liberación de los neurotransmisores inhibitorios. Los efectos bioquímicos de los organo-As se evaluarán midiendo la inhibición de las actividades lipoamida deshidrogenasa y glutatión reductasa, y el contenido de GSH.

A fin de presentar los resultados preliminares obtenidos en la primera fase del mencionado Convenio entre la Consejería de Agricultura y Pesca y las Universidades de Córdoba y Huelva, las entidades cooperantes decidieron la celebración de una Jornada Técnica sobre Efectos de los Contaminantes en los Recursos Pesqueros y Marisqueros del

Litoral Andaluz: Nuevas Metodologías Analíticas, que se celebraría el 16 de enero de 2001 en la sede de la Consejería de Agricultura y Pesca (C/. Tabladilla, s/n) en Sevilla.

La Jornada se planteaba los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar en las zonas de producción estudiadas los contaminantes detectados con protocolos usados rutinariamente (D.a.p.) o bien establecidos (UHU), con las respuestas de biomarcadores moleculares de contaminación ya validados.
2. Presentar datos de exposición a contaminantes modelo [Cu(II) y PCBs] para su evaluación y toma de decisiones sobre su diseño experimental.
3. Mostrar los desarrollos de nuevos procedimientos analíticos y biomarcadores moleculares de contaminación ambiental realizados hasta la fecha.
4. Presentar resultados sobre posibles efectos de los contaminantes del vertido tóxico de Aznalcóllar en especies de interés pesquero.
5. Elaborar conclusiones sobre la marcha de los proyectos del Convenio.

Con el ánimo de hacer públicas las actuaciones y resultados expuestos en aquella Jornada Técnica, se ha elaborado y editado esta publicación, donde se ofrece la panorámica y el resumen de los distintos estudios y proyectos emprendidos por las entidades participantes en el convenio, presentados en aquella reunión por los investigadores que se indican en el programa de la jornada, que permitan apreciar los objetivos, contenidos y principales resultados de los estudios y trabajos técnicos llevados a cabo, así como las técnicas y procedimientos empleados en los estudios.

Además, con presentación de los informes técnicos elaborados, pretendemos exponer la problemática que se manifiesta en relación con algunos de los principales contaminantes presentes en el mar, al tiempo que sirva para contribuir a la consolidación de la conciencia sobre la preocupante situación que puede suponer una potencial contaminación de las aguas litorales en relación con la producción y calidad de las especies de interés pesquero y acuícola.

LOS COORDINADORES:

Juan López Barea, Universidad de Córdoba.

José Luis Gómez Ariza, Universidad de Huelva.

J. Carlos Manzano Harriero, Consejería de
Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.

JORNADA TÉCNICA

EFFECTOS DE LOS CONTAMINANTES EN LOS RECURSOS PESQUEROS Y MARISQUEROS DEL LITORAL ANDALUZ

Salón de Actos, Consejería de Agricultura y Pesca
Calle Tabladilla, s/n, Sevilla

16 de enero de 2001

PROGRAMA DE LA JORNADA

Presentación

10,00 h. *Dres. Juan López Barea y José Luis Gómez Ariza*. Efectos de la contaminación en los recursos pesqueros y marisqueros del litoral andaluz. Cooperación entre la CAP, las Universidades de Córdoba y Huelva y la empresa D.a.p.

Niveles de contaminantes en las zonas estudiadas

Moderador Dr. Gómez Ariza

- 10,30 h. *Teresa García de Acuña* (D.a.p.). Contaminación por metales pesados, PCBs, plaguicidas organoclorados y radionúclidos usando protocolos establecidos.
- 10,45 h. *Mercedes Gallego Gallegos* (UHU). Contaminación de metales detectados por técnicas atómicas.
- 11,00 h. *Francisca Mingorance* (UHU). Contaminación por compuestos organoestánicos.
- 11:15 h. *Jesús Calañas Contiente* (UH). Contaminación por compuestos organoarsenicales.
- 11,30 h. Descanso y café

Biomarcadores de contaminación ya establecidos

Moderador Dr. López Barea

- 12,00 h. *Manuel Rodríguez Ortega* (UCO). Enzimas biotransformadoras, antioxidativas y peroxidación lipídica en chirlas (*Chamelea gallina*).
- 12,15 h. *Dr. José Alhama Carmona* (UCO). Cambios en los niveles de glutatión y su estado redox intracelular (*C. gallina*).
- 12,30 h. *Vitoria Funes Luque* (UCO). Detección de metalotioneínas tras desnaturalización y titulación con DTNB (*C. gallina*).

Exposición de chirlas (*C. gallina*) a contaminantes

Moderador Dr. López Barea

- 12,45 h. *Oscar Amezcua Rodríguez* (CICEM El Toruño/D.a.p.) Diseño experimental y datos biométricos del experimento de exposición a Aroclor 1254 y Cu(II).
- 13,00 h. *José Luis Marengo Sierra* (CICEM El Toruño) Cinéticas de acumulación y eliminación de Aroclor 1254 y Cu (II)
- 13,15 h. *Dr. Antonio Rodríguez Ariza* (UCO). Respuesta de biomarcadores moleculares de contaminación en experimentos a largo y corto plazo.

13,30 h. Discusión de las sesiones anteriores.

14,00 h. Almuerzo

Nuevos desarrollos analíticos y biomarcadores moleculares

Moderador Dr. Gómez Ariza

- 16,00 h. *Manuel Bujalance Arenas* (UHU). Desarrollo de nuevos procedimientos para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras de bivalvos.
- 16,15 h. *Dra. Inmaculada Giráldez* (UHU). Problemas asociados con la evaluación ambiental de los compuestos organoestánicos.
- 16,30 h. *Marco Caro de la Torre* (UHU). Especiación simultánea de compuestos de selenio polares y no polares mediante acoplamiento de columna ("column switching") y detección mediante AFS.
- 16,45 h. *Dr. Daniel Sánchez Rodas* (UHU). Avances en el procedimiento de especiación de arsénico.
- 17,00 h. *Dr. Alfredo Velasco Arjona* (UHU). Determinación de especies volátiles de selenio (dimetilselenio, dimetildiselenio, dietilselenio) en sedimentos mediante pervaporación y determinación por GC-MS.
- 17,15 h. *Dr. Gabriel Dorado Pérez* (UCO). Aislamiento de secuencias de DNA que codifican metalotioneínas en distintas especies de bivalvos.

Contaminación en las zonas estudiadas del Estuario del Guadalquivir

Moderador Dr. López Barea

- 17,30 h. *Antonio Romero Ruiz* (UCO). Respuesta de biomarcadores moleculares en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir. Niveles de distintos biomarcadores en zonas del estuario y control.

17,45 Descanso y café

18,15 Conclusiones y perspectivas

EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN EN LOS RECURSOS PESQUEROS Y MARISQUEROS DEL LITORAL ANDALUZ. COOPERACIÓN ENTRE LA CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA, LAS UNIVERSIDADES DE CÓRDOBA Y HUELVA Y LA EMPRESA D.A.P.

Juan López Barea¹ y José Luis Gómez Ariza²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, km. 396-a. 14071 CÓRDOBA

²Departamento de Química y Ciencias de los Materiales, Universidad de Huelva.
Campus de la Rábida, Carretera de Palos de la Frontera s/n, La Rábida, 21071 HUELVA

Al abrir esta Jornada queremos agradecer su presencia a D^a María Dolores Atienza, Directora General de Pesca de la Consejería de Agricultura y Pesca y daros la bienvenida a la Jornada Técnica sobre Efectos de los Contaminantes en los Recursos Pesqueros y Marisqueiros del Litoral Andaluz: Nuevas Metodologías Analíticas. Se trata de una reunión de trabajo donde los científicos que participamos en un proyecto FEDER y un convenio relacionado entre la Consejería y las Universidades de Córdoba y Huelva presentaremos y discutiremos los resultados obtenidos en ellos para sacar conclusiones sobre su presente y futuro. Ahora, José Luis y yo explicaremos brevemente la estructura y objetivos de ambos proyectos.

En Septiembre de 1997, iniciamos la preparación de un proyecto en el que se relacionaban dos temas que no suelen abordarse de forma integrada, como son la Pesca y el Medio Ambiente, con vistas a la convocatoria de proyectos cofinanciados con fondos FEDER, a punto de abrirse en aquel momento. En primer lugar, nos dirigimos a la Dirección General de Pesca para conocer su disposición ante tal proyecto. Muy pronto, la DGP nos mostró un gran interés en participar en el mismo, concretándose la participación de la Consejería a través del CICEM "El Toruño" del Puerto de Santa María (Cádiz).

Tras contactar con diversas industrias y empresas acuícolas andaluzas, con resultados escasos ante su preocupación fundamental por la resolución de problemas técnicos de forma inmediata, en Enero de 1998 la Empresa para el Desarrollo Agrario y Pesquero (D.a.p.) se interesó en el proyecto mencionado arriba y comenzamos su concepción y redacción de forma conjunta. El proyecto titulado "Efectos de la contaminación en los recursos marisqueiros del litoral andaluz: desarrollo de nuevas metodologías analíticas", cuyos principales datos se recogen en la Figura 1, se presentó en Mayo de 1998, fue aprobado por la CAICYT en Noviembre del mismo año, y comenzó a funcionar en Enero de 1999.

Figura 1. Principales datos del proyecto FEDER 1FD97-0610.

PROYECTO FEDER 1FD97-0610			
Efectos de la contaminación sobre los recursos marisqueros del litoral andaluz: desarrollo de nuevas metodologías analíticas			
Sometido		Mayo de 1998	
Aprobado por la CICYT		Noviembre de 1998	
Comienzo		Enero de 1999	
Entidad	Universidad de Huelva	Universidad de Córdoba CICEM El Toruño	D.a.p.
Mptas	30.795	57.340	31.024

La Figura 2 resume los principales objetivos planteados en el proyecto FEDER. Se evaluarán los contaminantes exigidos por la legislación vigente, pasando al desarrollo de nuevos métodos de extracción y tratamiento de muestras y nuevos métodos analíticos. Los análisis de contaminantes se compararán con los resultados obtenidos con biomarcadores bien establecidos y con nuevos biomarcadores de contaminación. En exposición en condiciones controladas se estudiará la acumulación y eliminación de contaminantes modelo. Se seguirá estacionalmente la contaminación y sus efectos biológicos, y, de haber lugar, se propondrán nuevos protocolos para el seguimiento y control de la contaminación ambiental.

Figura 2. Principales datos del proyecto FEDER 1FD97-0610.

PROYECTO FEDER
<ol style="list-style-type: none"> 1. Evaluar los contaminantes de las zonas de producción exigidos ya y los detectables con nuevas técnicas. 2. Nuevos métodos de tratamiento de muestras y de extracción y especiación de contaminantes. 3. Nuevos métodos analíticos para contaminantes con As y Se. 4. Comparar análisis convencionales de contaminantes y sus efectos biológicos con biomarcadores ya establecidos. 5. Nuevos biomarcadores moleculares de contaminación. 6. Cinéticas de acumulación de contaminantes modelo en exposiciones controladas. 7. Seguimiento estacional de la contaminación con los nuevos métodos y protocolos desarrollados. 8. Proponer nuevos protocolos para la contaminación litoral.

La organización del proyecto FEDER y las interacciones que se han establecido entre sus distintos participantes se muestran en la Figura 3. La empresa D.a.p., se encarga de tomar, distribuir y analizar las muestras usando los protocolos ya establecidos para el seguimiento de las zonas de producción de moluscos bivalvos del litoral andaluz. La Universidad de Huelva, se encarga de los nuevos desarrollos analíticos para el seguimiento de la contaminación litoral y la Universidad de Córdoba aplica los biomarcadores de contaminación ya establecidos y desarrolla otros nuevos. Por último, el CICEM El Toruño realiza los experimentos de exposición de bivalvos en condiciones controladas a contaminantes modelo y algunos análisis de contaminantes. A continuación pasaremos brevemente revista al papel de los grupos de las Universidades de Huelva y Córdoba al proyecto FEDER.

Figura 3. Organización del proyecto FEDER, principales tareas de los participantes e interacción entre ellos.



Los trabajos del grupo de Huelva se centran en bivalvos, en especial chirla (*Chamaelea gallina*), aunque se evalúa también los contaminantes en berberecho (*Cerastoderma edule*), coquina (*Donax spp.*) y coquina de fango (*Scrobicularia plana*). En los trasplantes a PIS-TRESA (Sanlúcar de Barrameda, Cádiz) se han estudiado también lenguado (*Solea senegalensis*) y camarón (*Palaemonetes varians*). Sobre todo se analizan metales pesados, contaminantes típicos de la costa de Huelva, presentes en el Estuario del Guadalquivir antes y después vertido de Aznalcóllar. Se han considerado los niveles totales de Cu, Ni, Zn, Cr, Pb, As, Cd, Mn, Fe, y sus formas químicas en matrices medioambientales (especiación), para conocer su biodisponibilidad y toxicidad. Así, el As inorgánico, As(III) o As(V), es muy tóxico, pero al metilarse en seres vivos, y entrar en las vías metabólicas como arseno-azúcares y arseno-betaina, se convierte en especies casi inocuas, como muestra la Figura 4.

De manera análoga, el Se(IV) y Se(VI), muy tóxico, es mucho más tolerable en forma de seleno-aminoácidos como seleno-metionina o la seleno-cisteína. En otros casos la toxicidad aumenta con el metabolismo, como ocurre con el estaño que en forma de tributil-estaño.

Figura 4. Biotransformación del As en medio marino.

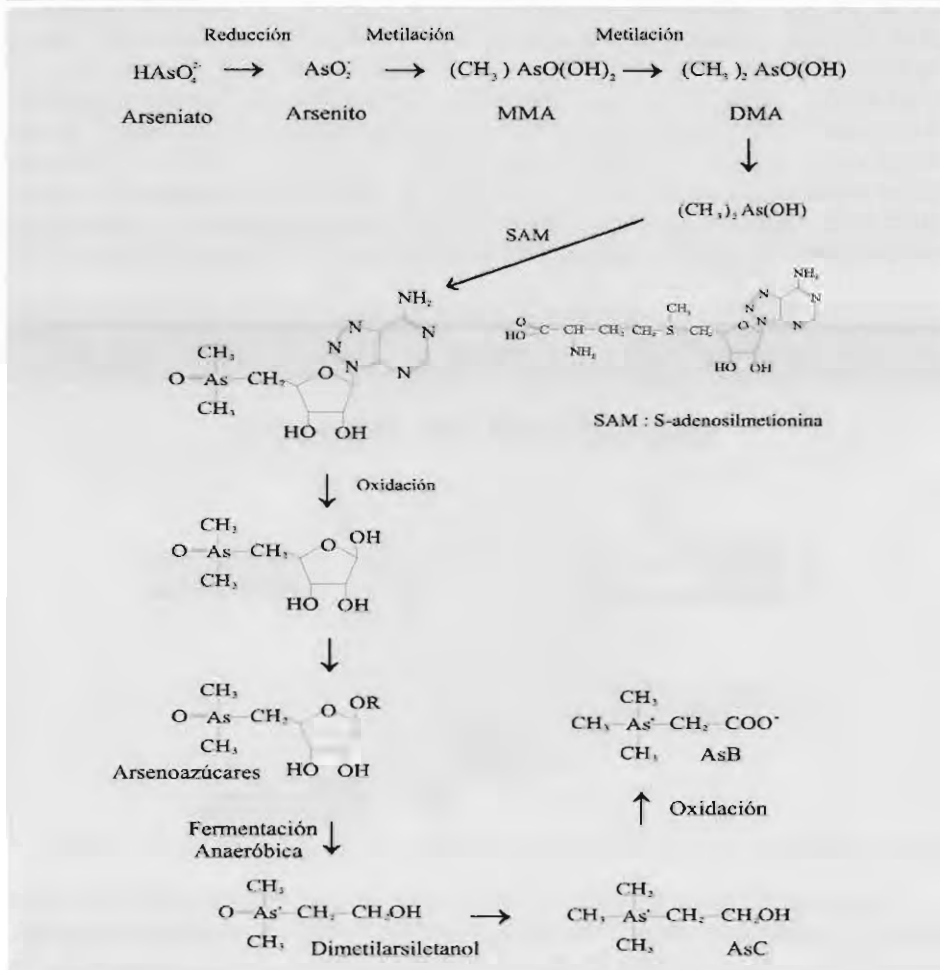


Figura 4. Biotransformación del As en medio marino. El arseniato [As(V)] se reduce a arsenito [As(III)] y recibe dos grupos metilos suministrados por el compuesto S-adenosil-metionina (SAM). Luego la SAM le transfiere el nucleósido de adenina, que se oxida convirtiéndose en As-ribosa y otros As-azúcares. La fermentación anaeróbica de éstos azúcares deja dos átomos de C unidos al As en forma de dimetilarsil-etanol, que al recibir otro metilo se convierte en As-colina, cuya oxidación produce As-betaína.

(TBT), es un potente biocida con acciones letales y subletales en bivalvos y gasterópodos a concentraciones de 0.2 ng l⁻¹. De todo esto se deduce que son precisas herramientas analíticas sofisticadas para caracterizar adecuadamente estas complejas matrices ambientales.

Como muestra la Tabla I, la presencia de metales totales se evalúa por espectroscopia de absorción atómica, en sus modalidades de llama, generación de hidruros y cámara de grafito, que han permitido caracterizar diversos elementos en el rango del mg g⁻¹.

Los organometálicos precisan el uso de acoplamientos instrumentales, desde la simple GC-FPD (cromatografía de gases con detector fotométrico de llama) para la especiación de Sn que permite cuantificar a la vez las seis especies más usuales (TBT, DBT, MBT, TPT, DPT, MPT) en niveles de 10 mg g⁻¹ (sedimentos), 50 mg g⁻¹ (bivalvos) y 10 ng g⁻¹ (agua), a los más complejos para la especiación de arsénico y selenio, para los que se usan la cromatografía líquida de alta eficiencia seguida de destrucción *on-line* de la fracción orgánica con radiación UV o microondas, generación de hidruros y detección por fluorescencia atómica (HPLC-UV(MW)-HG-AFS). Así hemos caracterizado la presencia de As(III), As(V), monometil-arsénico (MMA), dimetil-arsénico (DMA), arseno-betaina (AB) y arseno-colina (ACh) en las muestras estudiadas, a concentraciones de mg g⁻¹.

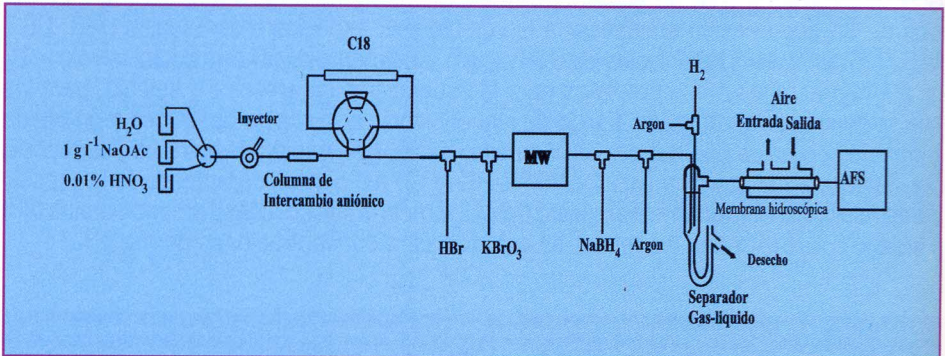
Tabla 1. Técnicas usadas para la determinación de metales y organoestánicos a los distintos rangos de concentración hallados en las muestras analizadas.

<p>Metales:</p> <p>Concentración en el rango del µg g⁻¹</p> <ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopía de Absorción Atómica con llama (FAAS) <p>Concentración en el rango del ng g⁻¹</p> <ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopía de Absorción Atómica con cámara de grafito (GFAAS) <p>Especies formadoras de hidruros (As) - ng g⁻¹</p> <ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopía de Absorción Atómica con generación de hidruros (HGAAS)
<p>Compuestos organoestánicos:</p> <p>Especies estudiadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - TBT, DBT, MBT, TPT, DPT, MPT <p>Sistemas instrumental:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cromatografía de gases con detector fotométrico de llama (GC-FPD) <p>Límites de detección:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sedimentos: 10 ng g⁻¹ - Bivalvos: 50 ng g⁻¹ - Aguas: 10 ng l⁻¹

Los trabajos realizados en estos proyectos están permitiendo, con el apoyo del grupo de Córdoba y de D.a.p, el estudio de la presencia de metales y compuestos organometálicos (As, Se, Sn) en áreas con importantes recursos pesqueros y marisqueros del litoral andaluz, en especial Huelva y Cádiz, utilizando como referencia otras zonas tradicionalmente menos contaminadas por metales, en Málaga o Almería.

La Figura 5 muestra el instrumental usado para la especiación de selenio por acoplamiento HPLC-MW-HG-AFS, usando una válvula de conexión que permite seleccionar una columna de intercambio aniónico, para separar Se(IV) y Se(VI), y otra de fase reversa (C-18), para separar seleno-metionina, seleno-etionina y seleno-cisteína.

Figura 5. Instrumental usado para la especiación de Se mediante el acoplamiento HPLC-MW-HG-AFS.

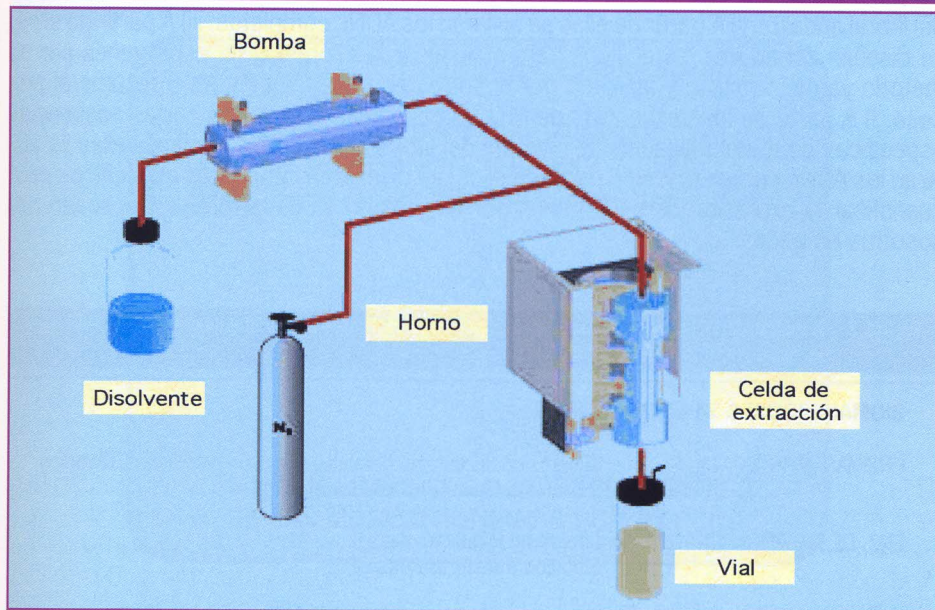


El conocimiento de la contaminación litoral exige nuevas herramientas que proporcionen información detallada de las especies químicas presentes. Los cromatogramas en chirlas muestran un gran pico de una especie desconocida de arsénico, diferente a los patrones usados antes, atribuible a algún arseno-azúcar. Durante una estancia del Dr. Sánchez-Rodas en la Universidad de Odense (Dinamarca) se aislaron cuatro arseno-azúcares en algas del género *Fucus* con una parte común, 3-(5'-deoxi-5'-(dimetilarsinoil-b-ribofuranosiloil-2-OH), y una cadena lateral distinta: a) -OH, b) HO₃POCH₂CHOHCH₂OH, c) SO₃H, y d) OSO₃H. En las muestras se demostró la presencia del arseno-azúcar con α-glicerofosfato, compuesto no tóxico, especie de arsénico mayoritaria, 50–90% de los compuestos de arsénico identificados. Asimismo, se ha abordado el análisis rápido de especies volátiles de selenio manipulando la muestra en una cámara de pervaporación, que simplifica el tratamiento de muestra, evita errores, y ahorra tiempo.

Aunque los contaminantes orgánicos (PCBs, plaguicidas clorados) se miden en el CICEM El Toruño, estamos poniendo a punto métodos rápidos de extracción, empleando disolventes presurizados (ASE), incorporando sorbentes sólidos a la célula de extracción, para extraer y limpiar los contaminantes, en especial PCBs, en 30 min, frente a las 24 h del método Soxhlet. La Figura 6 muestra el aparato que empleamos y que está permitiendo mejorar la eficiencia de los procedimientos de extracción y tratamiento de las muestras.

La aplicación de los métodos comentados a las más de 100 muestras recibidas en 1999 y 2000 ha generado mucha información sobre contaminantes en los recursos pesqueros y marisqueros del litoral andaluz, cuyas conclusiones se desarrollarán en diversos apartados de esta Jornada. Asimismo, es destacable las posibilidades que abre la aplicación de las nuevas herramientas analíticas, basadas en procedimientos de especiación, para la información sobre toxicidad o biodisponibilidad de los contaminantes.

Figura 6. Aparato usado para la extracción y limpieza de contaminantes ambientales, basado en el uso de disolventes presurizados (ASE), y la incorporación de sorbentes sólidos a la célula de extracción.



A continuación veremos el papel de la Universidad de Córdoba y el CICEM El Toruño en el proyecto FEDER. La Figura 7 muestra algunos biomarcadores ya establecidos que responden a los metales y contaminantes orgánicos del litoral andaluz, y que estamos aplicando a los bivalvos de distintas zonas de producción. Entre ellos se encuentran:

- 1) Enzimas antioxidativas y auxiliares, inducidas por metales y compuestos orgánicos que generan especies reactivas de oxígeno.
- 2) Enzimas detoxificadoras de Fase I y Fase II, inducidas por contaminantes orgánicos.
- 3) Daños oxidativos en biomoléculas, como los niveles de malondialdehído y el contenido y estado redox del glutatión, afectados por ambos tipos de contaminantes.
- 4) Capacidad de activación de arilaminas en compuestos mutagénicos.
- 5) Contenido de metalotioneínas, proteínas inducidas por metales.
- 6) Otros biomarcadores específicos de organoestánicos y organoarsenicales.

Además de analizar estos biomarcadores ya desarrollados y en los que tenemos gran experiencia, en Córdoba desarrollamos nuevos biomarcadores con técnicas de Biología Molecular. Así, las metalotioneínas son pequeñas proteínas que captan metales con sus abundantes residuos cisteína. La secuencia de los genes que codifican las metalotioneínas se conoce en varios organismos, aunque en bivalvos sólo se han secuenciado en la ostra del Pacífico y el mejillón. La homología de las secuencias conocidas se usará para obtener las secuencias específicas de metalotioneínas en chirla y otros moluscos

del litoral andaluz. La Figura 8 resume el proceso. i) A partir de las secuencias de MTs ya conocidas se aislarán cortas secuencias específicas de metalotioneínas de bivalvos del litoral andaluz. ii) A partir de ellas se aislarán los ADNc completos. iii) A partir de ellos, se diseñan cebadores específicos para cuantificar la expresión de esos genes por un método ya desarrollado y aplicado por nosotros en peces. La Figura 8 resume el proceso. i) A partir de las secuencias de MTs ya conocidas se aislarán cortas secuencias específicas de metalotioneínas de bivalvos del litoral andaluz. ii) A partir de ellas se aislarán los ADNc completos. iii) A partir de ellos, se diseñarán cebadores específicos para cuantificar la expresión de esos genes por un método ya desarrollado y aplicado por nosotros en peces.

Figura 7. Biomarcadores bien establecidos que responden a metales y contaminantes orgánicos aplicados en el proyecto FEDER.

BIOMARCADORES YA ESTABLECIDOS	
ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS:	Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa, Glutación reductasa, Glucosa-6p deshidrogenasa.
ENZ. DESTOXIFICADORAS:	Citocromo P4501A1 (fase I) Glutación transferasa (fase II)
DAÑOS OXIDATIVOS:	Isoenzimas Cu,Zn superóxido dismutasa Inactivación de la aconitasa Niveles de malondialdehído Estado redox del glutatión intracelular
BIOTRANSFORMACIÓN:	Conversión del 2-aminoantraceno en mutágenos detectables con la estirpe BA149 de <i>S. typhimurium</i>
METALOTIONEINAS:	Niveles de proteínas por FPLC, o colorimetría
ORGANO-Sn:	Colina-acetil transferasa, Aromatasa
ORGANO-As:	GSSG reductasa y lipoamida deshidrogenasa Estado redox del glutatión intracelular.

Junto al análisis de biomarcadores bien establecidos y el desarrollo de nuevos biomarcadores por técnicas de Biología Molecular, en las instalaciones del CICEM El Toruño se están exponiendo chirlas a cuatro contaminantes modelo (PCBs, cobre, arsénico, organoestánicos) para seguir su acumulación durante dos meses y su eliminación durante otros tres meses. Estos estudios, que se resumen en la Figura 9, pretenden alcanzar los siguientes objetivos: i) Conocer la cinética de acumulación de cada contaminante en la chirla y la respuesta de los biomarcadores (dosis/respuesta) para distinguir contaminaciones aguda y crónica. ii) Establecer el tiempo de depuración de cada compuesto para saber cuánto debe cerrarse una zona tras su contaminación. iii) Estudiar la conversión de contaminantes en otras especies químicas, de diferente toxicidad.

Figura 8. Desarrollo de nuevos métodos para medir la expresión de las metalotioneinas como biomarcador de contaminación por metales.

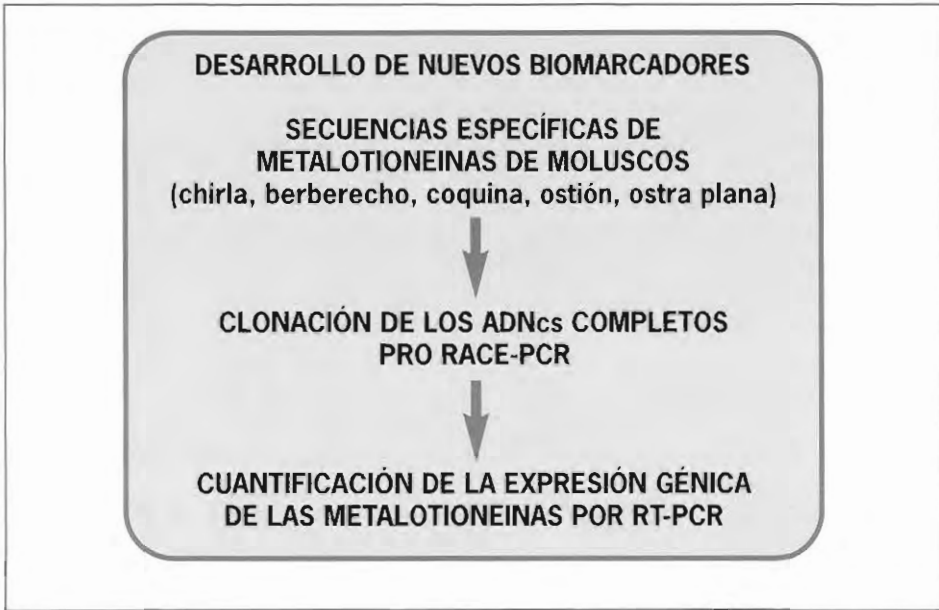
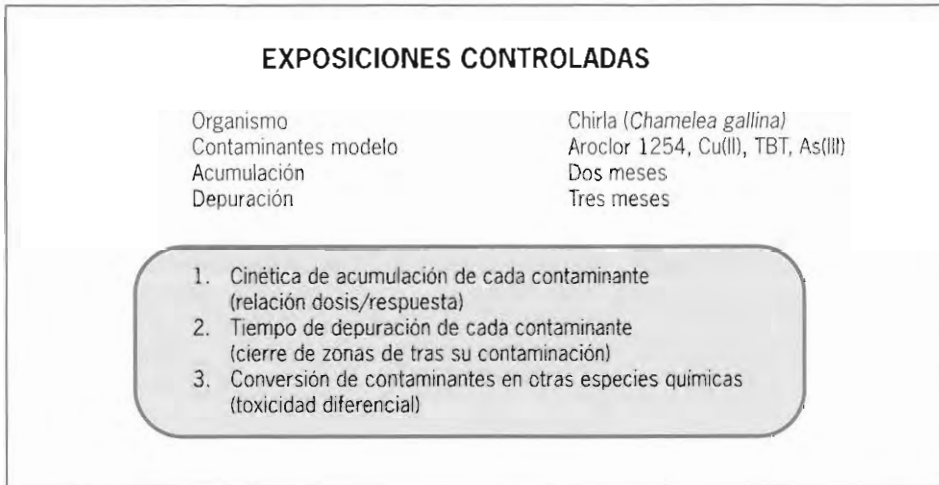


Figura 9. Planteamiento general y principales objetivos de los experimentos de exposición de chirlas a contaminantes modelo en condiciones controladas.



Tras exponer la estructura y objetivos del proyecto FEDER, presentaré brevemente el Convenio entre la Consejería de Agricultura y Pesca y las Universidades de Córdoba y Huelva para realizar "Estudios acerca de los efectos de contaminantes sobre los recursos pesqueros del litoral de Andalucía", incluyendo los posibles efectos del vertido tóxico de Aznalcollar sobre los recursos pesqueros y marisqueros del Estuario del río Guadalquivir, por lo que empezaré introduciendo el problema.

Desde su entrada en operación en 1979, la mina de pirita de Boliden-Apirsa, en pleno Cinturón Piritico Ibérico, en Aznalcollar (Sevilla), ha producido durante la extracción y tratamiento del mineral 100.000.000 Tm de agua ácida, lodos y escorias que se depositaron en una balsa de estériles, cuya presa fue recrecida sucesivamente, hasta alcanzar una altura final de 25 m y una superficie total de 360 Ha. En Abril del 1998 se rompió la balsa de estériles liberando, primero al río Agrio y luego al Guadiamar, cuatro hectómetros cúbicos de agua ácida y dos hectómetros cúbicos de lodos con numerosos metales piríticos, sobre todo Fe, As, Cu y Cd. El lodo se desbordó unos 200 m a cada lado del cauce del río Guadiamar hasta unos 40 Km aguas abajo de la presa, mientras que el agua ácida avanzó otros 20 Km, siendo finalmente retenida en la zona de Entremuros, gracias a un dique construido urgentemente al efecto, antes de que la riada entrara en el Parque Nacional de Doñana.

La limpieza del vertido comenzó inmediatamente tras el accidente, en Mayo de 1998 y estaba casi completa en Octubre, antes de que empezaran las lluvias otoñales. Los lodos depositados en las márgenes del Guadiamar se retiraron con máquinas que eliminaban el lodo y la capa superior del suelo. El agua retenida en la zona de Entremuros se depuró en una planta de tratamiento construida *in situ* al efecto, y se devolvió al río Guadalquivir a través del Brazo de la Torre. La Figura 10 muestra la zona afectada y la naturaleza y magnitud del vertido tóxico provocado por la rotura de la balsa de estériles de la mina de Aznalcollar.

En Julio del 1998 la Junta de Andalucía reunió diversas comisiones de expertos para proponer actuaciones ante la situación creada por el vertido de la mina de Aznalcollar. Una de ellas, convocada por la D. General de Pesca de la Consejería de Agricultura y Pesca, propuso estudiar los posibles efectos del vertido de Aznalcollar en los recursos pesqueros y marisqueros del Estuario del río Guadalquivir. El proyecto se elaboró por científicos de las Universidades de Córdoba y Huelva y personal del CICEM El Toruño en diversas reuniones de trabajo mantenidas en la Consejería de Agricultura y Pesca desde finales de 1998 hasta principios de 1999. Una vez elaborado la memoria científica, en Julio de 1999 se firmó entre la Consejería de Agricultura y Pesca y las Universidades de Córdoba y Huelva el Convenio cuya estructura y objetivos se resume en la Figura 11.

Figura 10. Situación de la balsa de estériles de Aznalcóllar, principales componentes del vertido y camino recorrido por el mismo.

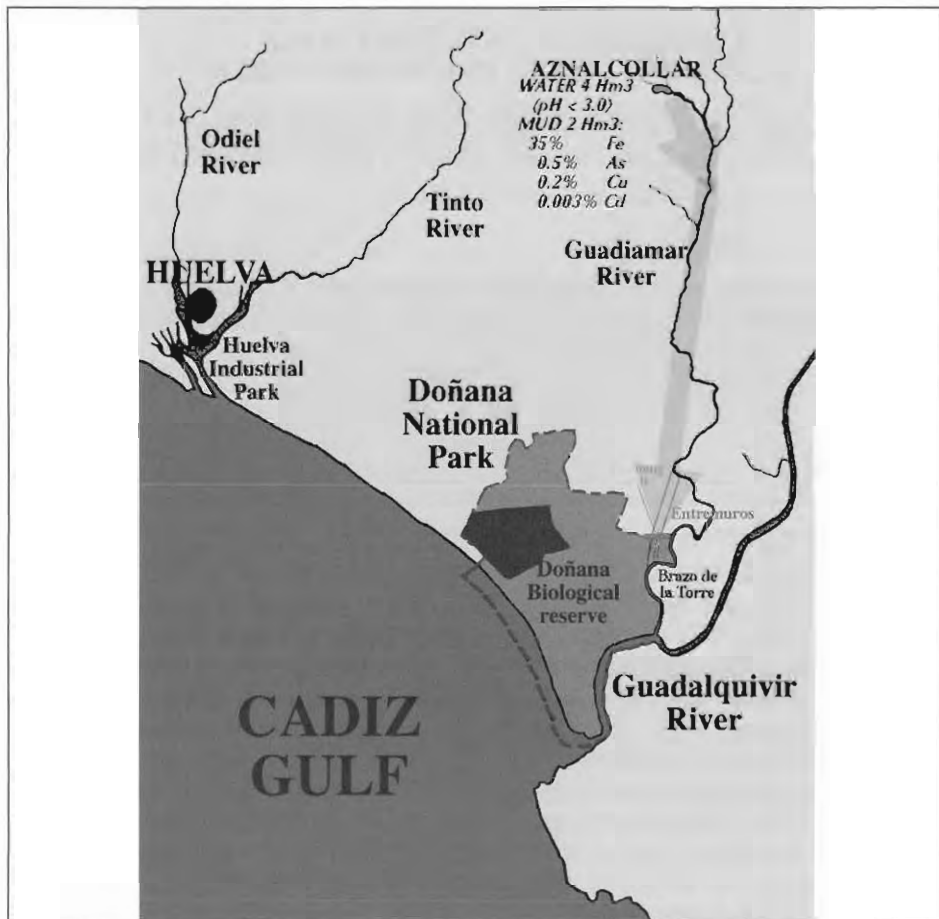


Figura 11. Principales datos del convenio entre la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y las Universidades de Córdoba y Huelva.

CONVENIO C. AGRICULTURA Y PESCA Y LAS UNIVERSIDADES DE CÓRDOBA Y HUELVA			
Realización de estudios acerca de los efectos de los contaminantes sobre los recursos pesqueros de litoral de Andalucía			
Elaborado Aprobado por la CAP		Enero de 1999 Julio de 1999	
Subproyecto II:		Oficializar el Proyecto FEDER (sin financiación)	
Subproyecto I:		Efectos del accidente de Aznalcóllar sobre los recursos pesqueros del Estuario del Guadalquivir	
Mptas	UCO 20.700	UHU 19.380	CICEM 9.920

El Convenio consta de dos subproyectos, cuyos objetivos entidades participantes y financiación se muestran en la siguiente figura. El primero de tales subproyectos, que carece de financiación adicional, tiene como objetivo dar carta oficial a la colaboración previamente establecida entre la Consejería con las Universidades de Córdoba y Huelva mediante el proyecto FEDER, ya descrito en la primera parte de esta presentación. El segundo subproyecto se proponía aplicar el equipo humano y el potencial científico previamente desplegado para el proyecto FEDER por las Universidades de Córdoba y Huelva y el CICEM El Toruño para estudiar los posibles efectos del accidente de Aznalcóllar en los recursos pesqueros del Estuario del Guadalquivir, usando dos aproximaciones complementarias:

- 1) Seguimiento mediante análisis químicos y de biomarcadores de moluscos bivalvos y peces muestreados periódicamente en distintas zonas del río Guadalquivir y su Estuario.
- 2) Seguimiento con análisis químicos y de biomarcadores de bivalvos (coquina de fango), crustáceos (camarón) y peces (lenguado) de interés comercial transplantados al Estuario del Guadalquivir (instalaciones de PISTRESA, frente a la desembocadura del Brazo de la Torre) y su posterior depuración tras su transplante a las instalaciones del CICEM El Toruño, en el Puerto de Santa María.

CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS, PCBs, PLAGUICIDAS ORGANOHALOGENOS Y RADIONÚCLIDOS EN MOLUSCOS BIVALVOS

**M^a T^a de Acuña Rivero, L. Pérez Pérez, C. Jiménez García, J. Collado Vallejo,
D. Arana Mesa, D. Hernández Guillén, A. Sánchez Molina,
L. F. Valle González, D. Acosta Camacho, R.M^a Palomar Calero,
M^aC. Sánchez López, L. Mamán Menéndez**

Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía, S.A. Laboratorio "El Rompido". Ctra.
Punta Umbria – Cartaya, s/n. 21.459, Cartaya (Huelva)

La Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía (D.a.p.) realiza la Asistencia Técnica de un Proyecto, que, como muestra el Esquema 1, se puede dividir en dos grandes apartados: 1) Control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción de moluscos bivalvos del litoral andaluz. 2) Estudio de la contaminación química del Estuario del Río Guadalquivir. En los dos párrafos siguientes se resumen los objetivos y estudios que realiza D.a.p., indicando los tipos de análisis que efectúa y las técnicas usadas.

El control de las zonas de producción de bivalvos del litoral andaluz se hace en muestras de 44 zonas, ubicadas a lo largo de todo el litoral andaluz. Se pretende garantizar la calidad sanitaria de los productos, tomando medidas preventivas si se detectasen valores anormales en los parámetros controlados. Para ello, se estudian muestras de bivalvos y del agua en que habitan. Con técnicas microbiológicas se analiza en agua y bivalvos la presencia de entero-bacterias, y en animales la presencia de diversas toxinas, los metales pesados más característicos de la zona, diversos contaminantes organohalogenados y varios radionúclidos.

El estudio de la contaminación química del Estuario del Guadalquivir pretende detectar los posibles efectos de los contaminantes del vertido de Aznalcollar en especies de interés pesquero. El estudio se realiza en diferentes especies de interés pesquero de diversas zonas del Estuario, supuestamente expuestas al vertido, determinándose la concentración de los metales Cu, Mn, Fe, Zn, Pb, Cd, As, Hg, por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) con llama y cámara de grafito y Sistema de Generación de Hidruros (FIAS).

Además de estas Asistencias, la empresa D.a.p. participa en un Proyecto cofinanciado con Fondos FEDER, suministrando a los grupos de investigación de las Universidades de Córdoba y Huelva muestras de bivalvos de las zonas de interés pesquero del litoral andaluz donde D.a.p. realiza el control sanitario antes citado. Además, la Empresa proporciona a tales grupos muestras de diversas zonas del estuario de Guadalquivir: molus-



cos bivalvos de Bonanza (Coquina de fango), Malandar (Coquina) y Zalabar (Coquina y Chirla), y lenguados y albures de Bonanza y Codo de la Esparraguera. Este proyecto evalúa los efectos de la contaminación sobre los recursos pesqueros, comparando las técnicas convencionales de análisis usadas rutinariamente por D.a.p. con nuevas metodologías desarrolladas en la UCO y la UHU. A continuación se resumirá, mediante gráficos, el control sanitario de los bivalvos en las zonas de producción del litoral andaluz, centrándonos en su evolución temporal, y estudiando también comparativamente cada especie en las provincias que componen dicha zona costera. Seguidamente se presentan los resultados obtenidos por la Empresa D.a.p. en los dos grandes apartados mencionados anteriormente.

CONTROL Y SEGUIMIENTO DE LAS CONDICIONES SANITARIAS EN LAS ZONAS DE PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS DEL LITORAL ANDALUZ

OBJETIVO: Garantía sanitaria de los productos recolectados, tomando medidas preventivas cuando se detecten valores anormales en los parámetros controlados.

ESTUDIO:

- 1 Agua: 1A Coliformes fecales
1B Plancton tóxico
- 2 Moluscos: 2A Microbiología (Salmonella, coliformes fecales, E. coli)
2B Biotoxinas (PSP, DSP, ASP)
2C Metales pesados (Cu, Pb, Cd, Hg)
2D Organohalogenados (DDT, Lindano, HCB, y PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180)
2E Radionúclidos (Cs-134, Cs-137, Ra-226, Ra-228, Th-228, K-40, Co-60, Fe-59, Mn-54, Zn-65, Zr-95)

ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN QUÍMICA DEL ESTUARIO DEL RÍO GUADALQUIVIR

OBJETIVO: Detección de posibles efectos de los contaminantes del vertido de Aznalcollar en especies de interés pesquero.

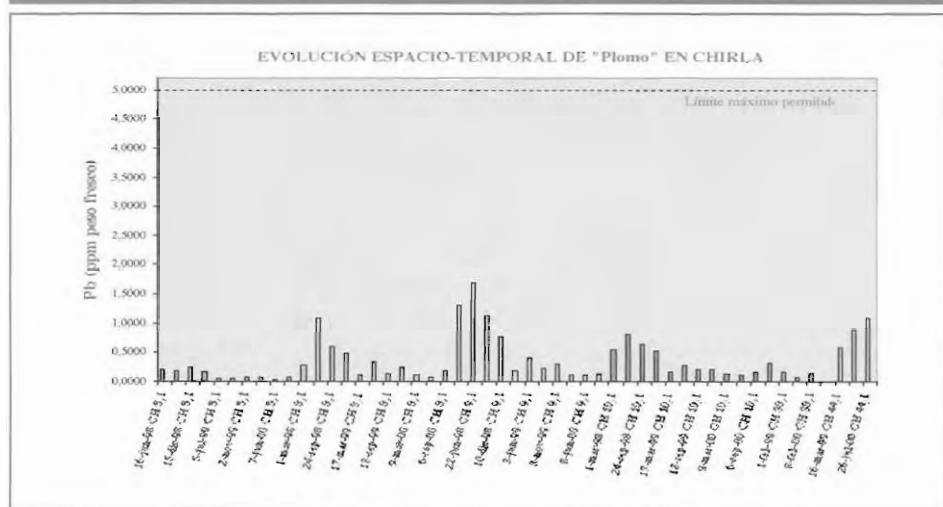
ESTUDIO: Peces, moluscos: Metales pesados (Cu, Mn, Fe, Zn, Pb, Cd, As, Hg)

TÉC. ANALÍTICAS: Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS): llama y cámara de grafito
Sistema de Generación de Hidruros (FIAS)

Esquema 1: Análisis realizados por D.a.p. en el Proyecto del "Control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción de moluscos bivalvos del litoral andaluz y Contaminación Química del Estuario del Guadalquivir".

- 2) Plomo (Figura 2): el contenido de Pb disminuye gradualmente a ambos lados de la zona AND1-09, donde se detectan los mayores niveles, muy por debajo de su límite máximo (5 ppm), aunque su concentración ha disminuido con el tiempo. En todas las zonas de Huelva el comportamiento de este metal ha seguido igual tendencia, disminuyendo a partir de Junio 1998. En Almería, hay mayor nivel de Pb en AND1-44 "Playa de Palomares" que en AND1-38 "Almerimar (Punta de las Entinas)", mayor incluso que en la zona AND1-08 de Huelva. A diferencia de lo observado en Huelva, la concentración de Pb ha ido en aumento, sugiriendo que la zona AND1-44 no es adecuada como referencia. A pesar de esto, en ninguna de las zonas estudiadas se han detectado episodios de contaminación alarmantes.

Figura 2. Niveles de plomo en chirla procedentes de las zonas indicadas en la Figura 1.



- 3) Mercurio (Figura 3): la zona AND1-09 muestra el mayor nivel de Hg, aunque muy inferior del máximo permitido (0,5 ppm). En general, la concentración de Hg fue mayor en 1998, disminuyendo en los años siguientes. Las zonas de Almería contienen menos Hg que las de Huelva, y por tanto cualquiera de las zonas de producción de Almería son útiles como referencia en lo que se refiere a este metal.
- 4) Cobre (Figura 4): de todos los analizados, este es el metal que se acumula en las chirlas en mayores concentraciones. En 1998 hubo episodios de contaminación por Cu por encima de los límites máximos permitidos (20 ppm) en las zonas AND1-08 y AND1-09, expuestas a la contaminación industrial y minera procedente de la Ría de Huelva. A medida que nos alejamos de estas dos zonas, la concentración de Cu baja, estando la zona Occidental de Huelva menos contaminada por este metal que la Oriental. Comparando los litorales de Huelva y Almería, el Cu es mucho menos abundante en las zonas almerienses. Conviene señalar que en 1998 también se detectaron en AND1-08 mayores niveles de plaguicidas organoclorados y PCBs que en 1999, aunque en AND1-09 sólo hubo mayor presencia de DDT. Estos resultados se presentarán mas adelante en este mismo Capítulo.

De los resultados obtenidos en chirlas podemos deducir las siguientes conclusiones: i) Las zonas de producción de bivalvos AND1-08 "Punta Umbría" y AND1-09 "Mazagón" son las más contaminadas del litoral de Huelva. ii) Las zonas de Almería AND1-38 "Almerimar (Punta de las Entinas)" y AND1-44 "Playa de Palomares" no son adecuadas como referencia.

Figura 3. Niveles de mercurio en chirla procedentes de las zonas indicadas en la Figura 1.

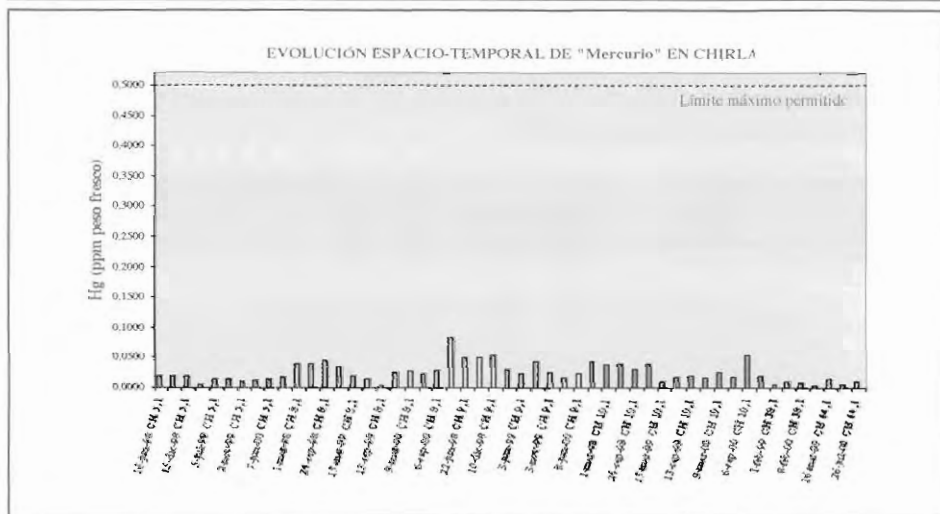
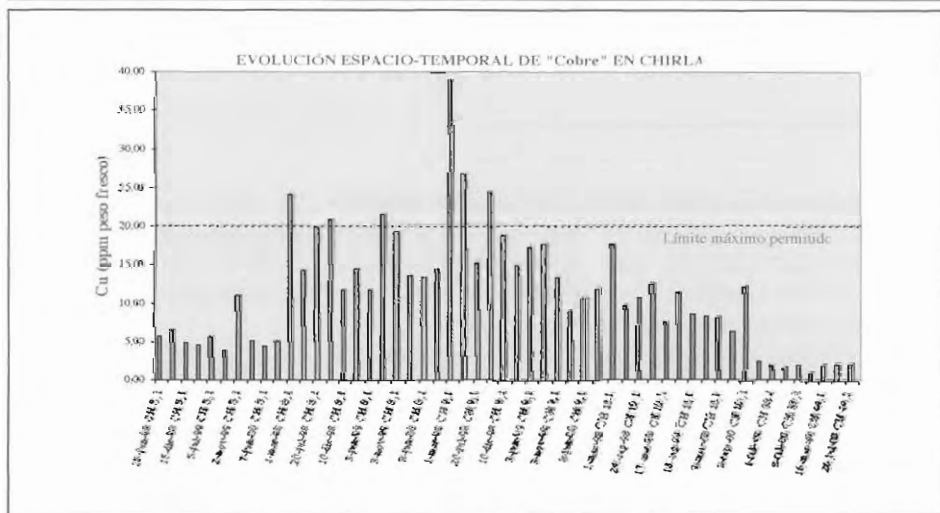


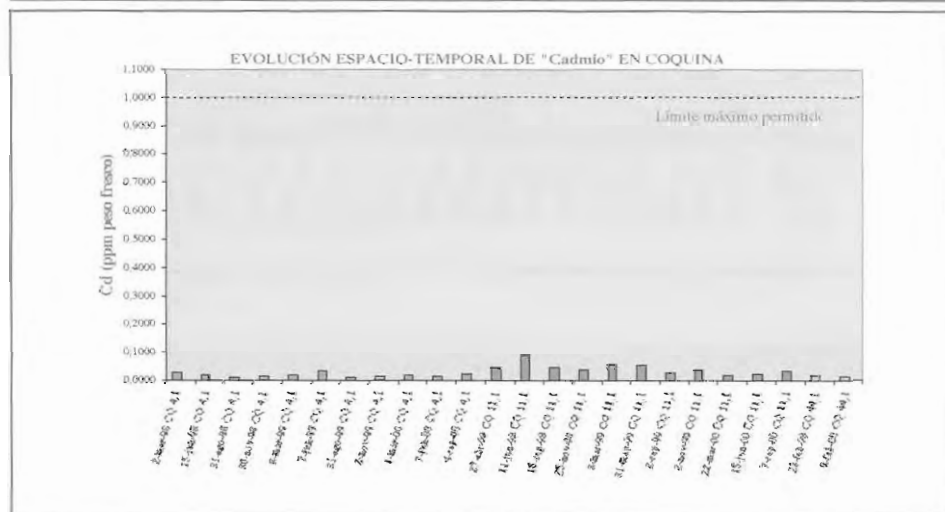
Figura 4. Niveles de cobre en chirlas procedentes de las zonas indicadas en la Figura 1.



EVOLUCIÓN DE LOS METALES PESADOS EN COQUINA

El contenido de los cuatro metales pesados en coquinas de dos zonas del litoral de Huelva y una de Almería donde se producen estos bivalvos se muestra en las Figuras 5 a 8. Su comparación permite apreciar que las coquinas tienen mayor concentración de Cd (Figura 5), Pb (Figura 6), Hg (Figura 7) y Cu (Figura 8) en la zona AND1-11 "Torre Zalabar" que en la AND1-04 "El Cenegal (Banco de O'Bril)". Estas diferencias pueden atribuirse al hecho de que la AND1-11 pudo verse afectada por el accidente de Aznalcóllar, ocurrido en Abril de 1998, que liberó al Estuario del Guadalquivir gran cantidad de metales pesados de origen pirítico al romperse la balsa minera de la presa de BOLIDEN Apirsa. No obstante, a pesar de las dimensiones de este accidente, sólo en dos momentos se superó el límite máximo permitido de Cu (Figura 30) como se verá mas adelante al explicar las zonas afectadas por dicho accidente.

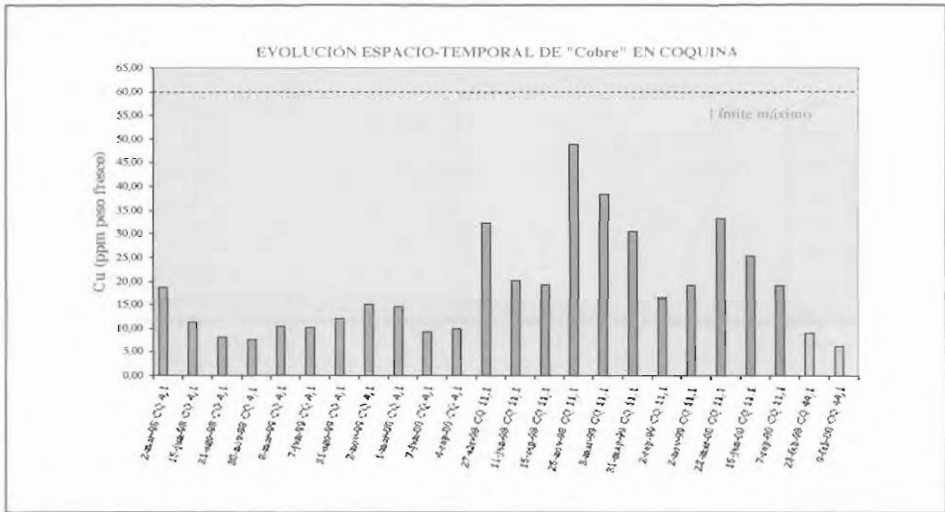
Figura 5. Niveles de cadmio en coquinas procedentes de las zonas de producción AND1-04 "El Cenegal" y AND1-11 "Torre Zalabar", en Huelva, y AND1-44 "Playa de Palomares", en Almería.



Comparando las zonas mencionadas de Huelva, con la AND1-44 de Almería, esta última tiene incluso más Pb (Figura 6) que la Torre Zalabar; mientras que los niveles de los restantes metales son muy inferiores y se asemejan más a los de la zona AND1-04. Esto podría deberse a la presencia en Almería de minas abandonadas de mineral de plomo que podrían seguir liberando este metal.

Los resultados obtenidos en coquinas permiten sacar las siguientes conclusiones:

- La zona AND1-11 "Torre Zalabar" está más contaminada que la AND1-04 "El Cenegal".
- La zona AND1-44 "Playa de Palomares", en Almería, tiene incluso más Pb que la de Torre Zalabar, lo que confirma que AND1-44 no es una buena "zona testigo" para estudios comparativos.

Figura 8. Niveles de cobre en coquina procedentes de las zonas indicadas en la Figura 5.


EVOLUCIÓN DE LOS METALES PESADOS EN COQUINA DE FANGO

El contenido de Cd, Pb, Hg y Cu en coquinas de fango de tres zonas de Cádiz, AND1-13 “Estuario de Guadalquivir (Bonanza)”, AND1-14 “Río San Pedro” y AND1-16 “Caño Sancti Petri”, donde se producen estos bivalvos se muestra en las Figuras 9 a 12. La zona AND1-13 “Estuario del Guadalquivir” se estudió intensivamente tras el accidente de Aznalcóllar y se explicará en mayor profundidad mas adelante. En principio, AND1-13 tiene más Cd (Figura 9) y Pb (Figura 10) que AND1-14 y AND1-16, mostrando estas dos últimas niveles parecidos de dichos metales. En cuanto al Hg (Figura 11), apenas hay diferencia entre las tres zonas y los niveles están muy por debajo del límite para este metal. En cuanto al Cu (Figura 12) el nivel detectado en la zona AND1-13 es mayor en los últimos meses del año, mientras que en las otras dos zonas estudiadas es bastante menor.

Como conclusión de los estudios en coquina de fango podemos deducir que AND1-13 “Estuario de Guadalquivir (Bonanza)” presenta mayor contenido de metales que las de la Bahía de Cádiz, AND1-14 “Río San Pedro” y AND1-16 “Caño Sancti Petri”.

Figura 9. Contenido de cadmio en coquina de fango procedentes de las zonas AND1-13 "Bonanza", AND1-14 "Río San Pedro" y AND1-16 "Caño Sancti Petri", en Cádiz.

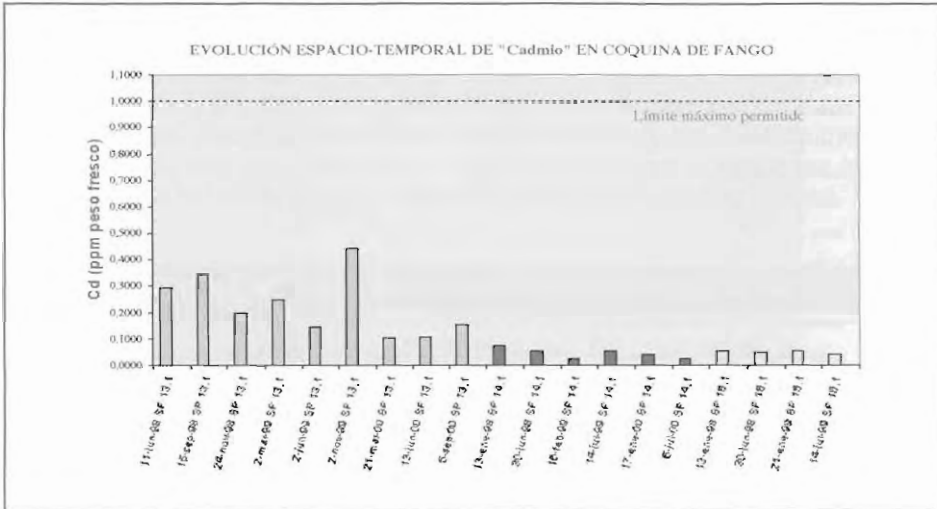
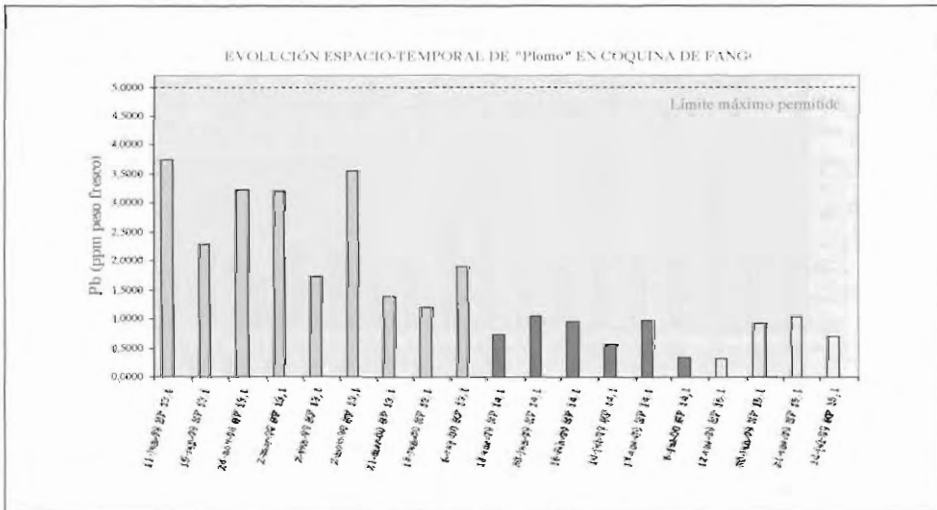


Figura 10. Niveles de plomo en coquina de fango procedentes de las zonas de producción de bivalvos indicadas en la Figura 9.



ZONA AND1-06 "AGUA DEL PINO": BERBERECHO Y ALMEJA FINA

En la zona AND1-06 "Agua del Pino", en Huelva, se analizaron los niveles de Cd y Pb (Figura 13), Hg y Cu (Figura 14) en almeja fina y berberecho. Aunque almeja fina y japonesa son las especies principales en esta zona, desde junio de 1998 se ha capturado berberecho ante la escasez de las otras. Por ello, no es posible comparar metales en ambas especies, porque la almeja fina se capturó sólo una vez. El nivel de metales en berberecho está muy por debajo de los límites permitidos por la legislación, por tanto desde 1998 no ha habido riesgo de contaminación para el consumo humano.

Figura 13. Niveles de Cd y Pb en almeja fina y berberecho de AND1-06 "Agua del Pino".

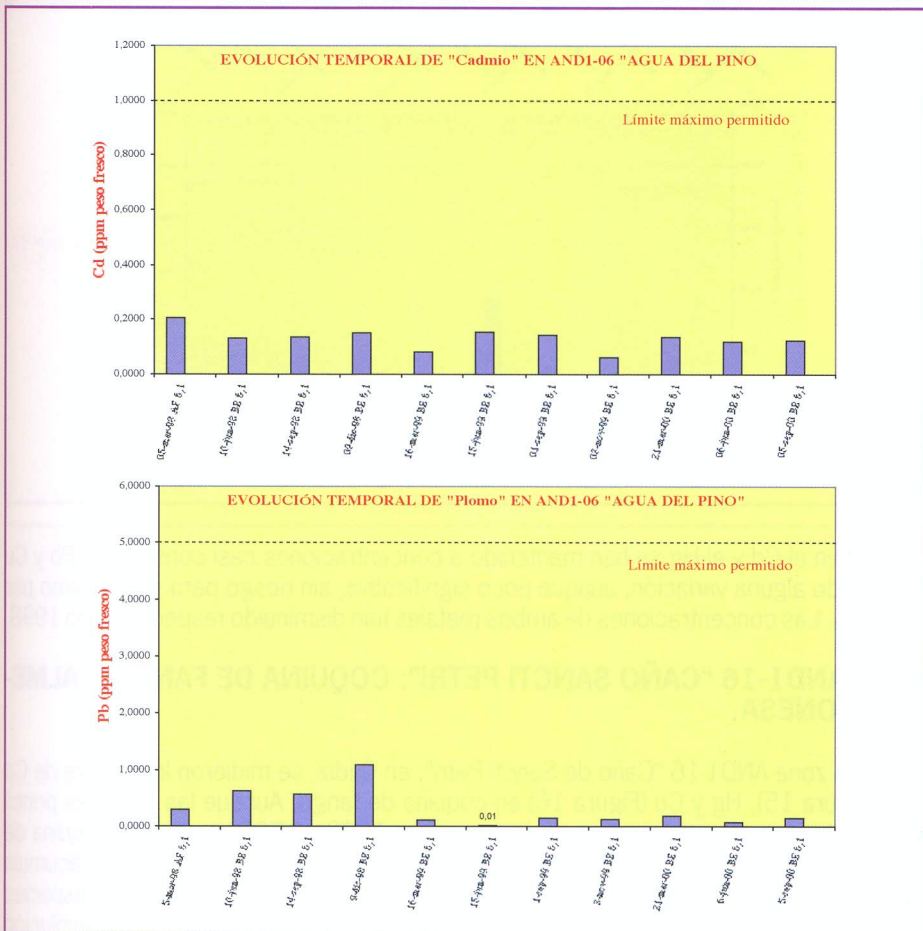
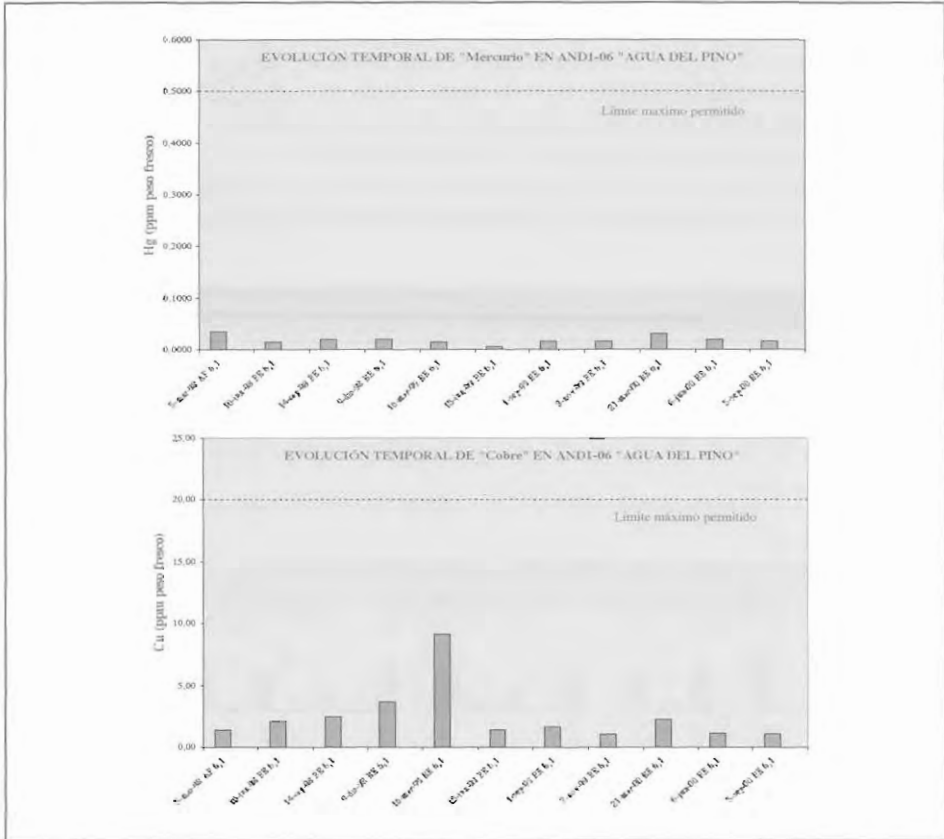


Figura 14. Niveles de mercurio y cobre en almeja fina y berberecho de la zona AND1-06.


Si bien el Cd y el Hg se han mantenido a concentraciones casi constantes, Pb y Cu han sufrido alguna variación, aunque poco significativa, sin riesgo para su consumo por humanos. Las concentraciones de ambos metales han disminuido respecto al año 1998.

ZONA AND1-16 "CAÑO SANCTI PETRI": COQUINA DE FANGO Y ALMEJA JAPONESA

En la zona AND1-16 "Caño de Sancti Petri", en Cádiz, se midieron los niveles de Cd y Pb (Figura 15), Hg y Cu (Figura 16) en coquina de fango. Aunque las especies principales en la zona son almeja fina y la japonesa, en 1998 y 1999 se capturó coquina de fango y almeja japonesa ante la escasez de la otra especie. La almeja japonesa acumula mucho menos Pb y Cu que la coquina de fango, aunque ninguna de estas dos especies retuvo metales por encima de los niveles máximos permitidos. Respecto a la evolución temporal, se puede decir que el Cd se mantuvo constante, Pb y Cu tuvieron pequeñas variaciones, pero a niveles muy por debajo de los permitidos, mientras que el Hg disminuyó.

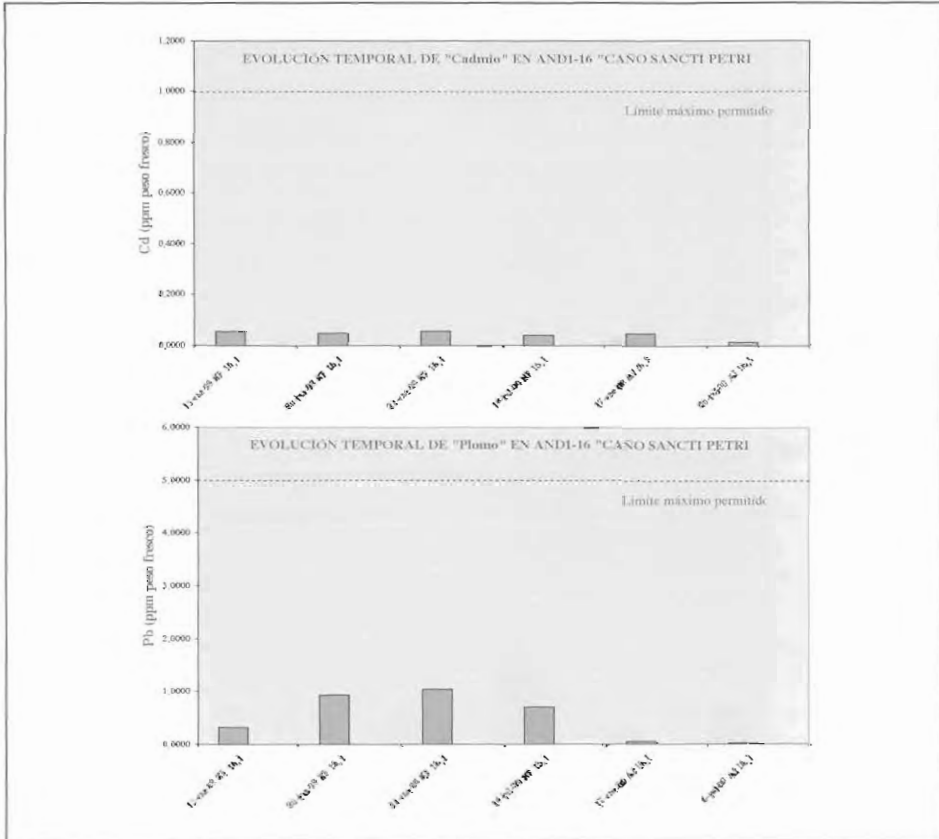
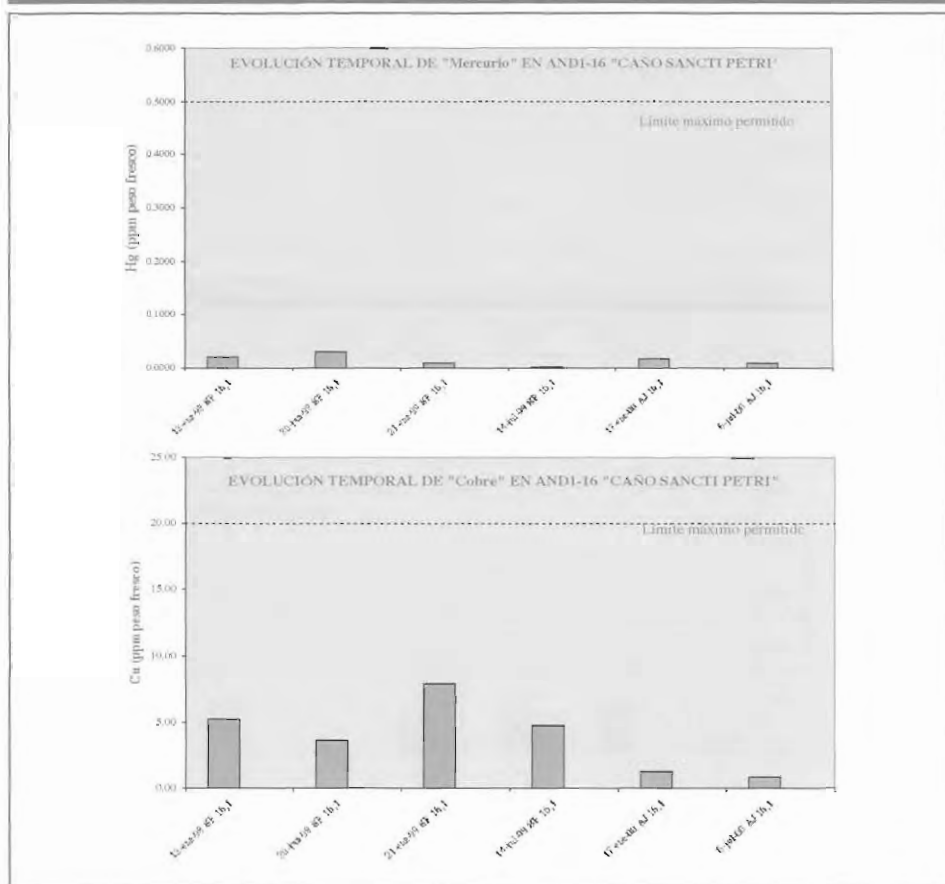
Figura 15. Niveles de cadmio y plomo en coquina de fango y almeja japonesa procedentes de la zona de producción de bivalvos AND1-16 "Caño Sancti Petri".

Figura 16. Niveles de mercurio y cobre en coquina de fango y almeja japonesa de la zona de producción de moluscos bivalvos AND1-16.

ZONA AND1-35 "PUNTA DE TORROX": CONCHA FINA

En la zona AND1-35 "Punta de Torrox", en Málaga, se analizaron los niveles de Cd y Pb (Figura 17), Hg y Cu (Figura 18) en concha fina. En esta zona, cuya especie principal es la concha fina, no se han producido episodios de contaminación. El contenido de metales pesados no difiere mucho de los encontrados en Cádiz (zonas AND1-22 a AND1-24) y en la misma provincia de Málaga (de AND1-27 a AND1-33) donde también se capturan conchas finas.

Figura 17. Niveles de cadmio y plomo en concha fina procedente de la zona de producción de moluscos AND1-35 "Punta de Torrox".

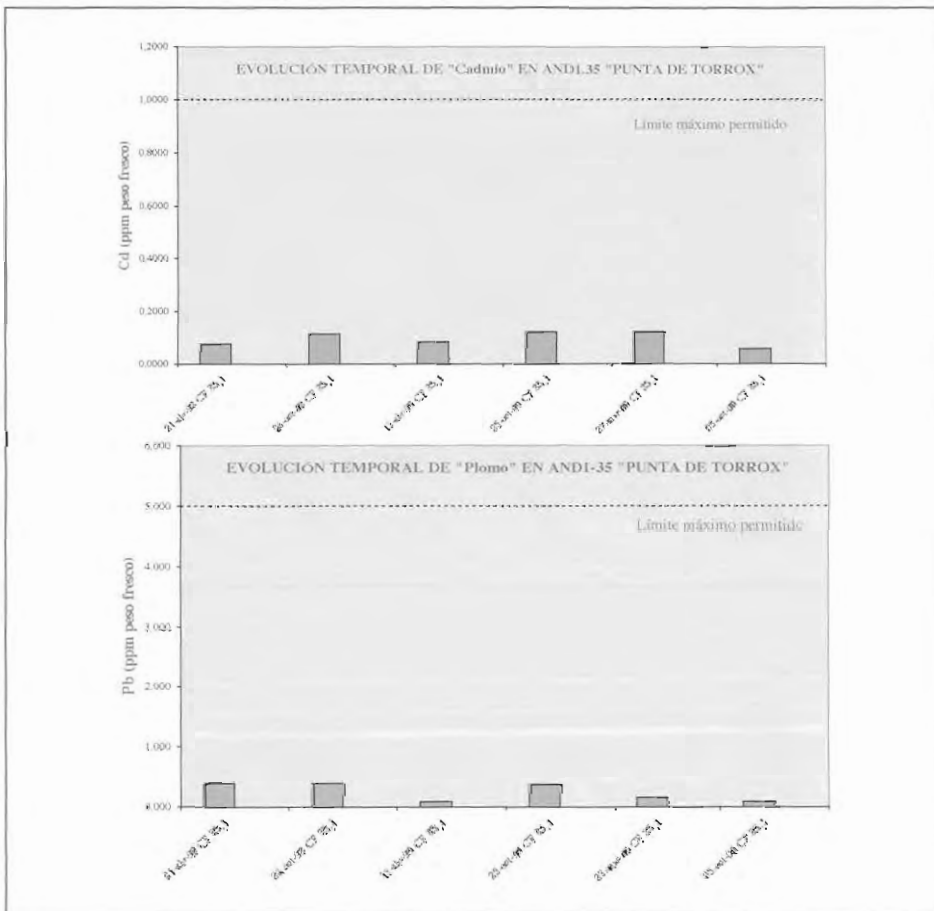
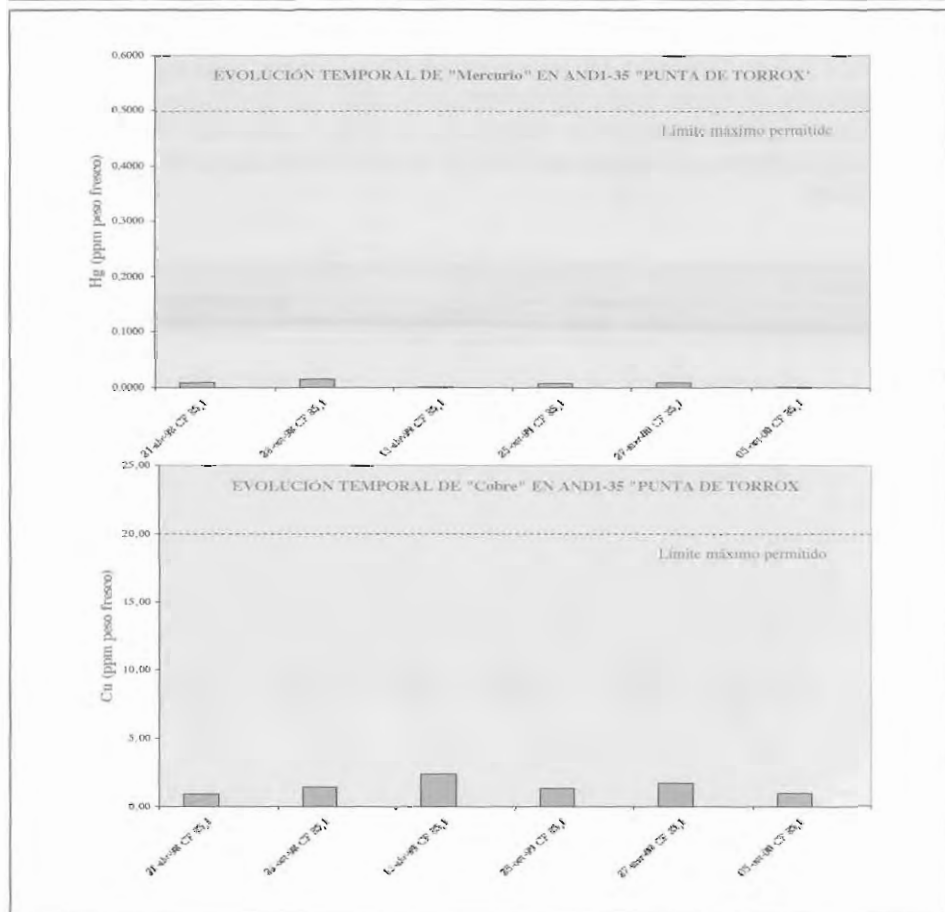


Figura 18. Niveles de mercurio y cobre en concha fina de la zona de producción AND1-35.



ZONA AND1-44 "PLAYA DE PALOMARES": CHIRLA Y COQUINA

En la zona AND1-44 "Playa de Palomares", en Almería, se midieron los niveles de Cd y Pb (Figura 19), Hg y Cu (Figura 20) en chirla. Si bien en esta zona la especie principal es la chirla, a principios de 1998 y finales del 2000 se capturó la especie secundaria, coquina. La coquina acumula mucho más Cu y Pb que la chirla, pero menos Cd. Conviene recordar que el límite máximo de Cu permitido para la coquina es 60 ppm en peso fresco, frente a 20 ppm para la chirla. Esta zona tampoco presentó riesgo de contaminación que pasase ninguno de los límites. Se observa en la chirla un aumento de la concentración de Cd y Pb. El Cu también aumentó, pero tan solo de 1,92 ppm, en marzo de 1999 a 2,12 ppm en julio de 2000.

Figura 19. Niveles de cadmio y plomo detectados en coquina y chirla procedentes de la zona de producción de moluscos bivalvos de AND1-44 "Playa de Palomares".

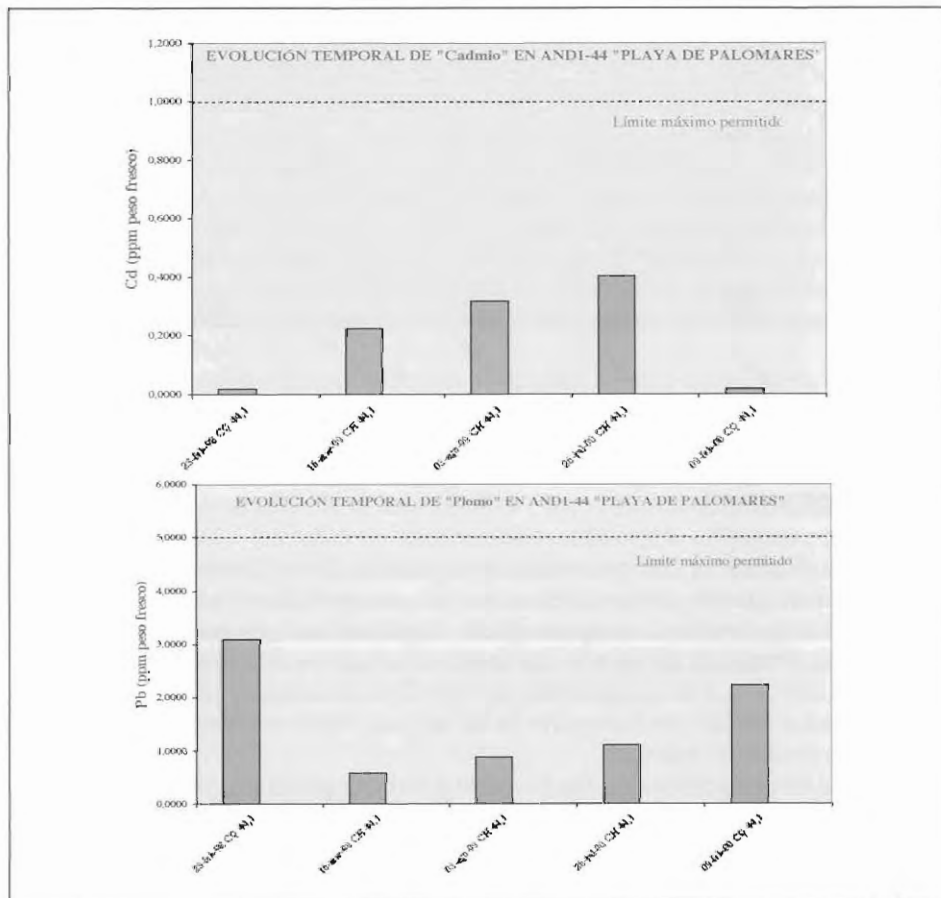
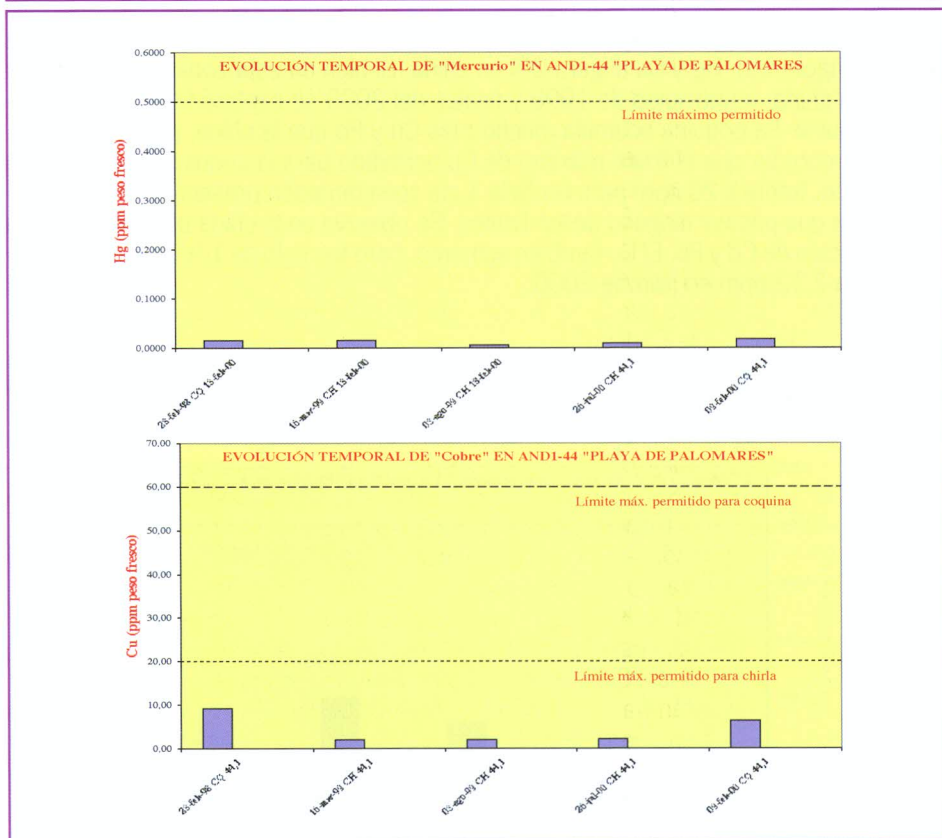


Figura 20. Niveles de Hg y Cu en coquina y chirla de AND1-44

HIDROCARBUROS

Muchos plaguicidas son persistentes y bioacumulables y poseen capacidad carcinogénica o mutagénica, por lo que el control de su presencia en el medio ambiente es absolutamente necesario. La mayoría de los plaguicidas son compuestos organohalogenados, poco solubles en agua y muy liposolubles, que se acumulan en el tejido adiposo de los animales, a los que penetran por ingestión o por vía cutánea. Los compuestos organoclorados constituyen la mayoría de los residuos contaminantes de la fabricación de diversos productos químicos.

Se trata de compuestos de alta toxicidad y no biodegradables, por lo que su vertido a los ríos o al mar constituye un grave delito ecológico. Estos compuestos suelen ir acompañados de metales pesados (Zn, Cr, Pb, As, Cd, Cu y Hg) que derivan de la incineración de los organoclorados con alto contenido en metales pesados y de otras fuentes antropogénicas. Aunque la normativa actual no establece límites máximos de orga-

noclorados, el Instituto Español de Oceanografía (IEO) aconseja como indicativos los siguientes: PCB's totales ≤ 20 ppb; total de DDT ≤ 80 ppb; lindano ≤ 12 ppb.

La Tabla 1 muestra el contenido de grasa y de compuestos organohalogenados (expresado en ppb respecto a peso húmedo) en muestras de diversas especies de moluscos bivalvos procedentes de distintas zonas de producción del litoral andaluz. En primer lugar, conviene señalar que ningún compuesto superó los niveles aconsejados por el IEO. Aunque el número de muestras no permite sacar conclusiones claras, parece que las mayores concentraciones de organohalogenados se observan en zonas expuestas a los efluentes de la Ría de Huelva y del Estuario del Guadalquivir, como consecuencia quizás de la actividad industrial y portuaria de dichas zonas. En concreto, el DDT parece más abundante en las zonas AND1-11 y AND1-13, afectadas por el Estuario del Guadalquivir, mientras que los PCBs totales son también mas abundantes en estas dos zonas y en algunas áreas de la Bahía de Cádiz.

RADIOISÓTOPOS

En los mares, los radioisótopos tienen doble procedencia: i) Núclidos naturales derivados de la evolución geológica de los materiales de la Tierra, que son los más abundantes. ii) Radionúclidos introducidos por diversas actividades industriales (incluidas la militar), que constituyen sólo $\sim 1\%$ del total de radioisótopos. La radiactividad natural varía con la salinidad, presentando niveles más altos de radioisótopos los recintos con niveles mayores de salinidad. El K-40 es el radioisótopo natural más abundante, aproximadamente el 97% del total, seguido de Tritio y Rb-87, que constituyen alrededor del 1%, U-235 y U-238, alrededor del 0,4%, y el C-14, con aproximadamente un 0,05% del total. En niveles inferiores están Ra-226, Pb-210 y Po-210. De los incorporados a los océanos que hasta entonces no pertenecían a su composición ordinaria se puede citar el Sr-90, Cs-137 y Pu-242.

La Tabla 2 muestra los radioisótopos detectados en diversas especies de moluscos bivalvos muestreados en varias zonas del litoral andalúz entre 1998 y 2000. Los valores se expresan en beckerelio (Bq) por Kg de masa húmeda, lo que constituye una medida de su radiactividad específica (Bq/Kg M. Hum). La mayoría de los radionúclidos analizados tienen niveles muy por debajo del valor mínimo de actividad detectable (M.A.D.), por ello en la Tabla 1 los datos correspondientes a ellos están reflejados con valores de cero. El más abundante en las muestras analizadas es el K-40 y resulta lógico encontrar alta radiactividad específica de este compuesto teniendo en cuenta que el medio en que viven los moluscos es el agua marina y el potasio se encuentra en gran cantidad formando sales. El siguiente en abundancia es el Th-228. Apenas se aprecian niveles detectables de los compuestos Cs-134, Cs-137, Co-58 ni Co-60.

Tabla 1. Contenido en grasa y concentración de compuestos organohalogenados (expresado en ppb respecto al peso húmedo) en moluscos bivalvos de las zonas de producción del litoral andaluz.

ZONA DE PRODUCCION	ESPECIE	FECHA	% GRASA	DDT	LINDANO	HCB	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180	ppb Σ PCB
ANDI-04	AF	02-mar-98	1,20	17,34	0,17	0,13	0,12	0,13	0,28	0,12	0,44	0,56	0,20	1,85
ANDI-04	CQ	31-ago-98	0,93	14,69	0,22	0,06	0,04	0,05	0,10	0,19	0,31	0,38	0,08	1,15
ANDI-05	CH	21-sep-98	0,74											
ANDI-05	CQ	02-mar-98	1,44	11,07	0,21	0,08	0,06	0,04	0,19	0,09	0,33	0,46	0,14	1,31
ANDI-06	AF	05-mar-98	0,82	1,04	0,21	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,10	0,11	0,08	0,40
ANDI-06	BE	14-sep-98	0,51											
ANDI-06	BE	16-mar-99	1,00	3,30	0,20	0,05	0,10	0,07	0,21	0,12	0,58	0,82	0,34	2,24
ANDI-08	CH	01-mar-98	0,66	6,43	0,37	0,06	0,05	0,08	0,23	0,12	0,57	0,76	0,39	2,20
ANDI-08	CH	24-sep-98	0,76											
ANDI-08	CH	17-mar-99	1,43	4,94	0,32	0,05	0,07	0,05	0,13	0,05	0,26	0,53	0,27	1,36
ANDI-09	CH	01-mar-98	0,59	4,21	0,25	0,05	0,06	0,05	0,18	0,07	0,38	0,45	0,31	1,50
ANDI-09	CH	24-sep-98	0,68											
ANDI-09	CH	17-mar-99	1,56	3,81	0,37	0,06	0,08	0,05	0,17	0,08	0,34	0,63	0,39	1,74
ANDI-10	CH	01-mar-98	0,94	10,64	0,28	0,08	0,05	0,08	0,28	0,13	0,69	0,91	0,45	2,59
ANDI-10	CH	24-sep-98	0,78											
ANDI-11	CH	01-mar-98	0,70	11,89	0,27	0,09	0,07	0,10	0,31	0,15	0,69	1,01	0,48	2,81
ANDI-11	CQ	15-sep-98	1,02	10,28	0,11	0,04	0,06	0,07	0,19	0,34	0,60	0,99	0,16	2,41
ANDI-11	CQ	23-mar-99	2,14	18,30	0,52	0,08	0,10	0,16	0,53	0,22	1,06	1,63	0,42	4,12
ANDI-13	CQ	05-mar-98	1,00	55,90	1,11	0,42	0,46	1,37	1,22	1,52	2,35	3,64	1,62	12,18
ANDI-13	SP	15-sep-98	1,01											
ANDI-14	SP	13-ene-98	0,51	14,59	0,31	0,05	0,06	0,06	0,21	0,27	0,46	0,69	0,27	2,02
ANDI-14	SP	30-jun-98	0,80	21,54	0,25	0,06	0,07	0,08	0,38	0,66	0,96	2,12	0,65	4,92
ANDI-16	SP	12-ene-98	0,76	11,46	0,40	0,04	0,08	0,10	0,26	0,37	0,71	1,09	0,49	3,10
ANDI-16	SP	30-jun-98	0,78	3,34	0,18	0,04	0,06	0,07	0,45	0,82	1,34	2,92	1,08	6,74
ANDI-16	SP	21-ene-99	0,92	9,80	0,70	0,05	0,09	0,10	0,38	0,20	0,84	1,53	0,71	3,85
ANDI-35	CF	21-abr-98	0,41											
ANDI-35	CF	28-oct-98	0,75	0,80	0,17	0,03	0,04	0,05	0,04	0,06	0,11	0,12	0,03	0,45
ANDI-35	CF	12-abr-99	1,54	2,81	0,35	0,05	0,05	0,04	0,12	0,08	0,19	0,30	0,06	0,84
ANDI-38	CH	26-ene-98					0,03	0,02	0,04	0,05	0,09	0,12	0,07	0,42
ANDI-38	CH	01-feb-99	0,83	1,84	0,21	0,05	0,04	0,03	0,08	0,09	0,17	0,26	0,06	0,73
ANDI-44	CQ	23-feb-98	0,71	2,43	0,12	0,02	0,02	0,02	0,06	0,10	0,18	0,09	0,09	0,56
ANDI-44	CH	16-mar-99	1,40	1,05	0,24	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,05	0,03	0,25



Tabla 2. Contenido en radioisótopos en moluscos bivalvos del litoral andaluz (en Bq/Kg de masa húmeda)

ZONA DE PRODUCC.	ESPECIE	FECHA	Cs-134	Cs-137	Ra-226	Ra-228	Th-228	K-40	Co-58	Co-60	Fe-59	Mn-54	Zn-65	Zr-95
ANDI-04	CQ	02-mar-98	0.38	0.40	0.96	1.53	1.33	6.86	1.20	0.60	7.78	0.77	1.62	2.38
ANDI-04	CQ	08-mar-99	0.00	0.00	0.00	1.80	3.00	178.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-04	CQ	01-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	51.00	416.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-05	CH	02-mar-98	0.36	0.40	0.93	1.44	1.22	5.94	1.02	0.40	1.81	0.44	1.05	1.99
ANDI-05	CH	08-mar-99	0.00	0.00	1.10	1.60	2.70	148.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-05	CH	07-mar-00	0.00	0.00	0.00	4.43	92.50	440.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-06	AF	05-mar-98	0.39	0.41	1.03	1.67	1.37	6.48	0.91	0.44	3.29	0.45	1.09	1.92
ANDI-06	BE	16-mar-99	0.00	0.00	0.00	2.20	2.40	133.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-06	BE	21-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	459.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-08	CH	01-mar-98	0.30	0.31	0.79	1.22	1.07	5.19	0.97	0.31	4.20	0.38	0.90	2.02
ANDI-08	CH	17-mar-99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	151.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-08	CH	09-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	307.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-09	CH	01-mar-98	0.32	0.34	0.85	1.33	1.11	5.70	0.91	0.37	3.29	0.41	1.33	1.82
ANDI-09	CH	17-mar-99	0.00	0.00	0.00	0.00	2.20	150.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-09	CH	09-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	35.50	382.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-10	CH	01-mar-98	0.30	0.33	0.85	1.35	1.09	5.61	0.61	0.33	1.62	0.37	0.72	1.13
ANDI-10	CH	17-mar-99	0.00	0.00	1.90	1.30	2.70	153.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-10	CH	09-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	356.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-11	CH	01-mar-98	0.22	0.23	0.58	0.87	0.73	4.03	0.58	0.23	2.22	0.26	0.59	1.23
ANDI-11	CQ	23-mar-99	0.00	0.00	1.30	2.20	2.80	1.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-11	CQ	22-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	538.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-13	CQ	05-mar-98	0.49	0.51	1.18	1.86	1.56	8.32	1.26	0.53	4.72	0.30	1.26	2.53
ANDI-13	SP	09-mar-99	0.00	0.00	1.10	2.20	3.40	157.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-13	SP	21-mar-00	0.00	0.00	0.00	0.00	36.00	410.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-14	SP	21-abr-98	0.00	0.00	2.40	3.10	2.80	148.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-14	SP	21-abr-99	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00	141.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-14	SP	11-abr-00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	516.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-16	SP	21-abr-98	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	102.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-16	SP	21-abr-99	0.00	0.00	0.90	2.10	2.80	149.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-16	AJ	11-abr-00	0.00	0.00	9.30	0.00	0.00	408.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-35	CF	16-feb-98	0.25	0.26	0.69	1.05	0.86	4.32	0.49	0.26	1.44	0.29	0.63	0.93
ANDI-35	CF	03-feb-99	0.00	0.00	0.00	0.00	3.40	158.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-35	CF	02-feb-00	0.00	0.00	0.00	0.00	63.00	431.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-38	CH	19-may-98	0.00	0.00	2.04	0.00	4.10	120.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-38	CH	10-may-99	0.00	0.00	0.00	2.50	3.00	152.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-38	CH	23-may-00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	351.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-41	CH	13-may-98	0.00	0.00	2.20	0.00	3.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-44	CH	05-may-98	0.00	0.00	1.70	3.00	3.00	135.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-44	CH	11-may-99	0.00	0.00	0.00	0.00	2.60	149.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ANDI-44	CQ	09-may-00	0.00	0.00	0.00	0.00	21.30	532.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

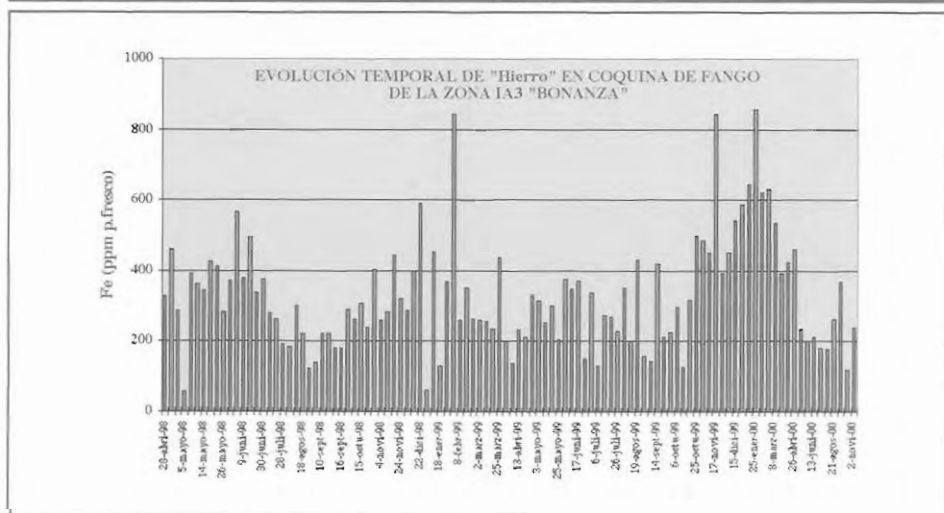
2) ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN QUÍMICA DEL ESTUARIO DEL RÍO GUADALQUIVIR.

Desde Abril de 1998, cuando ocurrió el vertido de Aznalcóllar, se tomaron semanalmente muestras de interés pesquero en zonas del Guadalquivir y su Estuario que podrían haber sido afectadas por metales piríticos. Dado que los niveles detectados en la mayoría de las muestras no suponían riesgo para el consumo humano, como se temió inicialmente, desde principios de 1999 se redujo la frecuencia de muestreo a quincenal y, desde Julio de 2000 a mensual. Si alguna especie superaba los máximos permitidos, se realizaba un control exhaustivo. De las especies de bivalvos destacan la coquina de fango del Río Guadalquivir en Bonanza (IA3), la coquina del litoral de Doñana en Punta de Malandar (IA4) y Torre Zalabar (IA5) y la chirla de Punta de Malandar (IA4). Entre los peces, lenguados y albures del Codo de la Esparraguera (IA1) y del Guadalquivir en Bonanza (IA3).

EVOLUCIÓN DE LOS METALES EN COQUINA DE FANGO DE LA ZONA IA3 "BONANZA"

La coquina de fango es el bivalvo que más hierro acumula, llegando a concentraciones >400 ppm en peso fresco. La Figura 21 muestra la evolución del Fe en animales del Guadalquivir en Bonanza. No se aprecia una clara tendencia temporal, pues hubo periodos en que se detectaron elevadas concentraciones, mientras que en otros no eran tan altas. Así, entre finales de 1999 y principios de 2000 se alcanzaron concentraciones >500 ppm que raramente se habían visto antes. No obstante, los picos de Fe suelen observarse en invierno, sugiriendo su relación con el arrastre por las lluvias, mas abundantes en el Sur de España en invierno.

Figura 21. Niveles de hierro en coquina de fango procedentes de la zona IA3 "Bonanza".



Hasta mediados de 1999 hubo pocas variaciones del nivel de Cu (Figura 22), nunca superior a 10 ppm, salvo en Mayo y Diciembre de 1998 en que sobrepasó el máximo (20 ppm). De Agosto de 1999 a Febrero de 2000 aumentó, quizás por las lluvias, volviendo luego a niveles similares a los anteriores. Como el Fe, el zinc (Figura 23), se acumula en coquina de fango más que en otros bivalvos. Su límite máximo no está legislado, al no ser tóxico sino necesario.

Figura 22. Niveles de cobre en coquina de fango procedentes de la zona IA3 "Bonanza".

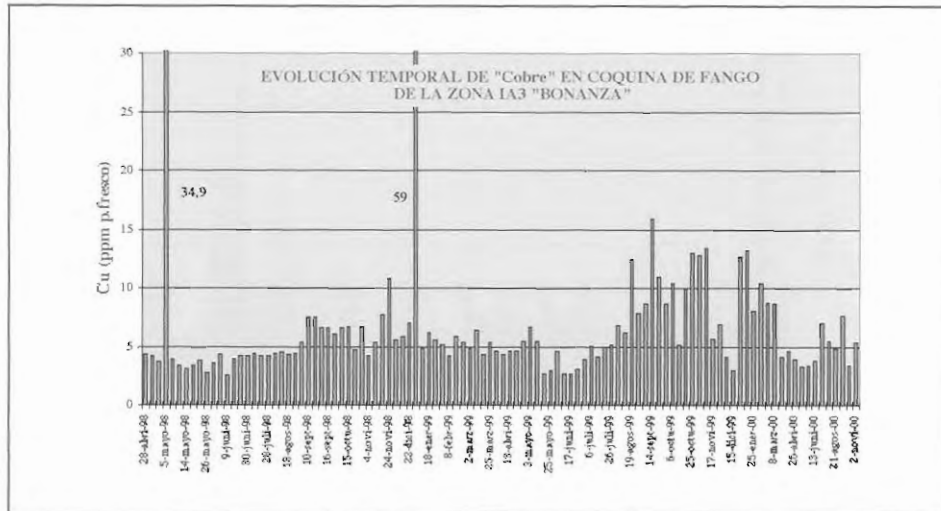
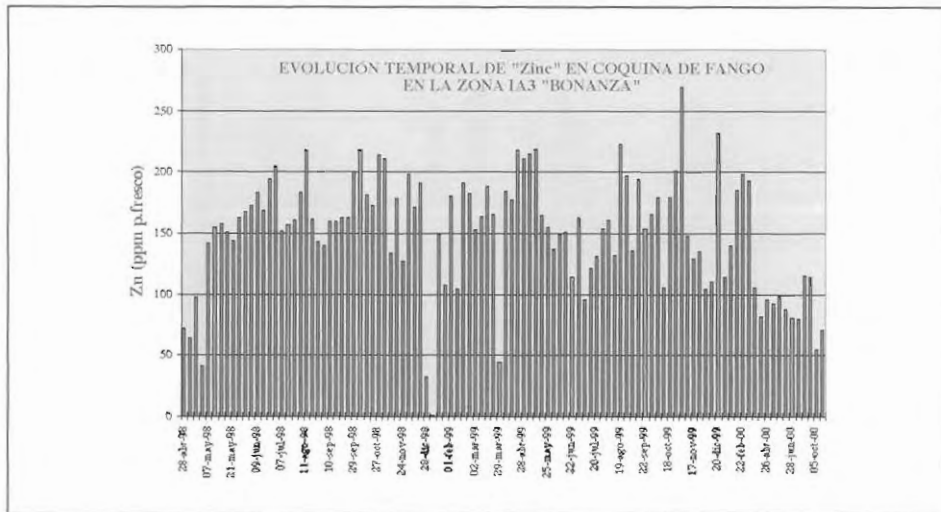


Figura 23. Niveles de zinc en coquina de fango procedente de la zona IA3 "Bonanza".



El manganeso (Figura 24) tampoco es tóxico, pero indica el estado reproductor de los bivalvos, pues se acumula en los órganos sexuales, dependiendo del sexo y período del año, y disminuye tras el desove. En coquina de fango hubo más Mn desde fin de 1999 a principio de 2000, como ocurría con el Cu, coincidiendo quizás con las lluvias caídas en dicha época.

Figura 24. Niveles de manganeso en coquina de fango procedente de la zona IA3 "Bonanza".

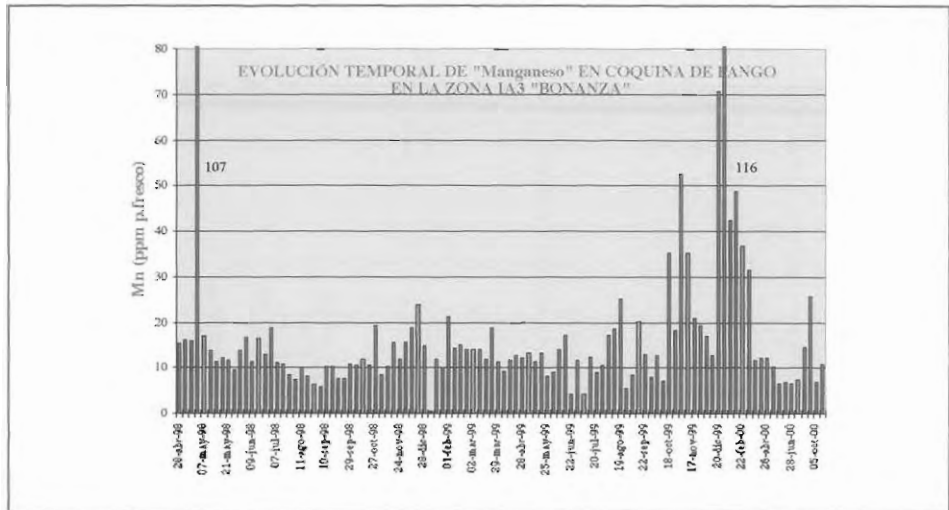
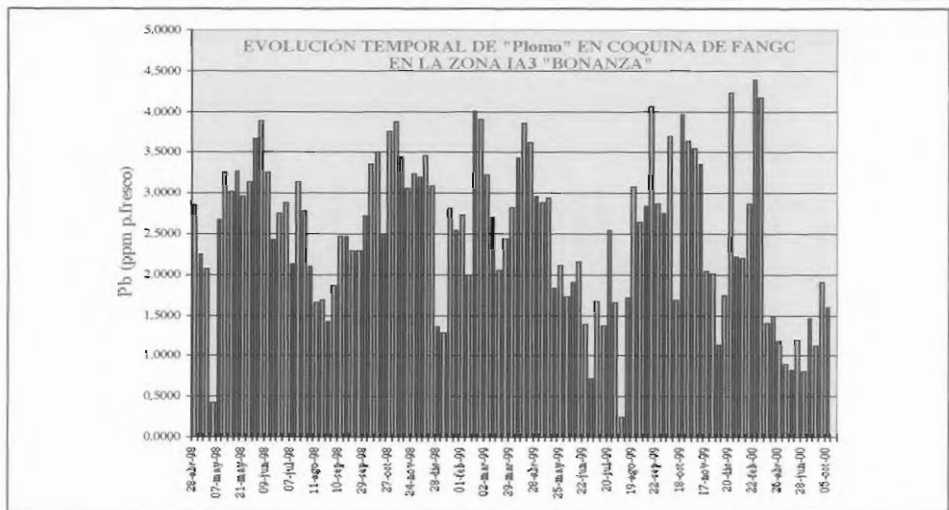


Figura 25. Niveles de plomo en coquina de fango procedente de la zona IA3 "Bonanza".



El plomo (Figura 25) mostró también variaciones cíclicas, aunque con otros periodos y ciclicidad. En general los niveles de Pb fueron también superiores en invierno, coincidiendo con las lluvias intensas. Se vieron niveles de Pb un poco más altos a principios del año 2000, pero nunca sobrepasó el límite máximo establecido (5 ppm). Nunca se superó el límite máximo de cadmio (Figura 26), aunque hubo variaciones, asociadas de nuevo al periodo invernal.

El arsénico (Figura 27) disminuyó en verano, con escasas lluvias, pero tampoco sigue una variación regular. El límite máximo de As no está legislado. En Diciembre de 1998 hubo un valor de mercurio un poco más alto (Figura 28), que alcanzó 0,1 ppm, en el resto del trienio estudiado no mostró variaciones apreciables, manteniéndose en torno a los 0,02 ppm.

Figura 26. Niveles de cadmio en coquina de fango procedentes de la zona IA3 "Bonanza".

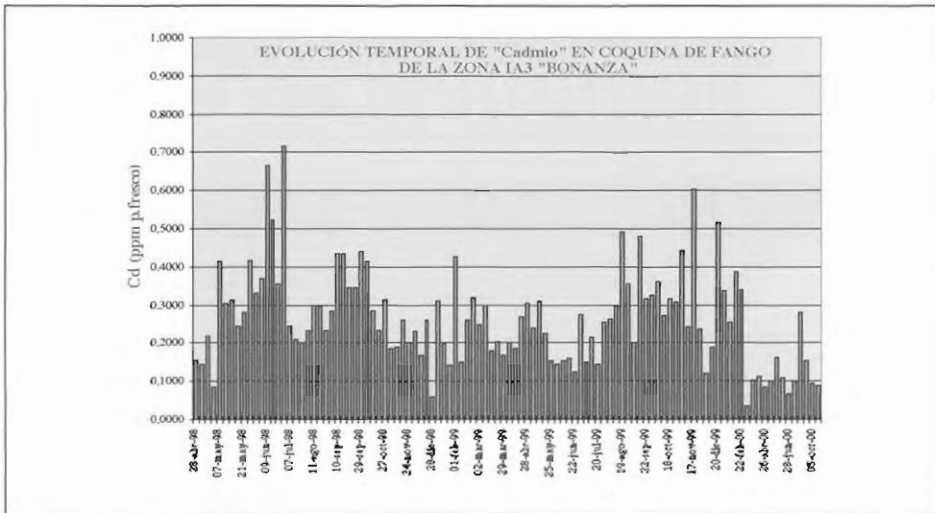


Figura 27. Niveles de arsénico en coquina de fango procedentes de la zona IA3 "Bonanza".

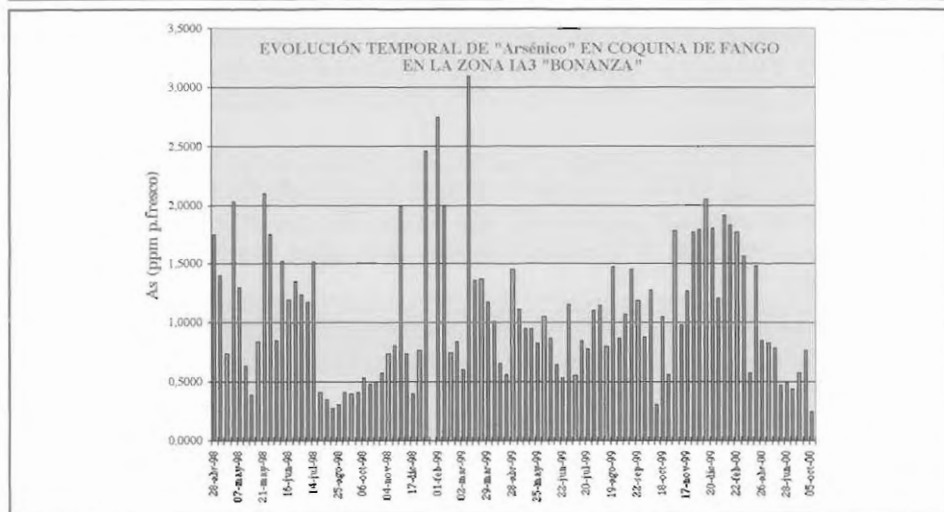
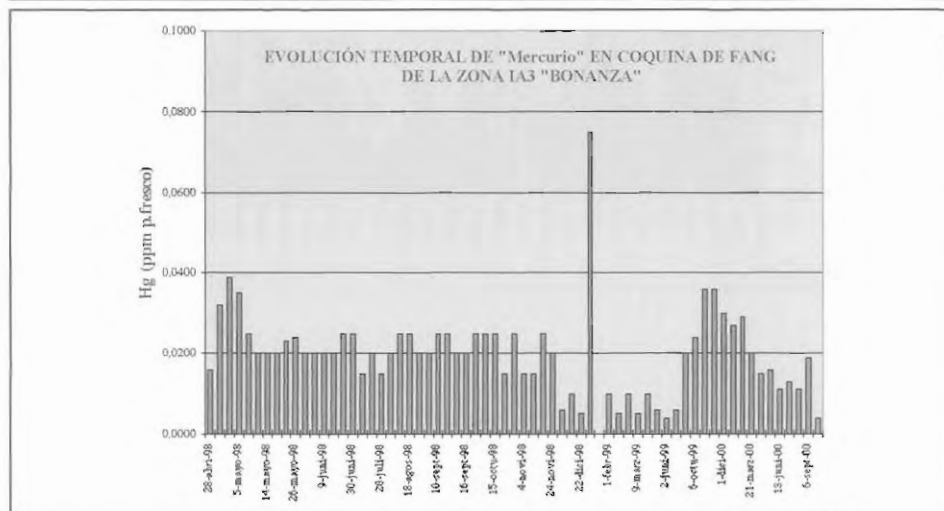


Figura 28. Niveles de mercurio en coquina de fango procedentes de la zona IA3 "Bonanza".



EVOLUCIÓN DE LOS METALES EN COQUINA DE LA ZONA IA4 "PUNTA DEL MALANDAR"

El hierro (Figura 29), en general, se ha comportado en coquinas de esta zona del Estuario del Guadalquivir de forma más o menos regular a lo largo de este trienio, con máximos asociados a los periodos de lluvias más intensas, salvo que en alguna ocasión se han detectado concentraciones más altas de lo normal.

En el cobre (Figura 30) y el manganeso (Figura 31) se han producido algunas variaciones en su concentración durante el trienio, aunque no hay límites establecidos para el Mn. Zinc (Figura 32), cadmio (Figura 33) y arsénico (Figuras 34) han disminuido desde que se produjo el accidente de Aznalcóllar y desde principios de 1999 se están comportando de manera regular.

En 1998 se observaron concentraciones de plomo (Figura 35) algo anormales en esta zona, aunque, en general, ha habido pocas variaciones en la concentración de este metal; tan solo en una ocasión (Diciembre de 1998) se obtuvo un valor que superó el límite, 5 ppm. En relación a los niveles de mercurio (Figura 36), los valores obtenidos se encuentran por debajo de los 0,5 ppm, aunque en Abril y Diciembre de 1998 se encontraron valores algo elevados.

Figura 29. Niveles de hierro en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".

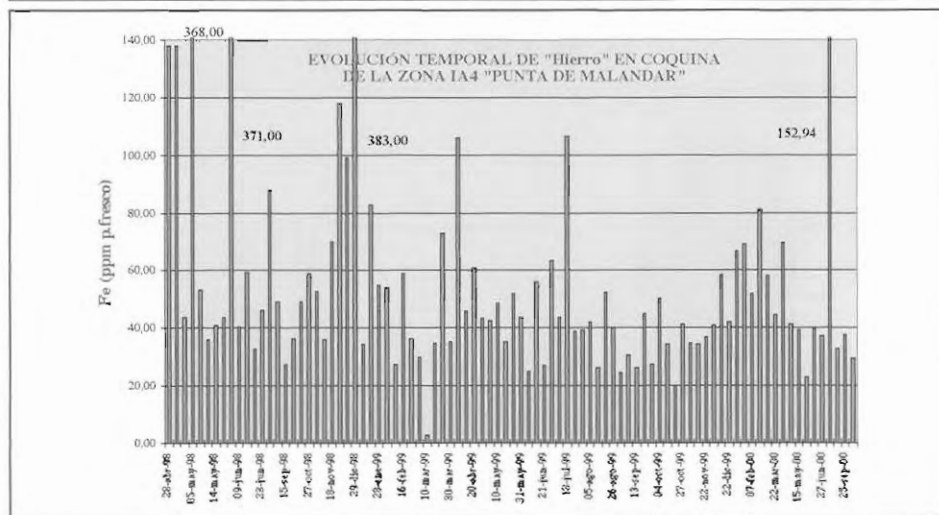


Figura 30. Niveles de cobre en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".

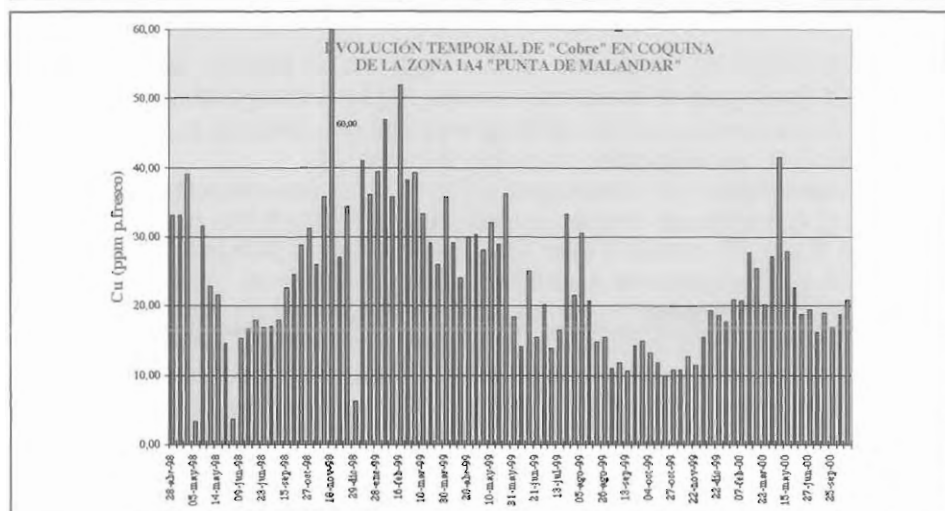


Figura 31. Niveles de manganeso en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".

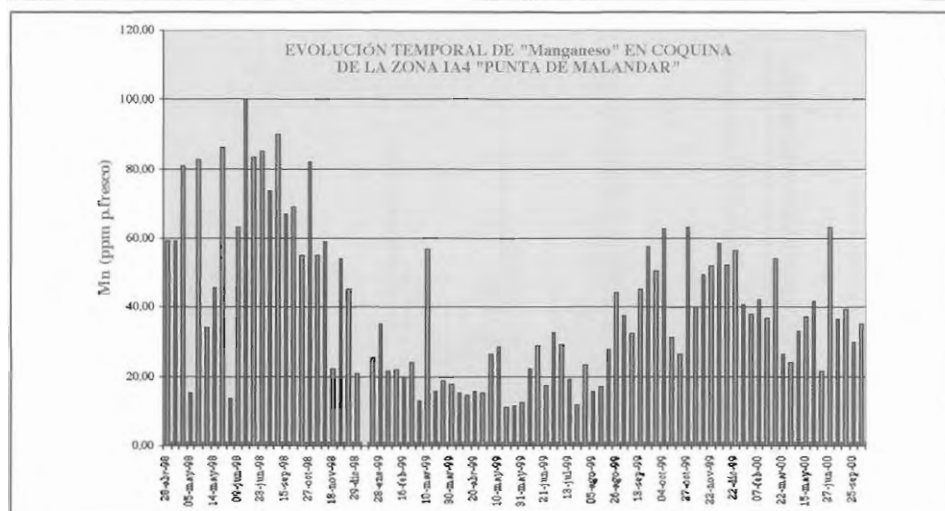




Figura 32. Niveles de zinc en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".

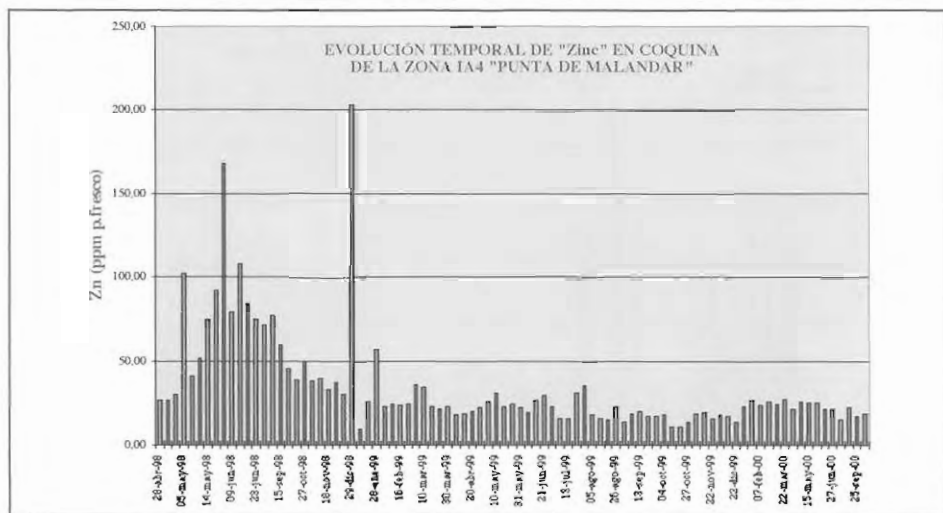


Figura 33. Niveles de cadmio en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".

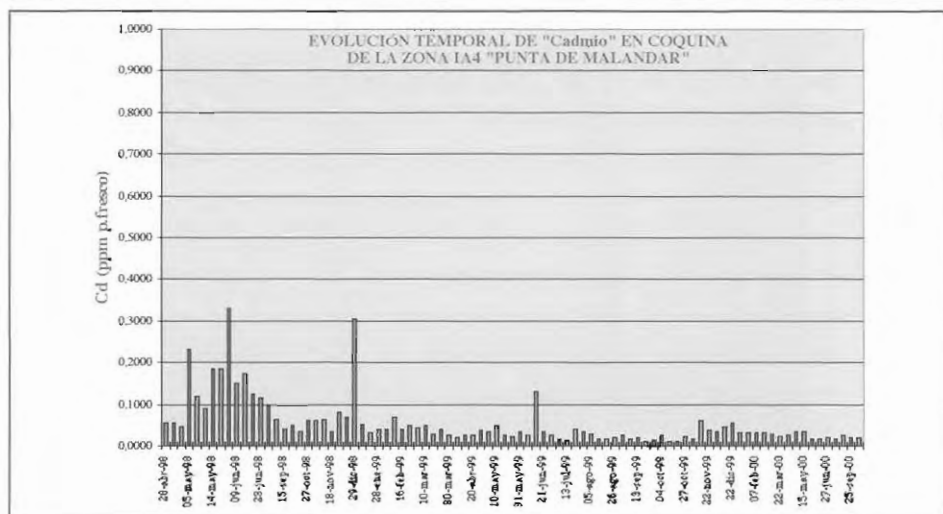


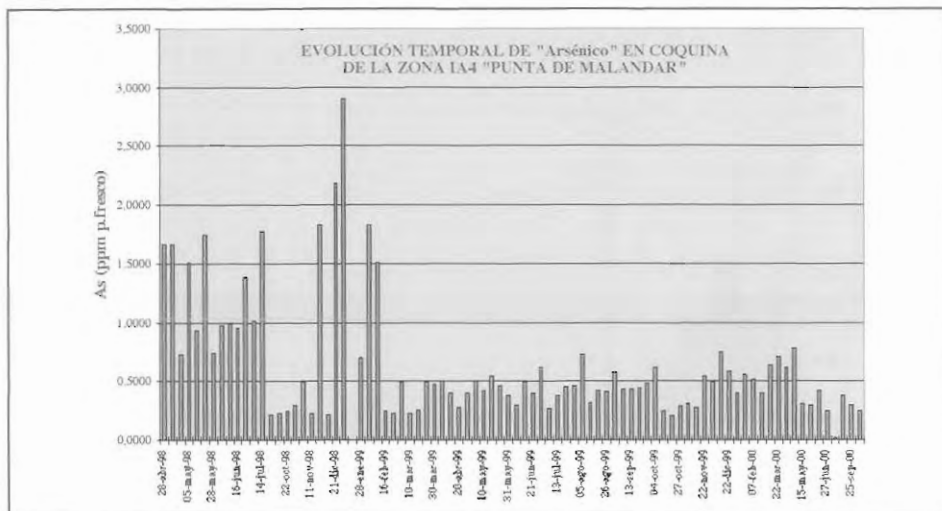
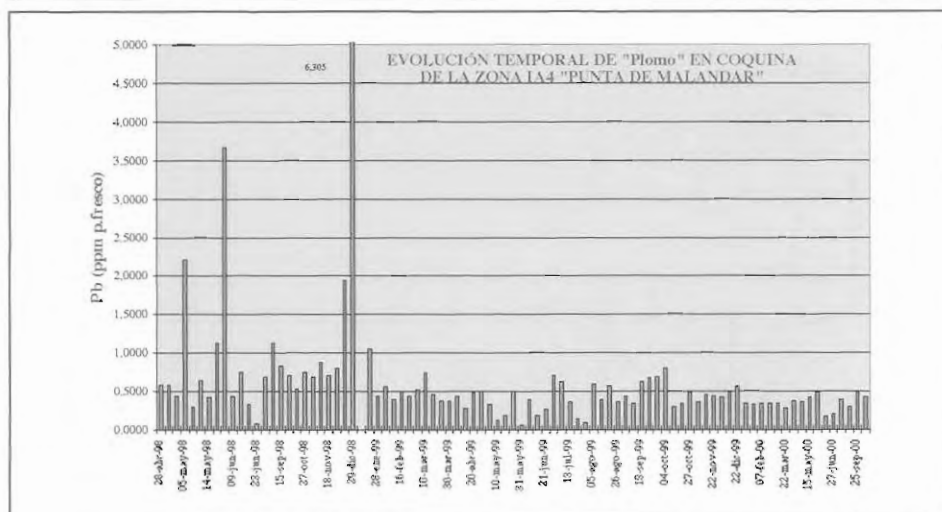
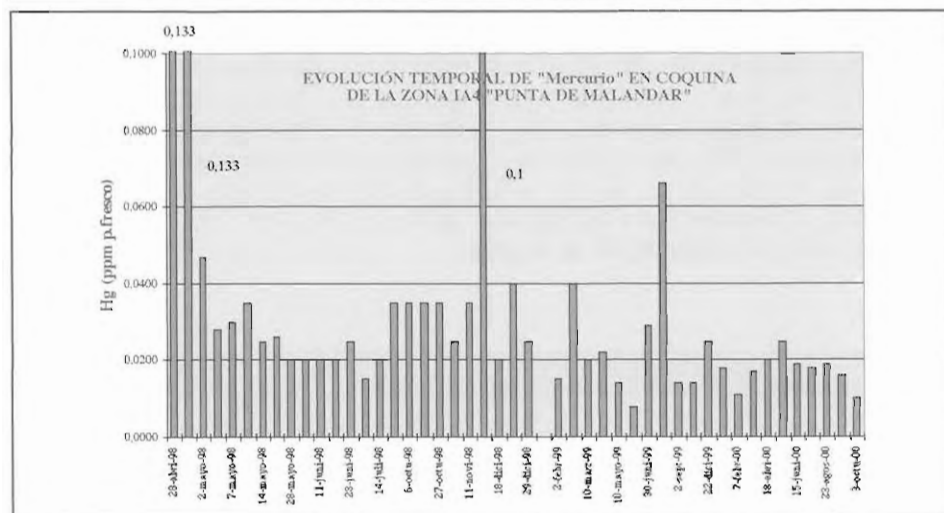
Figura 34. Niveles de arsénico en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".

Figura 35. Niveles de plomo en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".


Figura 36. Niveles de mercurio en coquina procedente de la zona IA 4 "Punta de Malandar".



EVOLUCIÓN DE LOS METALES EN COQUINA DE LA ZONA IA5 "TORRE ZALABAR"

Los valores de Cu, Mn, Pb, As y Cd en coquinas de esta zona se muestran en las Figuras 37 a 41. Estos metales han seguido igual patrón que los de Punta de Malandar. No obstante, en Torre Zalabar se superó el límite de Cu (Figura 37) en Noviembre de 1998 y Marzo de 1999, casi coincidentes con máximos observados también en la Punta de Malandar. En cambio, los niveles de Pb (Figura 39) no superaron el límite máximo, como había ocurrido en Punta de Malandar, aunque en Enero de 1999 se detectó un valor más alto que el resto de los analizados.

Figura 37. Niveles de cobre en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

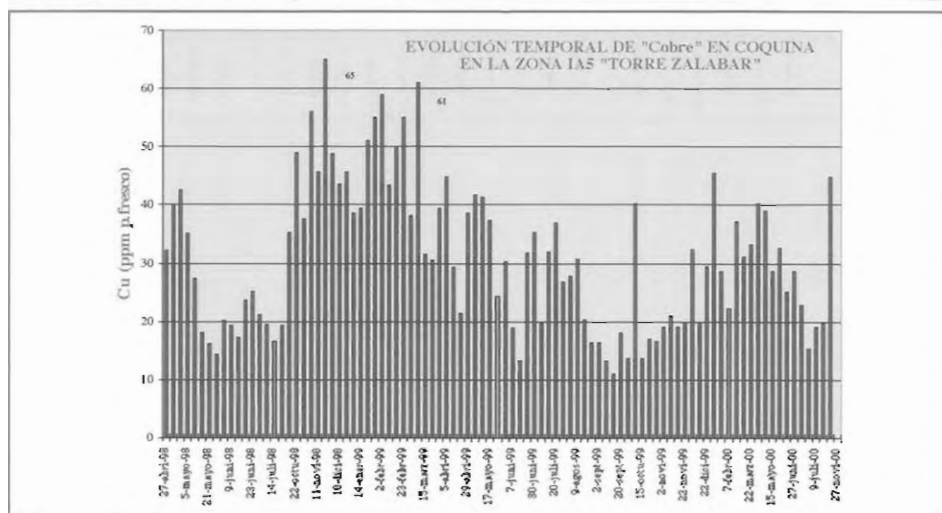




Figura 38. Niveles de manganeso en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

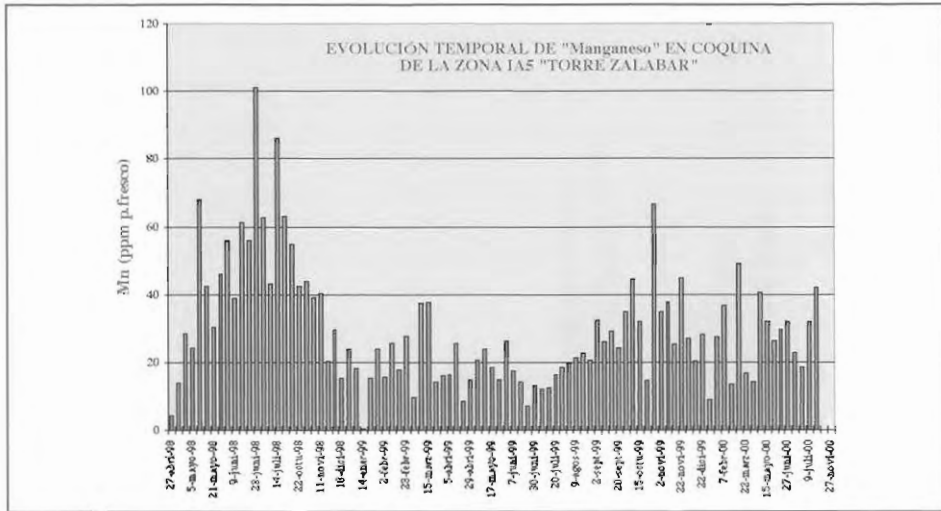


Figura 39. Niveles de plomo en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

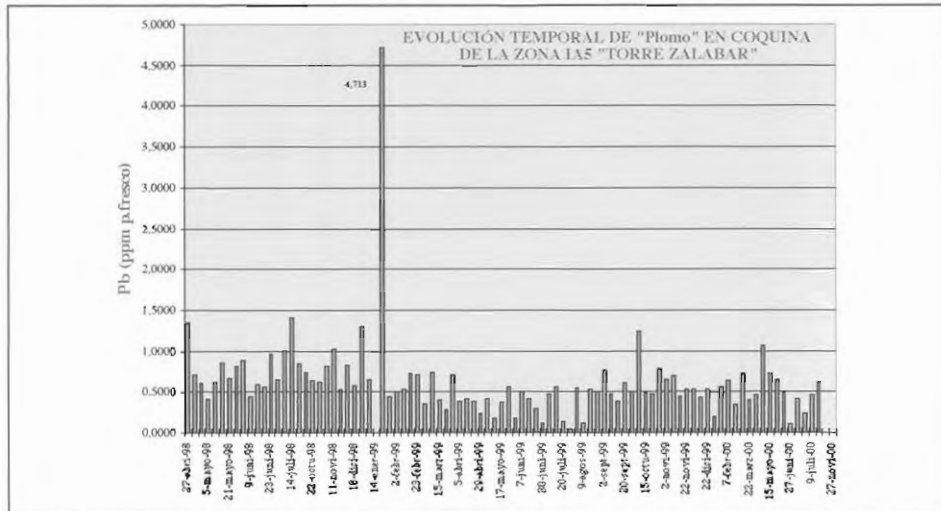


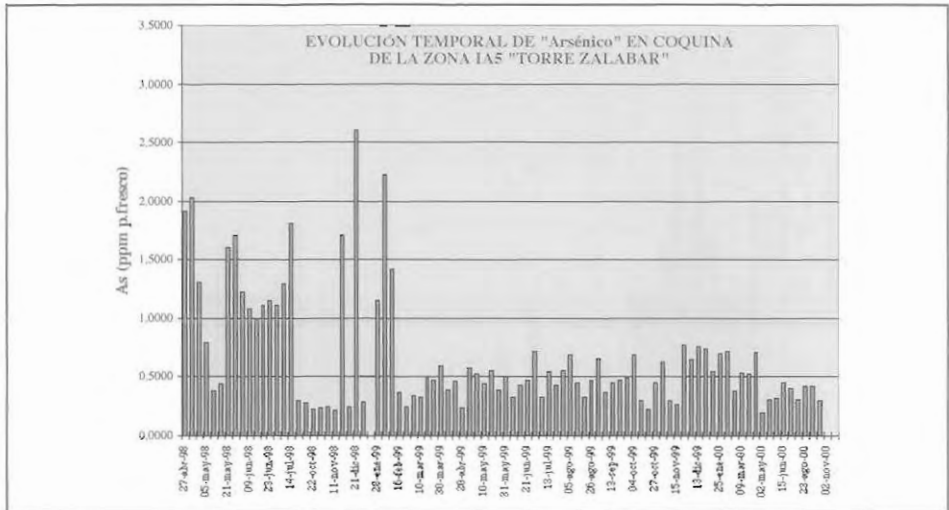
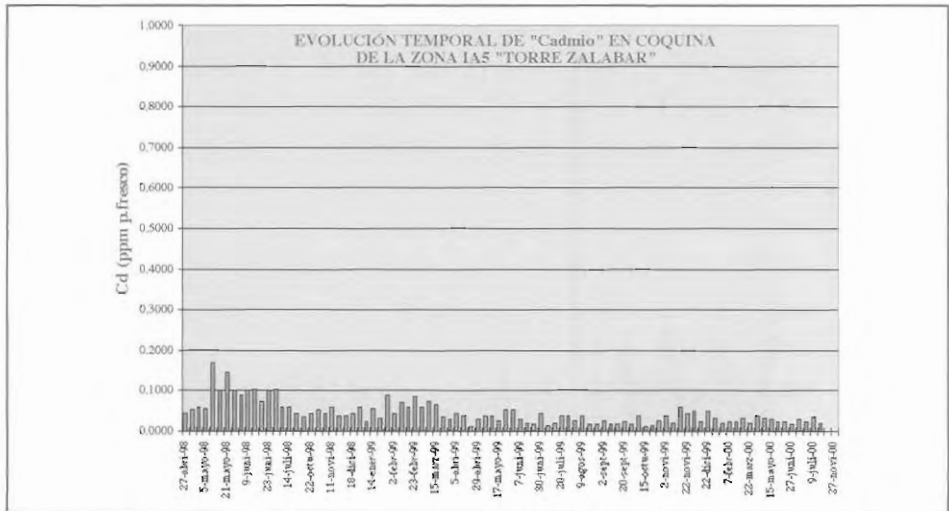
Figura 40. Niveles de arsénico en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".**Figura 41. Niveles de cadmio en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".**



Figura 42. Niveles de zinc en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

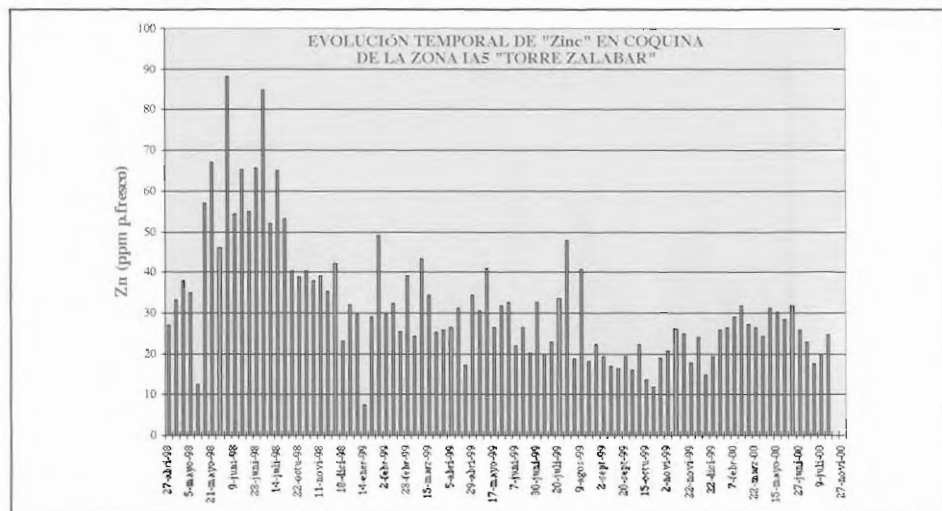


Figura 43. Niveles de mercurio en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

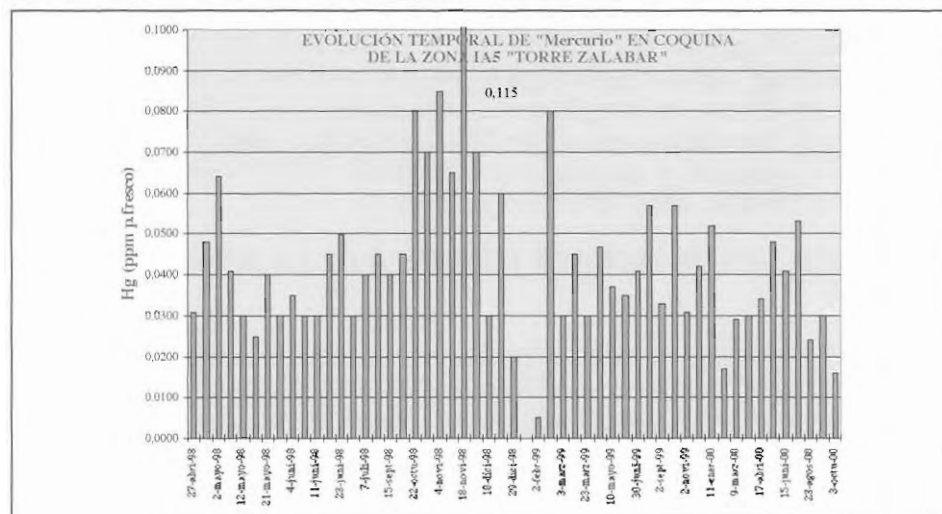
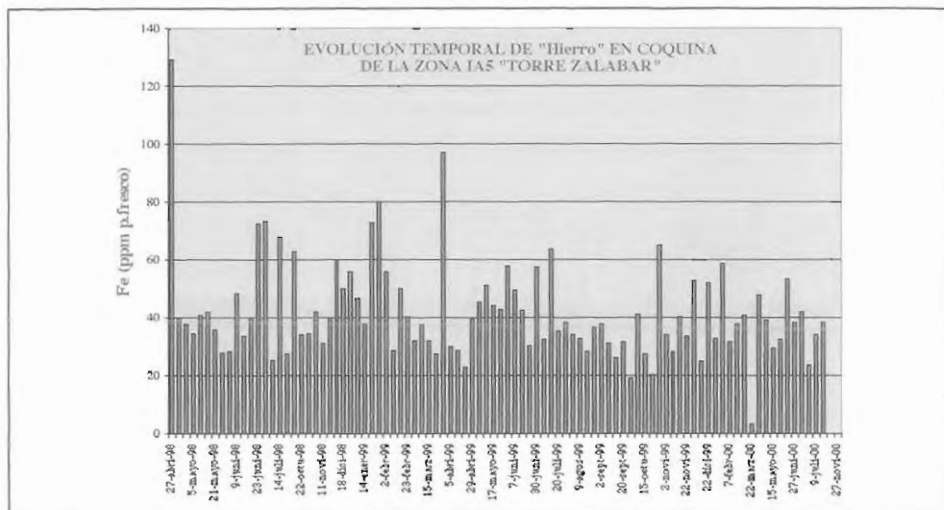


Figura 44. Niveles de hierro en coquina procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".



Al igual que el As (Figura 40) y el Cd (Figura 41), el zinc (Figura 42) también ha disminuido desde el vertido de Aznalcóllar. La coquina de Torre Zalabar acumula más mercurio (Figura 43) que la de Punta de Malandar, pero ambas a niveles inferiores a los de alerta. El hierro (Figura 44) se ha comportado de forma más regular que en la Punta de Malandar. Además, mientras que en esta última zona los niveles de Fe, en su mayoría, alcanzaban los 40 ppm, en Torre Zalabar estaban por debajo de este valor. Esto resulta lógico, pues Torre Zalabar está en mar abierto, y la Punta de Malandar está aún en el Estuario del Guadalquivir, lo que explica que los metales sean más altos en esta zona, y aún más en Bonanza, aguas arriba en el Estuario.

EVOLUCIÓN DE LOS METALES EN CHIRLA DE LA ZONA IA5 "TORRE ZALABAR"

En chirlas de la zona de Torre Zalabar no se han observado episodios de contaminación. No obstante, a comienzos de 1998 se superó el límite de cobre (Figura 45), aunque solo en dos décimas. Comparando chirla y coquina de esta zona, se observa que la chirla acumula menos manganeso (Figura 46), zinc (Figura 47) y mercurio (Figura 48) que la coquina. No obstante, también se detecta en chirla una clara disminución de estos metales desde comienzos de 1999.

El plomo (Figura 49) se acumula más en coquina que en chirla y en ésta última tuvo unas variaciones un tanto irregulares entre Abril y Agosto de 1999. Sin embargo, el cadmio (Figura 50) se acumula más en chirla que en coquina, habiéndose observado también en chirla una disminución del contenido de Cd desde que el vertido de Aznalcóllar. El comportamiento del arsénico (Figura 51) ha sido similar en ambas especies, con variaciones irregulares hasta Febrero de 1999, manteniéndose luego más constante. No se aprecian variaciones importantes en la concentración de hierro (Figura 52) detectado en chirla de esta zona.



Figura 45. Niveles de cobre en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

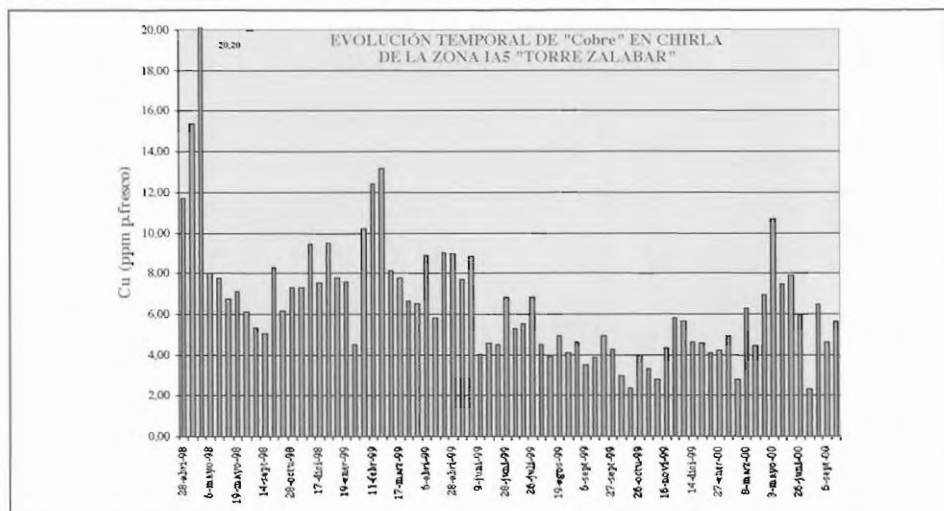


Figura 46. Niveles de manganeso en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

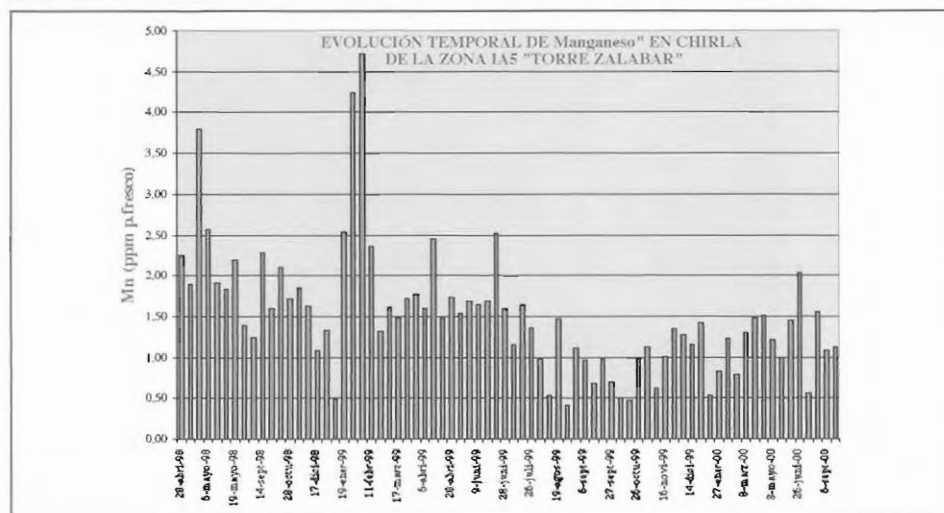


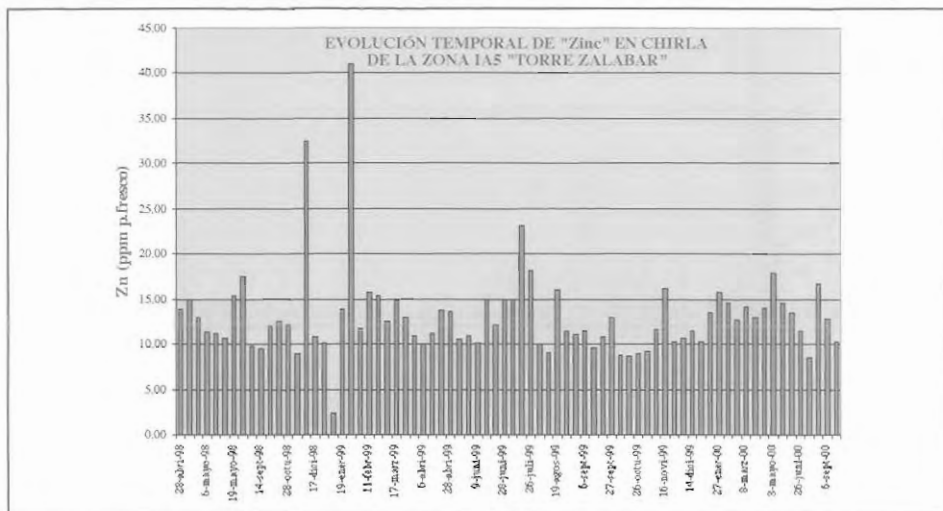
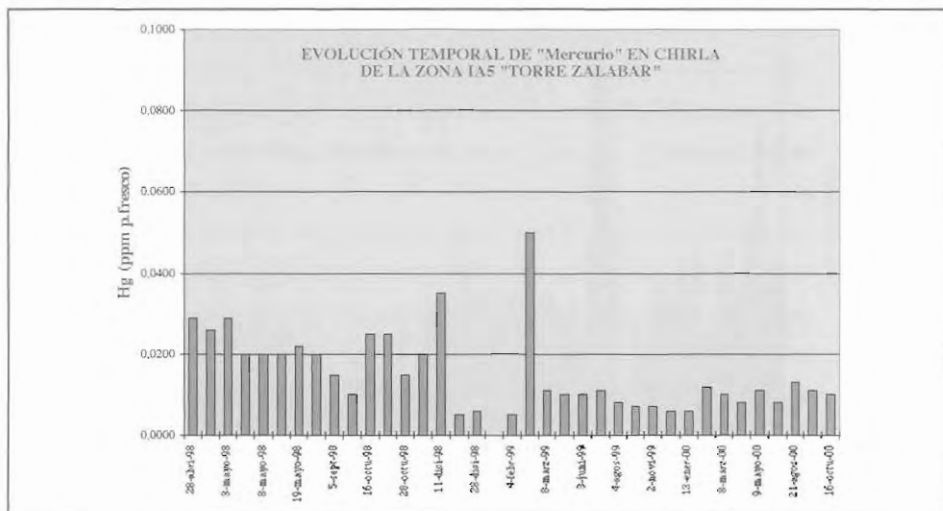
Figura 47. Niveles de zinc en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

Figura 48. Niveles de mercurio en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".




Figura 49. Niveles de plomo en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

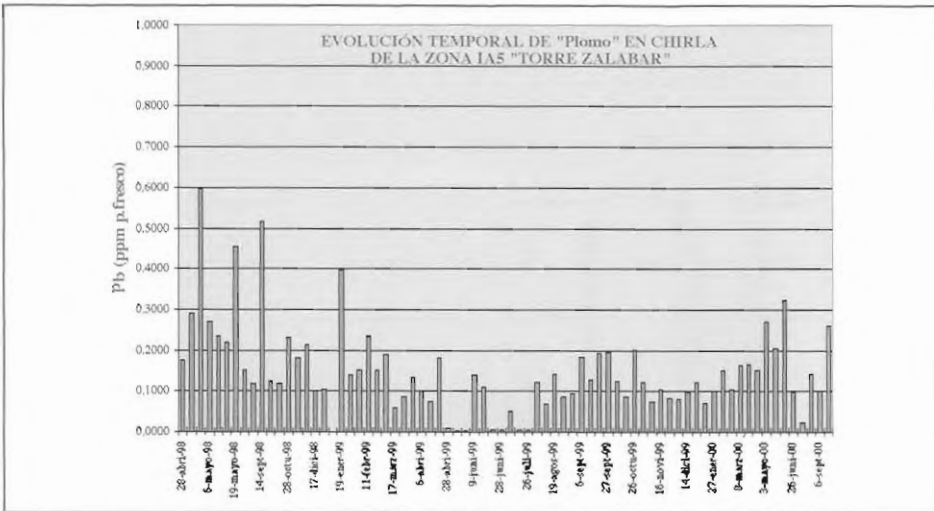


Figura 50. Niveles de cadmio en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

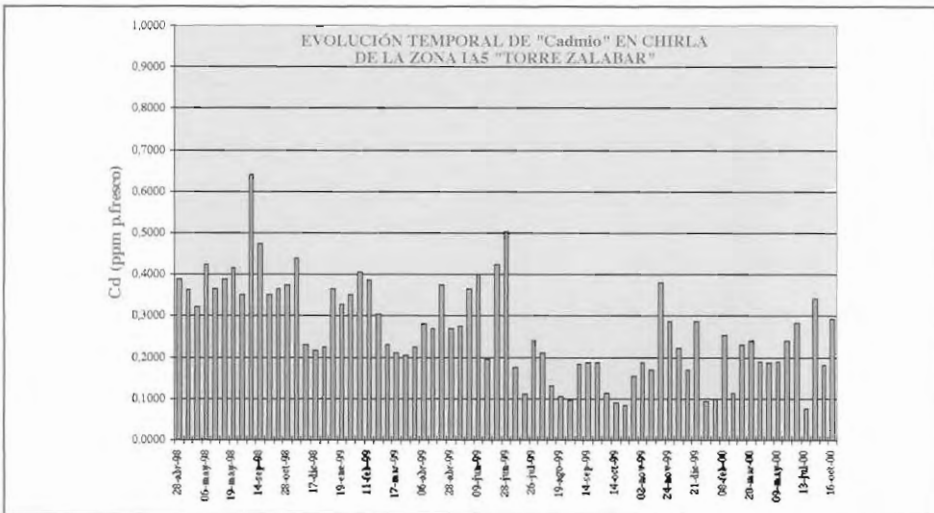
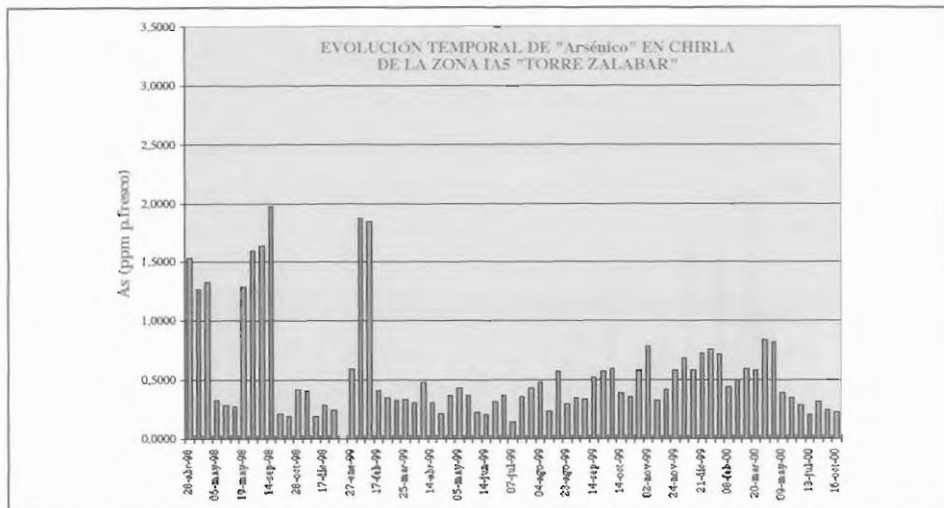
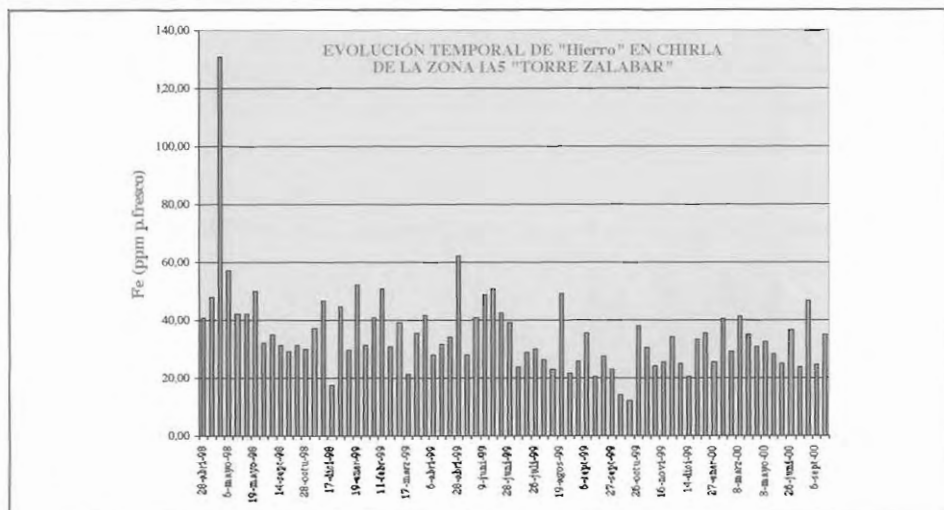


Figura 51. Niveles de arsénico en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".

Figura 52. Niveles de hierro en chirla procedente de la zona IA 5 "Torre Zalabar".




EVOLUCIÓN DE LOS METALES EN ALBUR DE IA3 "BONANZA" E IA1 "CODO DE LA ESPARRAGUERA".

En primer lugar, conviene indicar que los límites máximos permitidos para los peces, siempre que no estén congelados, en conserva o semiconserva, son iguales que para moluscos, salvo para el plomo, que en peces es 2 ppm del peso fresco, y en moluscos 5 ppm. En general, el nivel de metales pesados ha disminuído desde que se produjo el vertido de Aznalcóllar. En ningún momento se han superado los límites permitidos en ninguno de los metales cuya límites máximos están recogidos en la legislación.

En Bonanza, sin embargo, se ha observado un aumento de hierro (Figura 53) en Marzo de 1999, algo más acusado que en ocasiones anteriores, pero aún no se tienen datos para ver cómo ha evolucionado luego. Igual le ocurrió al lenguado de Codo Esparraguera en Enero de 1999, aunque la siguiente vez que se capturó (pasado más de un año) había disminuído de nuevo. El nivel de cobre (Figura 53) fue en todos los casos bastante inferior al límite, aunque en Bonanza hubo en Mayo de 1998 un pico un poco más alto, pero no alarmante. En el Codo de la Esparraguera no se observaron grandes variaciones del contenido de Cu.

La Figura 54 muestra la evolución de los contenido de cinc y manganeso en albu- res de Bonanza y Codo de la Esparraguera. En ambas zonas se observó una clara ten- dencia a disminuir los niveles de ambos metales desde 1998.

En Mayo de 1998 el nivel de plomo en ambas zonas fue el más alto detectado (Figura 55), llegando a alcanzar en Bonanza un valor próximo al máximo tolerado. La misma Figura muestra el contenido de cadmio, con mayores niveles en el Codo de la Esparraguera. En las restantes fechas en que se capturó esta especie había concentraciones mucho más bajas de Cd.

La Figura 56 muestra las concentraciones de arsénico en albu- res de ambas zonas. Hasta comienzos de 1999, los valores de arsénico fueron indetectables, aunque a partir de entonces se observaron valores en torno a los 0,5 ppm en Bonanza y mucho menores en Codo de la Esparraguera. La misma Figura muestra los niveles de mercurio en albu- res de ambas zonas. Aunque tras el vertido se detectaron en Bonanza 0,2 ppm de Hg, en los muestreos siguientes los valores disminuyeron; en Codo de la Esparraguera, sin embargo, se detectó por primera vez algo de Hg en Enero de 1999, pero también fue- ron valores bajos.

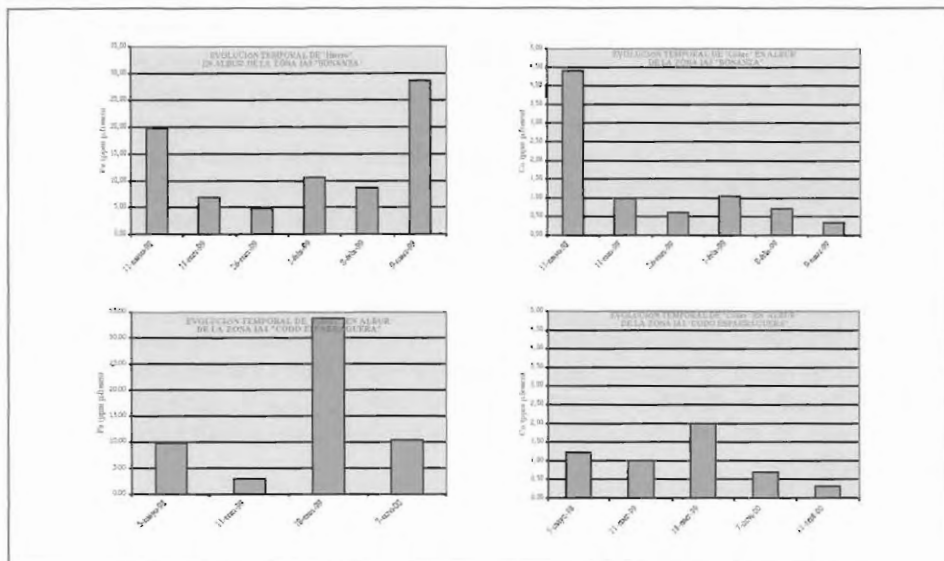
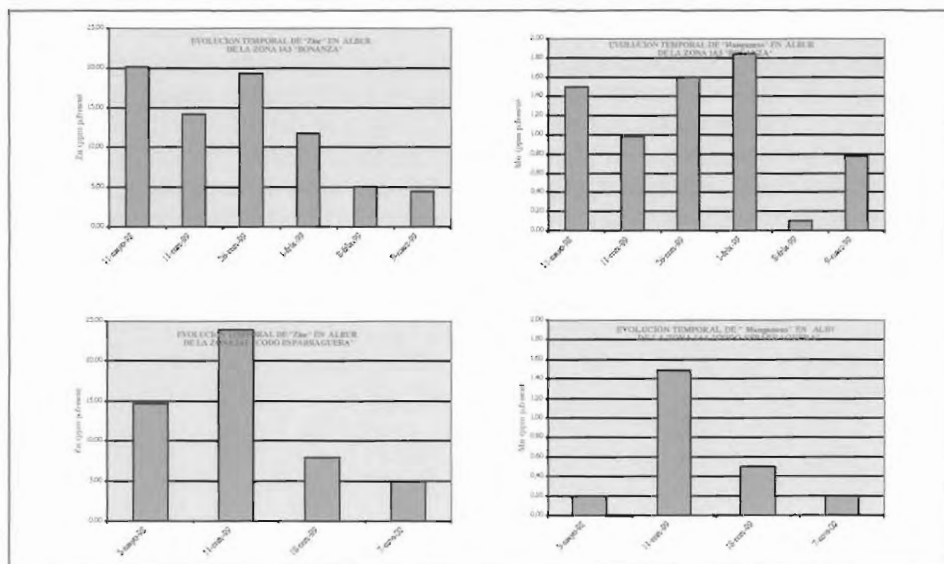
Figura 53. Niveles de hierro y cobre en albur de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".

Figura 54. Niveles de zinc y manganeso en albur de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".




Figura 55. Niveles de plomo y cadmio en albur de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".

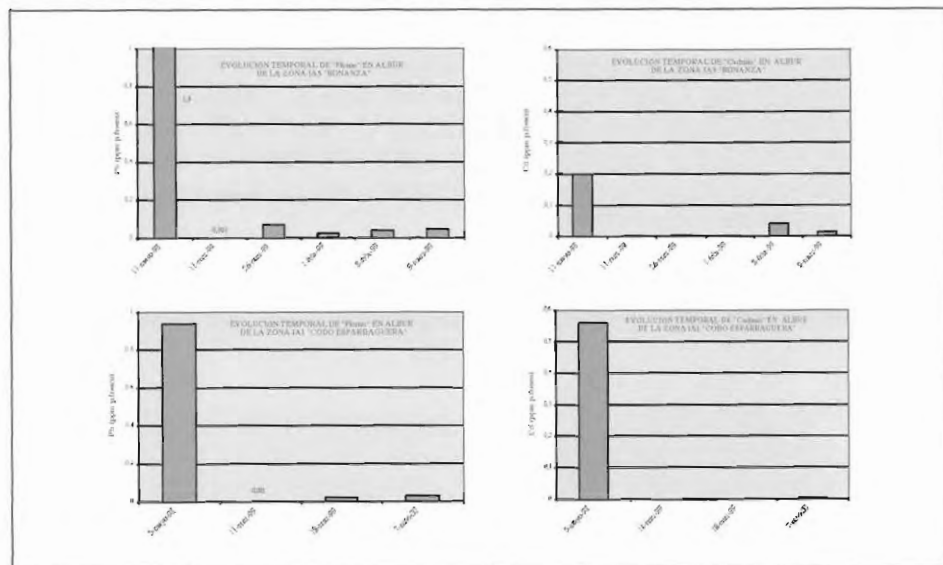
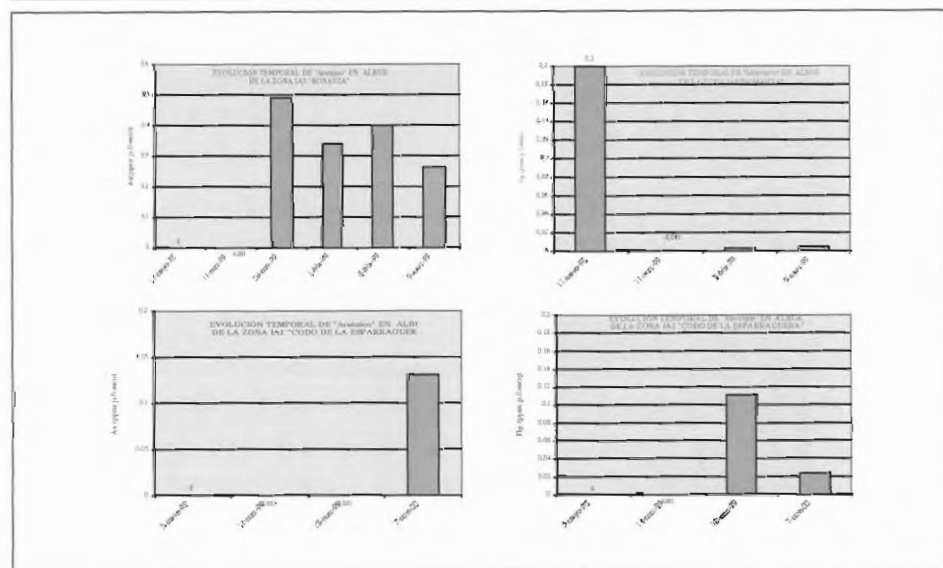


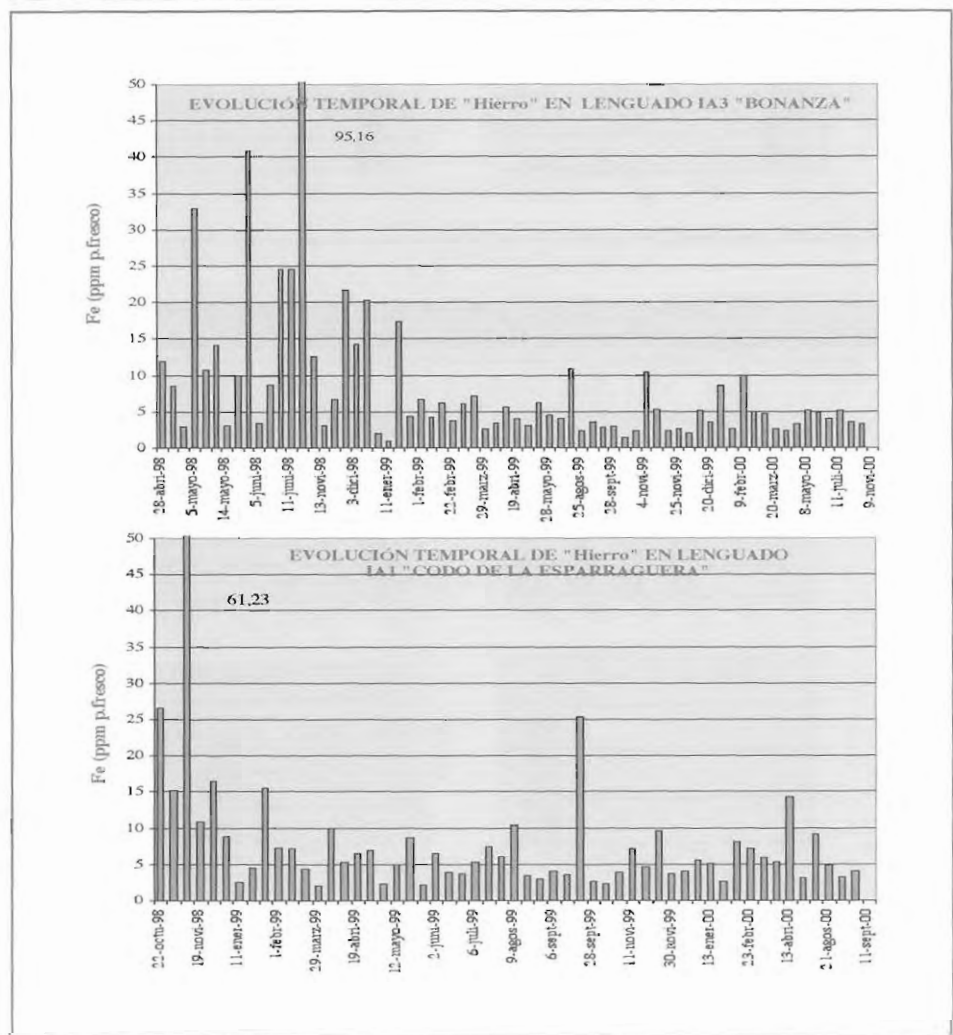
Figura 56. Niveles de arsénico y mercurio en albur de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".



EVOLUCIÓN DE LOS METALES EN LENGUADO DE LAS ZONAS IA3 "BONANZA" E IA1 "CODO DE LA ESPARRAGUERA"

En relación al contenido de hierro (Figura 57), entre Abril de 1998 y Enero de 1999, hubo en Bonanza varios picos de muy alta concentración, el más alto en Octubre de 1998, llegando a 95,16 ppm. A partir de esa fecha el nivel de Fe se estabiliza, con pequeñas variaciones. En el Codo de la Esparraguera el Fe tuvo su máximo en Noviembre de 1998, coincidiendo con los altos valores en Bonanza, para estabilizarse en torno a 10 ppm, salvo en Septiembre de 1999, donde se aprecia una subida hasta unos 25 ppm, volviéndose a estabilizar hasta la fecha actual.

Figura 57. Niveles de hierro en lenguado procedentes de las zonas "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".



En cuanto al cobre (Figura 58), salvo un exceso (superando el límite máximo permitido) en Bonanza en Agosto de 1999, en ambas zonas se aprecia una clara disminución desde 1998. En el Codo de la Esparraguera, desde Marzo-Abril de 1999 se mantienen niveles por debajo de 0,5 ppm. El contenido de zinc en lenguados de estas dos zonas (Figura 59) se ha mantenido bajo, aunque a veces se disparan los valores de Zn, a finales de 1998 y principios de 1999.

Figura 58. Niveles de cobre en lenguado procedentes de las zonas "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".

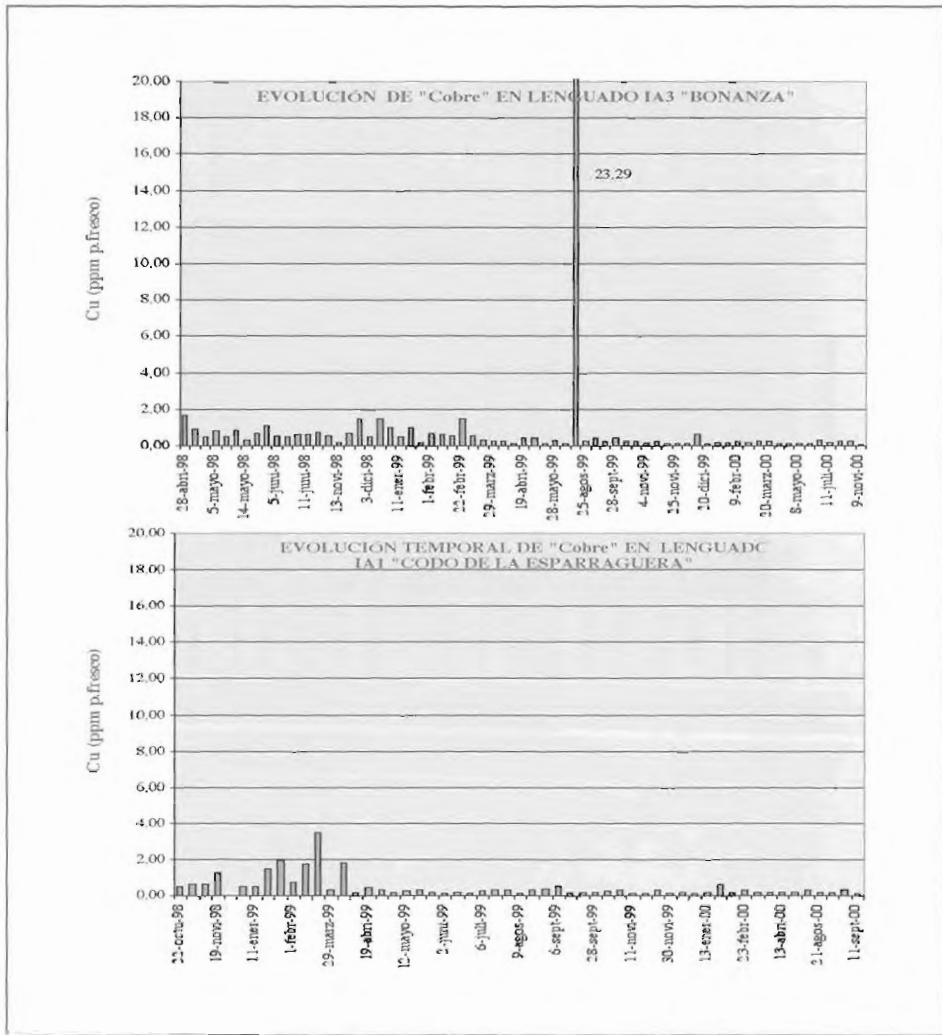
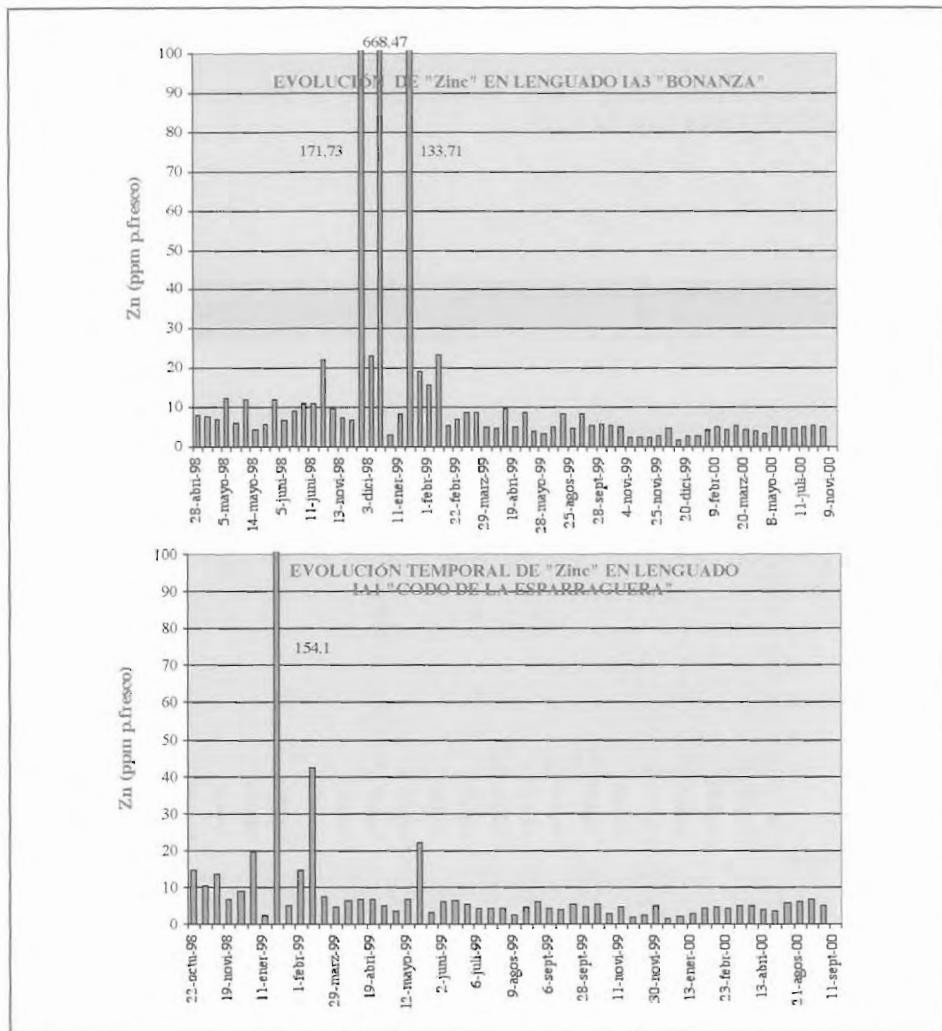


Figura 59. Niveles de zinc en lenguado de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".



La Figura 60 muestra el contenido de manganeso en estas dos zonas. Hasta Febrero de 1999 hay grandes altibajos, aunque el nivel de Mn se estabilizó a partir de esa fecha por debajo de 1 ppm. La Figura 61 muestra el contenido de plomo: entre Abril y Junio de 1998 hay en Bonanza un aumento desmesurado, con valores próximos al límite, normalizándose en Enero de 1999. Conviene señalar que esta zona, más próxima a la desembocadura del Guadalquivir, mostró mayor nivel de la mayoría de los metales analizados que el Codo de la Esparraguera, situada aguas arriba del Guadalquivir. En ambas zonas se detectan niveles similares de Pb a partir del comienzo de 1999.

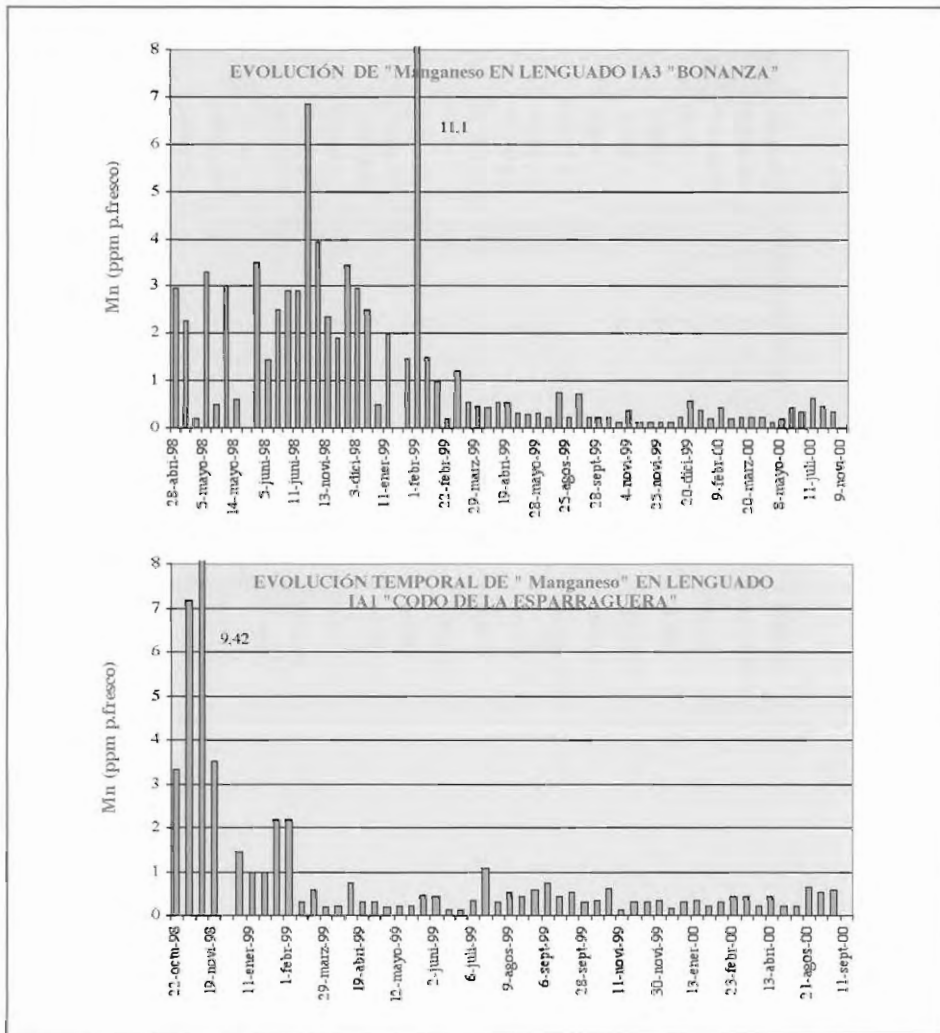
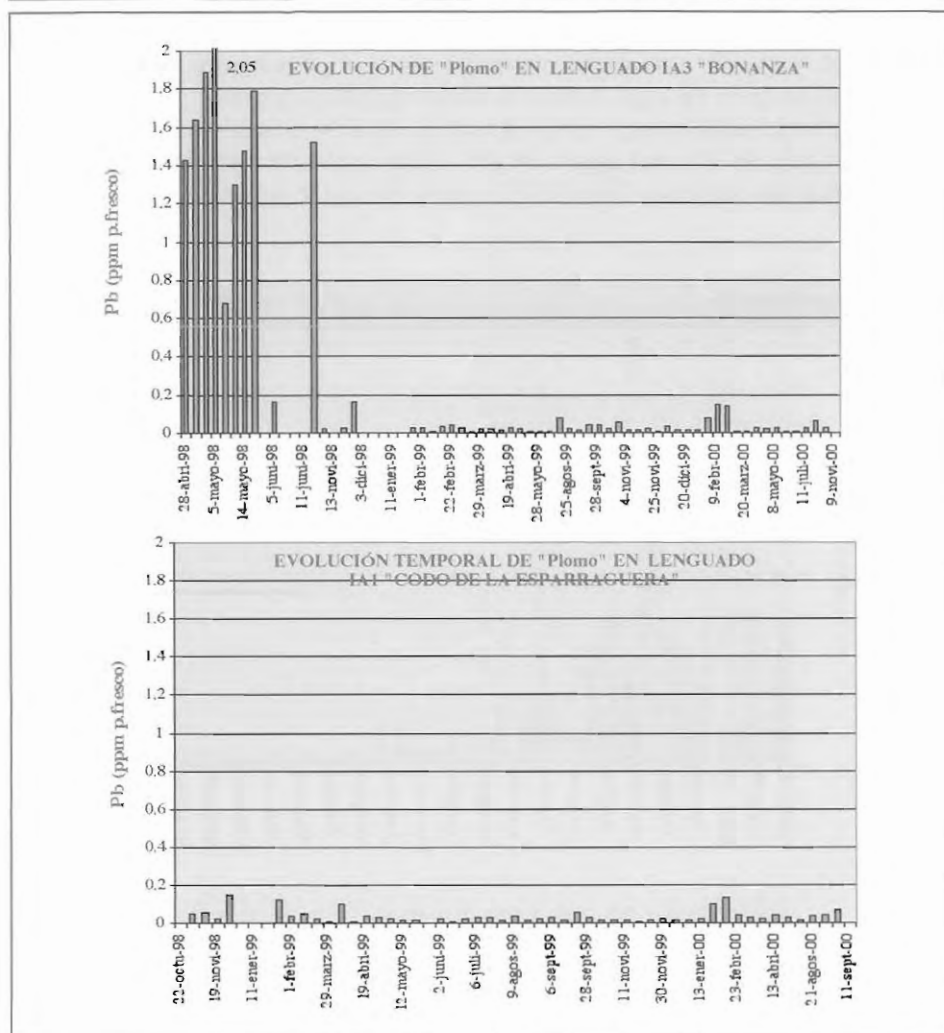
Figura 60. Niveles de manganeso en lenguado de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".


Figura 61. Niveles de plomo en lenguado de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".



La Figura 62 muestra el contenido de cadmio en lenguados de ambas zonas. En Bonanza se observó también una disminución drástica de Cd desde final de 1998. En contraste, en el Codo de la Esparraguera, no se comienza a detectar Cd hasta principios de 1999, y a partir de entonces sólo se ve una mínima cantidad de este metal, en general, <0,003 ppm. La Figura 63 muestra el contenido de arsénico: hasta comienzos de 1999, hay valores indetectables en la mayoría de las ocasiones, pero, a partir de entonces se encuentran valores en torno a 0,5 ppm y, esporádicamente, superiores a 1 ppm. Por último, la Figura 64 muestra el contenido de mercurio detectados en lenguados del Estuario. Hasta Febrero de 1999 hay oscilaciones, en ocasiones no detectables. Luego, la concentración de este metal pesado se normaliza, con valores casi constantes e inferiores a 0,02 ppm.

Figura 62. Niveles de cadmio en lenguado de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".

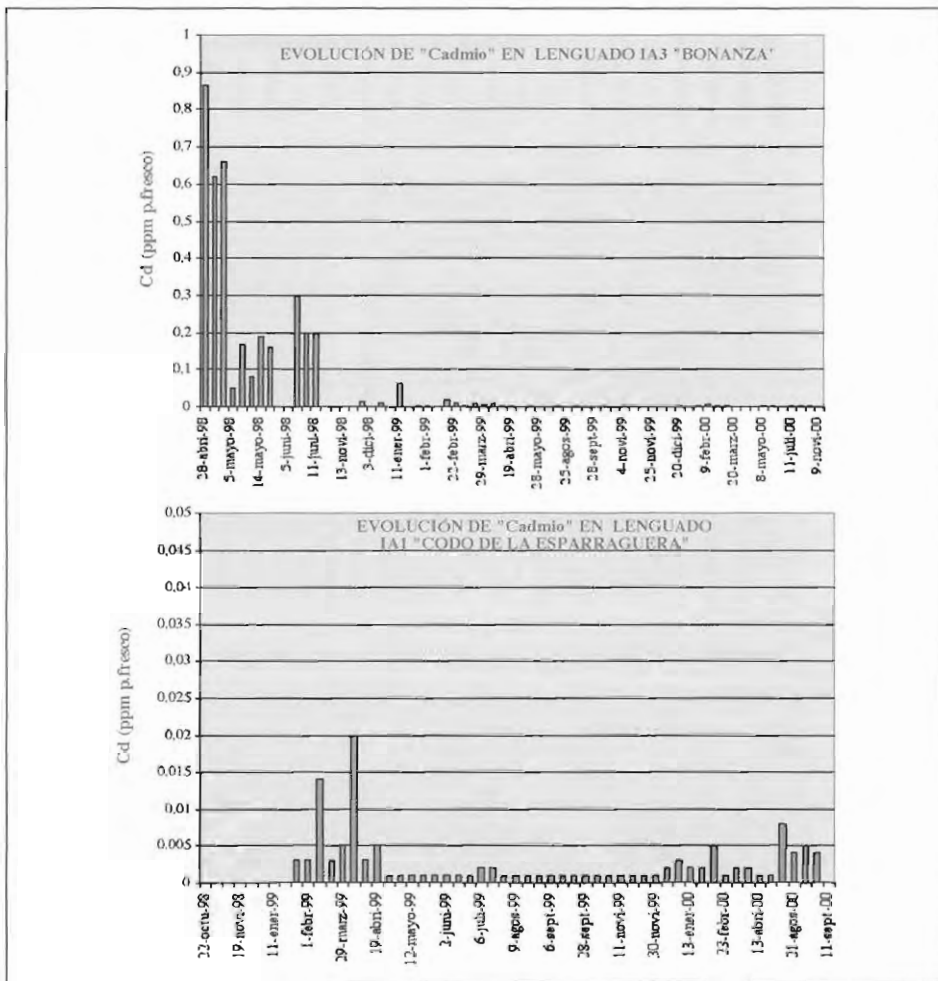


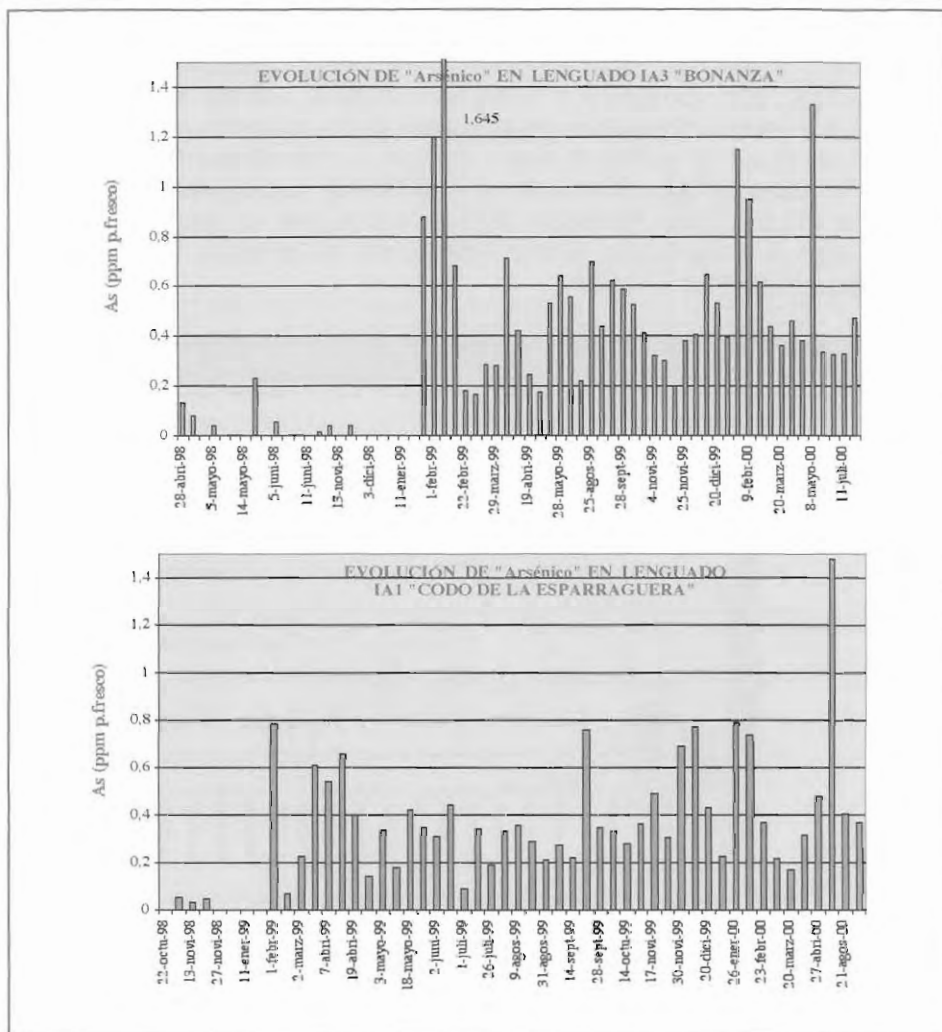
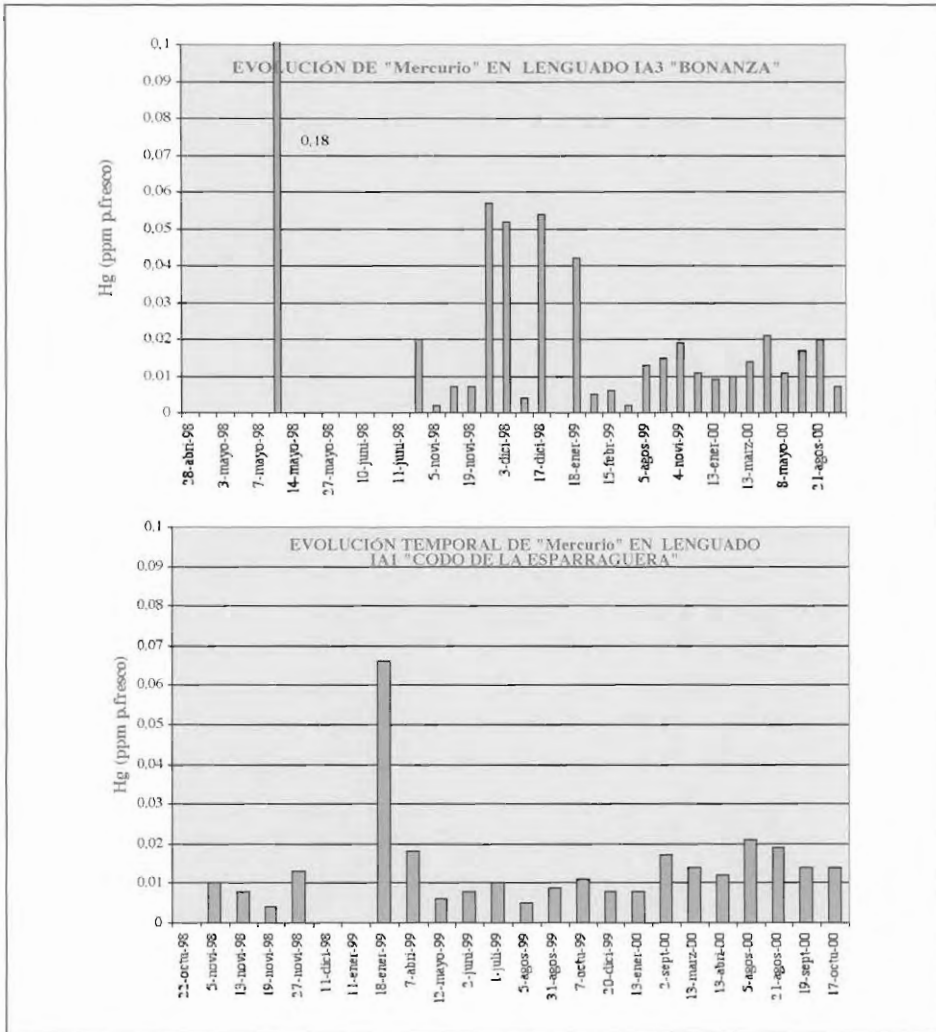
Figura 63. Niveles de arsénico en lenguado de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".


Figura 64. Niveles de mercurio en lenguado de "Bonanza" y "Codo de la Esparraguera".



CONTAMINACIÓN DE METALES DETECTADOS POR TÉCNICAS ATÓMICAS

Marco Antonio Caro de la Torre¹, Mercedes Gallego Gallegos¹, Inmaculada Giráldez Díaz¹, Juan López-Barea², José Luis Gómez-Ariza¹

¹ Dpto. de Química y CC. de los Materiales. Área de Química Analítica. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Huelva. Campus de La Rábida. Ctra. de Palos de la Fra. s/n.21819 Huelva.

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, edif.C6. Ctra. N-IV, Km 396-a. 14071 Córdoba.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la acumulación de metales en bivalvos constituye una buena herramienta para detectar episodios de contaminación marina. En el presente estudio se han considerado diversas especies de bivalvos características del litoral andaluz y los procesos de acumulación que estos experimentan.

Por otro lado, también es importante establecer los procesos potenciales de acumulación de metales en los organismos del estuario del Guadalquivir, y su influencia sobre los recursos marisqueros, como consecuencia del vertido tóxico de la balsa minera de Aznalcóllar. Para ello se realizaron experiencias de transplante de coquina de fango en las instalaciones de PISTRESA y posteriormente un seguimiento temporal de la presencia de metales en sus tejidos.

ORGANISMOS SELECCIONADOS.

Se ha utilizado muestras de los bivalvos *Chamelea gallina* (chirla) y *Donax* sp. (coquina) para estudiar la contaminación en el litoral, y *Scrobicularia plana* (coquina de fango) para las experiencias de transplante. Se han estudiado, además, otras especies, como berberechos, lenguados y camarones, aunque el número de muestras ha sido insuficiente para llevar a cabo un estudio sistemático.

ZONAS DE MUESTREO.

En la Fig. 1, pueden observarse las zonas de producción utilizadas para el muestreo.

Figura 1. Zonas de muestreo de moluscos bivalvos del litoral andaluz utilizados en el estudio.

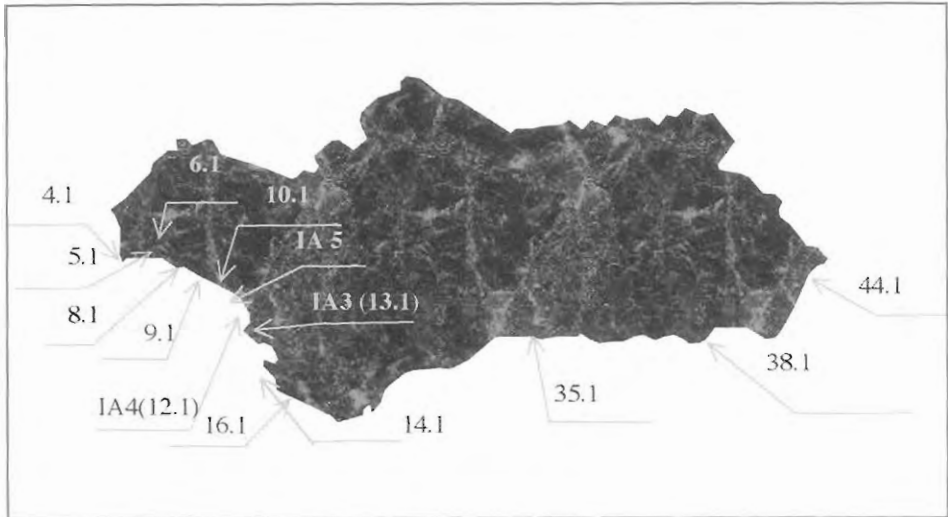


Figura 1. Zonas de muestreo de moluscos bivalvos del litoral andaluz utilizados en el estudio. 4.1: Isla Canela; 5.1: Barra del Terrón; 6.1: Marismas del Piedras; 8.1: Punta Umbría; 9.1: Mazagón; 10.1: Matalascañas; IA5 (11.1): Doñana; IA4 (12.1): Estuario Norte del Guadalquivir; IA3 (13.1): Estuario Sur del Guadalquivir; 14.1: Río San Pedro; 16.1: Sancti Petri; 35.1: Torrox-Nerja; 38.1: Almerimar-Entinas; 44.1: La Garrucha-Palomares (44.1).

MÉTODOS ANALÍTICOS

PRETRATAMIENTO DE MUESTRA.

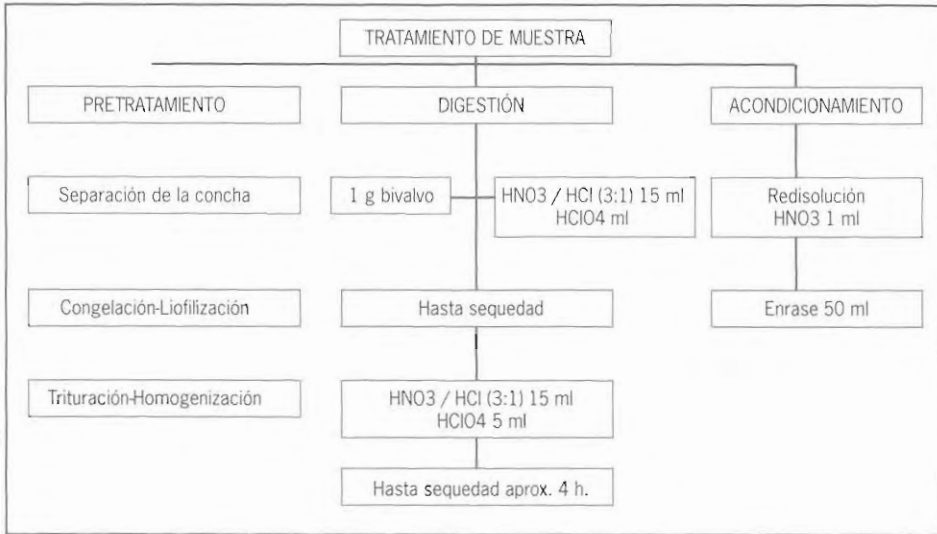
Antes de proceder a la apertura del bivalvo, ha de lavarse la concha, para eliminar la arena y suciedad presentes, evitando de este modo la posible contaminación de la muestra. Una vez abierto el bivalvo, se extrae el cuerpo cuidadosamente, eliminando restos de la concha que podrían dificultar la digestión del mismo (mineralización). Antes de la homogeneización de la muestra, esta se congela y liofiliza, reduciéndose finalmente a polvo con un molinillo.

DIGESTIÓN.

1 g de muestra liofilizada, en vaso de teflón abierto, se trata con 15 ml de agua regia inversa, más 5 ml de ácido perclórico y se calienta en baño de arena (a unos 120 °C), hasta sequedad (4 h). Este tratamiento se repite una segunda vez. Todo el proceso se resume en el Esquema 1.

CONTAMINACIÓN DE METALES DETECTADOS POR TÉCNICAS ATÓMICAS

Esquema 1. Tratamiento de muestra previo al análisis de metales.



ANÁLISIS DE LOS METALES.

Se han empleado técnicas analíticas espectroscópicas en función de los límites de cuantificación que se precisen: espectroscopia de absorción atómica de llama (FAAS), sistemas de inyección de flujo con espectroscopia de absorción atómica de llama acoplada a generación de hidruros (FI-HG-AAS) y espectroscopia de absorción atómica electrotrémica en horno de grafito (GFAAS). En la Tabla I se muestran los límites de detección que se alcanzan para los diversos elementos estudiados.

Tabla I. Límites de detección para los elemento estudiados.

Técnica		Analito	LD (mg g ⁻¹)
FAAS (Aire-Acetileno)		Fe	15,5
		Mn	2,5
		Zn	3,0
		Cu	4,0
FI-HG-FAAS		As	0,09
GFAAS	Sin plataforma de L'vov	Cr	0,017
		Ni	0,036
		Cu	0,037
		Mn	0,010
	Con plataforma de L'vov	Cd	0,004
		Pb	0,022

CALIDAD DE LOS ANÁLISIS.

Para evaluar la calidad de los resultados obtenidos, en todos los análisis se incluye el material de referencia TORT-1 (hepatopáncreas de langosta liofilizado) y blancos de los reactivos empleados. Se rechazan los valores con desviación estándar relativa (RSD) superior al 10 % entre replicados y en los valores del material de referencia, excepto para el cadmio, elemento presente en muy baja concentración, del cual se acepta hasta un 20 % de RSD. El sistema instrumental se validó antes de iniciar los análisis de rutina.

RESULTADOS

COMPARACIÓN ENTRE LA ACUMULACIÓN DE METALES ENTRE CHIRLAS Y COQUINAS, EN LA ZONA DE DOÑANA.

Para realizar una comparación de la acumulación de metales en distintos bivalvos, se ha seleccionado la zona de Doñana, por ser más representativa en función del elevado número de muestras recibidas. Las especies se han seleccionado con el mismo criterio. En la Fig. 2 se muestran las concentraciones (mg/g) de metales en el periodo de Enero a Diciembre de 1.999.

Las mayores diferencias de acumulación temporal se muestran para Mn, Pb y Cu especialmente en coquina. Los niveles de Fe y Cr presentan diferencias menos marcadas.

En la Fig. 3 se observa que las concentraciones de Cd presentan, en general, valores reducidos, siendo la acumulación superior en chirla. En As, Ni y Zn los niveles presentan valores análogos en las dos especies estudiadas.

CONTAMINACIÓN DE METALES DETECTADOS POR TÉCNICAS ATÓMICAS

Figura 2. Presencia de metales en dos especies de bivalvos de la zona de Doñana durante los meses de Enero a Diciembre de 1.999.

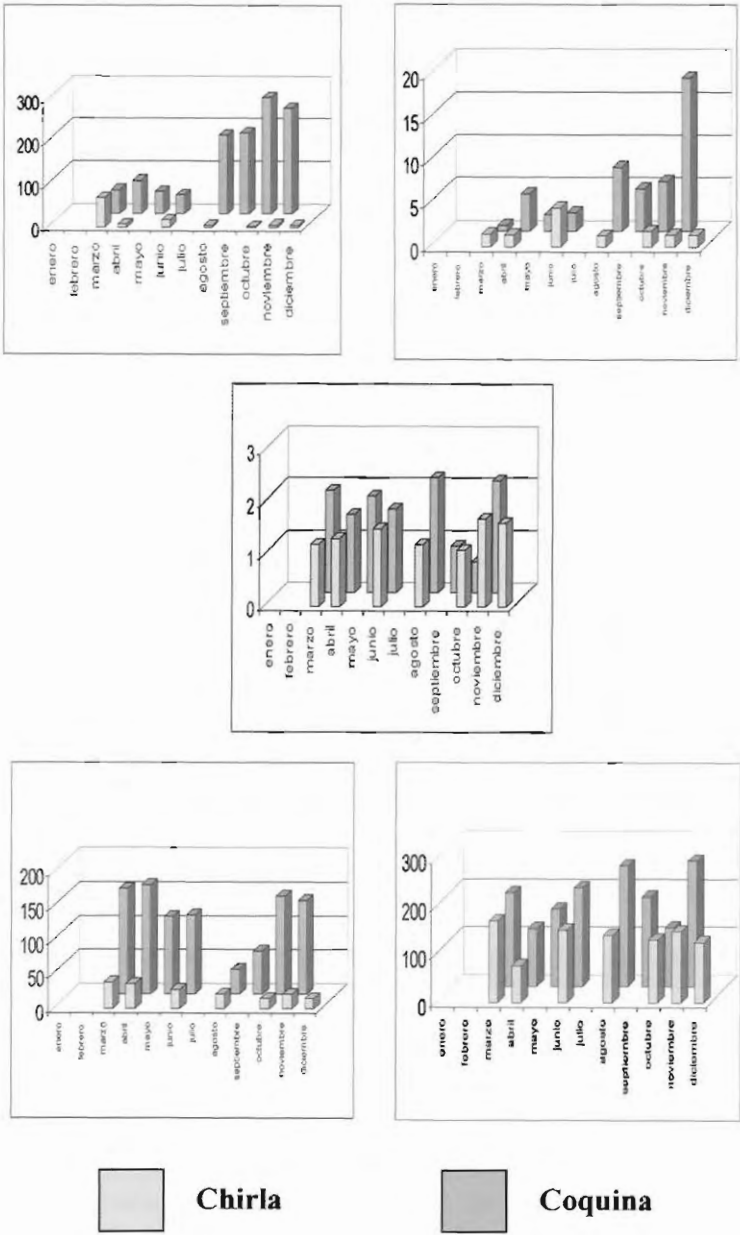
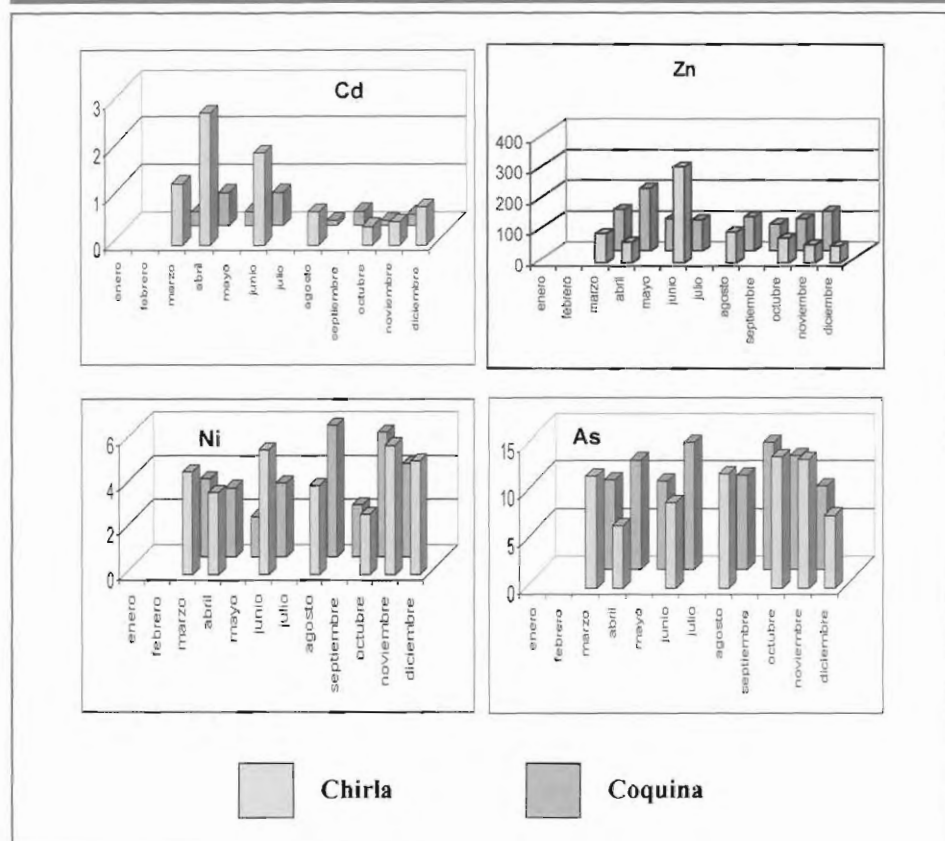


Figura 3. Presencia de metales en dos especies de bivalvos de la zona de Doñana durante los meses de Enero a Diciembre de 1.999.



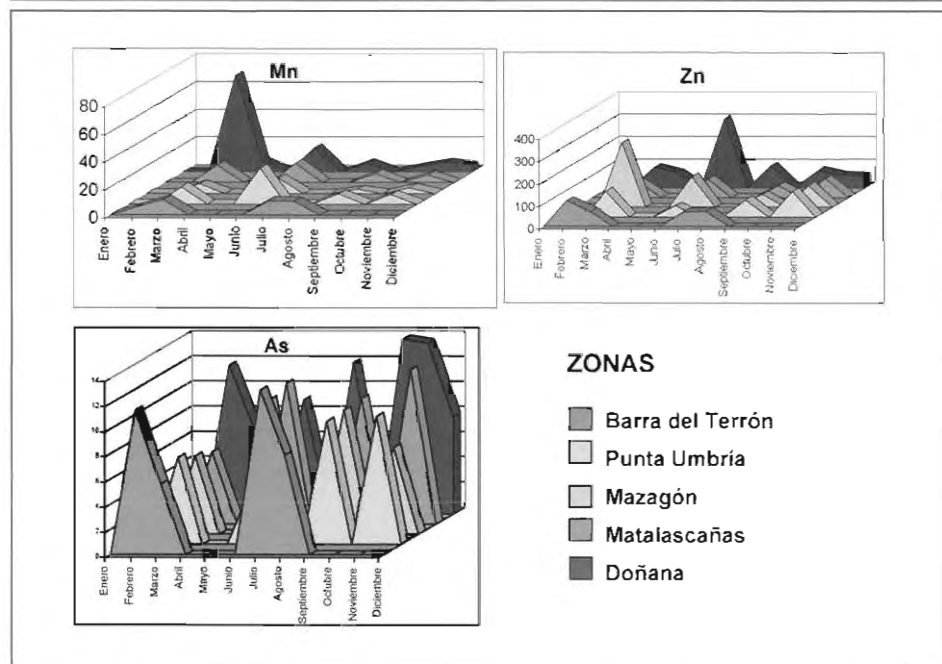
CONCENTRACIÓN DE METALES EN CHIRLAS, PROCEDENTES DE LA COSTA DE HUELVA.

La selección de esta zona se basa en la existencia de un mayor número de puntos de muestreo, especialmente para la chirla.

En la Fig. 4 puede observarse que las cantidades de Mn en primavera y Zn en verano son superiores en la zona de Doñana, mientras en el resto de la costa los niveles son similares.

El arsénico, elegido como bioindicador de contaminación, presenta, no obstante, valores muy semejantes a lo largo de toda la costa. En la zona de Doñana se observan concentraciones ligeramente superiores durante la primavera y el otoño, estos últimos asociados a épocas de lluvia y por tanto a la posible presencia de lixiviados.

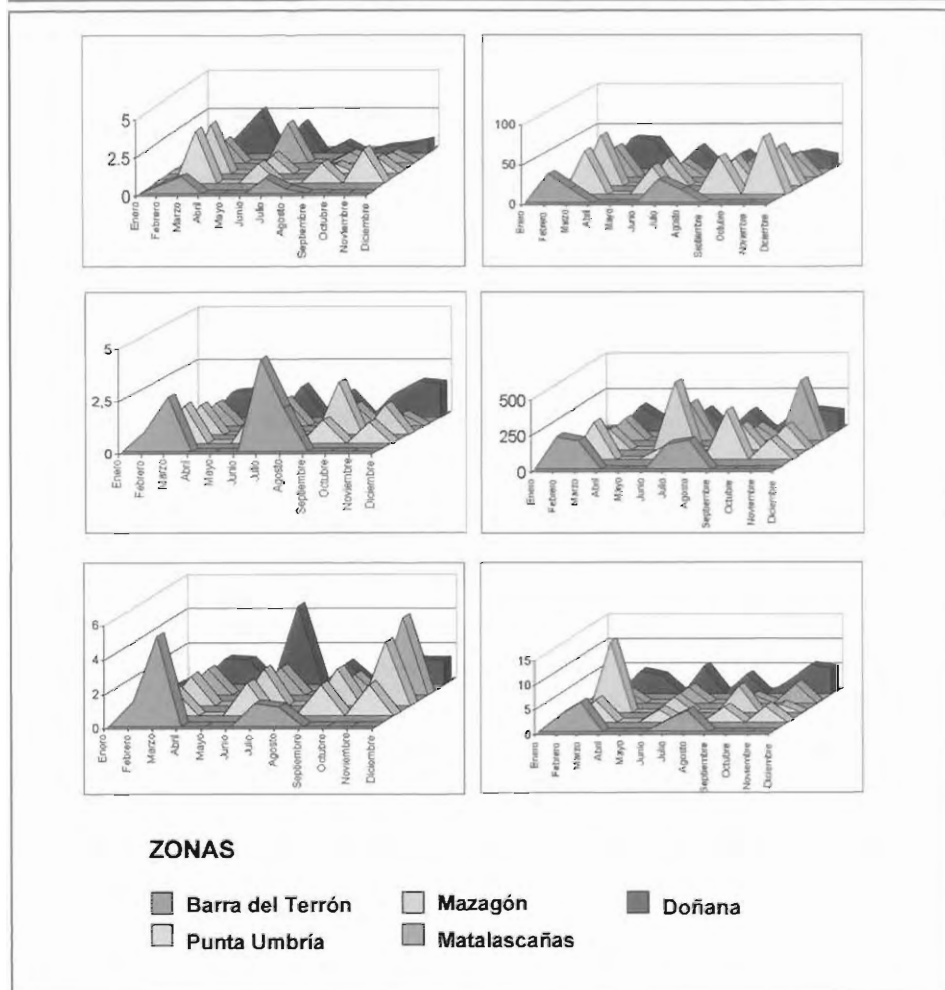
Figura 4. Concentraciones de metales (mg/g) en chirlas procedentes de la costa de Huelva.



Los niveles representativos de Cd (Fig. 5) parecen asociados a los meses de primavera. Los de Pb al verano en Doñana y otoño-invierno en Mazagón, Matalascañas y la Barra del Terrón. Los valores del Cr parecen mantener valores análogos a lo largo de toda la costa, excepto en la zona norte (Barra del Terrón), durante el verano.

El Cu se distribuye de forma análoga en todas las zonas, siendo su comportamiento muy similar en las áreas de Punta Umbría y Mazagón, ambas localidades situadas en los márgenes de la ría de Huelva. Por último el área de mazagón presenta valores puntuales de Fe y Ni, mientras que en el resto los niveles no difieren.

Figura 5. Concentraciones de metales (mg/g) en chirlas procedentes de la costa de Huelva.

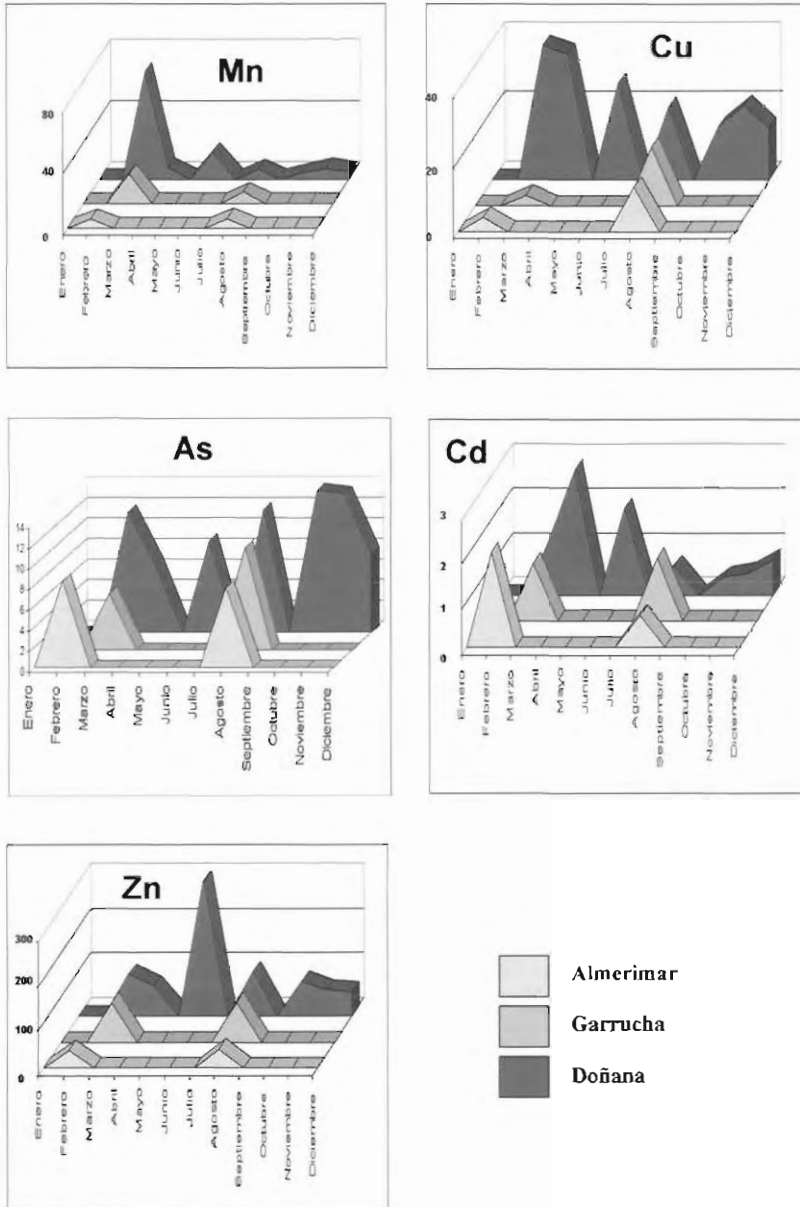


COMPARACIÓN DE LA PRESENCIA DE METALES EN CHIRLAS DE DOÑANA Y ALMERÍA

Es interesante comparar zonas potencialmente contaminadas por metales, como la costa de Huelva, con otras en las que la presencia de estos metales es menos marcada, como la costa de Almería, que podría utilizarse como blanco o zona de referencia.

Se aprecia una mayor presencia de Mn, Zn, Cu, As y Cd en la Zona de Doñana afectada por los aportes de la Ría de Huelva y del Río Guadalquivir, especialmente en los tres primeros metales (véase Fig. 6).

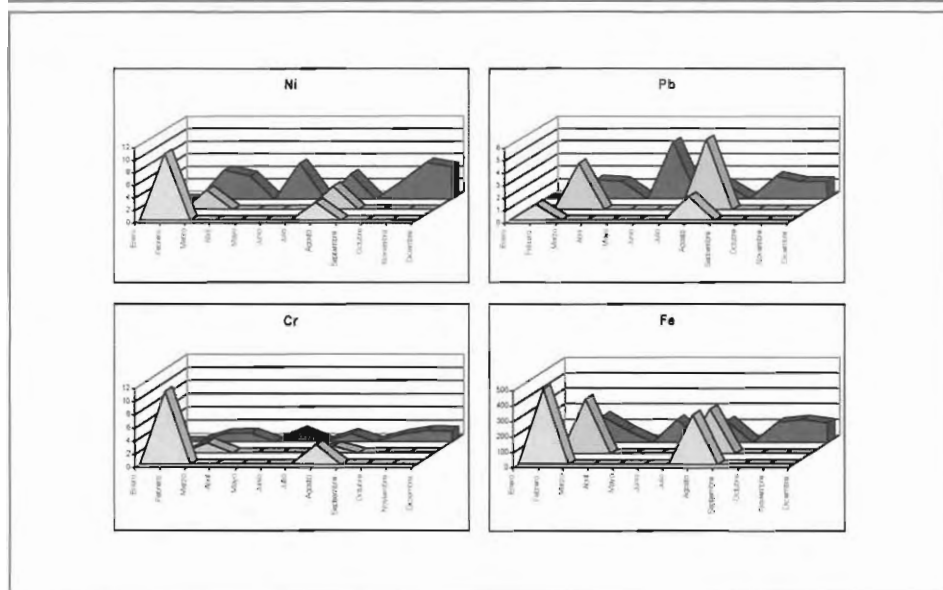
Figura 6. Concentraciones de metales (mg/g) en chirlas procedentes de las costas de Doñana y Almería.



Sin embargo, en la Fig. 7 se observa como Cr, Ni, Fe y Pb presentan mayores niveles en la zona de Almerimar. Estudios posteriores hacen pensar que esta diferencia puede atribuirse a la influencia de las antiguas explotaciones mineras de Rodalquilar (Níjar), que tuvieron actividad desde 1930 hasta principios de la década de los 60. Esta mina era rica en el mineral conocido como rodalquirita, descrito como cuarzo aurífero, con presencia de Cr y Ni.

Otros aportes podrían proceder de las minas de Bédar y Sierra Cabrera (Fe) y de la zona de la Garrucha (plomo argentífero).

Figura 7. Concentraciones de metales (mg/g) en chirlas procedentes de la Doñana y de la costa de Almería.



CONCLUSIONES

- La diferencia del número de muestras entre zonas, hace difícil establecer correlaciones entre ellas.
- Las variaciones temporales detectadas en chirlas en el área de Doñana, parecen señalar algunas tendencias:
- Verano: Máximos de acumulación para Pb y Zn.
- Primavera: Máximos de acumulación para Mn, Cd y As, presentando este último máximos también en otoño, que podría asociarse a las épocas de lluvia, y por tanto a una mayor presencia de lixiviados.
- La acumulación de metales en bivalvos, difiere para cada especie.
- La elevada presencia de Cr, Ni, Fe y Pb en la zona de Almerimar, consecuencia probable de antiguas explotaciones mineras, sugiere que se debería buscar otro punto de la costa andaluza como “blanco”.

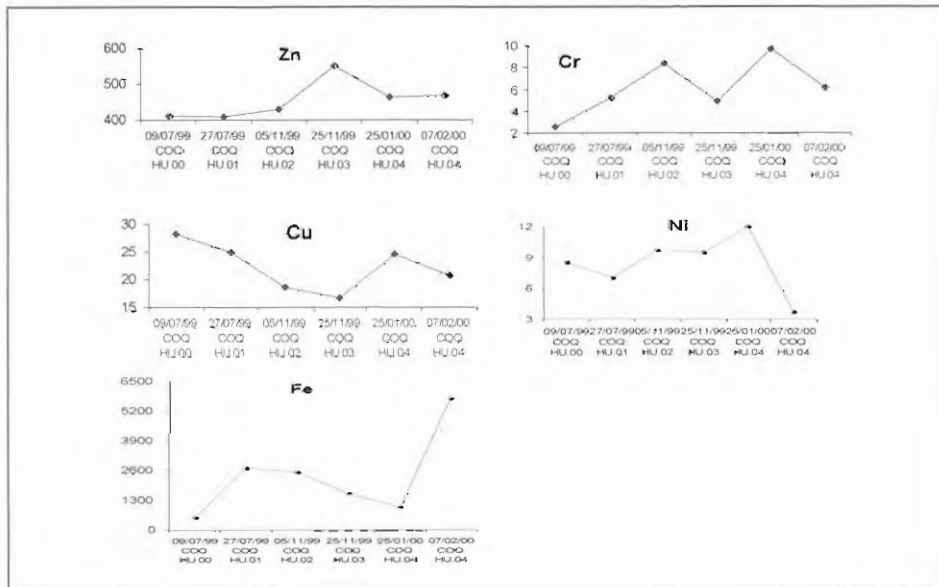
EFFECTOS DEL ACCIDENTE DE AZNALCÓLLAR SOBRE LOS RECURSOS PESQUEROS DEL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR

Se han transplantado al Estuario, especies de importancia pesquera y marisquera, como la coquina de fango, lenguado y camarón, procedentes de áreas de referencia. Utilizando las instalaciones de PISTRESA, se ha comprobado la evolución en la concentración de metales, estudiando "in situ" las posibles repercusiones del vertido de Aznalcóllar. En este informe se usan los datos de dos transplantes de coquina de fango, estudiándose la presencia de metales.

Lote 1.

Comprende el período que abarca desde Julio de 1.999 a Febrero de 2.000. Como se muestra en la Fig. 8, no se observan tendencias definidas para los siguientes metales: Ni, Cu, Zn. El Fe presenta un aumento de la concentración al final de la experiencia, pero este comportamiento no es significativo, ya que se trata de un elemento mayoritario y presente en elevadas concentraciones en el sedimento del Estuario, por lo que los valores encontrados podrían deberse a una resuspensión del sedimento en febrero como consecuencia de la lluvia, no debiendo asociarse los niveles de este elemento a procesos de contaminación.

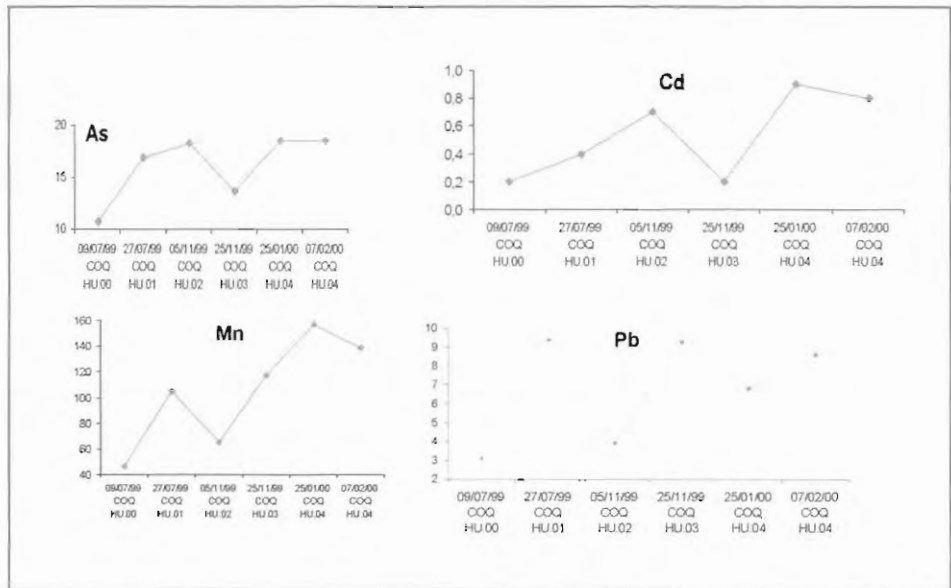
Figura 8. Concentraciones temporales de metales (mg/g) en coquinas de fango del LOTE1 en PISTRESA.



CONTAMINACIÓN DE METALES DETECTADOS POR TÉCNICAS ATÓMICAS

El comportamiento del As (Fig. 9) señala procesos de acumulación temporal de este elemento desde Julio de 1.999 a Febrero de 2.000, duplicándose la concentración de 10 a 18 ppm (peso seco). La concentración de Cr se incrementa de 2 a 7 ppm, la de Mn de 40 a 130 ppm, la de Pb de 3 a 8 ppm y Cd de 0.2 a 0.9 ppm. Este proceso de acumulación podría indicar la presencia de estos metales en las aguas.

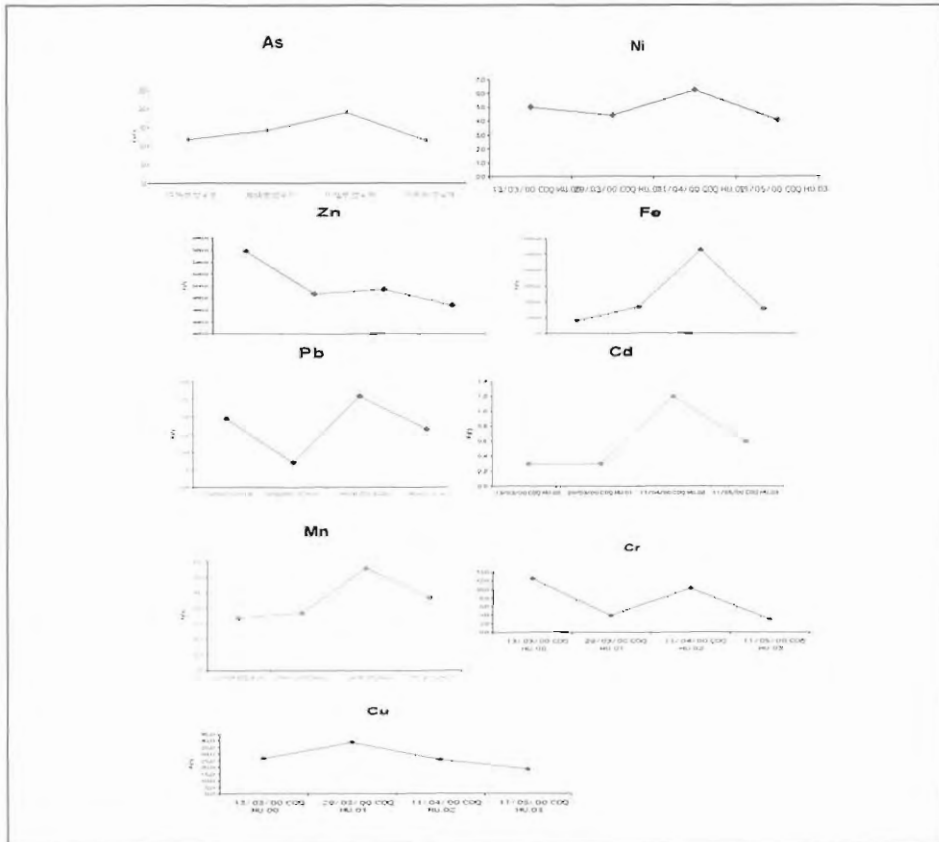
Figura 9. Concentraciones temporales de metales (mg/g) en coquinas de fango del LOTE 1 en PISTRESA.



Lote 3.

Comprende el período que abarca desde Marzo a Mayo de 2.000. La menor duración de esta experiencia (Fig. 10), no permite observar tendencias tan claras como en el caso anterior. Puede no obstante comprobarse un aumento de la concentración de Cd y Mn.

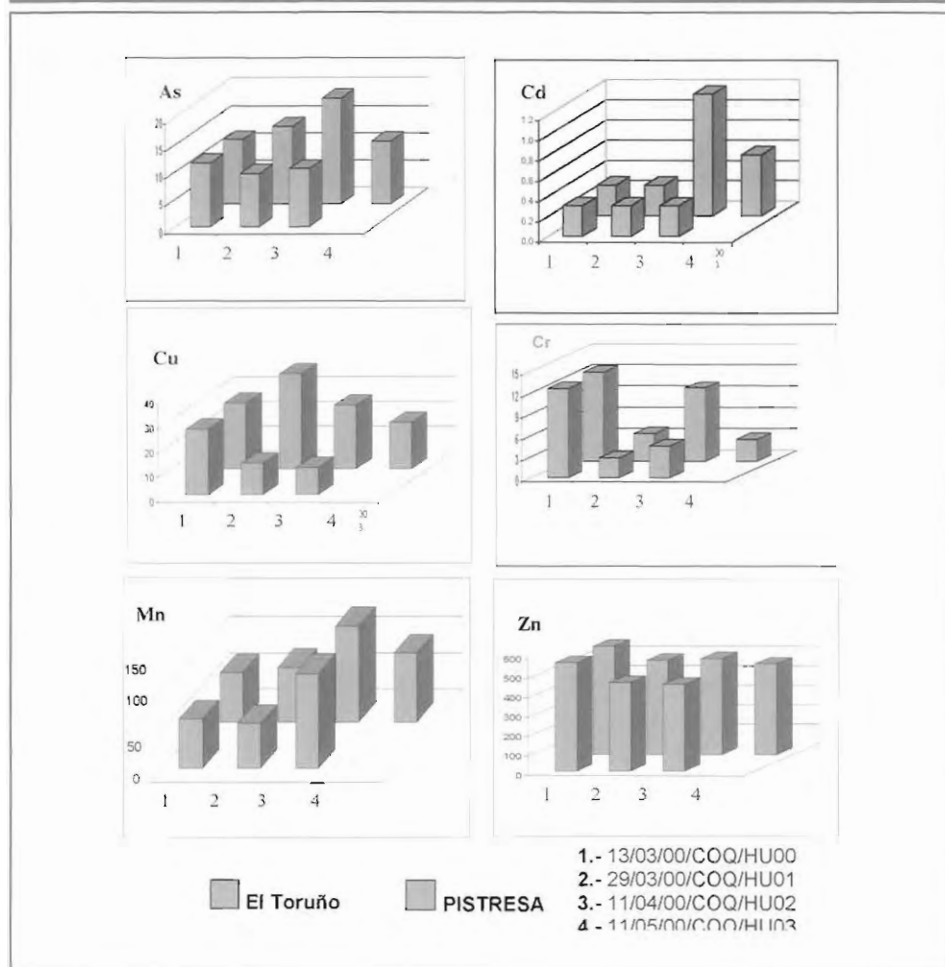
Figura 10. Concentraciones temporales de metales (mg/g) en coquinas de fango del LOTE 3 en PISTRESA.



COMPARACIÓN DE LA PRESENCIA DE METALES EN COQUINAS DE FANGO EN PISTRESA Y EL TORUÑO.

Es aconsejable comparar los procesos de acumulación de metales en coquinas de fango (LOTE 3) en una zona sometida a la acción potencial de los vertidos de Aznalcóllar (instalaciones de PISTRESA) y otra no contaminada como es la de El Toruño. En las Figs. 11 y 12 puede observarse que los valores de As, Cd y Cu en coquinas de PISTRESA son superiores a los obtenidos en El Toruño. No se aprecian diferencias significativas en el caso de Mn, Cr, Ni, Pb ni Zn. Los valores elevados de Fe, en algunos puntos de las muestras de PISTRESA, pueden asociarse también a procesos de resuspensión de sedimentos.

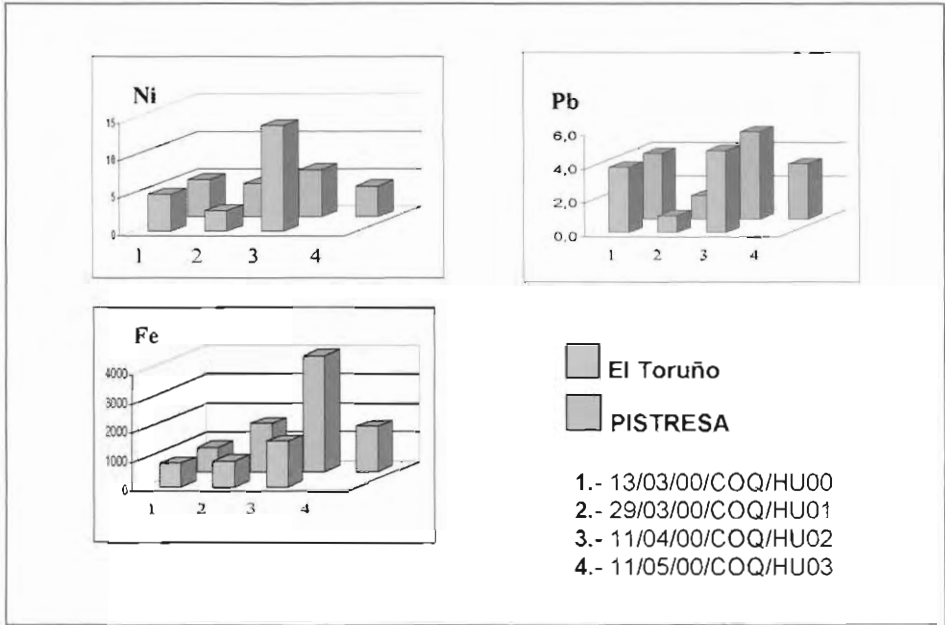
Figura 11. Concentraciones de metales (mg/g) en coquinas de fango del LOTE 3 en PISTRESA y El Toruño.



CONCLUSIONES

- La experiencia de transplante del LOTE 1, en las instalaciones de PISTRESA, podrían ser un indicador de la presencia de metales en las aguas, ya que se han detectado tendencias positivas de acumulación de As, Pb, Mn y Cd; sin embargo no se observan tendencias definidas para el resto de metales ensayados.
- La experiencia de transplante del LOTE 3, no permite observar tendencias claras, aunque señalan un incremento de la concentración de Cd, Mn y As, con el tiempo.
- Al comparar los resultados del LOTE 3 de PISTRESA con la experiencia paralela realizada en El Toruño, se aprecia una mayor acumulación en As, Cd, y Cu.

Figura 12. Concentraciones de metales (mg/g) en coquinas de fango del LOTE 3 en PISTRESA y El Toruño.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto 1FD97-0610-C003 concedido por la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Subdirección General de Proyectos de Investigación Científica y Técnica, Plan Nacional de I+D, del Ministerio de Educación y Cultura, a Juan López Barea y José Luis Gómez Ariza, como investigadores principales.

CONTAMINACIÓN POR COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS

Francisca Mingorance Camacho¹, Alfredo Velasco Arjona¹,
José Luis Gómez Ariza¹, Juan López Barea²

¹ Departamento de Química y Ciencias de los Materiales. Escuela Politécnica Superior.
Universidad de Huelva. Campus de La Rábida. Ctra. de Palos de la Frontera, s/n. 21819 Huelva.

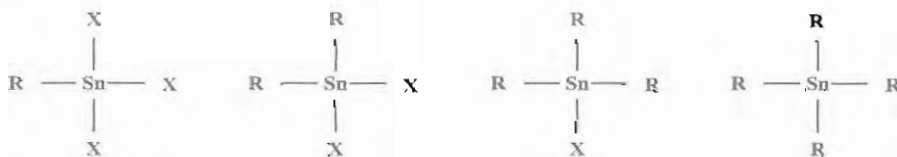
² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales.
Edif. C6. Ctra. N-IV km 396-a. 14071 Córdoba.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos de estaño presentes en el medio ambiente proceden de dos fuentes principales:

1. Natural, que integra las formas químicas que se originan en el medio ambiente, como consecuencia de la metilación del estaño inorgánico (biometilación).
2. Antropogénica, debido a las propiedades biocidas y usos tecnológicos de éstos. Una de las aplicaciones más importantes de estas sustancias ha sido su uso en pinturas de barcos como sustancias antiincrustantes, aunque también se han empleado como plaguicida en los cultivos de caña de azúcar, café, patata o arroz, o bien como estabilizadores del PVC.

Entre las especies de estaño de mayor significación medioambiental se encuentran: tributilestaño (TBT), dibutilestaño (DBT), monobutilestaño (MBT), monofenilestaño (MPT), difenilestaño (DPT) y trifenilestaño (TPT).



R = Butil, Fenil

Estos compuestos son tóxicos, habiéndose detectado casos de malformaciones en las ostras (*Crassostrea gigas*) debido a su presencia, pero también son agentes que provocan una disminución del crecimiento en algunas especies (*C. gigas*, *Mytilus edulis*) y

fenómenos de cambio de sexo (imposex) (*N. lapillus*, *B. undatum*). Asimismo, están relacionados con episodios de mortandad elevada (*M. edulis*, *Venerupis decussata*).

Esta demostrada la toxicidad diferencial de los compuestos de estaño, habiéndose comprobado que las especies químicas inorgánicas son mucho menos tóxicas que las orgánicas. En estas últimas la toxicidad se incrementa con el número de radicales orgánicos que las integran y la longitud de la cadena, alcanzando un máximo con el butilo. Ello se debe a un incremento de carácter lipofílico de las moléculas que favorece el transporte a través de las membranas biológicas y su solubilidad y movilidad por difusión a través del tejido graso.

Estos compuestos pueden degradarse en el medioambiente por pérdida de grupos orgánicos, pudiendo considerarse dos causas fundamentales de degradación:

- Microbiológica
- Fotoquímica

Dependiendo ambas de los sólidos en suspensión presentes y de la época del año.

Las especies de fenilestaño también posee una toxicidad significativa. Por todo ello, resulta imprescindible disponer y aplicar métodos de especiación química que permitan distinguir y cuantificar las diversas especies de estaño, presentes en concentraciones muy reducidas en las complejas matrices ambientales.

METODOLOGÍA ANALÍTICA

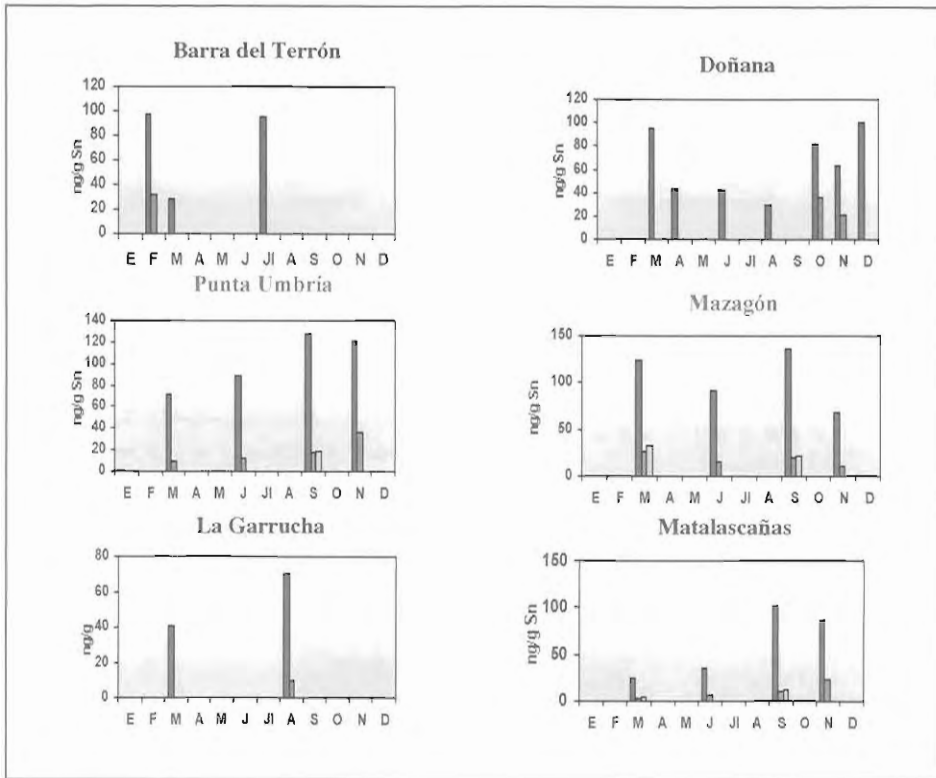
La metodología analítica que se ha seguido para la especiación de compuestos de estaño ha sido la siguiente: 1 gramo de muestra liofilizada se digiere con 50 ml de agua-ácido bromhídrico (1:1) durante una hora, y se extrae a continuación con diclorometano en presencia de tropolona como agente complejante de estaño, sustituyendo el diclorometano por hexano. Se derivatiza el extracto con el reactivo de Grignard (bromuro de pentilmagnesio), purificándolo con Florisil[©] seguido de elución con pentano, se concentra, se añade el estándar interno, dimetildipentilestaño, y se determinan las especies de estaño por cromatografía de gases con un detector fotométrico de llama.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

CHIRLAS (*Chamelea gallina*)

Como puede observarse en la Fig.1 en general no se han encontrado valores muy elevados para estas especies, destacando la ausencia de fenilestaño y la presencia de TBT y DBT, solo en algunos casos se ha detectado MBT. Los valores más elevados se han encontrado en Doñana, Punta Umbria, Matalascañas y Mazagón en los meses de septiembre-noviembre. En la barra del Terrón y en la Garrucha sólo se han tomado 3 y 2 muestras y los valores no son muy elevados.

Figura 1. Presencia de organoestánnicos en chirlas durante los meses de Enero a Diciembre de 1999.



COQUINAS (Donax sp.)

Al igual que en las chirlas nos encontramos que las mayores concentraciones se encuentran en los meses de octubre-noviembre y que solo se encontraron valores de TBT y DBT y en ningún caso se encontró MBT. Fig. 2.

COQUINAS DE FANGO (Scrobicularia plana)

Se aprecian valores significativos en Sancti Petri y en el Estuario del Guadalquivir en los meses de verano, posiblemente por la presencia de barcos recreativos en este periodo. Fig. 3

EXPERIENCIA DE TRANSPLANTE

Como puede observarse en la Fig. 4 en la mayoría de las muestras se encontraron TBT, DBT y MBT. En el Lote 1 y en el Toruño los niveles para el TBT son del orden de 120 ppb, siendo algo más elevados en las muestras de PISTRESA, ocurre lo mismo para el DBT y el MBT que en general se encuentran en niveles muy semejantes. También pode-

mos decir que el Lote 1 en una de las muestras la concentración de DBT es mayor que la de TBT y en otra muestra que la concentración de MBT es mayor que DBT, que puede atribuirse a un proceso de degradación.

Figura 2.

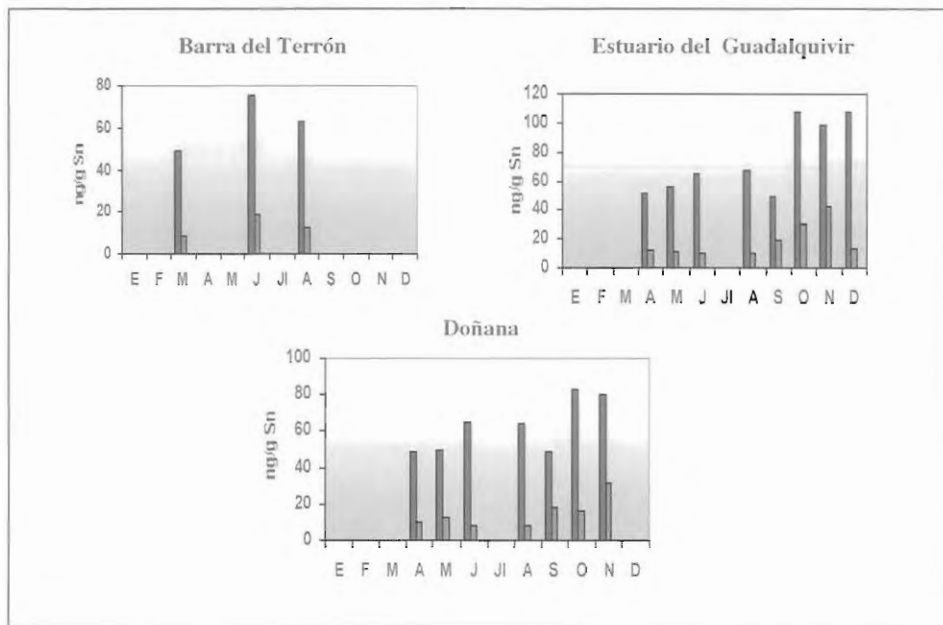


Figura 3.

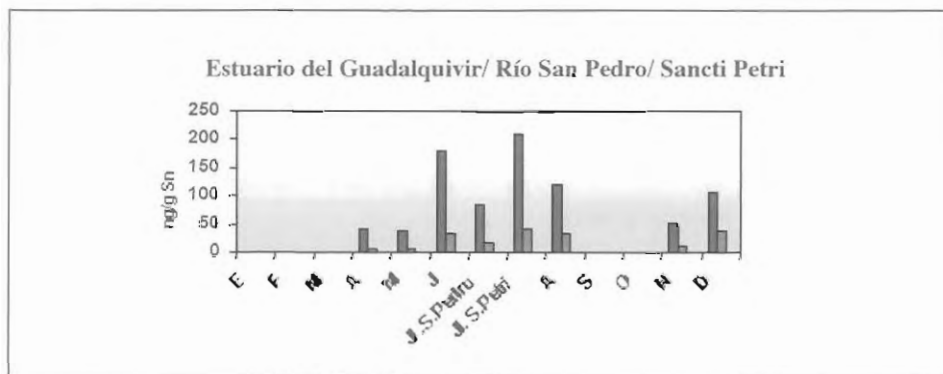
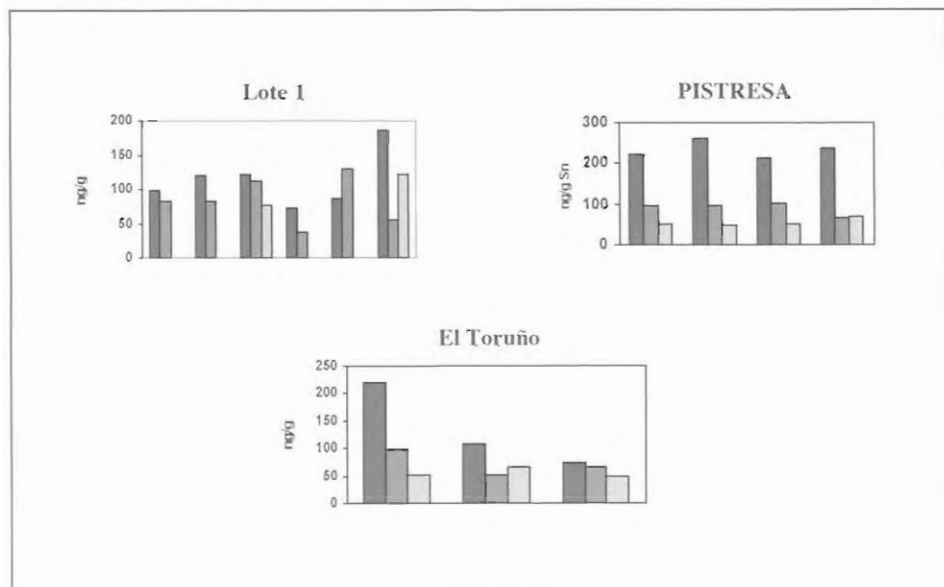


Figura 4.



CONTAMINACIÓN POR COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

Jesús Calañas Continente¹, Daniel Sánchez-Rodas¹,
Juan López-Barea² y José Luis Gómez Ariza¹

¹Departamento de Química y Ciencias de los Materiales. Escuela Politécnica Superior.
Universidad de Huelva. Campus de La Rábida. Ctra. de Palos de la Fra. s/n. 21819 Huelva.

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales.
Edif. C6. Ctra. NIV km 396-a. 14071 Córdoba.

INTRODUCCIÓN

La especiación de arsénico en estudios medioambientales posee especial interés ya que permite distinguir aquellas formas de este elemento con mayor toxicidad. Según la bibliografía, las especies más tóxicas son de naturaleza inorgánica frente a las especies orgánicas menos tóxicas. En la Fig. 1 pueden verse las especies de arsénico más abundantes en el medio marino.

Figura 1. Especies de As más frecuentes en el medio marino.

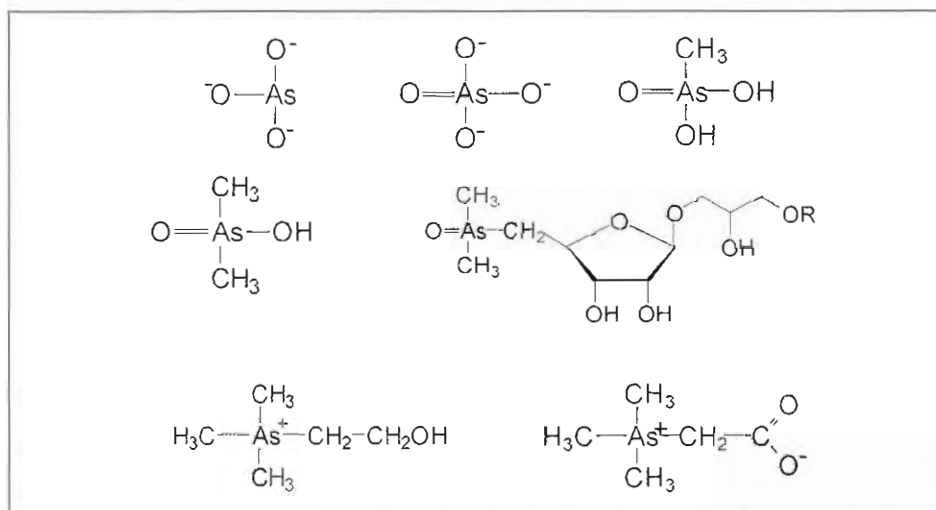


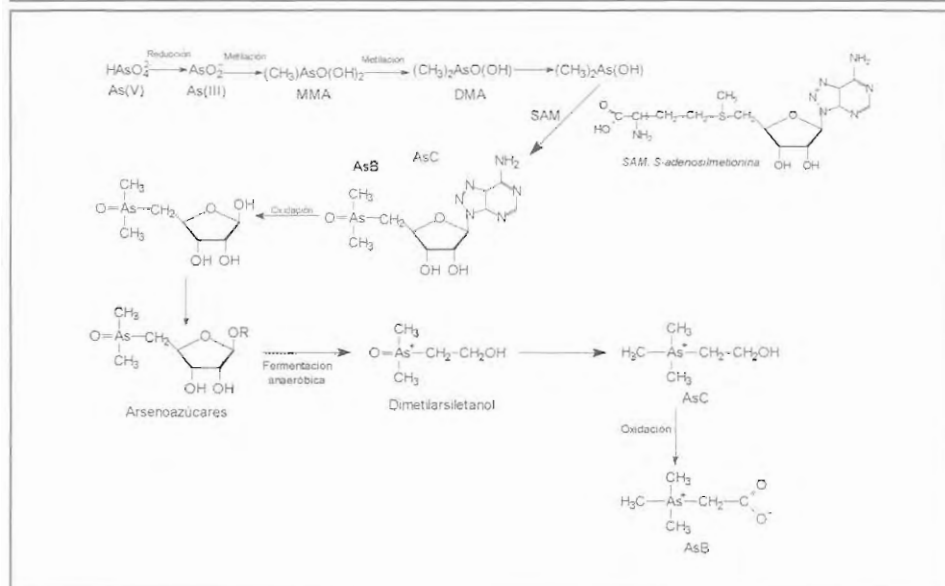
Figura 1. Especies de As más frecuentes en el medio marino. (a) As(III); (b) As(V); (c) Ácido monometilarsónico (MMA); (d) Ácido dimetilarsínico (DMA); (e) Arsenosazúcares (R: H, SO_2H , SO_3H , $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{PO}_3\text{H}$); (f) Arsenocolina (AsC); (g) Arsenobetaina (AsB).

CONTAMINACIÓN POR COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

El arsénico inorgánico suele encontrarse en los estados de oxidación +3 y +5, que, por su elevada toxicidad, son biometilados en los organismos marinos y terrestres como mecanismo de detoxificación para formar ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsónico (DMA).

Los seres vivos del medio marino son capaces de llevar a cabo transformaciones más intensas de estos compuestos (Fig. 2) con la intervención de la SAM (S-adenosilmetionina) para formar arsenorribósidos (arsenoazúcares).

Figura 2. Mecanismo de detoxificación de los compuestos de As.



A medida que el elemento se integra en estructuras similares a las de los aminoácidos, la toxicidad disminuye. Aunque la ruta metabólica de detoxificación de los compuestos de arsénico aún no se conoce totalmente, es destacable el hecho de que la SAM no actúa como donador de grupos metilo sino de grupos adenosina. La metilación parece implicar la reducción del As.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras analizadas son chirlas (*Chamelea gallina*), coquinas (*Donax sp.*) y coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) recogidas en las costas de Huelva, Cádiz y Almería. En la Fig. 3 se pueden observar los puntos de muestreo.

Fig. 3. Zonas de muestreo.

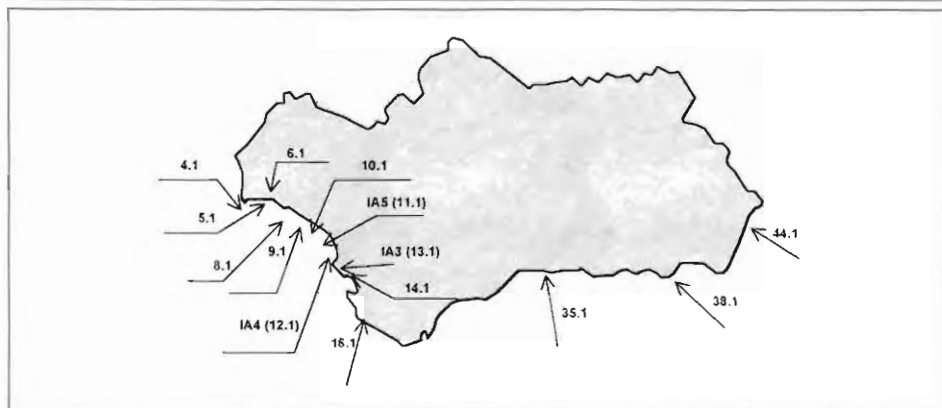


Figura 3. Zonas de muestreo. Los puntos corresponden a: Isla Canela (4.1), Barra del Terrón (5.1), Marismas del Piedras (6.1), Punta Umbria (8.1), Mazagón (9.1), Matalascañas (10.1), Doñana (11.1, IA5), Norte del estuario del Guadalquivir (12.1, IA4), Sur del estuario del Guadalquivir (13.1, IA3), Río San Pedro (14.1), Sancti Petri (16.1), Torrox-Nerja (35.1), Almerimar-Éntinas (38.1) y La Garrucha-Palomares (44.1).

Los bivalvos se separan de la concha, se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofilizan ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 mbar, 2-3 días). Las muestras se conservan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

- **Extracción de especies de arsénico.**

1.0 g de muestra liofilizada se trata con 20 ml de una mezcla equimolecular de metanol y agua en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifuga durante 10 minutos a 10000 rpm y se decanta el sobrenadante. Este tratamiento se repite tres veces y se reúnen los sobrenadantes para la posterior limpieza de la muestra. El metanol se elimina por rotavaporación, para evitar su interferencia en el sistema de detección. Para que las muestras se encuentren en condiciones experimentales sensiblemente equivalentes, se llevan a un peso final de 25 g. La limpieza de las muestras se llevó a cabo por extracción líquido-líquido con n-hexano, centrifugando la muestra durante 10 minutos a 10000 rpm.

- **Procedimiento de especiación.**

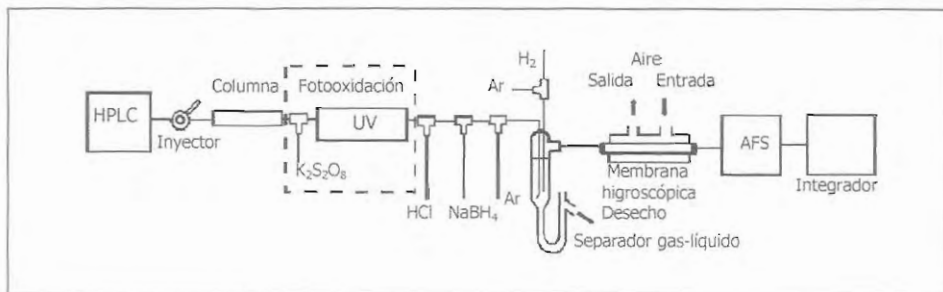
La especiación de arsénico se lleva a cabo con un acoplamiento instrumental (Fig. 4) basado en el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS) utilizando un sistema de inyección en flujo para la derivatización post-columna de las especies separadas en el cromatógrafo.

La separación de las especies de arsénico (As(III), As(V), MMA, DMA y AsB) se realiza con una columna de intercambio aniónico, transformadas en arsinas volátiles mediante generación de hidruros (HG) en continuo con HCl y NaBH_4 . Las arsinas son arrastradas con una corriente de argón hasta un separador gas-líquido y una membrana higroscópica para eliminar el vapor de agua que produce alteraciones en la señal. Finalmente, se atomizan en una llama de difusión de hidrógeno en el detector. Se intro-

CONTAMINACIÓN POR COMPUESTOS ORGANOARSENICALES

duce una corriente de hidrógeno auxiliar para que la llama del detector se establezca ya que el proceso de generación de hidruros produce numerosas alteraciones en la calidad de la llama debido, principalmente, a burbujas procedentes del sistema.

Figura 4. Esquema del acoplamiento instrumental HPLC-(UV)-HG-AFS. La etapa de fotooxidación es opcional.



La detección de AsB requiere una etapa adicional de destrucción de la materia orgánica por acción de la luz ultravioleta. El proceso se completa con la oxidación de todas las especies de arsénico separadas por el cromatógrafo a As(V). Este proceso, denominado fotooxidación, permite la detección de las especies de mayor masa molecular como son la AsB, AsC o los arsenozúcares. Durante esta etapa, se hace pasar la muestra por un tubo de PTFE de 8 m de longitud enrollado alrededor de la lámpara de Hg. Para la generación de hidruros en este sistema instrumental alternativo, se requiere el uso de HCl 8 M para compensar la alcalinidad generada por el $K_2S_2O_8$. La detección se llevó a cabo por espectroscopía atómica de fluorescencia, utilizando una lámpara de cátodo hueco con descarga (BDHCL). Las condiciones experimentales óptimas del acoplamiento instrumental se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Condiciones experimentales del acoplamiento HPLC-(UV)-HG-AFS.

<p>HPLC</p> <p>Columna Hamilton PRP-X100 (250 x 4.1 mm, 10 mm)</p> <p>Fase móvil: 25 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 5.8, 1.1 ml min⁻¹</p> <p>Inyección: 200 ml</p>	<p>HG</p> <p>HCl: 1.5 M o 8 M, 1 ml min⁻¹</p> <p>NaBH₄: 1.5% en NaOH 1%, 1 ml min⁻¹</p> <p>Ar: 200 ml min⁻¹</p>
<p>UV</p> <p>$K_2S_2O_8$ 2% en NaOH 2%, 0.3 ml min⁻¹</p> <p>Fuente UV: lámpara de Hg, 15 W, 1 254 nm</p> <p>Bucle: 8 m x 0.3 mm d. i., PTFE</p>	<p>AFS</p> <p>Aire: 3 l min⁻¹</p> <p>Ar: 100 ml min⁻¹</p> <p>H₂: 60 ml min⁻¹</p> <p>BDHCL: 27.5 y 35.0 mA</p>

Las principales ventajas de este acoplamiento instrumental son la posibilidad de trabajar en continuo y los bajos límites de detección que se alcanzan mediante el detector AFS (<1 mg l⁻¹). Las características analíticas del método se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Características analíticas del acoplamiento HPLC-HG-AFS.

	As (III)	DMA	MMA	As (V)
LD (mg l ⁻¹)	0.06	0.10	0.07	0.14
Linealidad (mg l ⁻¹)	0.25-6000	0.25-8000	0.25-6000	0.25-8000
RSD 0.5 mg l ⁻¹ (%)	4.2	5.3	3.1	6.2
RSD 2500 mg l ⁻¹ (%)	2.1	2.6	2.4	2.6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

• Experiencias de trasplante.

Se han transplantado al estuario especies de elevada importancia económica en Andalucía como son coquinas de fango (*Scrobicularia plana*), lenguados (*Solea senegalensis*) y camarones (*Palaemonetes varians*) procedentes de áreas de referencia. Utilizando las instalaciones de PISTRESA (Cádiz), se ha comprobado la evolución temporal en la concentración de las distintas especies de arsénico, estudiando posibles influencias del vertido tóxico de Aznalcóllar.

En cuanto a los resultados obtenidos a partir de las experiencias de trasplante del Lote 1 (Fig. 5), se aprecian tendencias de aumento progresivo en la concentración de especies inorgánicas de As tanto de As(V) que se incrementa de 80 a 700 ng/g como de As(III) de 20 a 250 ng/g. Por otro lado, la AsB, a pesar de alcanzar un máximo en noviembre, parece estabilizarse al final de la experiencia.

Figura 5. Resultados obtenidos en la primera experiencia de trasplante realizada en las instalaciones de PISTRESA desde Julio de 1999 hasta Febrero de 2000.

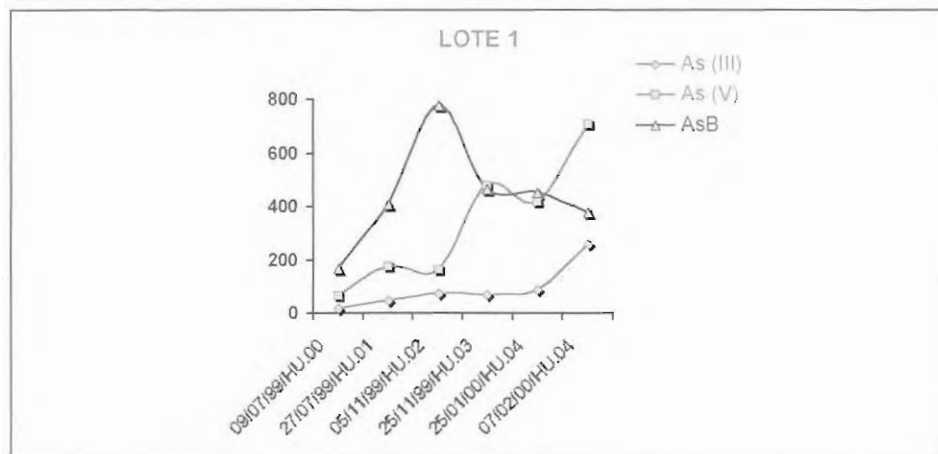
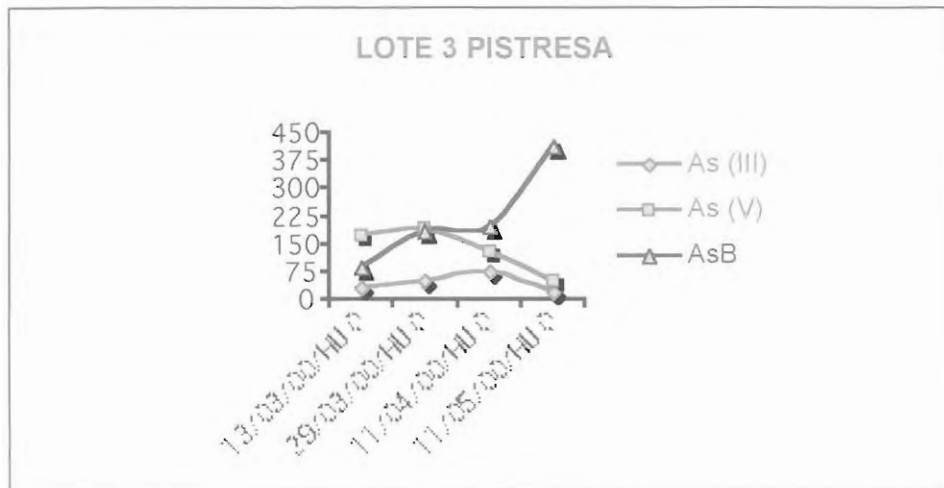


Figura 6. Resultados obtenidos en la segunda experiencia de trasplante realizada en las instalaciones de PISTRESA desde Julio de 1999 hasta Febrero de 2000.

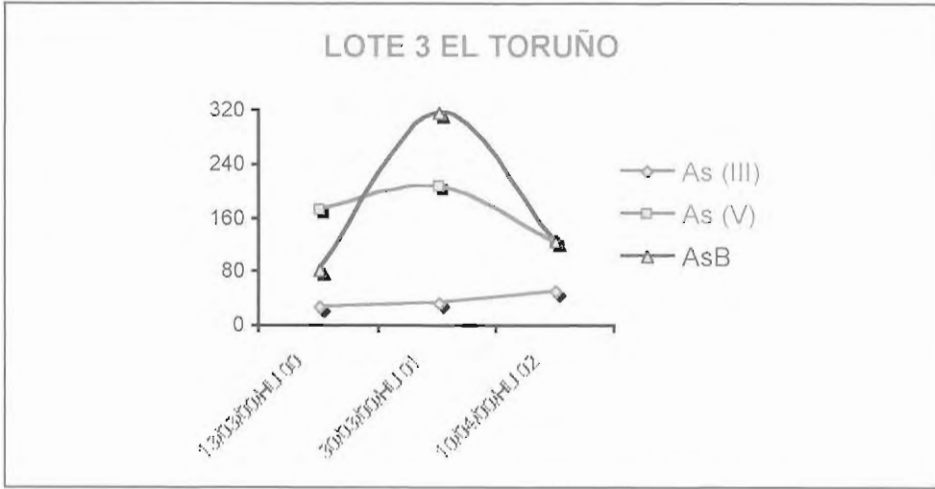


También se llevaron a cabo dos experiencias paralelas durante el periodo de marzo a mayo de 2000 con el objetivo de comparar los procesos de acumulación de las distintas especies de arsénico en coquina de fango transplantadas en una zona potencialmente contaminada por el vertido de Aznalcóllar (instalaciones de PISTRESA) y otra no contaminada (zona del CICEM "El Toruño"). Los resultados se muestran a continuación.

Los datos de muestras correspondientes a los trasplantes realizados en PISTRESA (Fig. 6) muestran que las concentraciones de As inorgánico tienden a reducirse aumentando al mismo tiempo la concentración de AsB (de 84 a 414 ppb). Esto sería justificable aceptando el hecho de que la AsB es el metabolito final de la vía de detoxificación, mientras que las especies inorgánicas son los metabolitos primarios.

En relación con las experiencias llevadas a cabo en el CICEM "El Toruño," no se pueden sacar conclusiones definitivas debido a la escasez de datos como consecuencia de la elevada mortandad de los organismos (Fig. 7).

Figura 7. Resultados obtenidos en la tercera experiencia de transplante realizada en el CICEM "El Toruño" de Marzo a Abril de 2000.



Es destacable en las tres experiencias el hecho de que tanto DMA como MMA no se detectaron.

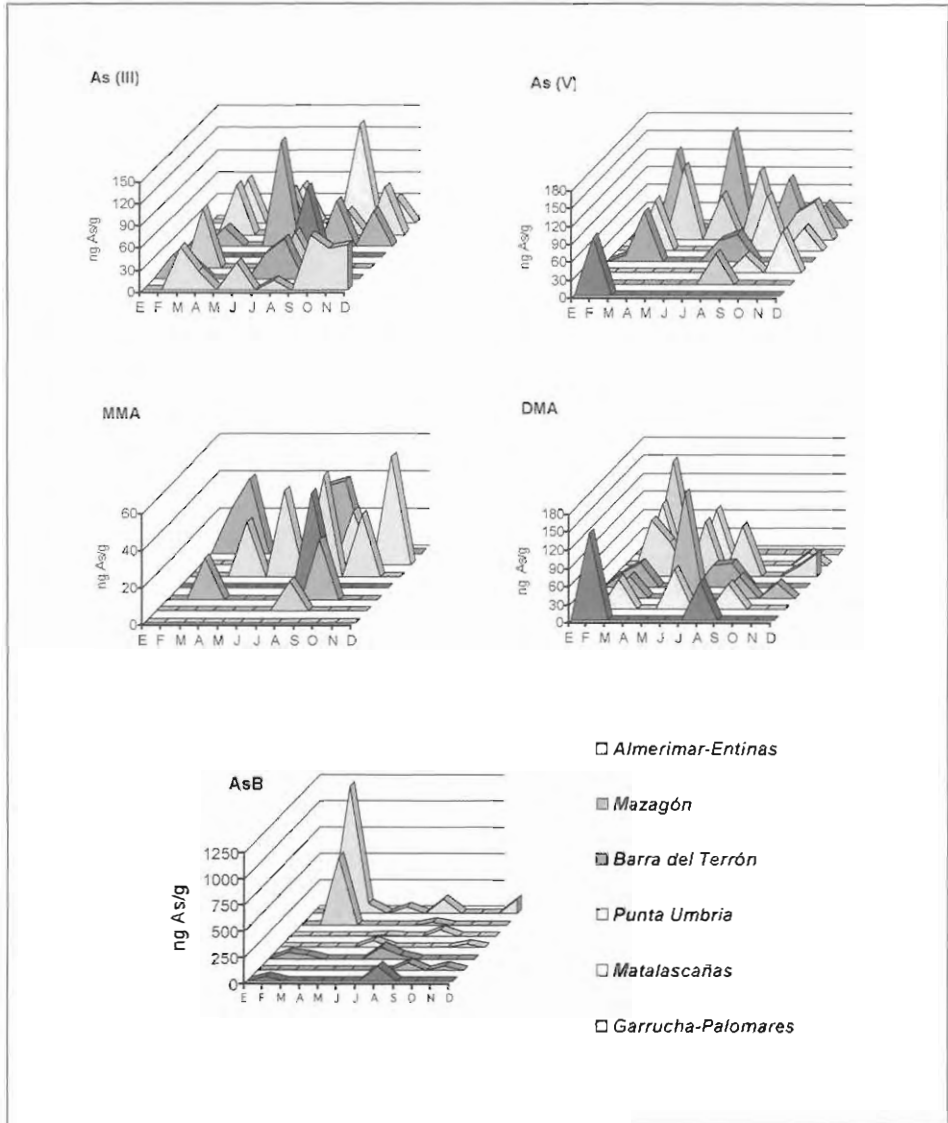
• ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE CONTAMINANTES SOBRE LOS RECURSOS PESQUEROS DEL LITORAL ANDALUZ.

Chirlas

Como se observa en la Fig. 8 no se detectan variaciones temporales significativas entre las diversas especies de As. Posiblemente, la transformación metabólica de unas especies en otras enmascare cualquier tipo de tendencia. Es destacable que las concentraciones de todas las especies de As son superiores en las zonas del litoral de Huelva, siendo generalmente altos en Mazagón, Punta Umbria y, especialmente, en Doñana. Los niveles elevados en las muestras provenientes de Doñana y las del norte y sur del estuario posiblemente puedan relacionarse con el vertido de Aznalcóllar.

Hay que resaltar que las concentraciones de AsB son inferiores a lo que cabría esperar, posiblemente por la presencia mayoritaria de arsenozúcares, como está descrito en la bibliografía. Esto puede observarse en la (Fig. 9) correspondiente al cromatograma de una muestra de chirla.

Figura 8. Especiación de As en chirlas (*Chamelea gallina*) a lo largo del año 1999.



Los datos se expresan como ng As/g muestra liofilizada.

Figura 9. Cromatograma obtenido a partir de una muestra de chirla de la zona 9.1 (Mazagón)

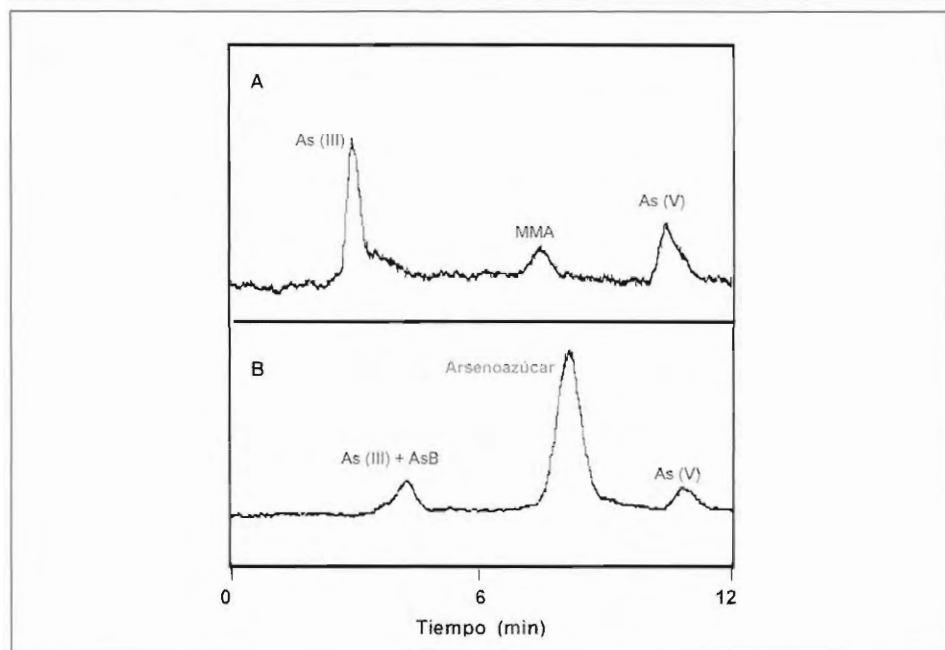
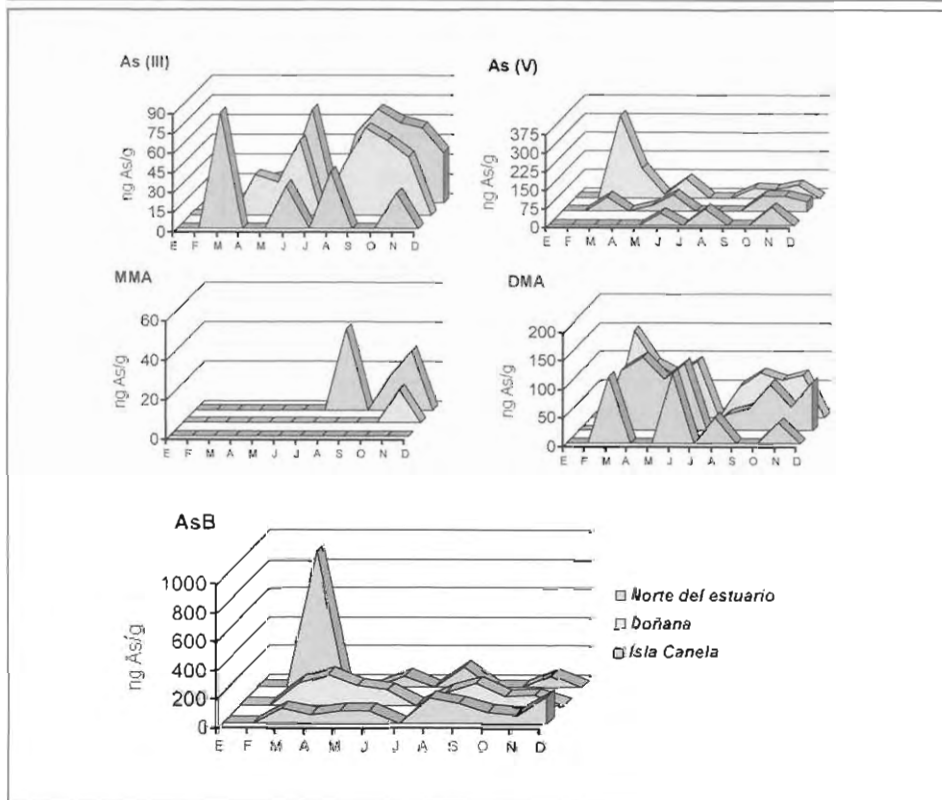


Figura 9. Cromatograma obtenido a partir de una muestra de chirla de la zona 9.1 (Mazagón), A: con acoplamiento HPLC-HG-AFS; B: con acoplamiento HPLC-UV-HG-AFS. Es destacable la gran diferencia de áreas y, por tanto, de concentración entre la AsB y el arsenozúcar.

Coquinas

No se aprecian variaciones temporales en estas muestras. Destacar la escasa presencia de MMA y los elevados niveles en Doñana. También es similar el comportamiento respecto a la AsB (Fig. 10).

Figura 10. Especiación de As en coquinas (Donax sp.) a lo largo del año 1999.

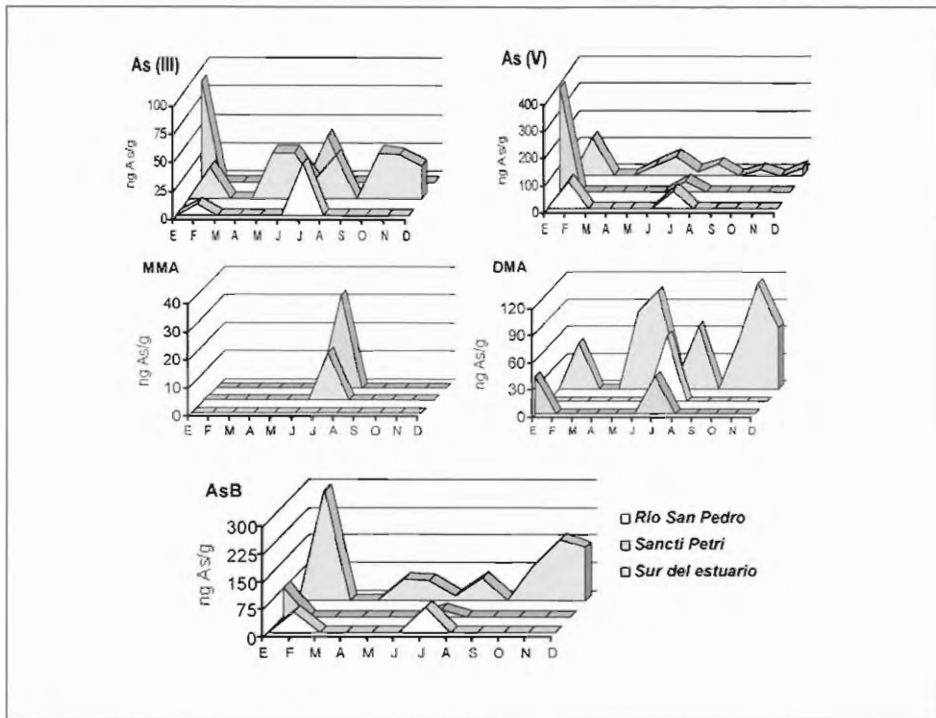


Los datos se expresan como ng As/g muestra liofilizada.

Coquinas de fango

No se aprecian variaciones temporales en este bivalvo con la excepción de una mayor presencia de As inorgánico en el mes de enero en la zona de Sancti Petri. Es destacable la práctica ausencia de MMA (Fig. 11).

Figura 11. Especiación de As en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) a lo largo del año 1999.



Los datos se expresan como ng As/g muestra liofilizada.

CONCLUSIONES

1. El acoplamiento instrumental HPLC(UV)-HG-AFS es adecuado para la especiación de arsénico en las muestras de bivalvos estudiados.
2. La especie mayoritaria en todas las muestras es un compuesto no identificado de naturaleza orgánica, posiblemente un arsenoazúcar.
3. En los bivalvos estudiados, As(V) y AsB son especies mayoritarias, seguidas de DMA y As(III), siendo muy escasa la presencia de MMA, especialmente en coquinas.
4. Los niveles de todas las especies de arsénico son superiores en la costa de Huelva aunque también se han apreciado niveles importantes de arsénico en la desembocadura del Guadalquivir.

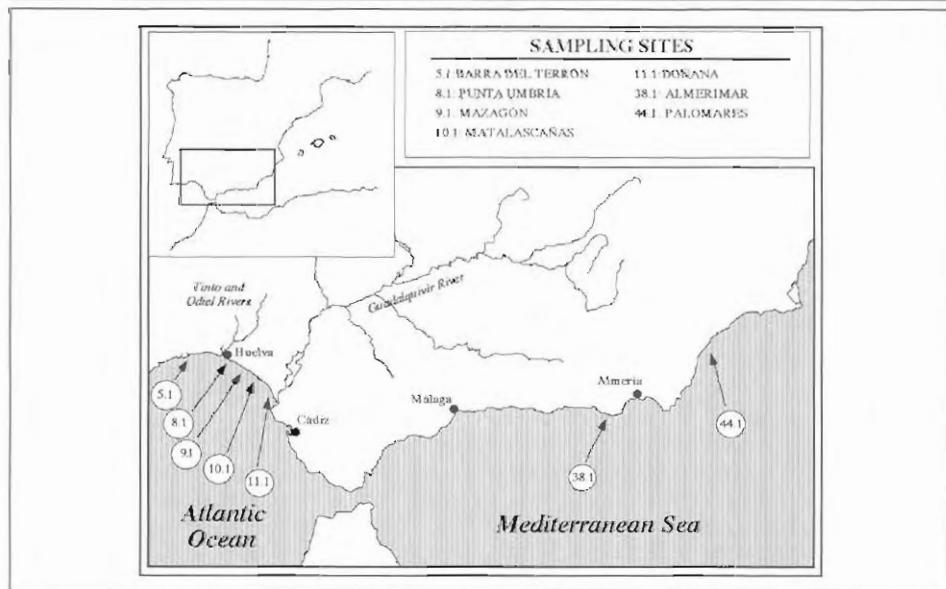
ENZIMAS BIOTRANSFORMADORAS, ANTIOXIDATIVAS Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CHIRLAS (*Chamelea gallina*)

Manuel José Rodríguez Ortega, José Alhama Carmona,
Antonio Rodríguez-Ariza y Juan López-Barea

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, km. 396-a. 14071 CÓRDOBA.

Como organismo centinela o bioindicador para el estudio de la contaminación ambiental se ha usado la chirla (*Chamelea gallina*), dado que se trata del molusco bivalvo más ubicuo a lo largo de las zonas de producción del litoral andaluz. La Figura 1 muestra las zonas de producción de chirlas del litoral andaluz estudiadas en este trabajo, indicando la numeración de cada una y el nombre de la localidad.

Figura 1. Zonas de producción de moluscos bivalvos del litoral andaluz donde se encuentra la chirla (*Chamelea gallina*) analizadas en el presente estudio



Para caracterizar la contaminación de las zonas estudiadas, la Figura 2 muestra esquemáticamente los metales y compuestos orgánicos en muestras recogidas en febrero/marzo, correspondientes al "invierno tardío", a partir de resultados analizados para la Consejería de Agricultura y Pesca y de los obtenidos por el grupo de la UHU. A grandes rasgos, las muestras procedentes del litoral onubense tienen niveles de contaminación muy superiores a las de Almería, tanto en contaminantes inorgánicos como en orgánicos. Esto nos llevó a tomar uno de los dos puntos de Almería como control, decidiéndonos por Palomares, pues, aunque sus niveles de contaminación son similares a los de Almerimar (presentando este último mayores niveles de Cr y Ni, aunque menos TBT), en este último punto hay un puerto deportivo, y esta cercanía de la actividad humana podría tener otros efectos en principio desconocidos. Las zonas con mayores índices relativos de contaminación son Mazagón (debido a la desembocadura de la ría de Huelva), seguida de Punta Umbría y Matalascañas, un proceso histórico asociado al Cinturón Pirítico Ibérico y a las industrias de Huelva.

Figura 2. Contenido de diversos metales y contaminantes orgánicos en chirlas muestreadas en marzo de 1999.

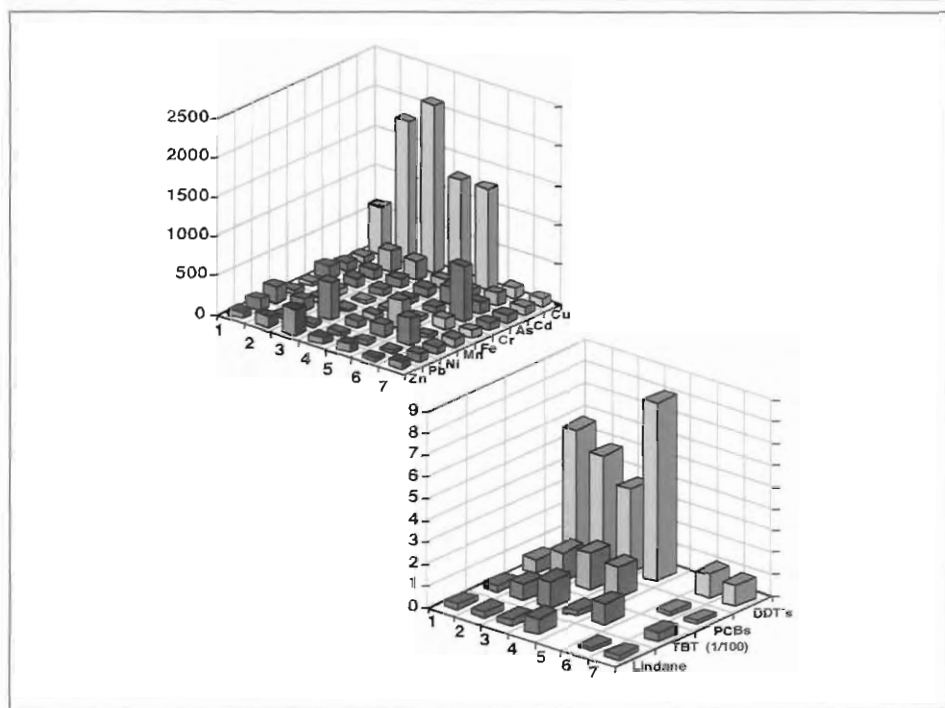


Figura 2. Contenido de diversos metales y contaminantes orgánicos en chirlas muestreadas en marzo de 1999 en El Terrón (1), Punta Umbría (2), Mazagón (3), Matalascañas (4), Doñana (5), Almerimar (6) y Palomares (7). Los metales (figura superior) se expresan en porcentaje del sitio de referencia (Palomares). Los contaminantes orgánicos (figura inferior) se expresan en ppb. Datos cedidos por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y por el grupo de la Universidad de Huelva.

La Figura 3 resume los biomarcadores moleculares de contaminación ambiental usados en este trabajo. La mayoría de ellos son actividades enzimáticas que cumplen diversas funciones fisiológicas en la defensa frente a situaciones estresantes. Un primer grupo está formado por las actividades de la glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y glutatión reductasa (GRasa), enzimas que mantienen reducido el estado redox intracelular al regenerar el glutatión reducido (GSH) o el piridín nucleótido reducido (NADPH) que se consumen en diversos procesos celulares, como las defensas enzimáticas contra el estrés causado por diversos contaminantes que generan estrés oxidativo. Un segundo grupo está formado por la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX), enzimas que detoxifican especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas son potentes agentes nucleofílicos que dañan numerosas biomoléculas, y que se originan, entre otros procesos, por la reacción de Fenton que produce radical hidroxilo, catalizada por metales pesados.

Un tercer grupo está formado por las actividades glutatión transferasas soluble (GSTc) y microsomal (GSTm) y las glioxalidas (Glx-I, Glx-II), enzimas que eliminan diversos compuestos electrofílicos exógenos o endógenos, conjugándolos con metabolitos que los hacen más solubles y excretables por los seres vivos. Las GSTs conjugan compuestos orgánicos electrofílicos con GSH, aumentando mucho su solubilidad. Las glioxalidas participan en la detoxificación de subproductos derivados de la peroxidación lipídica. Además, se midieron los niveles de malondialdehído (MDA), como índice de la peroxidación lipídica, como consecuencia de los daños que sufren las membranas biológicas al ser atacadas por EROs.

Figura 3. Biomarcadores analizados en chirlas y principales funciones en la detoxificación de contaminantes.

<i>Enzimas auxiliares</i>		
G6PDH	Regenera NADPH	Metales, EROs
IDH	Regenera NADPH	Metales, EROs
GRasa	Regenera GSH	Metales, EROs
<i>Enzimas antioxidativas</i>		
CAT	Elimina H ₂ O ₂	Metales, EROs
SOD	Elimina O ₂	Metales, EROs
GPX	Elimina ROOH	Metales, EROs
<i>Enzimas de fase II</i>		
GST	Elimina electrofílicos	Orgánicos
GLX-I	Elimina aldehidos	Metales, EROs
GLX-II	Elimina aldehidos	Metales, EROs
<i>Daños en lípidos</i>		
Malondialdehido	Producto de la peroxidación lipídica	Metales, EROs

La Figura 4 muestra los resultados de los biomarcadores antes señalados en las muestras recogidas en marzo de 1999, consideradas como de "invierno tardío". En general los niveles de casi todas las enzimas usadas como biomarcadores fueron mayores en las muestras procedentes de Huelva que en las procedentes de los dos puntos de Almería, con diferencias muy significativas en las actividades glutatión reductasa y glutatión transferasa microsomal, y menores, aunque también significativas, en el resto (G6PDH, IDH, GST, Glx-I y Glx-II). Es llamativo el hecho de se observe exactamente lo contrario con los niveles de MDA, que resultaron significativamente mayores en las muestras de Almería que en las de las zonas menos contaminadas (Huelva).

Figura 4. Biomarcadores ensayados en chirlas de zonas de producción a final de invierno de 1999.

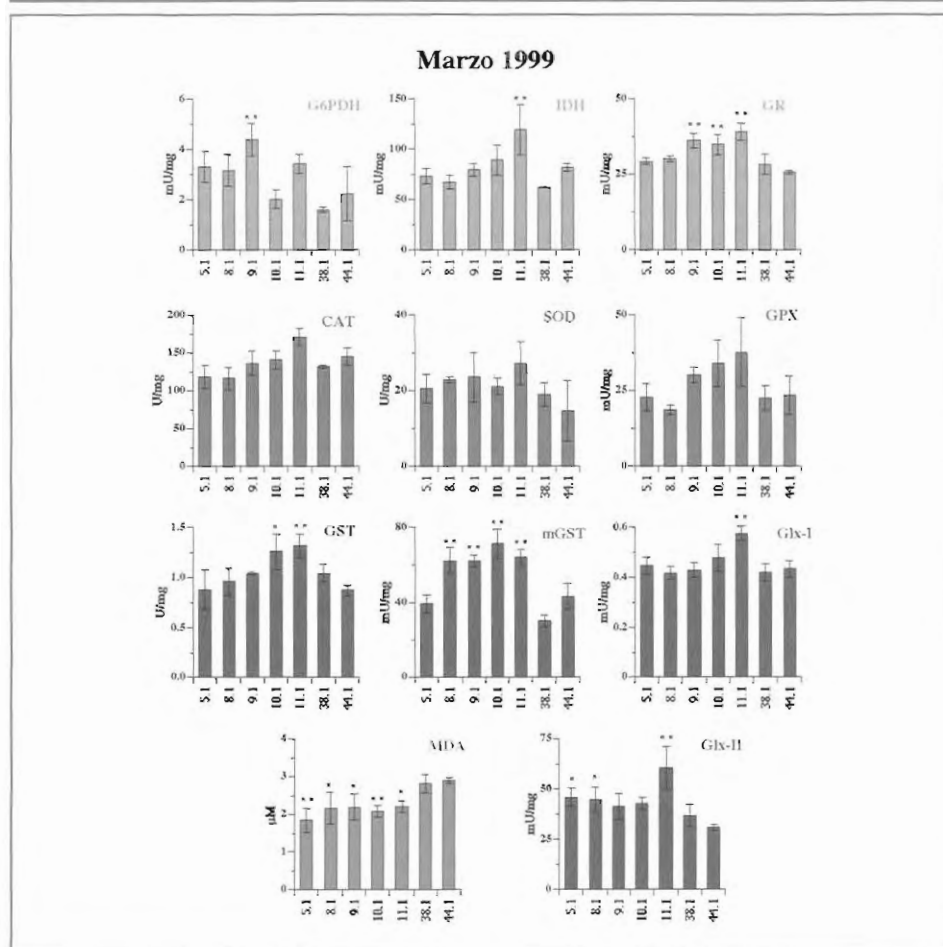


Figura 4. Biomarcadores ensayados en chirlas de zonas de producción a final de invierno de 1999. La significación estadística frente a los resultados de Palomares (44.1) se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Esto concuerda con los resultados obtenidos por nuestro grupo en trabajos anteriores, tanto con moluscos como con peces, y con lo obtenido por otros grupos. En efecto, los organismos expuestos a contaminantes ambientales se defienden de su presencia y efectos aumentando los niveles de diversas actividades enzimáticas que participan en su destoxificación, lo cual les hacen estar más protegidos contra los daños derivados de diversos fenómenos, como el estrés oxidativo. Esto se refleja en un menor nivel de daños en las membranas biológicas, como se pone de manifiesto en que las muestras de Huelva presentan niveles más bajos de MDA. En otra comunicación posterior se presentarán resultados de los niveles y estado redox del glutatión intracelular que confirman estas ideas.

Sin embargo, dentro de las muestras procedentes de las zonas con mayores niveles históricos de contaminación (litoral de Huelva) no se puede establecer una correlación perfecta entre el grado de contaminación y los niveles de biomarcadores analizados en este caso, ya que no en todos los casos la muestra de Mazagón presenta los mayores niveles. Hay que recordar que se trata de seres vivos en los que influyen numerosos factores.

La Figura 5 muestra resultados muy parecidos obtenidos en las chirlas muestreadas en distintas zonas de producción en el mes de septiembre (verano tardío). No obstante, en estas muestras no se observaron diferencias tan significativas como las detectadas en las muestras de invierno tardío, salvo en la glioxalasa I, pues en muchos casos las desviaciones estándar eran muy grandes. De nuevo se aprecia el comportamiento inverso de los niveles de MDA, superiores en las muestras de Almería que en las de Huelva. Como resumen de estos resultados, puede concluirse que los organismos expuestos de forma crónica a contaminantes que generan estrés oxidativo presentan mayores niveles de enzimas de defensa antioxidativa, lo cual les hace estar más protegidos contra los daños oxidativos causados por dichos contaminantes, como se refleja, al menos en los lípidos, en sus menores niveles de MDA.

Figura 5. Biomarcadores ensayados en chirlas de zonas de producción a final de verano de 1999.

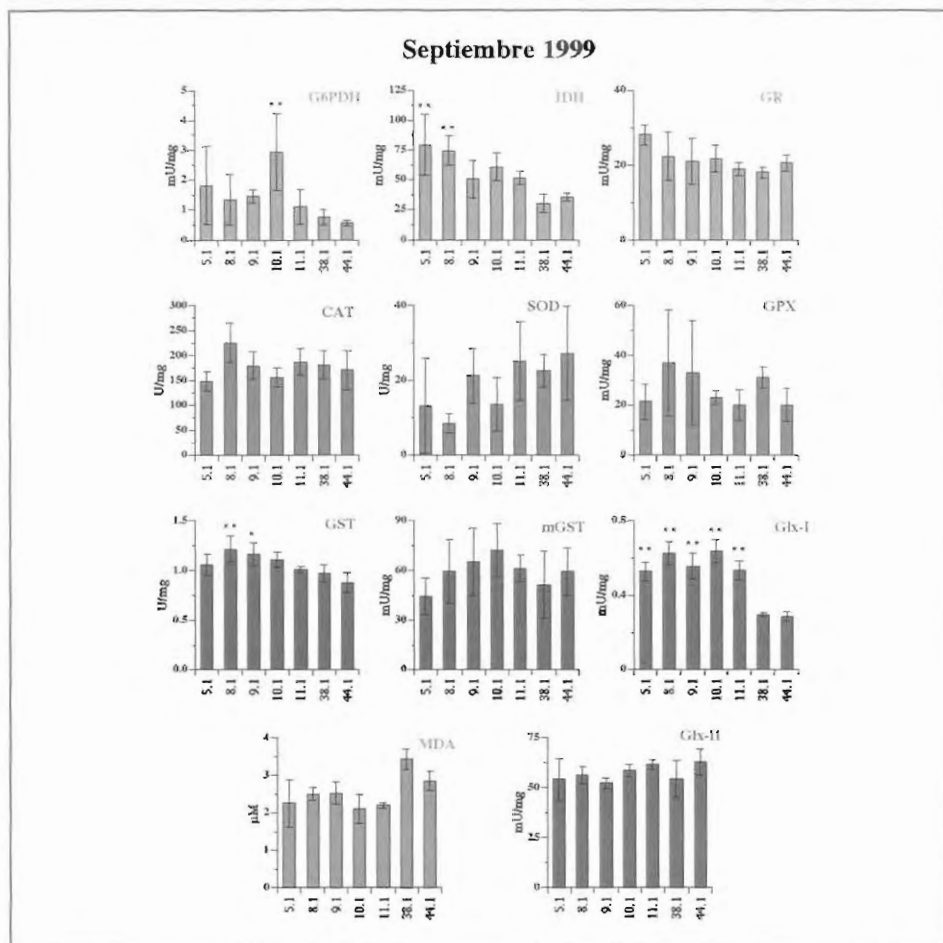


Figura 5. Biomarcadores ensayados en chirlas de zonas de producción a final de verano de 1999. La significación estadística frente a los resultados de Palomares (44.1) se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como sigue: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Dado que se habían analizado muestras recogidas en distintos periodos del año 1999, se estudió la posible variación estacional de dichos biomarcadores en varias de las zonas de muestreo. La Figura 6 muestra los resultados obtenidos en las muestras de Mazagón, Mata-lascañas y Doñana a lo largo del año 1999. A grandes rasgos, se ve que la mayoría de las actividades enzimáticas analizadas tienen variaciones cíclicas con dos máximos anuales, marzo y septiembre separados por seis meses, y dos mínimos, junio y diciembre separados también por seis meses. Dichas variaciones cíclicas son muy pronunciadas en la G6PDH, IDH, GSHPx y GSTm, con diferencias de hasta tres veces entre los niveles máximos y mínimos, y menos acentuadas en la CAT, GST, Glx-I y Glx-II, con

Figura 6. Evolución de los distintos parámetros bioquímicos durante el año 1999.

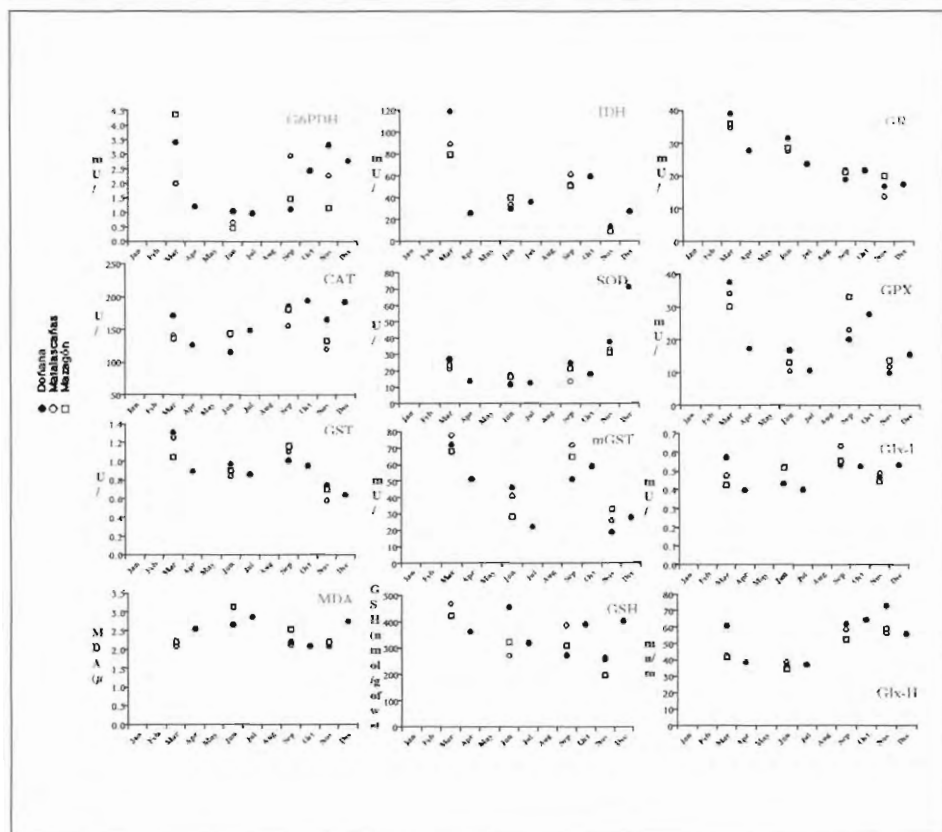


Figura 6. Evolución de los distintos parámetros bioquímicos durante el año 1999. Se representan los valores de los doce biomarcadores analizados en las chirlas muestreadas en Mazagón (9.1, cuadrados blancos), Matalascañas (10.1, círculos blancos) y Doñana (11.1, círculos negros) frente a las fechas de sus correspondientes muestreos.

diferencias entre máximos y mínimos de unas dos veces tan sólo. Por el contrario, las actividades SOD y GRasa y el contenido de GSH no muestran este perfil oscilante.

Curiosamente, el perfil de MDA es inverso al de la mayoría de las enzimas analizadas, con dos máximos (junio y diciembre) separados por seis meses que corresponden a los mínimos de las actividades enzimáticas, y a la inversa dos mínimos (marzo y septiembre) que corresponden a valores máximos de las defensas antioxidativas. Estos resultados coinciden y refuerzan lo expuesto antes: unos niveles altos de enzimas antioxidativas se corresponden con niveles bajos de MDA, y a la inversa los niveles de peroxidación lipídica aumentan al bajar las defensas. Esto puede interpretarse según lo que se ha indicado a lo largo de la exposición: los valores máximos de las defensas antioxidativas en marzo y septiembre protegerían mejor a los organismos en tales periodos, lo que se

confirmaría por el menor grado de peroxidación lipídica reflejado en el contenido de MDA. De forma similar, los descensos de las actividades enzimáticas en junio y noviembre podrían provocar un aumento en el estrés oxidativo de ciertas biomoléculas, como el reflejado en los niveles de MDA.

Las variaciones cíclicas anuales encontradas en los niveles de un número tan elevado de parámetros usados como biomarcadores de contaminación deben tener alguna causa común. Estos cambios parecen indicar que, además de la variación de la respuesta debida a variaciones de los propios contaminantes, podría haber otro(s) debido al estado fisiológico del organismo, que puede relacionarse con la época del año, disponibilidad de alimento, estado reproductor, etc. En efecto, podría pensarse en varias posibilidades:

Las concentraciones de los contaminantes presentes en las aguas litorales podrían sufrir cambios cíclicos, quizás a consecuencia de los diferentes caudales de agua y niveles de contaminantes arrastrados por los ríos Odiel y Tinto en distintas épocas del año debidos a lixiviación del terreno por el que circulan, perteneciente al Cinturón Pírrico Ibérico. De hecho se sabe que la temporada de lluvias (Noviembre a Marzo) lleva asociada máximos aportes de contaminantes a través de los ríos Tinto y Odiel y la Ría de Huelva.

Los contenidos de metales presentes en la chirla podrían experimentar cambios asociados a los ciclos reproductores, pues la gametogénesis y la emisión de gametos son procesos fisiológicos muy complejos que pueden ir asociados a cambios importantes en los contenidos de metales.

Además, el metabolismo general y antioxidativo de estos bivalvos podría experimentar cambios cíclicos estacionales debidos a otros factores, como las diferencias de intensidad luminosa, temperatura, disponibilidad de nutrientes primarios y de alimento generado por los productores primarios, niveles de oxígeno disuelto y tasas respiratoria, etc.

Los resultados presentados en este trabajo permiten obtener las siguientes conclusiones al menos de forma provisional:

- a) Las chirlas de zonas con mayores niveles históricos de contaminación relativa (litoral de Huelva) tienen valores más altos de varios biomarcadores antioxidativos que las chirlas de zonas menos contaminadas (litoral de Almería).
- b) Las mayores defensas antioxidativas de las chirlas de Huelva hace que muestren menos daños oxidativos en los lípidos (MDA).
- c) Muchos biomarcadores muestran variaciones cíclicas estacionales con valores máximos y mínimos coincidentes. Esto sugiere que tales variaciones reflejan variaciones periódicas en factores ambientales –luz, temperatura, concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes, aporte de contaminantes– o cambios estacionales de procesos biológicos, tales como la intensidad de los procesos metabólicos o los ciclos reproductores, a su vez conectados a los cambios del medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto 1FD97-0610-C003 concedido por la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Subdirección General de Proyectos de Investigación Científica y Técnica, Plan Nacional de I+D, del Ministerio de Educación y Cultura, a Juan López Barea y José Luis Gómez Ariza, como investigadores principales.

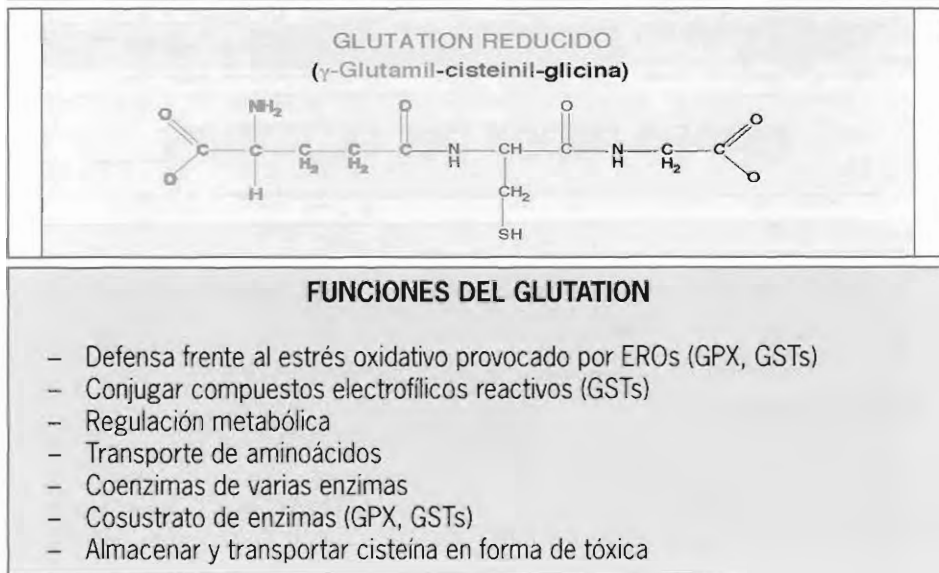
CAMBIOS EN LOS NIVELES DE GLUTATIÓN Y SU ESTADO REDOX INTRACELULAR EN MOLUSCOS BIVALVOS

José Alhama Carmona, Manuel José Rodríguez Ortega,
Antonio Rodríguez-Ariza y Juan López-Barea

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, Km. 396-a. 14071 CÓRDOBA

El glutatión reducido (GSH), cuya estructura se muestra en la Figura 1, es el tiol no proteico más abundante que está presente en la inmensa mayoría de las células procariontas y eucariotas. La forma reducida del glutatión es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina unidos por enlaces peptídicos (g-Glu-Cys-Gly), el Glu se une por un enlace peptídico gamma a la Cys, con lo que no es sensible al ataque de las proteasas intracelulares. La forma reducida del glutatión está presente en el citosol a concentración milimolar, por lo que mantiene este compartimento en un estado muy reducido gracias a las propiedades redox del grupo tiol (-SH) de su residuo Cys.

Figura 1. Estructura del glutatión reducido (GSH, g-Glu-Cys-Gly) y principales funciones metabólicas. En azul se destaca su papel en la defensa frente al estrés oxidativo.



Son diversas las funciones asignadas al glutatión, que se recogen en la Figura 1. Destacan su papel en la conjugación de compuestos electrofílicos, en el transporte de azufre entre diversos órganos en forma no tóxica, en el transporte de aminoácidos al interior de las células, y en la regulación de diversos procesos metabólicos. En la presente comunicación nos centraremos exclusivamente en su papel en la defensa frente al estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (EROs), gracias a su papel en la reducción de hidroperóxidos orgánicos mediante reacciones catalizadas por la enzima glutatión peroxidasa (GPX) y algunas de las isoenzimas de la glutatión transferasa (GSTs), capaces de reaccionar también con tales EROs.

En todas las células el glutatión se encuentra en dos formas distintas, la reducida (GSH) descrita ya en la Figura 1, y la oxidada (GSSG), que está formada por dos tripeptidos como el antes descrito enlazados mediante un puente disulfuro (-S-S-) que se forma entre los dos grupos -SH de sus cisteínas al oxidarse cediendo a diversos sustratos aceptores (radicales libres, proteínas, etc.) dos átomos de hidrógeno. Aunque las estructuras preferidas tanto del GSH como del GSSG se han establecido por cristalografía de rayos X, no viene al caso su estudio detallado.

Para cada una de las distintas situaciones fisiológicas de un organismo, se define el estado redox del glutatión (Figura 2) como la relación que existe entre la concentración de glutatión oxidado (2 x GSSG, expresada en equivalentes de GSH) y la de glutatión reducido. Para diagnosticar la exposición de los organismos al estrés oxidativo se usan a menudo las alteraciones de la relación 2 x GSSG/GSH. En efecto, en condiciones fisiológicas óptimas, el glutatión está presente mayoritariamente en el interior de las células en su forma reducida, y solo una pequeña cantidad (< 5%) en su forma oxidada, por lo que la relación que define el estado redox, 2 x GSSG/GSH, es muy baja. Esta situación se debe al funcionamiento continuado de la glutatión reductasa, una enzima muy abundante en las células, y a la presencia de suficiente concentración de NADPH generado por diversas vías metabólicas.

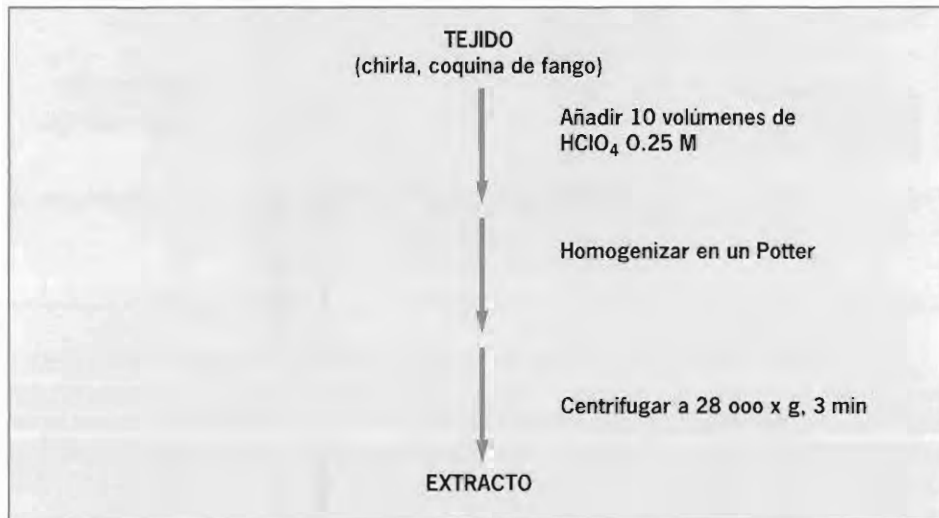
Figura 2. Definición del estado redox del glutatión intracelular.



Sin embargo, cuando un organismo o una célula del mismo sufre un estrés oxidativo, derivado de la formación de EROs, se provoca la oxidación del glutatión, lo que aumenta la relación $2 \times \text{GSSG}/\text{GSH}$, al aumentar el numerador y disminuir el denominador. Un incremento en los niveles de GSSG se considera, pues, un índice muy seguro de que el organismo en cuestión ha estado sometido a un estrés oxidativo. En consecuencia, la medida de las concentraciones de GSH y GSSG, y la determinación de su estado redox intracelular es un poderoso biomarcador bioquímico que indica el grado de estrés oxidativo de un organismo en un momento determinado. Además dado que muchas enzimas antioxidativas usan GSH como sustrato, la medida de este antioxidante permite conocer el grado de funcionamiento de estas defensas antioxidativas.

La Figura 3 muestra de forma abreviada los pasos necesarios para extraer el glutatión intracelular con vistas a la determinación de los niveles y estado redox del glutatión. Ambas formas del glutatión, reducida y oxidada, se determinan tras añadir a las células o tejidos de la muestra ácido perclórico, homogeneizar suavemente en un aparato Potter, y centrifugar en frío para obtener el correspondiente extracto libre de células. Estas condiciones, no sólo se rompen las células, sino que además precipitan las proteínas y se mantiene un pH bastante bajo para evitar la oxidación del GSH durante la extracción, uno de los problemas más críticos en estas determinaciones analíticas.

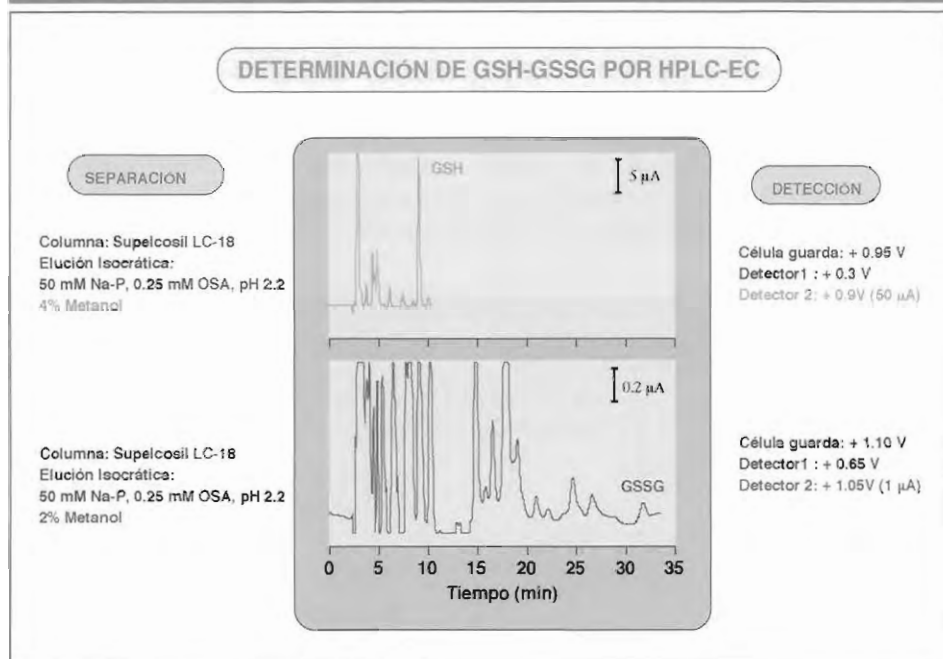
Figura 3. Protocolo abreviado para la extracción del glutatión intracelular para determinar su estado redox.



La Figura 4 muestra los pasos necesarios para determinar los niveles de glutatión oxidado y reducido con vistas a determinar su estado redox intracelular. El análisis de GSH y GSSG en los extractos obtenidos por el protocolo arriba descrito se realiza tras su separación por HPLC en fase reversa con elución isocrática empleando ácido octanosulfónico como par iónico en una columna C18, acoplada a la detección electroquímica muy específica. La separación de ambas formas del glutatión se realiza de forma

independiente usando métodos algo diferentes. Para la determinación de GSH se usa como fase móvil tampón 50 mM fosfato sódico, pH 2,2 conteniendo 0,25 mM de ácido octanosulfónico y 4% de metanol. Para el GSSG se usa la misma fase móvil pero con 2% de metanol. La detección electroquímica se realiza en un detector ESA empleando el electrodo 1 como apantallamiento y ajustando el electrodo 2 de medida a 0,9 V para GSH y 1.05 V para el GSSG. En estas condiciones el GSH eluye alrededor del minuto 8, mientras que el GSSG lo hace a los 32 minutos.

Figura 4. Determinación de los niveles de GSH y GSSG por HPLC en fase reversa y detección electroquímica.

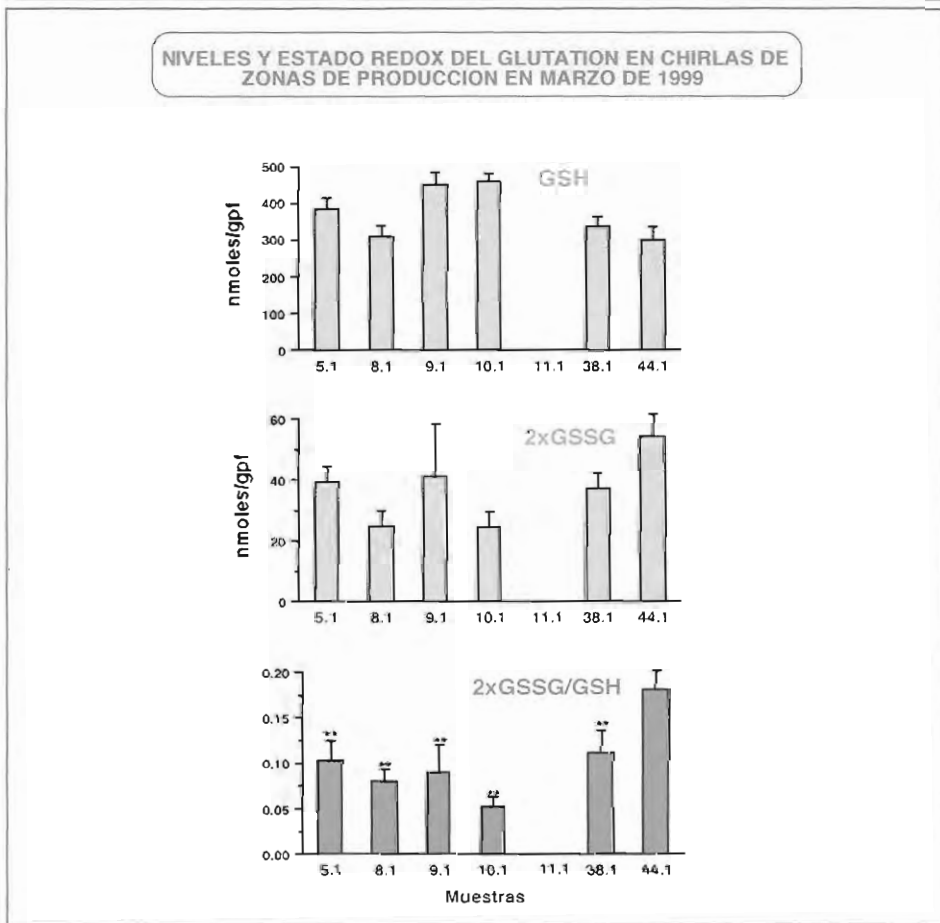


Tras exponer la metodología para la extracción y análisis de los niveles y estado redox del glutatión, pasaremos a presentar los estudios en distintos bivalvos. Los estudios del efecto de la contaminación del litoral andaluz se han realizado usando como especie bioindicadora la chirla (*Chamaelea gallina*), el bivalvo que está presente en más áreas del litoral andaluz. Se ha estudiado el estado redox del glutatión en chirlas recogidas en 1.999 en distintas zonas de producción de bivalvos. La Figura 5 muestra la concentración de glutatión en forma reducida y oxidada y su estado redox intracelular en chirlas muestreadas en Marzo de 1.999 en distintas zonas litorales.

Cuando se comparaban con los animales muestreados en la playa de Palomares (44.1) usados como referencia, las chirlas de Mazagón (9.1) y Matalascañas (10.1) mostraban concentraciones algo superiores de GSH, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas. Además, las chirlas de todas las zonas analizadas de Huelva presentaban niveles más bajos de GSSG que los animales de la zona de referencia. Ello

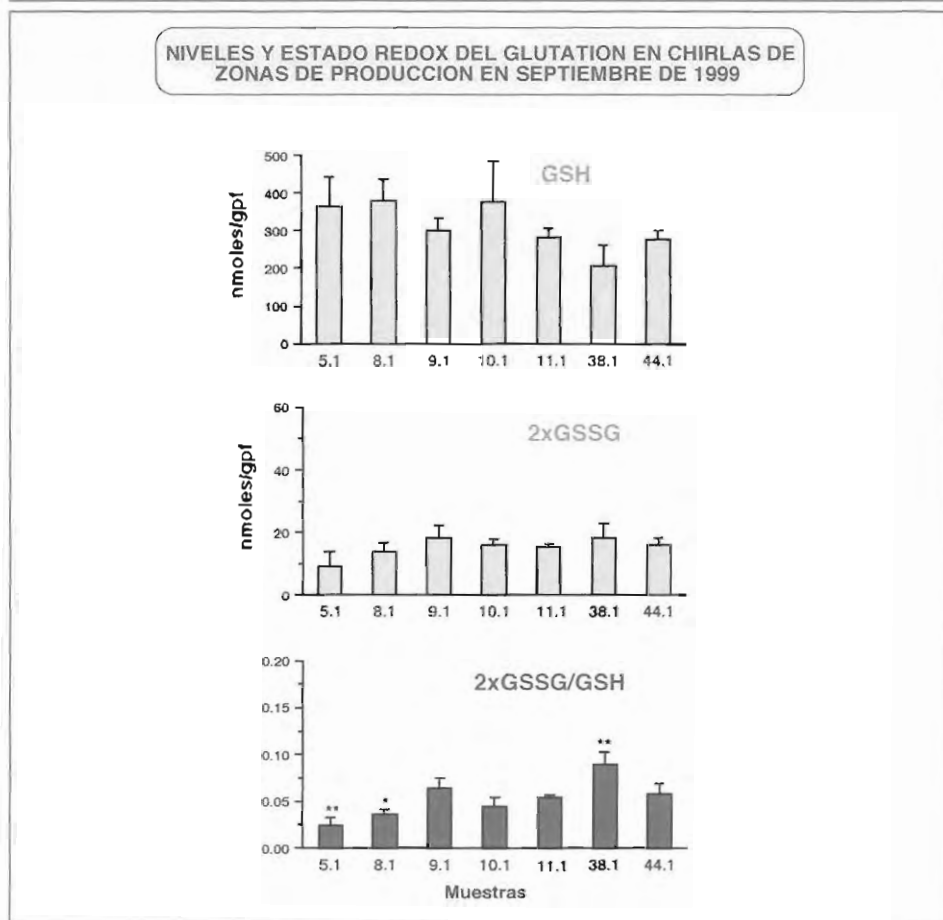
hacia que el estado redox del glutatión resultara mucho menos oxidado en los bivalvos de Huelva. En efecto, en comparación con Palomares, la relación $2 \times \text{GSSG}/\text{GSH}$ fue significativamente menor en los animales precedentes de El Terrón (5.1), Punta Umbría (8.1), Mazagón (9.1), Matalascañas (10.1), siendo en la mayoría de las zonas la mitad que en la de referencia. El menor contenido de GSSG de las chirlas de Huelva podría deberse a la mayor actividad hallada en estos animales de las enzimas glucosa-6P deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa, que generan poder reductor en forma de NADPH y de la glutatión reductasa, encargada de reducir el GSSG a expensas del NADPH generado por la otras dos enzimas auxiliares como ya se vió. Estos resultados confirmaban que las chirlas de Huelva, expuestas habitualmente a metales y contaminantes orgánicos que generan EROs, podrían estar mejor protegidos contra el estrés oxidativo que los animales usados como referencia, al igual que ocurría cuando se analizó el contenido de MDA.

Figura 5. Niveles de GSH y GSSG y estado redox del glutatión intracelular en chirlas (*Chamaelea gallina*) muestreadas en Marzo de 1999 en distintas zonas de producción del litoral andaluz.



Por analogía con la anterior, en la Figura 6 se muestra el contenido y estado redox del glutatión en chirlas muestreadas en Septiembre de 1.999. Los niveles de GSSG en chirlas muestreadas en esta fecha eran, en general, menores que los de que las muestreadas en invierno, lo que hizo que el estado redox fuera menos oxidado, provocado seguramente por variaciones estacionales en los contenidos de contaminantes ambientales capaces de provocar estrés oxidativo. Tomando como referencia de nuevo la zona de Palomares (44.1), solo los animales procedentes de El Terrón (5.1) y Punta Umbria (8.1) mostraron un estado redox significativamente menos oxidado. Estos resultados vuelven a confirmar que las chirlas de Huelva están mejor protegidas frente al estrés oxidativo que podrían haber provocado los metales presentes de forma crónica en dicha zona, que las chirlas de Almería.

Figura 6. Niveles de GSH y GSSG y estado redox del glutatión intracelular en chirlas (*Chamaelea gallina*) muestreadas en Septiembre de 1999 en distintas zonas de producción del litoral andaluz.



Además de los estudios realizados con chirlas procedentes de distintas zonas de producción de bivalvos del litoral andaluz, y para estudiar los posibles efectos del accidente de Aznacollar sobre el estuario del Guadalquivir, se llevaron a cabo experimentos de transplante de coquinas de fango procedentes del río Barbate a dicho Estuario. Además, para controlar los posibles cambios fisiológicos relacionados con el estrés debido al transplante, se transplantaron de forma paralela coquinas de fango a una zona limpia de contaminantes que fue considerada como zona control (Figura 7).

Figura 7. Niveles de GSH y GSSG y estado redox del glutatión intracelular en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*)

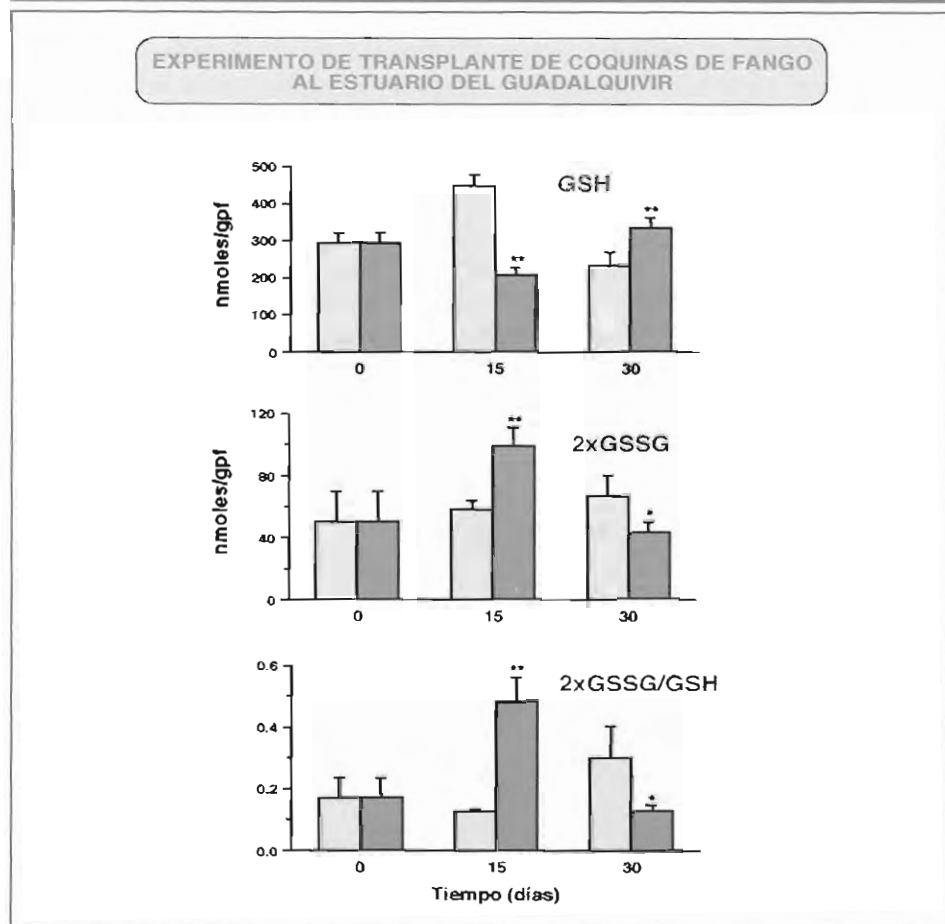


Figura 7. Niveles de GSH y GSSG y estado redox del glutatión intracelular en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) transplantadas de forma paralela desde Barbate a las instalaciones de PISTRESA (histogramas rojos) en el río Guadalquivir, frente a la desembocadura del Guadalimar (Brazo de la Torre) y al CÍCEM El Toruño (histogramas rosas).

Al estudiar el contenido de glutatión y su estado redox, se comprobó que había diferencias significativas entre los animales de los grupos control, transplantados al CICEM El Toruño, y del grupo problema, transplantados a las instalaciones de PISTRESA en el río Guadalquivir, frente a la desembocadura del río Guadiamar (Brazo de la Torre), posiblemente expuesto al vertido de la mina de Aznalcollar. A los quince días de su transplante al Estuario, las coquinas de fango tenían niveles muy inferiores de glutatión reducido que las transplantadas a la zona control. Este descenso del GSH se veía además acompañado por un aumento paralelo de la concentración de glutatión oxidado, lo que les había provocado un aumento estadísticamente significativo (niveles más de 3.5 veces mayores) del estado redox del glutatión intracelular ($2 \times \text{GSSG}/\text{GSH}$).

Estos resultados confirman la idea de que en el estuario del Guadalquivir los animales podrían estar sometidos a un fuerte estrés oxidativo debido a metales. Tras aumentar el GSSG a los 15 días del transplante, en el siguiente muestreo se vió una fuerte respuesta de los animales expuestos, al bajar la forma oxidada del glutatión. Este cambio podría deberse a una defensa adaptativa frente al estrés oxidativo provocado por la acumulación de metales (As, Fe, Cd y Cu). Sin embargo, aún desconocemos el mecanismo de esta respuesta antioxidativa, pues los niveles de las enzimas antioxidativas apenas variaron.

Como conclusiones provisionales de este trabajo podemos decir que la correlación entre acumulación de metales y el estado redox del glutatión intracelular demuestra la validez de este parámetro como biomarcador de alerta temprana de contaminación ambiental. Asimismo de los resultados obtenidos se puede deducir la persistencia de un cierto grado relativo de contaminación en la desembocadura del río Guadalquivir por compuestos capaces de provocar estrés oxidativo.

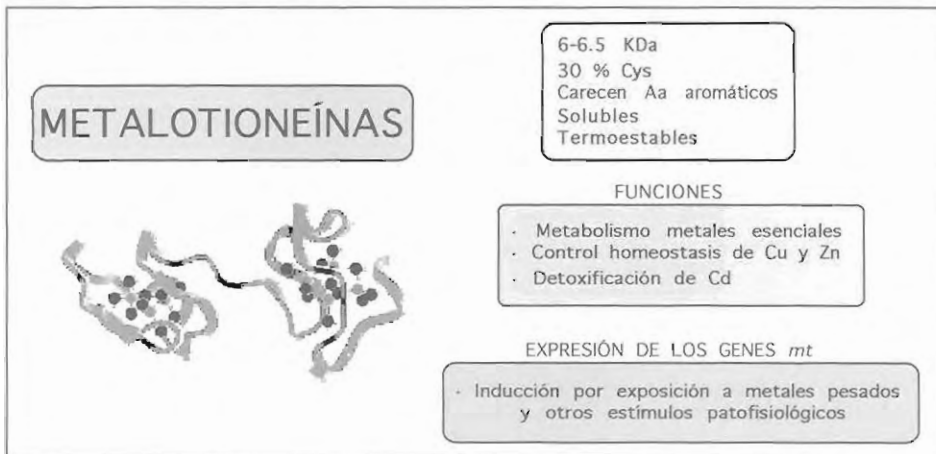
DETECCIÓN DE METALOTIONEÍNAS TRAS SU DESNATURALIZACIÓN Y TITULACIÓN CON DTNB EN CHIRLAS (*Chamelea gallina*)

Maria Victoria Funes Luque, José Peinado Peinado y Juan López-Barea

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, km. 396-a. 14071 CÓRDOBA

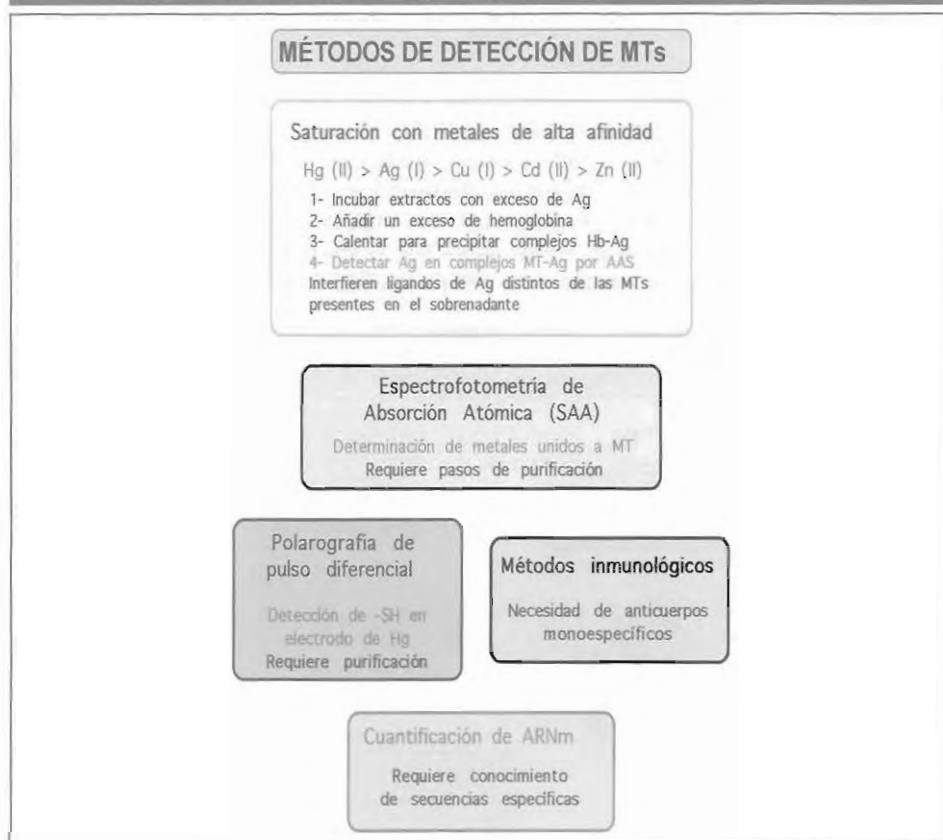
Las metalotioneínas (MTs), cuya estructura tridimensional se muestra en la Figura 1 representando la cadena de proteína como una cinta, son pequeñas proteínas de unos 6 kDa de masa molecular, muy solubles y termoestables y carentes de residuos aromáticos, que están presentes en todos los organismos conocidos, desde los invertebrados más primitivos a los mamíferos superiores. De un total de unos 60 aminoácidos, estas proteínas poseen numerosos residuos cisteína, del orden del 30-35% del total, cuyos grupos -SH se unen a metales endógenos (Cu, Zn) o exógenos (Cd, Ag, Hg). Como muestra la Figura, las metalotioneínas tienen dos dominios organizados de forma que los átomos de azufre de sus Cys (en azul) acomplejan varios átomos metálicos (en rojo) en cada uno de sus dominios. Estas proteínas participan en el metabolismo de metales esenciales, en la homeostasis del Cu y Zn (recuérdese la importancia de los dedos de Zn en las proteínas reguladoras) y en la detoxificación del Cd. Los metales, y algunos estímulos patofisiológicos, inducen la transcripción de los genes MT, lo que justifica su empleo como biomarcador de la presencia de metales o de estrés fisiológico en poblaciones naturales.

Figura 1. Metalotioneínas: estructura, propiedades químicas, funciones biológicas y regulación de la expresión de los genes que las codifican.



Aunque en nuestro grupo estamos desarrollando métodos para medir la expresión de los genes *mt*, que se describirá en el Capítulo 17 de esta publicación, hay ya varios métodos para cuantificar esta proteína, que revisaremos brevemente, comentando sus ventajas e inconvenientes para su uso como ensayos rutinarios para el control ambiental. La Figura 2 resume los más usados. El primero es el de saturación con metales con alta afinidad hacia las MTs. Los grupos -SH de estas proteínas tienen distinta afinidad hacia los metales, que sigue aproximadamente el siguiente orden decreciente: Hg (II) > Ag (I) > Cu (I) > Cd (II) > Zn (II). Se han desarrollado varios ensayos de saturación de las MTs con metales de gran afinidad hacia ellas. En uno de ellos se incuban los extractos con un exceso de Ag, que desplaza de la MT a los otros metales y se une además a otras proteínas solubles. Para eliminar la Ag no unida específicamente, se añade hemoglobina en exceso, se calienta y se centrifuga, quedando sólo la Ag unida a la MT, que se cuantifica por espectrofotometría de absorción atómica. El método es simple, rápido y reproducible, pero tiene el inconveniente de que otros ligandos distintos de las MTs pueden quedar en el sobrenadante final, interfiriendo en el ensayo.

Figura 2. Métodos usados en la actualidad para la cuantificación de las metalotioneínas como biomarcador de contaminación ambiental por metales.

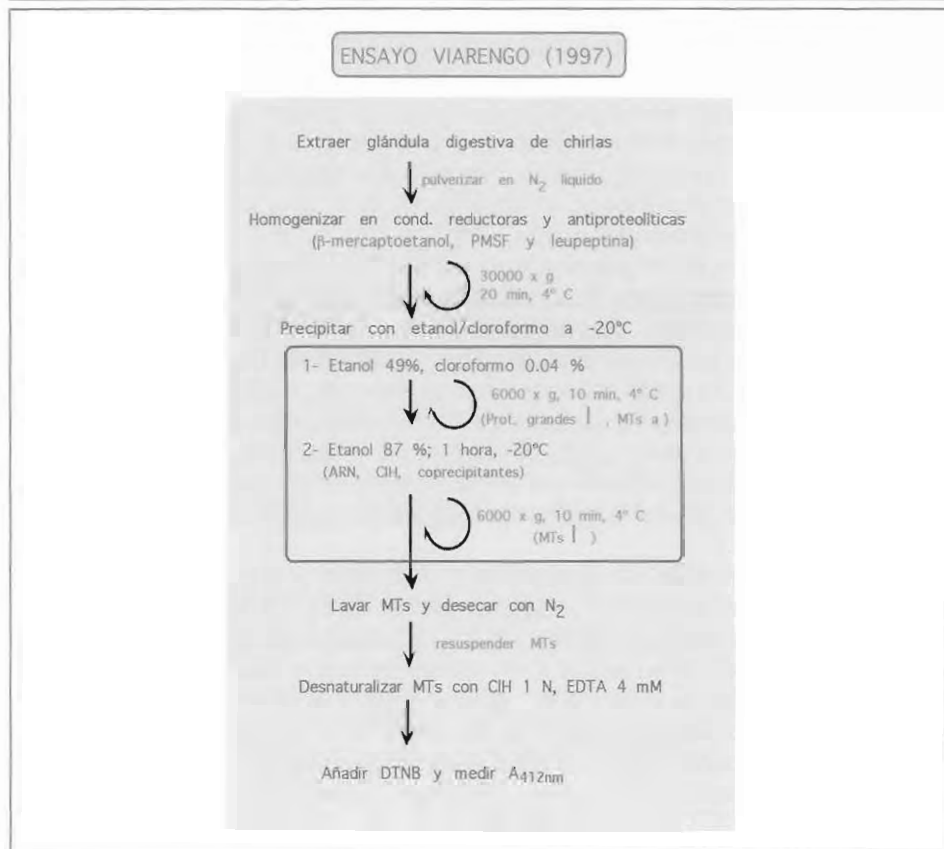


Otro método también usado es la *cuantificación de metales unidos a las MTs*. La espectrometría de absorción atómica permite determinar distintos metales usando diferentes longitudes de onda de emisión. Esta técnica requiere purificar el extracto para eliminar otras metaloproteínas distintas de las MTs y los metales libres en el extracto, dado que estos metales podrían confundir el ensayo. Para la cuantificación de metalotioneínas se usan también los métodos electroquímicos. Los grupos -SH de las MTs pueden medirse por *polarografía de pulso diferencial* con un electrodo de gota de mercurio, calibrando la respuesta del aparato con concentraciones conocidas de MTs comerciales. El inconveniente de este método es que también necesita pasos previos de purificación.

La cuantificación de metalotioneínas también puede hacerse por *métodos inmunológicos*. Los métodos de enzima-inmunoensayo (ELISA) y de radio-inmunoensayo (RIA) son muy sensibles, pero tienen el inconveniente de requerir anticuerpos monoespecíficos, no siempre disponibles. Recientemente se ha desarrollado la *cuantificación de ARNm específicos* de las MTs por técnicas de Biología Molecular. Distintos ensayos detectan secuencias de ADN o ARN conocidas de los genes que codifican las MTs. En nuestro grupo se ha desarrollado la metodología RT-PCR competitiva y "GeneScan" que se ha aplicado con éxito a varios genes (metalotioneína y citocromo P450) de dos especies de peces autóctonos, doradas y lisas. No obstante, estos métodos tienen el inconveniente de necesitar conocer previamente la secuencia específica de los genes que se desea cuantificar.

El *ensayo colorimétrico de Viarengo* (Figura 3) se basa en la reacción de los grupos -SH de las metalotioneínas con el reactivo de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitribenzoico, DTNB). El método es simple, sensible y barato, por lo que se escogió en el presente proyecto de investigación para cuantificar las metalotioneínas en bivalvos del litoral andaluz como biomarcador de la presencia y efectos biológicos de los metales. El procedimiento seguido es el siguiente: de las chirlas se extrae la glándula digestiva, con alto contenido en MT. Las glándulas se pulverizan en nitrógeno líquido y se homogenizan en condiciones reductoras y en presencia de inhibidores de las proteasas. La fracción soluble, que contiene las MTs, se precipita en frío (-20°C) con etanol/cloroformo, para lo cual: i) Se añade etanol al 49% y cloroformo al 0.04% y se centrifuga para eliminar proteínas de alto peso molecular que podrían interferir en el ensayo. ii) Las MTs precipitan añadiendo 3 volúmenes de etanol (87%) y 37% HCl y ARN como coprecipitantes; se incuba una hora y luego se centrifuga. El precipitado se lava, se seca con gas N₂, se resuspende en tampón, y se desnaturaliza con HCl 1 N, EDTA-Na 4 mM para separar los metales unidos a los grupos tioles. Por último, se añade el reactivo DTNB que reacciona con los grupos -SH liberados de las MTs y se mide la absorbancia del complejo a 412 nm.

Figura 3. Ensayo colorimétrico desarrollado por Viarengo (1997) para la cuantificación colorimétrica de MTs.



La Figura 4 muestra las rectas de calibrado preparadas para calcular la concentración de MTs de bivalvos. Como patrón se puede utilizar bien MTs comerciales, glutatión reducido o incluso el aminoácido cisteína, pues todos ellos poseen grupos -SH que reaccionan con el DTNB. Nosotros usamos varias concentraciones de MT de hígado de conejo o bien de GSH; en este caso se asume que 1 mM de grupos -SH equivale a 0.055 mM de MT, es decir que una molécula de MT posee 18 grupos -SH con igual reactividad hacia el DTNB que el GSH.

Figura 4. Restas de calibrado para la cuantificación colorimétrica de MTs por el método de Viarengo (1997).

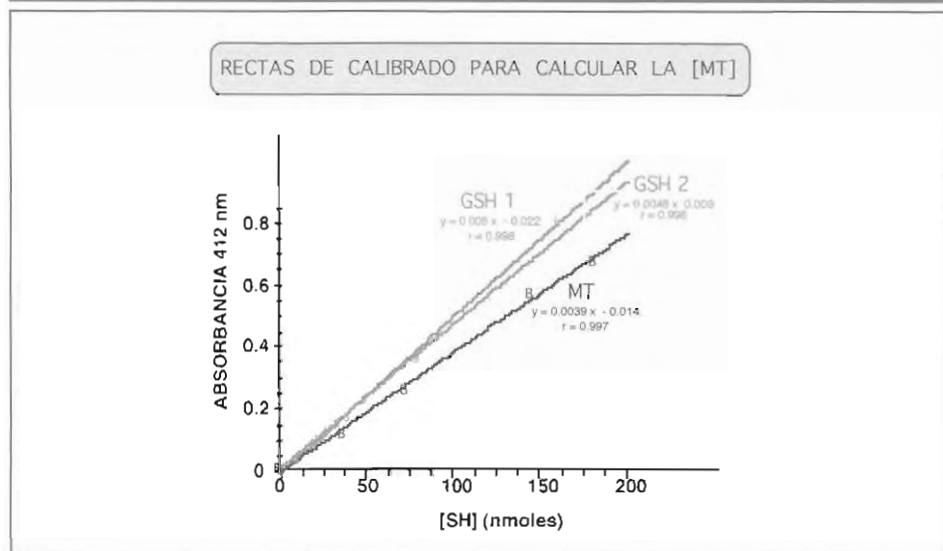


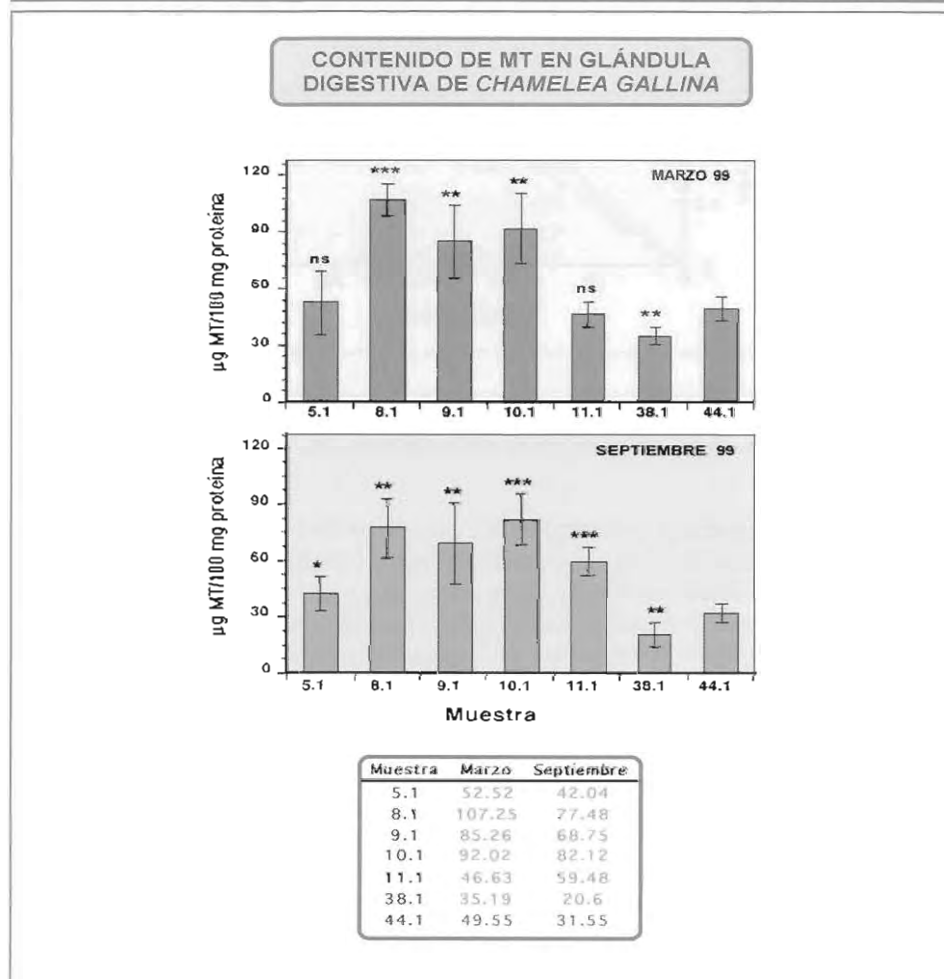
Figura 4. Restas de calibrado para la cuantificación colorimétrica de MTs por el método de Viarengo (1997). En azul se muestra la recta de calibrado a partir de metalotioneína de conejo; en verde y en rojo se muestran dos rectas de calibrado distintas preparadas ambas con glutatión reducido.

La Figura 5 muestra el contenido en MT que se ha determinado en chirlas de distintas zonas de producción de bivalvos del litoral andaluz recogidas en Marzo y Septiembre del año 1999. Los datos son medias de seis medidas, y se muestran en forma numérica en la Tabla adjunta. Tomando Palomares (44.1) como zona de referencia, en Marzo había un contenido de metalotioneína significativamente mayor en Punta Umbria (8.1), Mazagón (9.1) y Mata-lascañas (10.1). De igual forma, en Septiembre, aunque se detectó una disminución generalizada del nivel de MT en todas las zonas, éste resultó también significativamente superior en todas las zonas de Huelva, como El Terrón (5.1), Punta Umbria (8.1), Mazagón (9.1), Matalascañas (10.1) y Doñana (11.1), en comparación con la de referencia. Estos resultados concuerdan con los antes expuestos para los biomarcadores de estrés oxidativo y confirman que el litoral de Huelva presenta índices de contaminación relativa por metales superiores a Almería, por el aporte de los ríos Tinto y Odiel procedentes del Cinturón Píritico Ibérico y de las industrias del Polo Químico ubicadas en las márgenes de la Ría. Nuestros resultados también indican que puede usarse el litoral oriental como referencia. No obstante, conviene recordar que el litoral de Almería presenta algunos puntos con niveles apreciables de contaminación por metales, posiblemente derivadas de sus antiguas explotaciones mineras.

La variación estacional de los contenidos de metalotioneínas se muestra en la Figura 6 en chirlas muestreadas en Marzo, Junio y Septiembre de 1999 en distintas zonas del litoral andaluz, Punta Umbria (8.1), Matalascañas (9.1), Mazagón (10.1) y Doñana (11.1). Salvo en esta última zona, se detectaron variaciones parecidas a las observadas con los

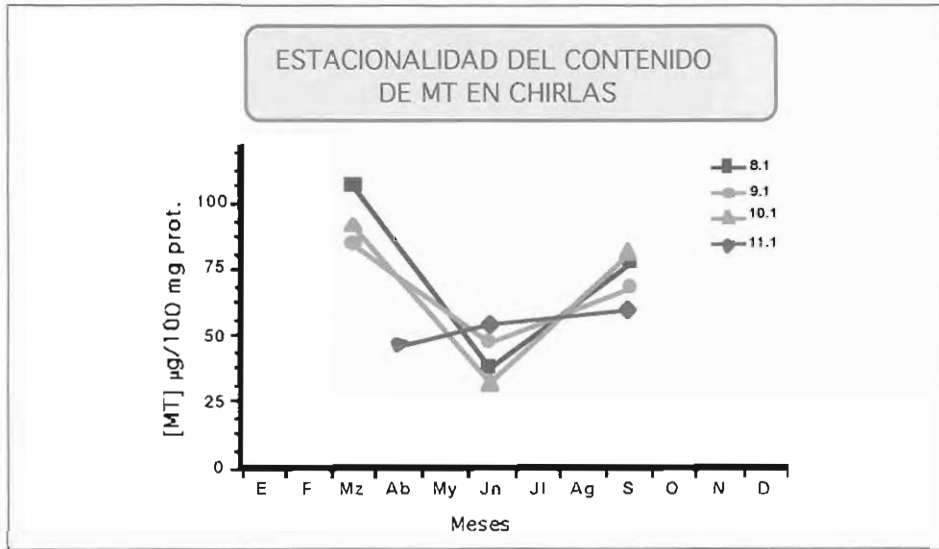
biomarcadores antioxidativos ya descritos, con niveles de metalotioneínas máximos en Marzo y Septiembre, y mínimos en Junio. Por el contrario, las chirlas muestreadas en Doñana mostraban una evolución distinta, con niveles progresivamente crecientes en el año 1999.

Figura 5. Niveles de metalotioneínas determinados por el método de Viarengo en chirlas (*Chamaelea gallina*) muestreadas en distintas zonas de producción del litoral andaluz en Febrero y Septiembre de 1999.



Conviene recordar, no obstante, que a diferencia de los resultados obtenidos en el proyecto con los restantes biomarcadores de contaminación ambiental ensayados en bivalvos, las metalotioneinas se analizaron en glándula digestiva de chirlas, donde sus contenidos son superiores a los que existen en cuerpos enteros, lo que podría explicar que las diferencias encontradas fuesen algo superiores. Sin embargo, la gran cantidad de trabajo necesario para extraer las glándulas digestivas de cada muestra recibida podría desaconsejar este esfuerzo a menos que los resultados obtenidos fuesen drásticamente distintos a los obtenidos en cuerpos enteros, lo que no está claro en la mayoría de los biomarcadores analizados.

Figura 6. Evolución estacional del contenido de metalotioneinas en glándula digestiva de chirlas (*Chamaelea gallina*) muestradas en distintas zonas de producción del litoral andaluz en 1999.



De los resultados obtenidos al usar el ensayo colorimétrico de las MTs de chirlas como biomarcador de contaminación ambiental en el litoral andaluz, podemos obtener las siguientes conclusiones provisionales que se recogen en la Figura 7:

- El ensayo colorimétrico de Viarengo sirve para cuantificar la concentración de metalotioneinas presente en chirlas.
- Las chirlas del litoral onubense presentan mayores niveles de metalotioneinas que las del litoral almeriense, de acuerdo con el contenido en metales de ambas zonas.
- El contenido de metalotioneinas en chirlas presenta una variabilidad estacional, con mayores niveles en Marzo y Septiembre, pero disminuyendo en Junio.

Figura 7.

1. El método de Viarengo sirve para medir la cantidad de metalotioneínas de chirlas.
2. Las chirlas del litoral onubense tienen más MTs que las del litoral almeriense, de acuerdo con el contenido en metales de ambas zonas.
3. El contenido de metalotioneínas presenta una variabilidad estacional con mayores niveles en Marzo y Septiembre, disminuyendo en Junio.

EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES MODELO EN CONDICIONES CONTROLADAS DE UN CULTIVO DE CHIRLAS (*Chamelea gallina*).

Oscar Amézcuca Rodríguez¹, José Luis Muñoz Pérez¹,
José Luis Marengo Sierra¹, José Naranjo Márquez¹,
José Luis Gómez Ariza² y Juan López-Barea³

1. CICEM "El Toruño", Aptdo. 16. 11500, Puerto de Sta. María. CÁDIZ

2. Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Universidad de Huelva

3. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba

El siguiente informe resume el trabajo llevado a cabo para poner a punto y realizar una experiencia de exposición de moluscos bivalvos a contaminantes modelo en condiciones controladas, enmarcada dentro del Proyecto FEDER y el Convenio de colaboración entre la Consejería de Agricultura y Pesca y las Universidades de Córdoba y Huelva para la realización de "Estudios acerca de los efectos de contaminantes sobre los recursos pesqueros del litoral de Andalucía". Dicha experiencia ha sido realizada en el CICEM "El Toruño", ubicado en el Puerto de Santa María, Cádiz.

Como muestra esquemáticamente la Tabla 1, la experiencia ha consistido en exponer un cultivo de chirlas (*Chamaelea gallina*) en condiciones controladas a dos contaminantes modelo, el ión Cu (II), como representante de metales pesados presentes en el litoral onubense, y el Aroclor 1254, mezcla comercial de bifenilos policlorados como representante más característico de los distintos contaminantes orgánicos presentes en la zona citada. El experimento de exposición controlada de este bivalvo se planteaba alcanzar los siguientes objetivos de gran interés no sólo para obtener datos básicos del comportamiento de este bivalvo sino para asegurar a las Administraciones Públicas la correcta gestión de situaciones de contaminación aguda o crónica de ecosistemas reales:

- 1) Establecer el estado estacionario de cada contaminante, sus factores de bioconcentración y el tiempo necesario para su depuración.
- 2) Estudiar la relación dosis-respuesta para cada biomarcador, a fin de seleccionar aquellos que resulten mas sensibles a los contaminantes.
- 3) Determinar la capacidad de acumulación de los animales empleados como modelo experimental y de reflejar cambios de contaminación.

Tabla 1: Factores preliminares que caracterizan el ensayo.

FACTORES DEL ENSAYO			
Bioindicador:	<i>Chamaelea gallina</i>		
Contaminantes:			
	CuCl ₂	40 ppb	
	Aroclor 1254	10 ppb	
	TBT		
	As ₂ O ₅		
Muestreos:	Número de individuos		
	U. Córdoba	U. Huelva	Cádiz
Canaleta 1	15	0	45
Canaleta 2	15	45	0
Canaleta 3	10	25	25
Canaleta 4A	15	0	45
Canaleta 4B	15	45	0
Frecuencia:			
	1.	Inicio	
	2.	2 semanas	
	3.	4 semanas	
	4.	8 semanas	
	Descontaminación		
	5.	1 día	
	6.	2 días	
	7.	4 días	
	8.	2 semanas	
	9.	8 semanas	

Para realizar esta experiencia se utilizó un sistema para el cultivo de chirlas que consiste en cuatro canaletas construidas en fibra de vidrio reforzado, de sección trapezoidal y 6 m de longitud, como la que se muestra en la Figura 1. Estas canaletas tienen en el fondo una capa de grava gruesa, luego una capa superior de unos 10-12 cm de arena, cubierta finalmente por una lamina de agua de unos 15 cm, de manera que cada una tiene una superficie de arena para cultivo de aproximadamente $0,7 \times 6 = 4,2 \text{ m}^2$. En cada canaleta se han instalado los siguientes elementos de impulsión y control para facilitar el adecuado desarrollo de la experiencia:

1. Sistema de recirculación de agua por bomba sumergible (VSX-I 60), situado al final de la canaleta, que proporciona un caudal de unos 2000-3000 l/h.
2. Sistema de renovación de agua, constituido por un depósito en cabeza de 700 litros que recibe agua salina procedente de pozo disponible ya en el CICEM "El Toruño".
3. Sistema de dosificación semiautomático de alimentación de los bivalvos, basado en microalgas (*Chaetoceros gracilis*/T-Iso) en suspensión, movida por bomba de impulsos, que vierten directamente a cada canaleta, de modo que el alimento no se mezcla previamente con el contaminante con lo que se simplifica la experiencia.

4. Sistema de dosificación de contaminante acoplado al de renovación de agua. A tal efecto, una bomba de impulsos vierte la solución madre de contaminante, con una concentración nominal adecuada, al depósito de cabeza, asegurando la distribución homogénea del contaminante.
5. Sistema de evacuación y almacenaje de los residuos tóxicos.

Figura 1.

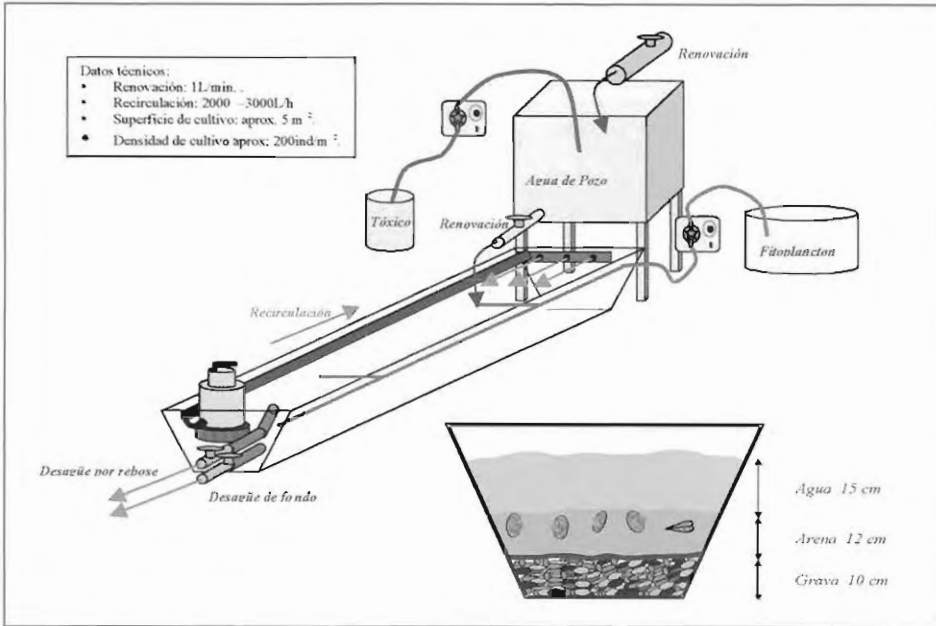


Figura 1: Izquierda: Esquema del sistema de cultivo para una canaleta. En el caso del blanco es exactamente igual sin el sistema de dosificación de contaminante. La cuarta canaleta lleva una separación longitudinal a lo largo de la canaleta. Derecha: Vista de un corte transversal de una canaleta.

En cada canaleta se sembraron unas 1000 chirlas de tamaño comercial a una densidad de 200 individuos/m², establecida en diversos experimentos previos con densidades crecientes de animales. Tras una primera fase de aclimatación al nuevo hábitat durante varias semanas se comenzó la exposición a los dos contaminantes modelo. En una canaleta, denominada en lo sucesivo C-I, se expusieron los individuos a 10 ppb de Aroclor1254, mezcla de bifenilos policlorados. En otra canaleta, que se llamará C-II, las chirlas se expusieron a 40 ppb de cobre en forma de Cl₂Cu. Una tercera canaleta, denominada C-III, sirvió como control de animales no expuestos, y la última canaleta, designada C-IV, sirvió para la segunda fase de la experiencia en la que se quiso estudiar las variaciones que podrían tener lugar al transplantar los individuos expuestos o control a un sistema no contaminado. En efecto, transcurridos dos meses de experiencia se deja de añadir contaminante para continuar con el cultivo en un medio limpio y estudiar los procesos de descontaminación tanto en el sustrato que recibió un contaminante (C-I y

C-II), como en otro totalmente limpio y no expuesto antes (C-IV). Esta canaleta se dividió longitudinalmente en dos para diferenciar los individuos procedentes de la primera y segunda canaleta.

A lo largo del experimento se han realizado numerosos muestreos periódicos de agua, de chirlas y de sedimentos, en las fechas y con los análisis que se recogen en la Tabla 2. Durante la fase de contaminación los animales se muestrearon cada dos semanas, analizándose los contenidos de los contaminantes en los tejidos animales y el agua, y en algunos casos también en el sedimento. Durante la fase de descontaminación los animales se muestrearon a los dos días, dos semanas, dos meses y al final del experimento.

Tabla 2: Muestreos realizados durante la experiencia.

Fase	Muestreo nº	Fecha	Tiempo de exposición/ descontaminación	Tipo de muestra
A	00	17/05/00	0 días	Ch, Ag, Sd.
	01	31/05/00	2 semanas	Ch, Ag.
	02	14/06/00	1 mes	Ch, Ag.
	03	12/07/00	2 meses	Ch, Ag.
Comienza la fase de descontaminación				
B	04	14/07/00	2 días	Ch, Ag, Sd.
	05	26/07/00	2 semanas	Ch, Ag.
	06	13/09/00	2 meses	Ch, Ag.
	07	20/09/00	2 meses y una semana	Ch, Ag, Sd.

Tabla 2: Muestreos realizados durante la experiencia. Los tipos de muestras que están indicados en la última columna son los siguientes: Ag: Agua; Ch: Chirlas; Sd: Sedimento.

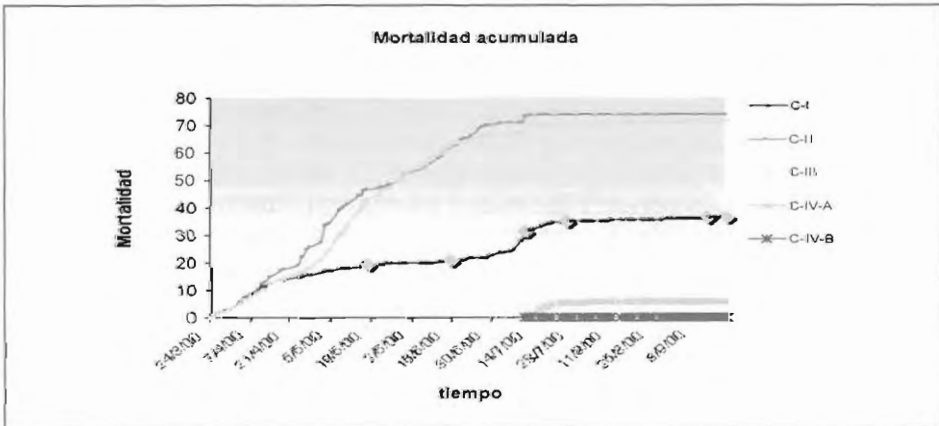
En cada muestreo de cada canaleta se tomaron 60 chirlas a las que se les hizo un estudio biométrico antes de ser congeladas a -80°C para su posterior envío a los laboratorios de las Universidades de Córdoba y Huelva. De la misma forma se realizó una toma de agua previa al muestreo de chirlas para analizar la concentración real de contaminante al que estaban siendo sometidas, así como de sedimentos. A cada uno de los individuos muestreados se le tomaron las siguientes variables biométricas: peso total, longitud, peso escurrido, peso húmedo de la carne, peso seco de la carne. Con ello se pretendía ver posibles evoluciones en algunos índices de condición a lo largo del tiempo de exposición a contaminante, así como en el periodo de depuración y descontaminación. Además del estudio biométrico, se realizaron extracciones de tejido en Soxhlet para realizar análisis cromatográficos de la cantidad de Aroclor acumuladas en el tejido de los individuos, que se recogen en el Capítulo 10 de la presente publicación. También se ha estado llevando un seguimiento sobre la mortalidad del cultivo para obtener información sobre su estado fisiológico.

Como paso previo al experimento se hicieron diversos ensayos para tener información más adecuada de los parámetros de funcionamiento que convenía usar para este experimento. En concreto se hicieron los estudios previos siguientes:

1. Determinación de la dosis de los distintos contaminantes: Aroclor1254, cobre, arsénico y tributilestaño. Estas pruebas se realizaron en pequeñas bandejas en sistemas de circuito cerrado con un sistema de renovación discontinuo.
2. Distintas pruebas de densidad de cultivo, hasta encontrar la densidad de cultivo adecuada para el experimento, 200 individuos/m², que aseguraba inicialmente un número de individuos suficientes para todos los muestreos que se pretendía realizar en el transcurso del mismo con vistas a los análisis químicos y bioquímicos que había que realizar en ellos.
3. Optimización del funcionamiento del filtro biológico, para asegurar la adecuada eliminación del amonio y nitritos presentes en el agua de pozo que alimentaba el sistema.
4. Verificación de la capacidad de un filtro comercial para eliminar residuos tóxicos (Cu), con vistas a la posible evacuación directa de agua con trazas de este metal.

Durante el tiempo del experimento se siguió la mortalidad del cultivo para comprobar su viabilidad y posible bienestar o estrés fisiológico durante la experiencia. La Figura 2 muestra la evolución de la mortalidad, tomando como referencia la acumulada en cada canaleta. Se aprecia claramente que la mortalidad fue muy diferente en cada canaleta, pues mientras chirilas expuestas a Aroclor 1254 tuvieron una mortalidad acumulada del 36,5%, las expuestas a cobre y las mantenidas como control no expuesto siguieron muriendo a lo largo del experimento, estabilizándose sólo al comienzo de la segunda fase.

Figura 2: Mortalidad acumulada en las 4 canaletas.



En C-I están marcados los días en que realizó el muestreo.

La Tabla 3 muestra los valores de mortalidad al final de la experiencia que, en general, fueron muy elevados. Sólo en la canaleta IV (control de la segunda fase del experimento) se dieron valores bajos de mortalidad. En C-I también hubo una mortandad algo

elevada, pero claramente menor que en la canaleta donde se contaminó con cobre y en la usada como control sin contaminar. El hecho de que en la tercera canaleta se dieran una mortandad tan alta, mayor que en un cultivo contaminado, indica que la mortalidad no estaba causada por la contaminación, sino tal vez por la adaptación del cultivo.

Tabla 3: Valor de la mortalidad al final de la experiencia en cada una de las canaletas.

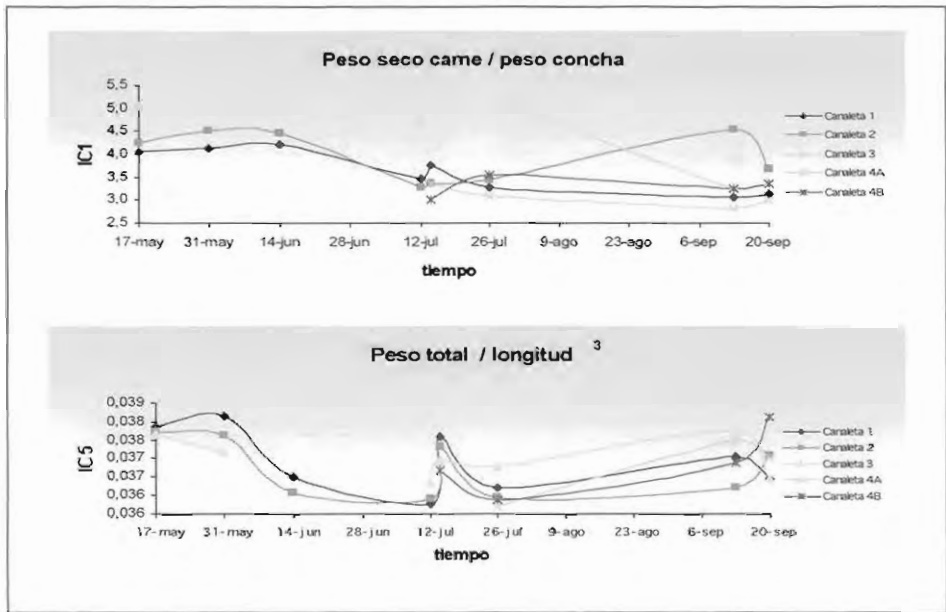
	C-I	C-II	C-III	C-IV A	C-IV B
Mortalidad final	36.5	73.7	71.2	5.8	0

Aunque se desconoce la procedencia del lote de *C. gallina* usado en el experimento, sabemos que ha tenido que pasar por su captura y viaje en el barco de pesca, un transporte de duración incierta y un largo periodo en seco, que han podido influir en su escasa viabilidad. Por ello, el seguimiento de los distintos índices de condición utilizados no ha producido un resultado fiable o que permita deducir la exposición a contaminantes de forma clara. Se han utilizado los siguientes índices de condición:

- 1.- I.C. 1: peso seco de la carne/ peso de la concha
- 2.- I.C. 2: peso seco de la carne/ peso total del animal – peso de la concha
- 3.- I.C. 3: peso fresco de la carne/ peso de la concha
- 4.- I.C. 4: peso fresco de la carne/ peso total del animal – peso de la concha
- 5.- I.C. 5: peso total/ longitud³
- 6.- Porcentaje en grasas
- 7.- Relación peso seco/ peso húmedo
- 8.- Relación talla/peso.

Las Figuras 3 y 4 muestran la evolución de estos parámetros. De todos los índices de condición antes descritos, se han tomado como representativos el IC 1 e IC 5, que se muestran en la Figura 3, pues los demás presentaban una evolución muy similar a ellos. Ningún I.C. muestra una evolución en la que se pueda deducir con claridad la presencia de contaminante en un cultivo, frente a otro cultivo sin contaminar, aunque podemos apreciar algunos patrones de carácter general. En ambos índices de condición se observan valores superiores en chirlas control, mientras que en animales expuestos descienden de forma apreciable. Al eliminar los contaminantes se produjo un profundo cambio en todos los grupos experimentales, aunque solo fue sólo transitorio para descender mucho a los tiempos más largos de depuración.

Figura 3: Evolución de dos de los índices de condición más representativos de la experiencia.



En azul se representan los valores de C-I (Aroclor1254), en morado los de C-II (CuCl2), en amarillo los de C-III (individuos no expuestos). El 12 de Julio la mitad de las chirlas expuestas a Aroclor se transfirieron a C-IVA, (en celeste) y el resto se mantuvo en C-I. A la misma vez, la mitad de las chirlas de C-II se transfirieron a C-IVB, (en grana), y el resto se quedo en C-II.

La Figura 4 muestra el comportamiento de los índices de condición 2,3 y 4 durante todo el experimento y de otros tres índices, porcentaje de grasas, relación talla/peso y relación peso seco/peso húmedo. Se aprecia claramente que estos seis índice de condición analizados tienen una representación muy similar a la del I.C. 1. Tanto el porcentaje de grasas como la relación peso seco/peso húmedo se han estudiado en los individuos a los que se les realizó análisis del contenido de Aroclor 1.254 en tejido; a pesar de la poca viabilidad del cultivo en las canaletas C-II y C-III, estos dos parámetros parecen responder a un patrón de contaminación/blanco, mientras que la relación talla/peso estudiada para todos los grupos experimentales parece mostrar de manera más clara una relación con la viabilidad de cada cultivo. En general se confirma que en la segunda fase los animales control mostraban valores superiores a los expuestos. También se aprecia un drástico cambio en todos los índices analizados en los primeros días tras la eliminación de los contaminantes, como se confirma en otros análisis efectuados y que se presentarán en el Capítulo 11 de la presente publicación.

Figura 4.

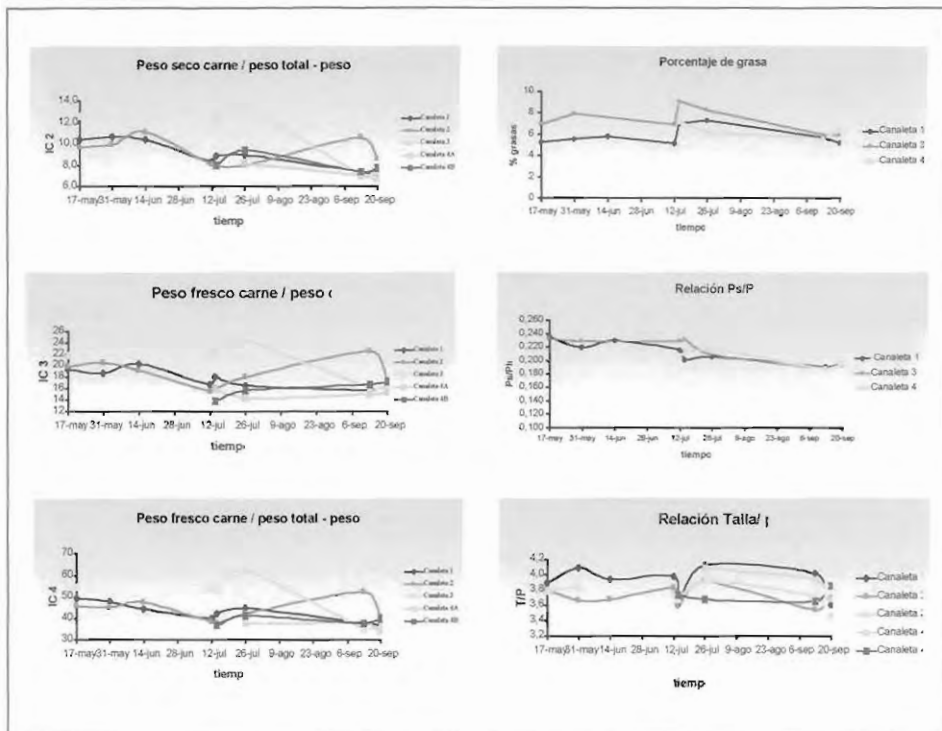


Figura 4: Izquierda: Evolución de los índices de condición I.C.-2, I.C.-3 e I.C.-4. En azul se representan los valores de C-I (Aroclor1254), en morado los de C-II (CuCl₂), en amarillo los de C-III (ind. no expuestos). El 12 de Julio la mitad de las chirlas expuestas a Aroclor se transfirieron a C-IVa, (celestes) y el resto se mantuvo en C-I. A la misma vez, la mitad de las chirlas de C-II se transfirieron a C-IVb, (grana), y el resto se quedo en C-II. Derecha: Evolución del porcentaje de grasas y de la relación peso seco/peso húmedo en individuos de C-I, C-III y C-IV. En la parte inferior está representado la evolución de la relación talla-peso durante la experiencia.

CINÉTICAS DE ACUMULACIÓN Y DESACUMULACIÓN EN CHIRLAS EXPUESTAS A AROCLOR 1254 Y Cu (II)

José Luis Marengo Sierra¹, Oscar Amézcuca Rodríguez¹,
José Luis Muñoz Pérez¹, José Naranjo Márquez¹,
José Luis Gómez Ariza² y Juan López-Barea³

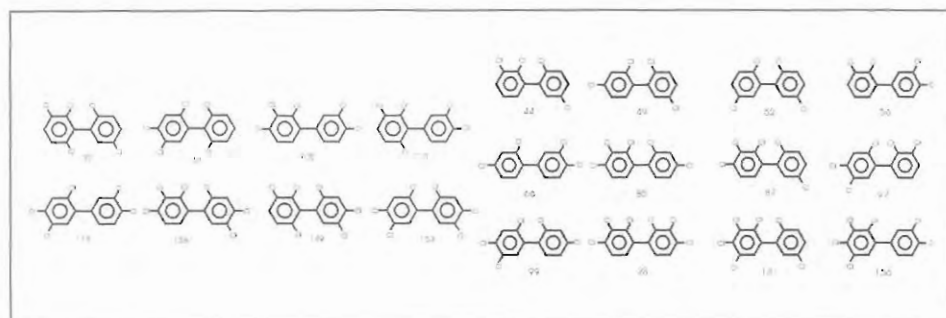
1. CICEM "El Toruño". Apdo. 16. 11500 El Puerto de Santa María, Cádiz

2. Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Universidad de Huelva

3. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba

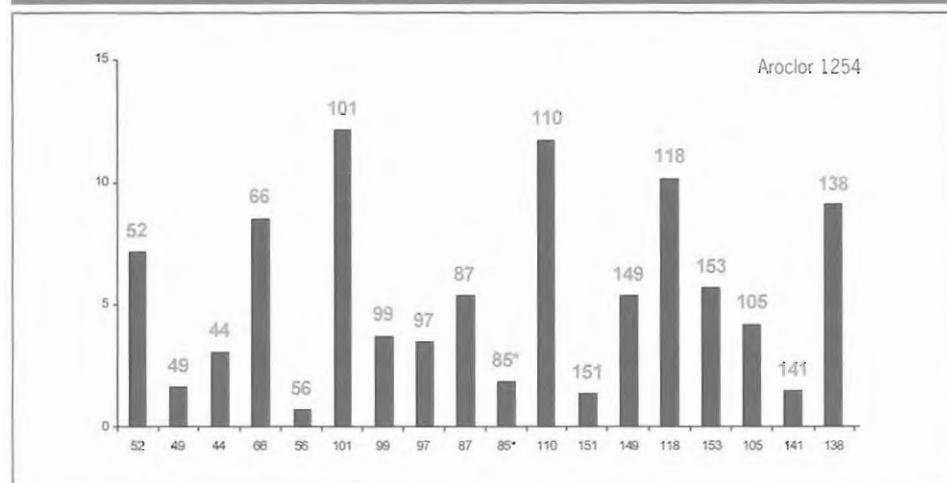
Aroclor 1254 es el nombre de una mezcla comercial de bifenilos policlorados (PCB's) muy usada en diferentes aplicaciones industriales, principalmente debido a su capacidad como dieléctrico en transformadores, condensadores e interruptores. La mezcla citada contiene un 54% de Cl, de ahí las dos últimas cifras del nombre, aunque hay otras denominaciones y marcas comerciales. El Aroclor 1254 está formado por un conjunto de 77 clorobifenilos (CB's) diferentes o congéneres en distinta proporción, correspondiendo el 48% de los mismos a los derivados penta-Cl, el 23% a los hexa-Cl y el 21% a los tetra-Cl. El Esquema 1 adjunto muestra la estructura del anillo bifenilo, numera sus diferentes átomos de carbono, e indica las distintas posiciones en que pueden situarse los átomos de Cl sustituyentes. En teoría, al sustituir los átomos de H en diferentes posiciones del bifenilo de partida podrían formarse 209 combinaciones diferentes, dando lugar a los derivados mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hasta el deca-sustituído, que es el de mayor tamaño que se obtendría por sustitución del anillo básico.

En este trabajo hemos analizado 20 de los 77 CB's presentes en el Aroclor, correspondientes a los mayoritarios, 52, 49, 44, 66, 56, 101, 99, 97, 87, 85*, 110, 151, 149, 118, 153, 105, 141, 138, 128 y 156, numerados por su orden de elución en cromatografía gaseosa, técnica usada de forma rutinaria para su análisis (el CB 85* coeluye con pp' DDE). Las estructuras químicas de estos 20 compuestos analizados en el presente trabajo se muestran en el Esquema 2, que se muestra inmediatamente a continuación:



La Figura 1 muestra la composición porcentual de los distintos CB's mencionados en la mezcla comercial de Aroclor 1254 usada en el experimento. Es evidente que algunos congéneres son muy abundantes y otros son minoritarios. Por ello, y debido a su mayor abundancia relativa, se ha estudiado los procesos de acumulación y eliminación en chirlas de los PCBs mas abundantes en la mezcla comercial, en concreto un compuesto tetracloro, el CB 66, cuatro pentacloros, los CB's 101, 105, 110, y 127, y otros cuatro congéneres con seis átomos de Cl, los CB's 128, 138, 149 y 153.

Figura 1. Concentración relativa de los veinte congéneres de CB mas abundantes presentes en la mezcla comercial Aroclor 1254.



La Figura 2 muestra la evolución de las concentraciones de los 20 CB's analizados en las muestras tomadas durante los dos meses que duró la fase inicial de acumulación. En chirlas se alcanzaron concentraciones totales de CB's de 1785, 4810 y 6180 ppb a las 2, 4 y 8 semanas de exposición, respectivamente. Los contenidos de cada uno de los congéneres analizados aumentaron progresivamente durante la fase de exposición, aunque en distintas proporciones en cada uno de ellos. Las mayores concentraciones se alcanzaron para los congéneres 110, 118, 138, 101, 153, 105, 95, 149, 87, 99,

97, 128, 156 y por orden decreciente de concentración. Conviene señalar que el tercer muestreo realizado durante la fase de exposición dió resultados un tanto anómalos en todos los congéneres analizados.

Figura 2. Evolución de las concentraciones de los 20 CB's bas abundantes del Aroclor 1254 durante la fase de acumulación en chirlas.

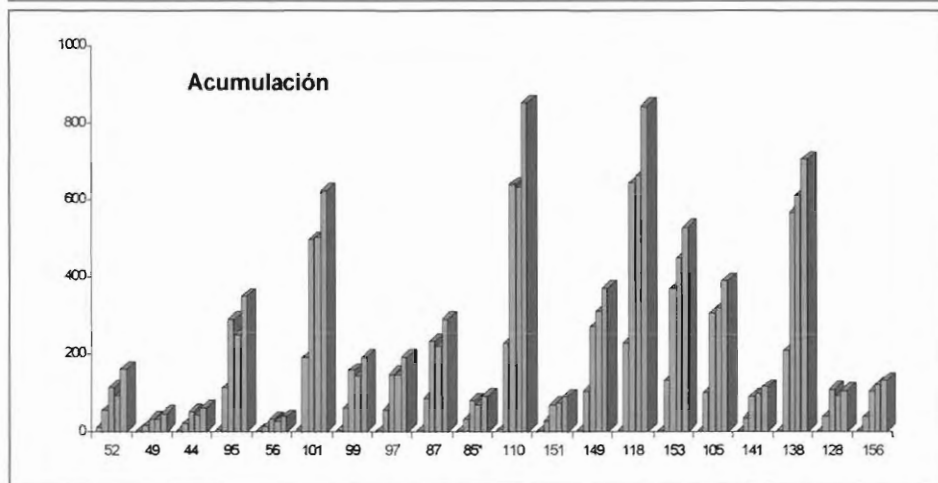


Figura 2. Evolución de las concentraciones de los 20 CB's bas abundantes del Aroclor 1254 durante la fase de acumulación en chirlas. Los muestreos se realizaron al comienzo y a las 2, 4 y 8 semanas. Los resultados se expresan en ppbs en peso húmedo.

La Figura 3A muestra la evolución de los 20 CB's analizados en el experimento durante la acumulación. La concentración de cada uno de los CB's aumentó progresivamente, aunque las diferencias entre 4 y 8 semanas fueron menores, sugiriendo que las chirlas mostraban una tendencia a la saturación al no poder acumular mas PCBs. Las mayores concentraciones se alcanzaron en los congéneres 110, 118, 153, 105, 138, 128, 156 y 95, siendo menores en los restantes. La Figura 3B muestra la cinética de acumulación de los CB's mas abundantes.

Figura 3.A.

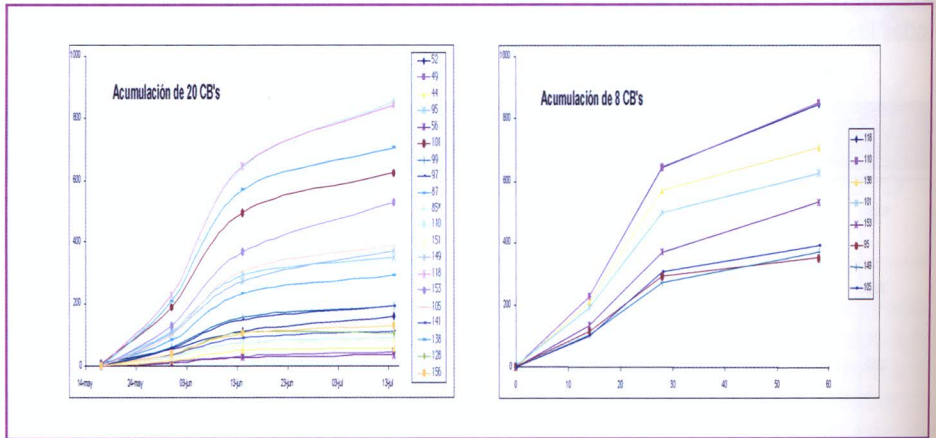


Figura 3. A: Cinética de acumulación de los CB's mas abundantes del Aroclor 1254. B: Acumulación de los 8 CB's mas abundantes. Muestreos al inicio (tiempo 0) y a las 2, 4 y 8 semanas.

La fase de desacumulación del experimento con las chirlas se hizo en dos canales: la misma que había estado expuesta al contaminante, en la que se mantuvo el sustrato que había entrado en contacto con el Aroclor 1254 (C I), y otra con sustrato limpio, no expuesto antes al contaminante (C IV). Como es lógico, el proceso de desacumulación fue muy distinto en ambas condiciones. A los 12, 60 y 67 días de descontaminación, las concentraciones totales de CB's fueron 3000, 260 y 250 ppb en la canaleta I, frente a sólo 1600, 43 y 30 ppb, en la canaleta IV, confirmando la importancia del sustrato limpio en la eliminación del Aroclor. Además, la desacumulación fue mucho más rápida y completa en la canaleta IV. Las Figuras 4A y 4B muestran la evolución de los veinte congéneres analizados durante esta fase: se aprecia claramente que la desacumulación fue más acentuada en las chirlas transplantadas a sustrato limpio.

Figura 3.A.

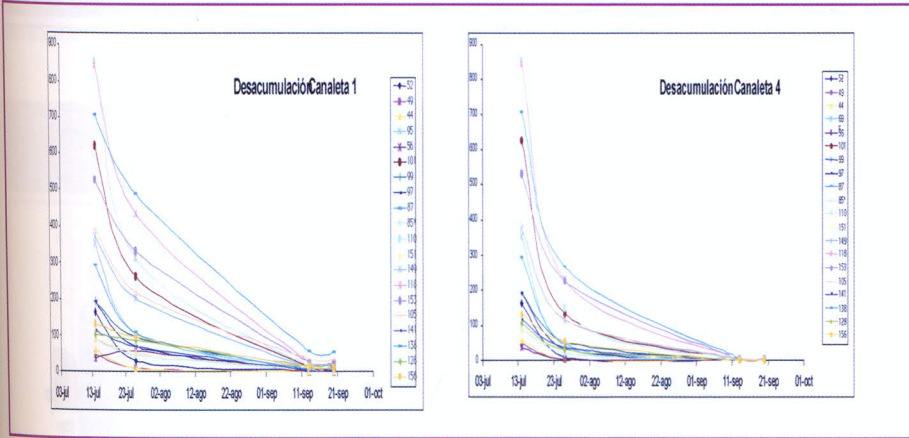


Figura 4. Evolución de las concentraciones de los 20 CB's más abundantes del Aroclor 1254 en las canaletas I (sustrato ya contaminado) y IV (sustrato limpio). Los muestreos se realizaron los 12, 60 y 67 días de descontaminación.

El comportamiento diferencial de los sustratos de ambas canaletas en la descontaminación se comprobó midiendo los contenidos de los distintos CB's en lixivados del sustrato preparados con agua de mar, para reproducir en lo posible el proceso que tendría lugar tras un episodio agudo de contaminación. Se obtuvieron concentraciones totales de 0.8 y 0.16 ppb (inicio y término en la canaleta C I) y 0.06 ppb en la canaleta C 4). La Figura 5 compara los las concentraciones de los CB's lixiviados de la canaleta C I al inicio y al final del proceso de descontaminación. Los 20 CB's analizados bajaron, aunque en diferentes proporciones: los mayoritarios (95, 101, 110, 118, 153, 105, 138) se liberaban del sustrato de manera clara, mientras los minoritarios (52, 49, 44, 56, etc.) apenas disminuyeron. La Figura 6 compara los congéneres lixiviados al final de la descontaminación en las canaletas I y IV: el sustrato de la canaleta IV tenía al final del experimento concentraciones muy inferiores de los distintos CB's que el de la canaleta.

Figura 5. Comparación de los distintos CB's lixiviados con agua de mar de la arena de la canaleta I al inicio (histogramas rojos) y al final (histogramas verdes) de la fase de descontaminación.

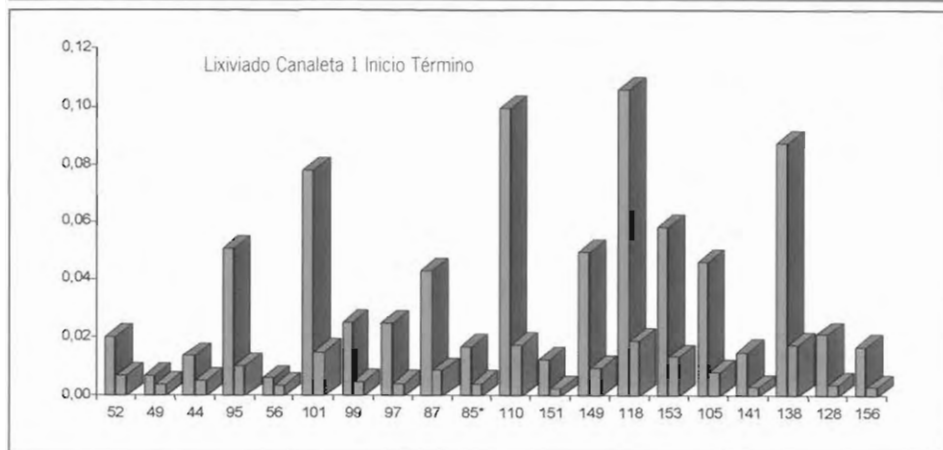
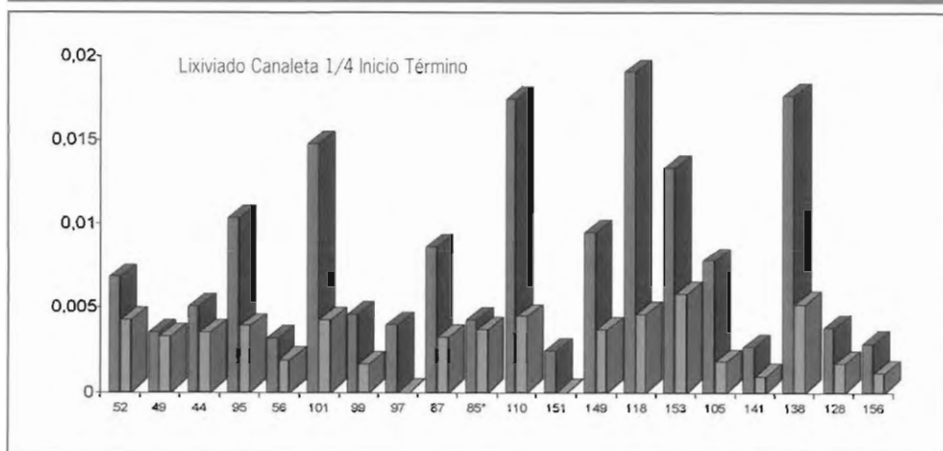


Figura 6. Comparación de los CB's lixiviados con agua de mar de las canaletas I (histogramas verde oscuro) y IV (histogramas verde brillante) al final de la fase de descontaminación.



Como se muestra claramente en la Figura 7, al final de la exposición la proporción de cada CB en las chirlas fue muy parecida a su proporción en la mezcla inicial de Aroclor 1254, pues los más abundantes en la mezcla comercial se acumularon preferentemente en los animales expuestos al contaminante. Sin embargo, la proporción no fue idéntica, pues los congéneres 110, 118, 153, 105 y 138 se acumulaban en los tejidos analizados en mayor proporción de la que estaban en la mezcla inicial, mientras que los compuestos 52, 49, 44, 56 y 101 eran menos abundantes que en el Aroclor 1254 usado como contaminante inicial. Los congéneres más acumulados por las chirlas te-

nían más átomos de Cl, lo que podría hacerlos más hidrofóbicos y explicar su acumulación en los tejidos adiposos. Esta hipótesis se confirma al comprobar que los congéneres menos acumulados por chirlas contienen menos átomos de Cl en sus moléculas.

Figura 7. Porcentajes de cada CB acumulados en chirlas a las 8 semanas de exposición a Aroclor 1254 (histogramas rojos) comparados con su proporción en la mezcla comercial original (histogramas azules).

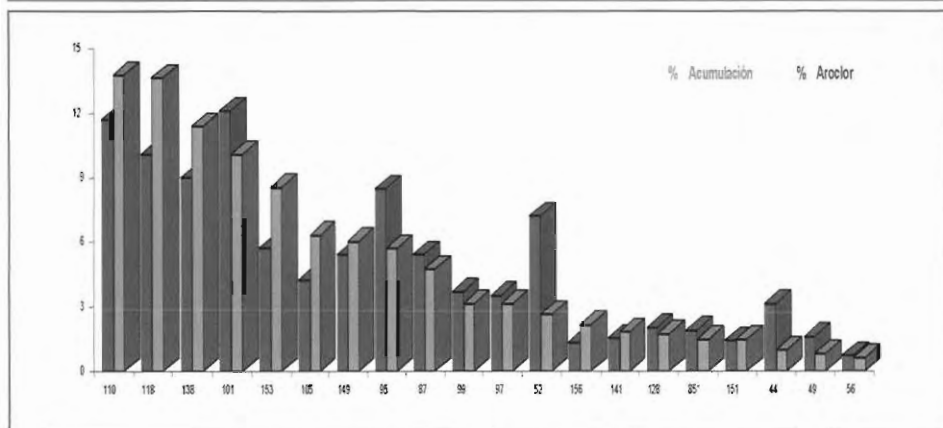


Figura 8. Comparación de los porcentajes de los veinte CB's analizados al final de la fase de desacumulación (histogramas rojos) con los contenidos de dichos congéneres en la mezcla inicial de Aroclor 1254 (histogramas azules).

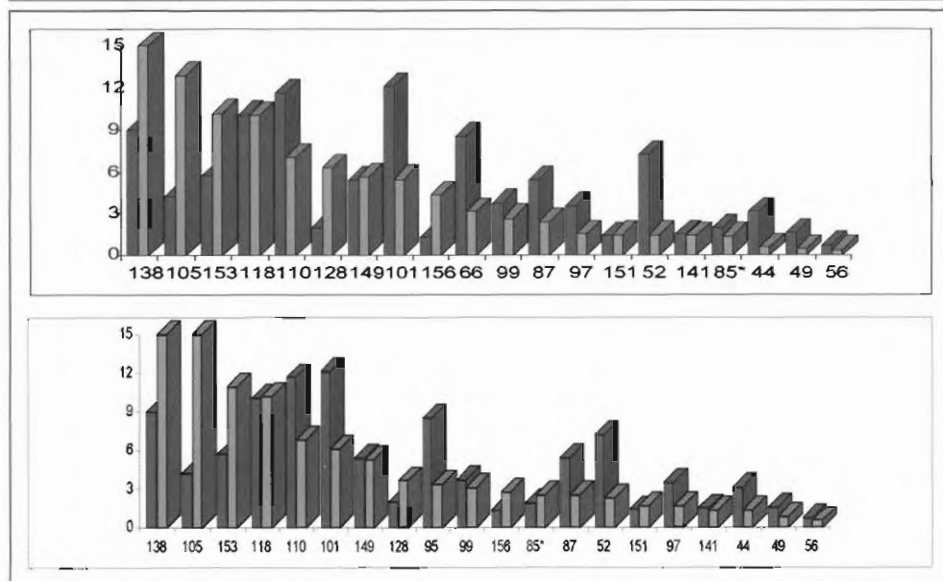


Figura 9. Evolución de las proporciones de los congéneres del Aroclor 1254 analizados durante las fases de acumulación y desacumulación.

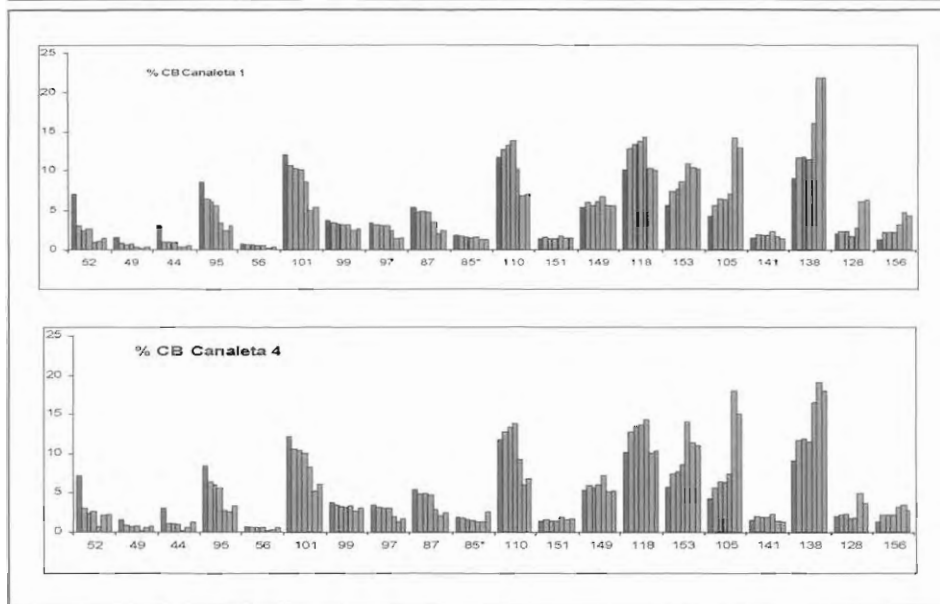


Figura 9. Fases de acumulación (histogramas en rojo) y desacumulación (histogramas en verde). Con histogramas en azul se muestra a efectos comparativos la proporción de cada CB en el Aroclor 1254 inicial.

En la fase de descontaminación se comparó los porcentajes de los distintos congéneres con la proporción en que estaban en el Aroclor 1254 inicial (Figura 8). En ambas canaletas, los porcentajes de los CB's 138, 105, 153, 128 y 156 que quedaban en las chirlas eran superiores a los existentes en el Aroclor usado como contaminante inicial, sugiriendo que estos congéneres se liberaban con dificultad de los animales. Por el contrario, los CB's 110, 101, 66, 99, 87, 97 y 52 eran menos abundantes en los animales expuestos y descontaminados que en el Aroclor 1254, es decir, se liberaban de los animales mejor que los anteriores.

Para finalizar, las Figuras 9 A y B comparan mediante histogramas la proporción de cada uno de los veinte CB's analizados durante el experimento con las chirlas, comparando para cada canaleta la proporción presente en el Aroclor 1254 inicial, con la evolución de su porcentaje durante la fase de acumulación, y durante la fase de desacumulación. Se comprueba de nuevo lo expuesto anteriormente, la diferente acumulación y eliminación de los distintos congéneres del Aroclor. Por el momento desconocemos las bases fisicoquímicas, bioquímicas o fisiológicas de este comportamiento tan diferente.

Los resultados presentados indican que, al menos en lo que respecta al Aroclor 1254, las chirlas acumularon los bifenilos policlorados de forma similar a la esperada, liberándolos en la fase de desacumulación. Las diferencias en la acumulación y desacumulación relativa de los distintos congéneres merece un análisis más detallado para tratar de comprender si se deben a diferencias fisicoquímicas entre los congéneres o hay un cierto componente biológico en esta aparente selección.

RESPUESTA DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE CONTAMINACIÓN EN EXPERIMENTOS A CORTO Y LARGO PLAZO: EXPOSICIÓN DE CHIRLAS A LOS CONTAMINANTES MODELO AROCLOR 1254 Y CU (II)

**Antonio Rodríguez-Ariza¹, Manuel J. Rodríguez-Ortega¹,
Oscar Amezcua Rodríguez², José Luis Marengo Sierra²,
José Naranjo Márquez² y Juan López-Barea¹**

1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, km. 396-a. 14071 CÓRDOBA,
2. CICEM "El Toruño", Aptdo. 16, 11500 El Puerto de Santa María, Cádiz

El presente capítulo resume la respuesta de varios biomarcadores moleculares, que suelen responder a la contaminación ambiental, entre los que se incluyen las actividades de diversas enzimas antioxidativas y destoxicadoras y el contenido y estado redox del glutatión intracelular, en un experimento realizado con chirlas durante su exposición crónica a Aroclor 1254 ó a Cu (II) y su posterior depuración en las condiciones descritas en los dos capítulos anteriores en ausencia de contaminantes. En las gráficas que se muestran en el resto del presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en una primera fase de exposición durante dos meses (control y contaminado) y una segunda fase de tres meses en la que los animales se mantuvieron en la misma canaleta donde se habían expuesto (descontaminación) o se llevaron a otra con arena totalmente limpia (depuración), de acuerdo con lo descrito anteriormente.

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos en chirlas expuestas a Aroclor 1254, con tres enzimas antioxidativas auxiliares (glucosa-6-P deshidrogenasa, 6-P-gluconato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa), que regeneran los piridín nucleótidos reducidos, y otras tres antioxidativas primarias (catalasa, glutatión peroxidasa, y superóxido dismutasa) que destoxifican especies reactivas de oxígeno. En general, las actividades de estas seis enzimas fueron muy parecidas en los animales utilizados controles y en los expuestos a la mezcla de PCBs, como ocurrió en las actividades IDH y GSHPx. No obstante, las chirlas expuestas al contaminante tenían mayores actividades G6PDH, 6PGDH y catalasa que los controles durante los dos meses de exposición. En cambio, la actividad SOD fue muy baja tanto en las chirlas control como en las expuestas durante los primeros dos meses de exposición a Aroclor 1254, pero aumentó de forma muy significativa durante los tres meses siguientes tras eliminar el contaminante.

Figura 1. Actividades G6PDH, 6PGDH, IDH, Catalasa, GSHPx y SOD en chirlas expuestas a 10 ppb de Aroclor 1254.

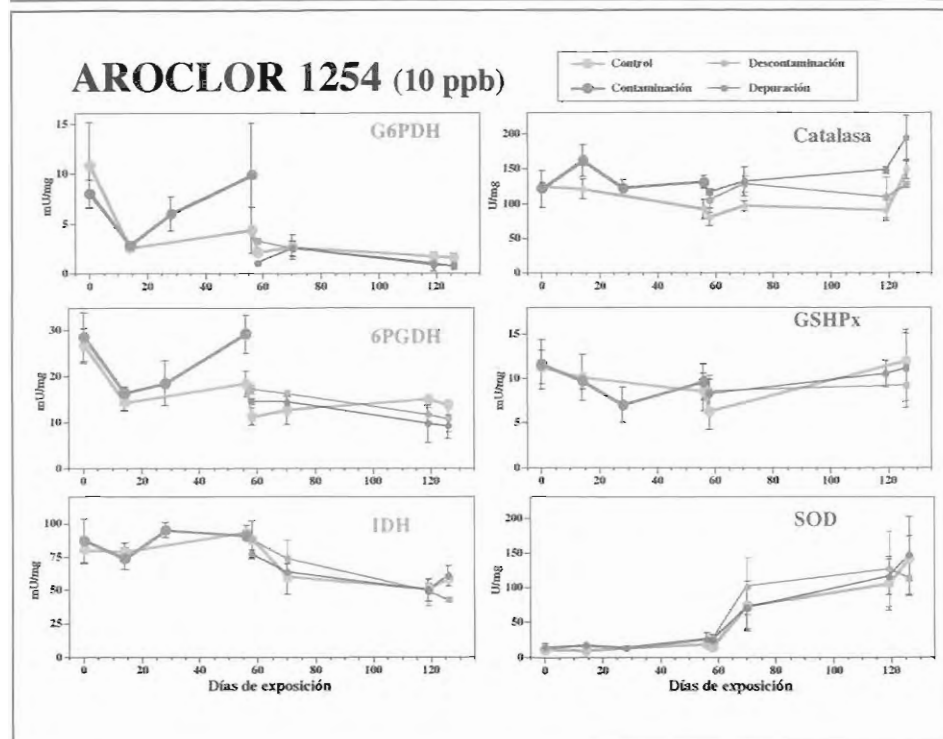


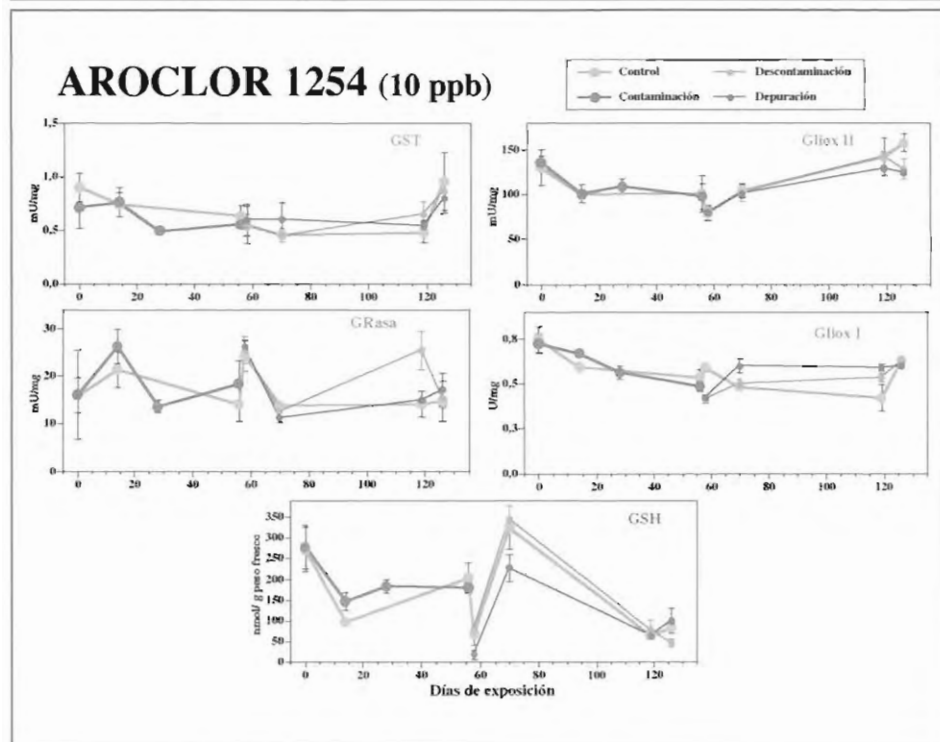
Figura 1. Actividades G6PDH, 6PGDH, IDH, Catalasa, GSHPx y SOD en chirlas expuestas a 10 ppb de Aroclor 1254. Se muestran los resultados en una primera fase de exposición durante dos meses (control en color naranja y contaminado en color rojo) y una segunda fase de tres meses de descontaminación (verde) o depuración (azul).

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos con otros cinco biomarcadores ensayados en el mismo experimento, incluyendo cuatro enzimas relacionadas con el glutatión reducido (glutatión transferasa, glutatión reductasa, glioxalasa I y II) y el propio contenido de GSH. En estos cinco parámetros tampoco se observaron apenas diferencias entre las chirlas control y las expuestas a Aroclor 1254. Sin embargo, fueron muy llamativos los drásticos cambios observados en los niveles de GSH al comienzo de la segunda fase, disminuyendo hasta alcanzar sólo un 20-30% del valor inicial a los dos días de cesar el tratamiento con el contaminante, subiendo al 150 % a los dieciséis días de esta segunda fase y volviendo a bajar en los muestreos finales.

Cambios parecidos, aunque no tan drásticos como los observados en el contenido del glutatión, se vieron a los dos días de descontaminación/depuración en otros muchos biomarcadores. Las seis actividades auxiliares y antioxidativas de la Figura 1 bajaban, al igual que la actividad Gliox II de la Figura 2, mientras que la GRasa subía llamativamente en este mismo momento. Todos estos cambios sugieren una menor capacidad

antioxidativa tras el trasplante, al bajar a la vez actividades antioxidativas y auxiliares y el propio contenido de glutatión reducido. Esto podría estar compensado en parte por el aumento de la actividad glutatión reductasa. Alteraciones parecidas se observaron en los índices de condición IC3 e IC5 descritos anteriormente por Oscar Amezcua en el Capítulo 9 de la presente publicación. Conviene resaltar que todos estos cambios se observaron tanto en los animales control como en aquellos expuestos a Aroclor 1254.

Figura 2. Actividades GST, Gliox II, GRasa, Gliox I, y niveles de GSH en chirlas expuestas a 10 ppb de Aroclor 1254.



Véase leyenda de la figura 1.

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos en chirlas expuestas al Cu(II) en el mismo experimento. Los resultados resultaron bastante parecidos a los obtenidos con el Aroclor 1254, mostrados en la Figura 1, aunque las respuestas a la exposición a cobre fueron algo superiores. Así, en chirlas expuestas a este metal con propiedades redox, las actividades G6PDH, 6PGDH y CAT fueron durante los cinco meses que duró el experimento claramente mayores que en chirlas control. Esto sugería una cierta inducción de estas tres actividades antioxidativas, posiblemente debido al estrés oxidativo que puede causar este metal debido a sus propiedades redox. Sin embargo, como se había observado en el experimento del Aroclor 1254, en las actividades glutatión peroxidasa e iso-

citrato deshidrogenasa no hubo diferencias entre control y problema. De nuevo, la actividad superóxido dismutasa de chirlas expuestas a cobre se mantuvo muy baja durante los dos meses de exposición, aunque aumentó de forma significativa en la segunda fase.

Figura 3. Actividades G6PDH, 6PGDH, IDH, Catalasa, GSHPx y SOD en chirlas expuestas a 40 ppb de Cu (II).

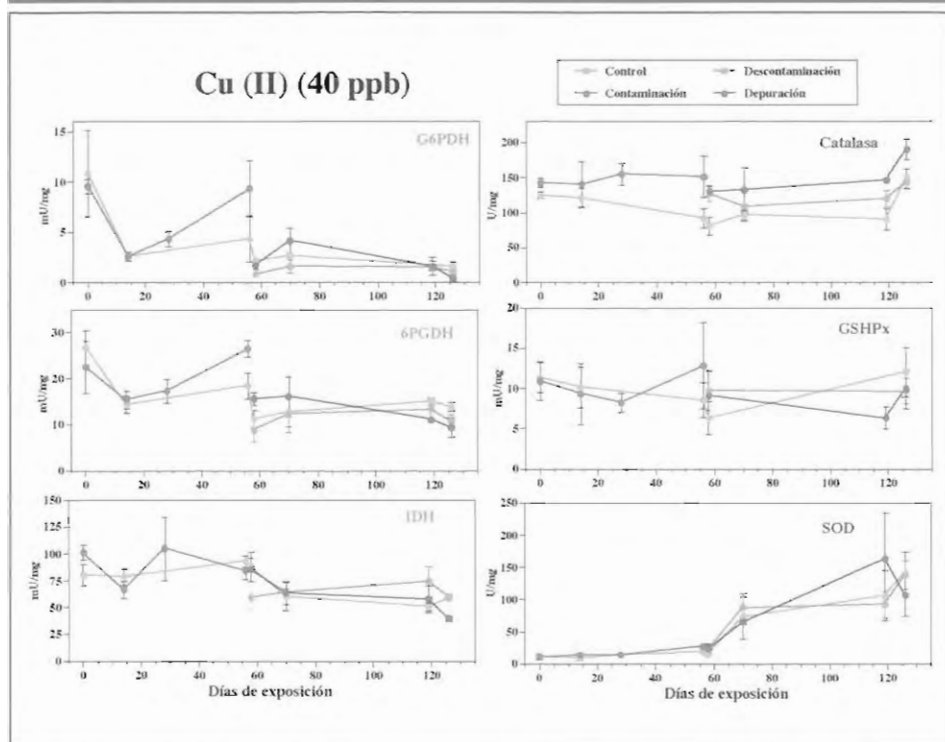


Figura 3. Actividades G6PDH, 6PGDH, IDH, Catalasa, GSHPx y SOD en chirlas expuestas a 40 ppb de Cu (II). Se muestran los resultados en una primera fase de exposición durante dos meses (control en color naranja y contaminado en color rojo) y una segunda fase de tres meses de descontaminación (verde) o depuración (azul).

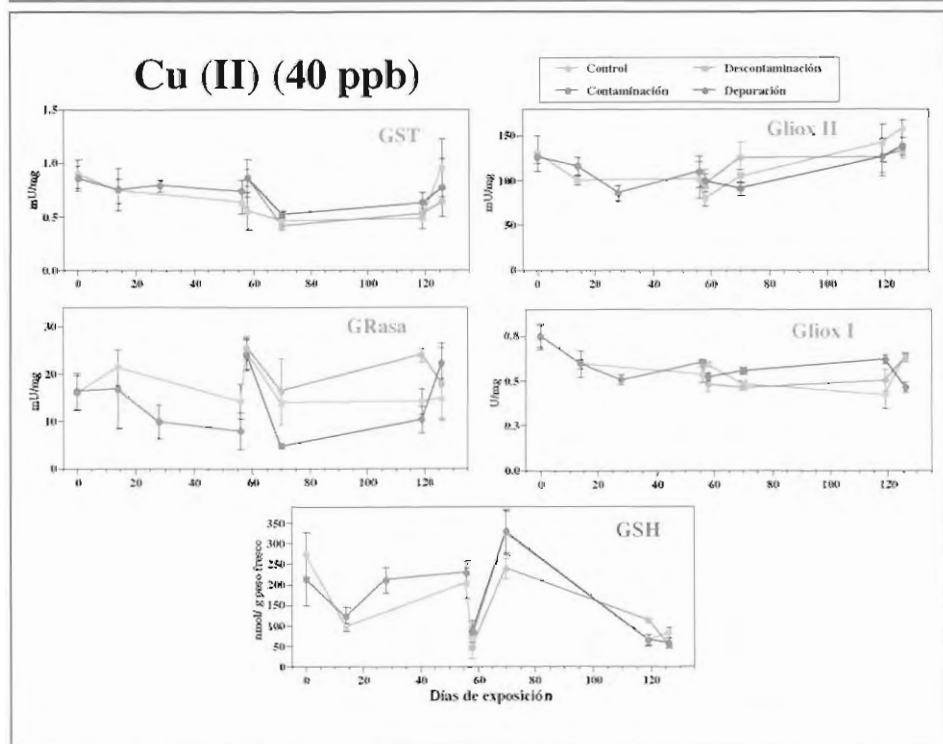
En la Figura 4 se muestra la evolución que presentaron las cuatro enzimas relacionadas con el glutatión analizadas y los niveles de glutatión reducido durante el experimento de exposición al Cu(II). Si comparamos los animales control con los expuestos, no se observaron cambios significativos en la mayoría de estos biomarcadores. De nuevo se aprecian cambios muy drásticos en el contenido de GSH al comienzo de la fase de descontaminación y también cambios bruscos en la evolución del resto de biomarcadores en este punto del experimento, de forma muy parecida a lo observado en la exposición a Aroclor 1254. Esto confirmaba las sospechas iniciales de que estos cambios tan marcados podrían no ser respuestas a la exposición a contaminantes sino una

clara indicación de estrés en los animales (control y problema) debido a su manipulación experimental.

En efecto, todas las chirlas que quedaban en las canaletas C-I (Aroclor), C-II (Cu) y C-III (control) tras la primera fase de ambos tratamientos se recogieron y se volvieron a sembrar bien en las canaletas de partida o en la nueva (C-IV) con arena limpia. Todos los lotes de animales sufrieron la misma manipulación para evitar las diferencias experimentales. No obstante, la evolución de la mayoría de los biomarcadores indica que la manipulación derivada de sacar las chirlas y volver a sembrarlas de nuevo supuso un estrés muy significativo que alteró de manera muy acusada la posterior evolución del experimento.

Por tanto, los resultados obtenidos en este primer experimento nos han llevado a proponer importantes cambios en el diseño de futuros experimentos de exposición, para intentar evitar que la manipulación produzca efectos que anulen o enmascaren los posibles cambios en los biomarcadores debidos a la exposición a contaminantes. Entre estos cambios destacan:

Figura 4. Actividades GST, Gliox II, GRasa, Gliox I, y niveles de GSH en chirlas expuestas a 10 ppb de Cu (II).



Véase leyenda de la figura 3.

- 1) En primer lugar, se realizarán experimentos de corta duración (1 semana) en bateas con distintas concentraciones de contaminante para intentar observar una relación dosis-respuesta y determinar una posible respuesta más rápida de los animales a la presencia del contaminante.
- 2) En segundo lugar, se eliminará la depuración en una canaleta limpia (canaleta IV), con lo que no será necesario cambiar los animales de canaleta, simplificando mucho no sólo el experimento sino sobre todo la manipulación de los animales, con lo que esperamos anular las alteraciones supuestamente provocadas por la manipulación de los animales y detectar los cambios debidos fundamentalmente a la presencia y efectos de los contaminantes o su retirada posterior.

OPTIMIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PCBs EN MUESTRAS DE BIOTA: BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs).

E. Morales, M. Bujalance y J.L. Gómez Ariza

Dpto. De Química y Ciencias de los Materiales
Escuela Politécnica Superior, Campus La Rábida
Universidad de Huelva

Los bifenilos policlorados (PCBs) forman una familia de compuestos integrada en un grupo más amplio de contaminantes persistentes en el medioambiente, siendo regulados por las legislaciones europeas. Son compuesto hidrofóbicos que suelen bioconcentrarse en numerosos organismos como bivalvos y peces.

Las técnicas analíticas para su determinación constan de varias etapas:

- a) Extracción de PCBs a partir de los tejidos biológicos, empleando normalmente un disolvente orgánico.
- b) Purificación de los extractos, eliminando sustancias interferentes, fundamentalmente lípidos.
- c) Preconcentración, para eliminar el disolvente orgánico y preparar la muestra para la determinación analítica final.
- d) Adición de un patrón interno.
- e) Determinación analítica final, fundamentalmente mediante cromatografía de gases (GC) empleando como detector el de captura de electrones (ECD) o la espectrometría de masas (MS).

El ECD es más sensible que MS en la detección de PCBs, aunque también es muy superior el número posible de interferencias, por lo que los resultados no son tan seguros. A pesar de su menor sensibilidad, MS permite la confirmación de la presencia de estos compuestos lo que origina que el número de falso positivos sea muy inferior. Además, la sensibilidad mejora casi un orden de magnitud al emplear la modalidad MS/MS.

En cualquier caso, la etapa más larga y que introduce mayor probabilidad de errores es la extracción inicial. Las técnicas clásicas: extracción Soxhlet (y su variante automática Soxtec), la extracción mediante agitación mecánica con disolvente o la extracción con ultrasonidos, emplean un tiempo muy largo de extracción, volúmenes muy elevados de disolvente e implican numerosas manipulaciones. Ello origina costes elevados tanto de personal como de eliminación de residuos.

Las técnicas clásicas anteriores están siendo sustituidas por otras que emplean volúmenes inferiores de disolvente y son más rápidas. Entre ellas se encuentran la extrac-

ción asistida con ultrasonidos, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción acelerada con disolventes (ASE), siendo esta última la de más reciente incorporación.

En este estudio, se evalúa las posibilidades de la ASE en la extracción de PCBs, pero al mismo tiempo se han optimizado cada una de las etapas del procedimiento analítico.

1. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA.

La determinación final de los PCBs se realiza mediante cromatografía de gases empleando como detector la espectrometría de masas con trampa de iones (GC-IT-MS), con ionización por impacto de electrones, con las opciones MS y MS/MS.

Los congéneres de PCBs estudiados son: PCB 1 (2-cloro-), PCB 11 (3,3'-dicloro-), PCB 29 (2,4,5-tricloro-), PCB 47 (2,2',4,4'-tetracloro-), PCB 121 (2,3,4,5,6-pentacloro-), PCB 87 (2,2',3,4,5-pentacloro-), PCB 99 (2,2',4,4',5-pentacloro-), PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentacloro-), PCB 105 (2,3,3',4,4'-pentacloro-), PCB 118 (2,3',4,4',5-pentacloro-), PCB 128 (2,2',3,3',4,4'-hexacloro-), PCB 136 (2,2',3,3',6,6'-hexacloro-), PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-hexacloro-), PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexacloro-), PCB 156 (2,3,3',4,4',5-hexacloro-), PCB 170 (2,2',3,3',4,4',6-heptacloro-), PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptacloro-), PCB 183 (2,2',3,4,4',5',6-heptacloro-), PCB 185 (2,2',3,4,5,5',6-heptacloro-), PCB 194 (2,2',3,3',4,4',5,5'-octacloro-), PCB 206 (2,2',3,3',4,4',5,5',6-nonacloro-) y PCB 209 (decacloro).

1.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

Los patrones se han preparado en disoluciones de hexano, inyectando alícuotas de la mismas en el cromatógrafo de gases (Varian 3800) para las optimizaciones de los distintos parámetros cromatográficos.

La separación de PCBs se ha realizado en una columna VA-5MS de 30 m, 0.25 mm d.i. y 0.25 μ m de grosor de película. Se han estudiado distintas programaciones de temperatura, generando resultados más reproducibles la siguiente:

- 1.- isoterma inicial a 80oC durante 1 minuto
- 2.- rampa de 5oC min⁻¹ hasta 250oC
- 3.- isoterma a 250oC durante 1 minuto
- 4.- rampa de 20oC min⁻¹ hasta 280oC
- 5.- isoterma a 280oC durante 4.5 minutos

Como gas portador se emplea He con un flujo de 1.0 ml min⁻¹. Los tiempos de retención de cada PCB se muestran en la Tabla I, observándose una buena separación entre los distintos congéneres de PCBs.

La inyección se realiza con alícuotas de 3 μ l de forma manual (jeringa de 10 μ l) en un inyector split/splitless, en el modo *sin división de flujo*. Se ha estudiado la influencia que tiene el tiempo en el que la válvula de split se encuentra cerrada sobre la señal cromatográfica. Se han realizado experiencias a 20, 30, 50, 75, 100 y 120 s, observán-

dose que es necesario mantener cerrada dicha válvula al menos durante 50 s. Se ha elegido, por tanto, un tiempo algo superior, 60 s.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos optimizados para la determinación de PCBs mediante GC-MS y GC-MS/MS.

Comp.	Tr (min)	HRGC - MS			HRGC - MS / MS		
		L.D. (ppb)	R.L. (ppb)	r2	L.D. (ppb)	R.L. (ppb)	r2
PCB1	16,891	80	1000	0,991	10	1000	0,99
PCB11	22,983	51	1000	0,993	8,6	1000	0,993
PCB29	24,556	48	1000	0,994	7,9	1000	0,991
PCB47	26,797	53	1000	0,996	9,2	1000	0,995
PCB121	28,957	47	1000	0,999	8,2	1000	0,992
PCB87	29,823	41	1000	0,995	7,7	1000	0,991
PCB99	29,984	60	1000	0,994	9	1000	0,99
PCB101	30,798	58	1000	0,992	9,1	1000	0,991
PCB136	31,024	53	1000	0,992	8,3	1000	0,991
PCB105	32,145	57	1000	0,994	7,4	1000	0,991
PCB153	32,93	43	1000	0,993	6,2	1000	0,994
PCB118	33,052	49	1000	0,998	7,1	1000	0,995
PCB128	33,89	56	1000	0,999	6,9	1000	0,996
PCB180	34,61	42	1000	0,999	7,3	1000	0,994
PCB138	34,824	50	1000	0,993	7,7	1000	0,993
PCB185	35,011	41	1000	0,994	8,1	1000	0,994
PCB156	35,711	43	1000	0,997	6,4	1000	0,997
PCB183	36,371	41	1000	0,998	6	1000	0,997
PCB170	37,183	39	1000	0,993	7,1	1000	0,996
PCB194	38,85	34	1000	0,994	7,3	1000	0,995
PCB206	39,917	33	1000	0,993	6,6	1000	0,992
PCB209	40,917	42	1000	0,991	6,3	1000	0,991

La temperatura del inyector se ha variado entre 100 y 300oC, siendo necesario emplear una temperatura de 280oC para obtener la máxima señal de los PCBs menos volátiles.

1.2. DETECCIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La detección se realiza en el detector de trampa de iones Saturno 2000 (Varian), que se ha calibrado cada semana con perfluorotributilamina para obtener la máxima sensibilidad. Se comprobaron los siguientes parámetros: presencia de aire y agua, fondo de integración, ajuste del gas de calibración, posición de las masas, potencial del electromultiplicador y control de ganancia automática.

La programación del detector varía cuando se emplea en modo MS o en modo MS/MS. Sin embargo, los parámetros siguientes se mantienen iguales en ambos casos:

- 1.- Durante los primeros 15 minutos, el detector se mantiene apagado para evitar el efecto adverso del disolvente.

- 2.- Energía de impacto electrónico: 70 eV.
- 3.- Corriente de emisión: 10 μ A.
- 4.- Velocidad de barrido: 1 s⁻¹.
- 5.- Temperatura de la línea de transferencia: 250°C.
- 6.- Temperatura de la trampa de iones: 200°C.

1.2.1. Condiciones en la opción MS.

El desarrollo cromatográfico se dividió en tres segmentos de tiempo. El primero (15 minutos) se emplea para evitar el efecto del disolvente sobre la detección, manteniendo, por tanto, el detector apagado.

En el segundo segmento (14 minutos y 30 segundos) se detectan los PCBs que contienen entre 2 y 5 átomos de cloro, además del etil paratión (empleado como patrón interno). Se hace un barrido de masas entre 175 y 340 m/z.

En el tercer segmento (12 minutos y 30 segundos) se detectan los PCBs que contienen entre 6 y 10 átomos de cloro. Se hace un barrido de masas entre 300 y 600 m/z.

Las masas que se emplean para la detección de los distintos PCBs estudiados se recogen en la Tabla 2. La cuantificación se realiza mediante la preparación de rectas de calibrado basadas en el empleo de 6 disoluciones de los patrones con distinta concentración y con la técnica del patrón interno. Para este fin se utiliza el etil paratión. Los resultados de esta calibración se muestran en la Tabla 1 en la que se recoge el límite de detección (en μ g l⁻¹), el rango máximo de trabajo estudiado (en μ g l⁻¹) y los coeficientes de correlación. Se observan límites de detección en el rango de 30-80 μ g l⁻¹, pudiéndose medir concentraciones de hasta 1000 μ g l⁻¹ con coeficientes de correlación superiores a 0.99.

1.2.2. Detección mediante MS/MS.

La optimización en este modo de detección es más compleja que en el caso anterior ya que se introducen una serie de nuevos parámetros. Es necesario aislar un ion del PCB (ión padre), el cual se somete a una fragmentación inducida por colisión obteniéndose unos nuevos iones que se emplean para la detección y cuantificación.

El proceso cromatográfico se ha dividido en 20 segmentos de tiempo diferentes. El primero corresponde a la eliminación del disolvente, y el resto a distintos PCBs y al patrón interno. Los parámetros optimizados se muestran en la Tabla 2, observándose que los PCBs con el mismo número de átomos de cloro se comportan de forma semejante, y cuando se eluyen de forma consecutiva en el cromatograma se pueden agrupar en un único segmento de tiempo.

Una vez optimizados los parámetros de adquisición de datos, se realizó una calibración basada en el empleo de 6 disoluciones con distintas concentraciones de los patrones de PCBs, empleando como patrón interno etil-paratión. Los resultados se resumen en la Tabla 1, en donde se observa que la sensibilidad obtenida con este modo operativo es casi un orden de magnitud mayor que cuando se emplea la detección de masas simple.

Tabla 2. Parámetros optimizados en MS/MS.

Comp.	Tiempo (min)	Rango (m/z)	Masas cuantif. (m/z)	Ion precursor (m/x)	ExcAmp (v)	Estab. (m/z)	Modo
PCB1	15-18	145-198	151-153	188	71,4	70	no resonante
PCB11	18-24	145-232	152-153	222	85	80	no resonante
PCB29	24-25	145-268	186-188	258	94	90	no resonante
PCB47	25.50-27.15	215-302	220-223	292	88	95	no resonante
PCB121	27.15-28.20	135-301	141.235.263.291	291	59	128	no resonante
PCB87	28.20-30.92	250-336	254-256	326	88	95	no resonante
PCB99	28.20-30.92	250-336	254-256	326	88	95	no resonante
PCB101	28.20-30.92	250-236	254-256	326	88	95	no resonante
PCB136	30.92-31.50	283-370	288-291	360	87	100	no resonante
PCB105	31.50-32.50	250-336	254-256	326	88	95	no resonante
PCB153	32.5-33	283-370	288-291	360	87	100	no resonante
PCB118	33-33.5	250-336	254-256	326	88	95	no resonante
PCB128	33.5-34.25	283-370	288-291	360	87	100	no resonante
PCB180	34.25-34.7	320-404	322-325	394	80	100	no resonante
PCB138	34.7-34.9	283-370	288-291	360	87	100	no resonante
PCB185	34.9-35.3	320-404	322-325	394	80	100	no resonante
PCB156	35.30-36.12	283-370	288-291	360	87	100	no resonante
PCB183	36.12-38	320-404	322-325	394	80	100	no resonante
PCB170	36.12-38	320-404	322-325	394	80	100	no resonante
PCB194	38-39.30	355-440	393-395	430	0,85	189	resonante
PCB206	39.30-40.3	390-474	427-429	464	1,3	204	resonante
PCB209	40.3-42	420-510	428-463	498	0,75	219	resonante

2. PRECONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Cuando se lleva a cabo las extracciones de los PCBs a partir de muestras de biota, los compuestos quedan diluidos en un volumen elevado de disolvente orgánico, siendo necesaria la preconcentración de los compuestos antes de su inyección en el cromatógrafo. Esta preconcentración se realiza eliminando el disolvente por destilación en rotavapor. Aunque este tratamiento puede originar pérdidas de analitos muy volátiles.

En este estudio se ha evaluado la posibilidad de pérdidas de PCBs durante la eliminación de disolvente con rotavapor, sometiendo a este proceso un volumen de 100 ml de hexano con cantidades conocidas de PCBs y eliminando el disolvente hasta distintos volúmenes finales: sequedad, 1, 2, 5 y 10 ml. Los resultados de esta experiencia se muestran en la Tabla 3 donde se observa que no hay pérdidas cuando la concentración se lleva hasta un volumen final de 2 ml, incluso para el PCB 1, que es el más volátil de los estudiados. Sin embargo, la reducción de volumen no puede llevarse más allá de 2 ml sin que aparezcan pérdidas de los más volátiles. Se recomienda utilizar este método para eliminar disolvente hasta un volumen final de 5 ml.

El procedimiento de preconcentración por evaporación se complementa el empleo de corriente de nitrógeno para poder llevar el extracto a sequedad sin pérdida de volátiles. Finalmente el residuo se redissuelve en 100 μ l de patrón interno (etil paratión) y se inyecta en el cromatógrafo. Con este método de preconcentración final no se han observado pérdidas de ninguno de los analitos.

Tabla 3. Porcentajes de pérdida de PCBs durante la eliminación de disolvente orgánico empleando el rotavapor.

Comp.	Volumen final (ml)				
	0	1	2	5	10
PCB1	85	43	1	0	0
PCB11	77	26	0	0	0
PCB29	71	15	0	0	0
PCB47	67	7	0	0	0
PCB121	39	9	0	0	0
PCB87	26	5	0	0	0
PCB99	31	11	0	0	0
PCB101	24	6	0	0	0
PCB136	27	7	0	0	0
PCB105	23	3	0	0	0
PCB153	24	1	0	0	0
PCB118	28	0	0	0	0
PCB128	16	2	0	0	0
PCB180	19	0	0	0	0
PCB138	20	4	0	0	0
PCB185	15	0	0	0	0
PCB156	13	0	0	0	0
PCB183	11	0	0	0	0
PCB170	15	0	0	0	0
PCB194	17	0	0	0	0
PCB206	13	0	0	0	0
PCB209	14	0	0	0	0

3. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Durante la extracción de los PCBs de las muestras de biota también se coextraen otras muchas sustancias (fundamentalmente lípidos) que interfieren en la determinación cromatográfica, siendo necesario su eliminación.

Se ha comprobado la eficiencia de dos métodos para la eliminación de los lípidos de los extractos: (a) destrucción con H₂SO₄., (b) extracción en fase sólida y adsorbentes polares (Florisil).

3.1. PURIFICACIÓN CON ÁCIDO SULFÚRICO.

El extracto orgánico que contiene los PCBs se extrae con H₂SO₄ concentrado. Los PCBs quedan en la fase orgánica, mientras que los lípidos, una vez degradados, se eliminan con el ácido sulfúrico. Es necesario evaluar si la destrucción de lípidos es adecuada y si no se producen degradaciones de los PCBs.

Se extrae con un dispositivo Soxhlet una muestra de chirila. El extracto, se reduce a un volumen de 5 ml y se enriquece con cantidades conocidas de los distintos PCBs

Tabla 4. Recuperaciones de PCBs (%) en la purificación con sulfúrico concentrado de los extractos de diversos extractos.

Comp.	Volumen final (ml)				
	0	1	2	5	10
PCB1	99	102	103	93	
PCB11	98	97	99	91	
PCB29	102	93	97	96	
PCB47	104	91	94	104	
PCB121	93	108	105	108	
PCB87	97	105	103	100	
PCB99	95	100	100	99	
PCB101	91	93	94	97	
PCB136	106	94	97	96	
PCB105	107	94	99	99	
PCB153	103	94	99	100	
PCB118	98	97	99	104	
PCB128	99	99	96	103	
PCB180	100	100	95	106	
PCB138	101	103	91	107	
PCB185	96	104	94	92	
PCB156	95	95	94	91	
PCB183	96	93	97	93	
PCB170	102	91	99	105	
PCB194	102	98	103	103	
PCB206	101	103	105	104	
PCB209	103	104	109	106	

tratándolo con 5 ml de H₂SO₄ concentrado durante 3 min. Las fases se separan, tratando la orgánica con H₂SO₄ concentrado. Este proceso se repite hasta que la fase de ácido queda incolora. Al menos es necesario realizar 3 extracciones. El extracto orgánico se preconcentra con corriente de nitrógeno y se analiza mediante GC-MS.

Los resultados obtenidos (en forma de porcentaje de recuperación) se muestran en la Tabla 4, empleando distintos tipos de biota (chirla, ostra, coquina y coquina de fango). No se observan pérdidas de analitos, pero en los cromatogramas, el ruido de fondo es 100 veces más elevado que cuando se analizan patrones, por la posible eliminación incompleta de los lípidos, por ello no es aconsejable emplear el método para muestras con bajos contenidos en PCBs, a menos que se complete con una purificación con Florisil.

3.2. PURIFICACIÓN CON FLORISIL

Se emplean 10 g de Florisil activado a 170oC, en una columna de vidrio. Se acondiciona con 50 ml de pentano y se añade el extracto de muestra enriquecida con cantidades conocidas de PCBs. Los analitos son posteriormente eluidos con un volumen de disolvente adecuado (1.5 ml min⁻¹), quedando retenidos los lípidos.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de PCBs durante la purificación con Florisil empleando 100 ml de eluyentes de distinta polaridad.

Comp.	% de DCM en pentano			
	0	3	5	10
PCB1	68	99	94	97
PCB11	76	102	102	103
PCB29	81	93	99	92
PCB47	94	98	100	107
PCB121	101	98	98	105
PCB87	99	98	98	97
PCB99	107	101	98	93
PCB101	103	97	101	107
PCB136	98	103	99	105
PCB105	95	100	103	106
PCB153	91	100	104	104
PCB118	99	97	106	95
PCB128	105	95	96	97
PCB180	100	98	95	93
PCB138	99	97	95	89
PCB185	98	102	96	98
PCB156	99	103	97	98
PCB183	100	104	99	99
PCB170	103	97	101	102
PCB194	93	99	97	104
PCB206	94	100	103	103
PCB209	97	100	95	97

Se ha estudiado el tipo y volumen de disolvente adecuado para eluir los PCBs quedando retenidos en el Florisil los lípidos. Para ello, la elución se realizó con 100 ml de disolventes de polaridad diferente: pentano y 3, 5 y 10% de diclorometano en pentano. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Se observa que es necesario emplear, al menos, un 3% de diclorometano en pentano para extraer los PCBs más polares (con 2 y 3 átomo de cloro. Una mayor polaridad en el eluyente provoca al mismo tiempo la elución de los lípidos.

Se han ensayado distintos volúmenes (20, 50 y 100 ml) de la mezcla de 3% de diclorometano en pentano para eluir los PCBs. Los resultados se recogen en la Tabla 6, observándose que es necesario, al menos emplear 50 ml de eluyente.

Por tanto, se recomienda una elución con 50 ml de diclorometano en pentano.

4. EXTRACCIÓN ASE

La extracción acelerada con disolventes emplea extractantes a elevada temperatura que se mantienen en estado líquido gracias al uso de presiones elevadas. Con ello se favorece la solubilidad, la velocidad de difusión y la transferencia de masas de los analitos, disminuyendo la viscosidad y la tensión superficial del disolvente.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación de PCBs durante la purificación con Florisil empleando distintos volúmenes de 3% de diclorometano en pentano.

Comp.	Volumen de disolvente		
	20	50	100
PCB1	79	102	99
PCB11	82	99	102
PCB29	91	98	83
PCB47	94	97	98
PCB121	93	97	98
PCB87	87	102	98
PCB99	95	103	101
PCB101	97	97	97
PCB136	94	96	103
PCB105	93	103	100
PCB153	96	102	100
PCB118	91	100	97
PCB128	92	100	95
PCB180	94	100	98
PCB138	93	99	97
PCB185	91	97	102
PCB156	92	103	103
PCB183	94	98	104
PCB170	93	104	97
PCB194	91	106	99
PCB206	92	98	100
PCB209	96	98	100

Los parámetros que se optimizan en la extracción ASE son el grado de dispersión de la muestra en un adsorbente inerte (Celatom), la polaridad del disolvente empleado para la extracción, la temperatura, la presión, el tiempo de extracción y el volumen de extractante.

Para realizar estos estudios de optimización, se han tomado muestras de ostras del Espigón de Huelva, que se separa del tejido, se homogeneiza y liofiliza durante 24 h. El producto resultante se tritura y almacena para los análisis.

En cada ensayo se han tomado 2 g de muestra, que se enriquece con una cantidad conocida de PCBs (PCB 1, PCB 11, PCB 29, PCB 47, PCB 121, PCB 136, PCB 185, PCB 194, PCB 206 y PCB 209) con distinto grado de cloración obteniéndose una concentración final de 10 ng g⁻¹. Se dispersa en una cantidad determinada de Celatom y se introduce en la celda de extracción (de 22 ml de capacidad). La celda se pre-calienta durante 5 minutos y se introduce el disolvente a la presión establecida. Después de un tiempo de extracción estática, se arrastra el extracto hasta el recipiente de colección. El proceso se repite varias veces, y en la última se purga la celda con corriente de nitrógeno durante 60 s. El extracto recogido se concentra en un rotavapor, se purifica con columna de Florisil, se vuelve a preconcentrar con rotavapor hasta unos 5 ml, y se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno. Se redisuelve en 100 µl de patrón interno (etil paratión) y se inyectan 3 µl en el GC-MS.

4.1. EFECTO DE LA CANTIDAD DE DISPERSANTE

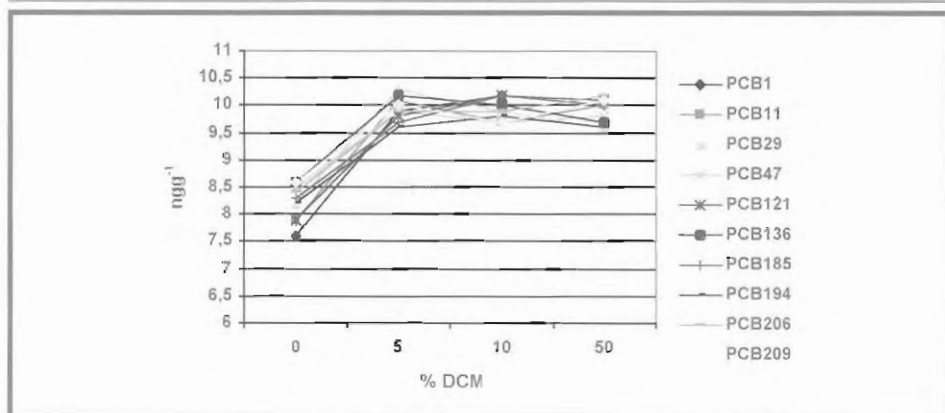
Se dispersa la muestra con Celatom en proporciones 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4. La extracción se realiza con hexano:acetona 1:1, durante 30 minutos a 150oC y 1500 psi. El proceso se repite de forma sucesiva dos veces, obteniéndose un volumen final de 70 ml.

Los resultados obtenidos indican que el grado de dispersión no influye en las recuperaciones de PCBs, siendo superiores al 85%.

4.2. EFECTO DE LA POLARIDAD DEL DISOLVENTE

Se dispersa la muestra 1:1 con Celatom y se realiza extracciones bajo las condiciones del apartado anterior empleando distintos tipos de disolventes: hexano y disoluciones del 5, 10 y 50% de acetona en hexano. Los resultados se muestran en la Fig 1. Al menos es necesario emplear un porcentaje del 5% de acetona en hexano para extraer de forma cuantitativa todos los PCBs, y este disolvente se emplea en las siguientes experiencias.

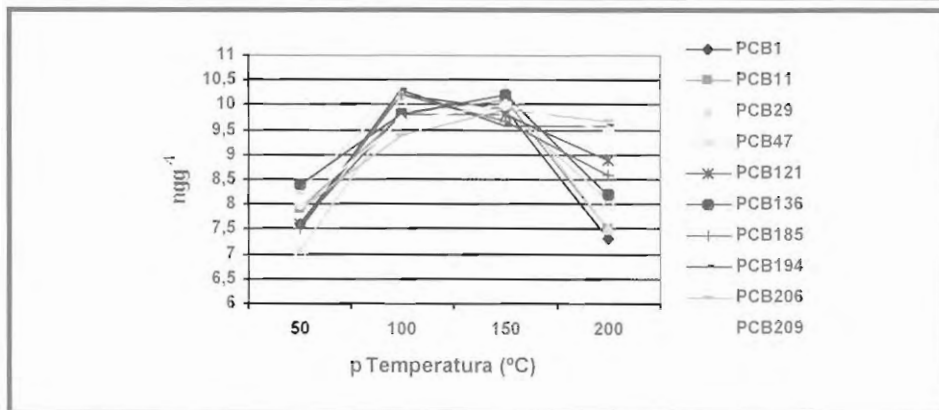
Figura. 1. Recuperaciones en función del % de DCM en pentano.



4.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se han ensayado las siguientes temperaturas de extracción: 50, 100, 150 y 200oC. Los resultados se muestran en la Fig 2. El valor óptimo de temperatura es de 100oC.

Figura. 2. Recuperaciones en función de la temperatura de extracción.



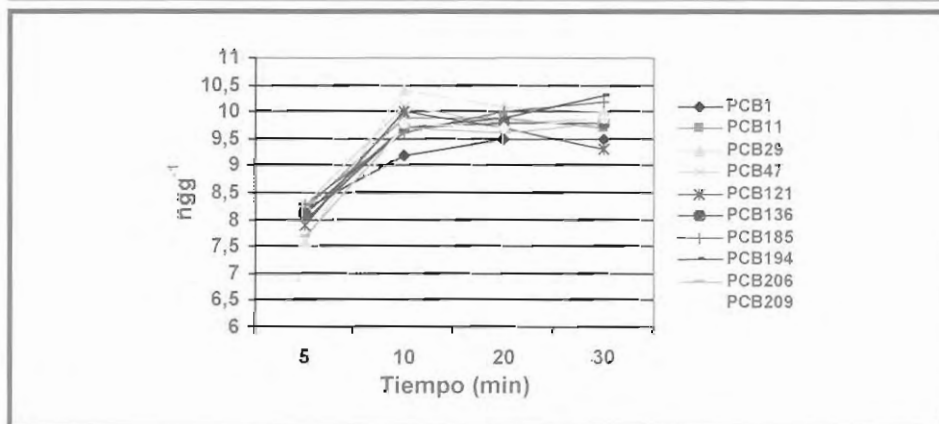
4.4. EFECTO DE LA PRESIÓN

Se estudian los siguientes valores de presión: 500, 1000, 1500 psi. No se observa ninguna influencia de este parámetro sobre la extracción. Se elige una presión de 1000 psi para las siguientes experiencias.

4.5. EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Se han ensayado los siguientes tiempos de extracción: 5, 10, 20 y 30 s. Los resultados se recogen en la Fig 3. Al menos es necesario llevar a cabo la extracción durante 10 min para obtener buenos resultados, y se ha tomado este valor como óptimo para experiencias posteriores.

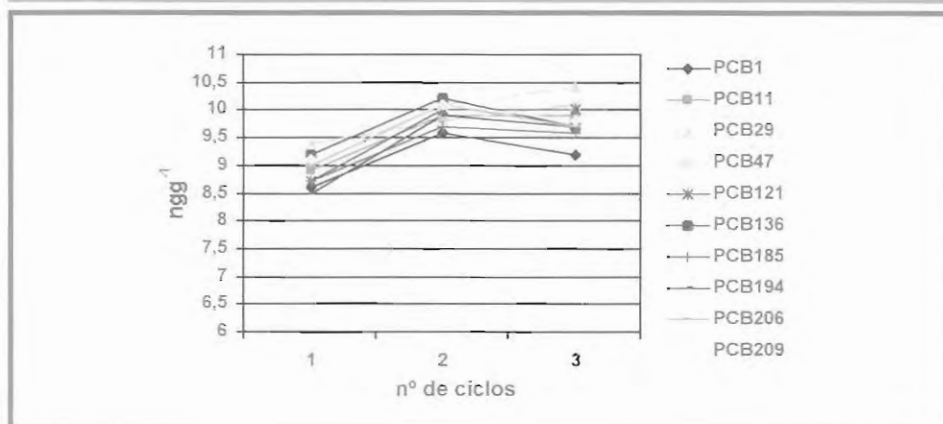
Fig.ura 3. Recuperaciones a diferentes tiempos de extracción.



4.6. NÚMERO DE CICLOS DE EXTRACCIÓN

Se han ensayado extracciones con 1, 2 y 3 ciclos. Los resultados se recogen en la Fig 4. Son necesarios dos ciclos de extracción para obtener buenas recuperaciones de los analitos.

Figura. 4. Recuperaciones aplicando varios ciclos de extracción.



4.7. CONDICIONES ÓPTIMAS

Las condiciones óptimas en la extracción ASE de PCBs son las siguientes:

Se dispersan 2 g de muestra con 2 g de celatom y se introduce en una celda de 22 ml rellenándose el resto con celatom. La extracción se realiza durante 10 minutos con 5% de acetona en hexano a 100oC y 1000 psi, en dos ciclos.

5. COMPARACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASE CON SOXHLET PARA DIVERSOS TIPOS DE MUESTRAS

El método ASE se ha comparado con la extracción Soxhlet. Las condiciones elegidas para realizar esta extracción son las siguientes: 2 g de muestra, 150 ml de hexano-acetona (4:1), 24 h con un reflujo de 10 vaciados por hora.

Ambos métodos se han aplicado a muestras de chirla, ostra, coquina, coquina de fango, berberecho y concha fina enriquecidas con 10 ng g⁻¹ de congéneres de PCBs de distinto grado de cloración. Los resultados se resumen en la Tabla 7. Se encuentra una buena concordancia entre ambos métodos de extracción, con lo que se concluye que ASE es una técnica adecuada para la evaluación de PCBs en bivalvos, que emplea un volumen muy inferior de disolvente al del Soxhlet, realizando la extracción en un tiempo considerablemente inferior.

Tabla 7. Comparación de ASE y Soxhlet en muestras de biota enriquecidas con 10 ng g⁻¹ de distintos PCBs.

Comp.	Coquina (Isla Cristina)		Chirla (Terrón)		Ostra (Huelva)		Coquina (Doñana)		Coquina fango (Guadalquivir)		Concha fina (Nerja)	
	ASE	Soxhlet	ASE	Soxhlet	ASE	Soxhlet	ASE	Soxhlet	ASE	Soxhlet	ASE	Soxhlet
PCB1	9,98	10,20	9,76	10,10	9,92	9,76	9,88	9,68	10,40	10,10	10,20	10,20
PCB11	10,10	10,20	9,99	9,74	10,10	10,20	10,10	9,99	9,97	10,30	9,65	9,91
PCB29	10,30	9,76	9,86	9,98	10,00	10,00	10,40	10,20	9,82	9,84	9,66	9,87
PCB47	9,84	9,95	10,20	9,89	9,76	9,69	9,99	9,73	10,30	9,93	9,74	9,67
PCB121	9,51	9,91	10,00	9,95	9,59	9,76	10,00	9,85	9,66	9,71	10,10	9,81
PCB136	9,99	10,10	10,10	10,20	9,98	10,10	9,75	10,20	10,00	10,20	10,00	9,73
PCB185	10,10	10,30	9,94	10,40	40,20	9,84	9,65	9,69	9,90	9,85	9,80	9,97
PCB194	9,99	9,67	10,30	9,68	10,30	9,86	9,88	9,79	9,83	9,66	9,92	10,00
PCB206	10,20	9,96	9,88	10,10	9,87	9,99	9,97	9,99	10,30	9,94	9,84	10,00
PCB209	9,79	9,88	9,64	10,10	9,77	10,00	9,99	10,30	10,20	10,10	9,71	10,10

PROBLEMAS ASOCIADOS CON LA EVALUACIÓN AMBIENTAL DE LOS COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS

I. Giráldez, E. Morales y J.L. Gómez Ariza

Dpto. Química y C. Materiales, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Huelva, Campus de la Rábida, 21819-Palos de la Frontera (Huelva)

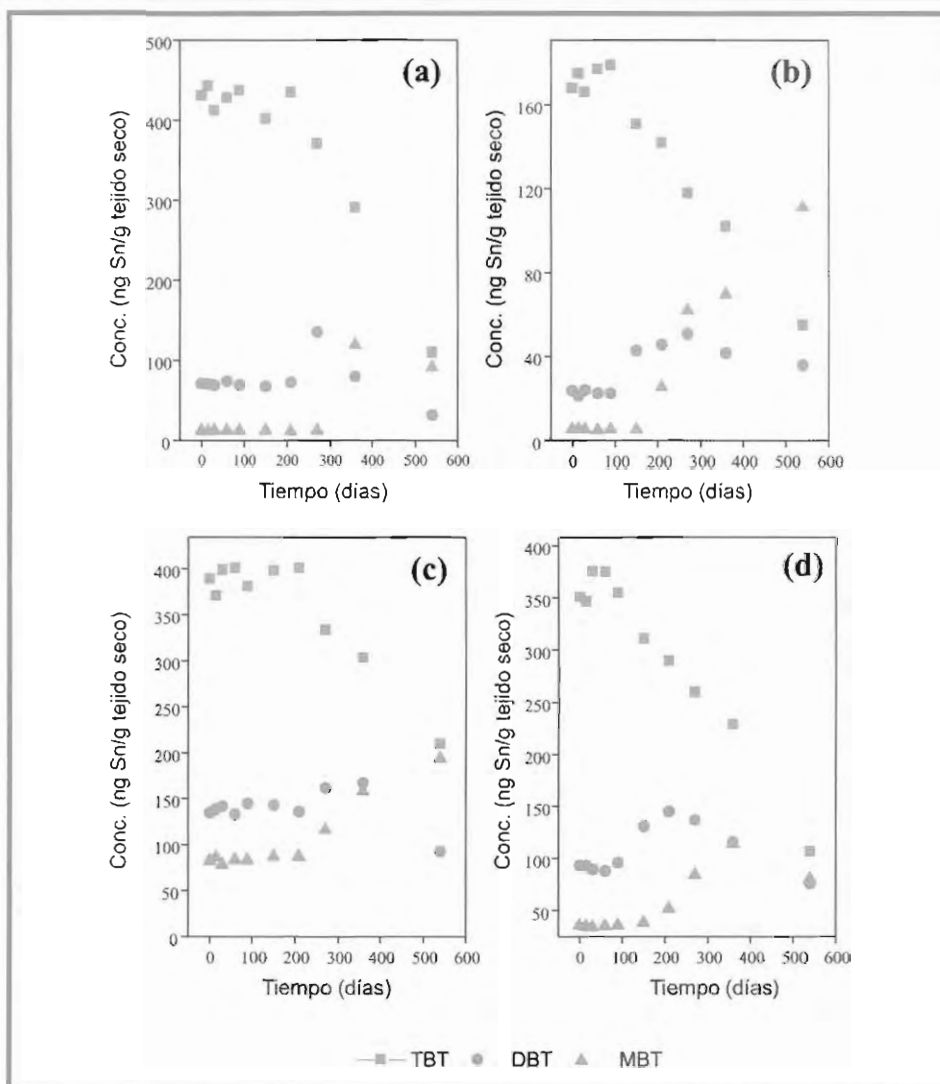
El tributilestaño (TBT) es un contaminante que se introduce en el medio marino a través de las pinturas antiincrustante de los barcos. Este compuesto tiene diversos efectos sobre los organismos marinos, como malformaciones en ostras y otros bivalvos, imposex en gasterópodos. Estos procesos afectan a la tasa de desarrollo, crecimiento y reproducción de estos organismos y contribuye a una mayor mortalidad de los mismos. Ello ha motivado diversas regulaciones de los organismos publico con responsabilidad medioambiental en el ámbito europeo y mundial y hace necesario disponer de métodos para la monitorización continua de estos contaminantes. La evaluación de los niveles de contaminación en sistemas acuáticos precisa el estudio de aguas, sedimentos y tejidos biológicos. No obstante, no basta con los resultados analíticos sobre concentración de especies organoestánnicas para una correcta interpretación del significado medioambiental de los mismos, por lo que es necesario considerar otros parámetros que determinan y afectan la presencia de estas sustancias, en especial en tejidos biológicos. Entre las variables más críticas en cuanto a su influencia en la correcta interpretación de los datos analíticos sobre la presencia del TBT y sus productos de degradación hay que considerar la estabilidad y conservación de los compuestos organoestánnicos en tejidos biológicos, variación espacial y temporal de su presencia en bivalvos, los factores de bioconcentración y los procesos de acumulación en diferentes tejidos.

1. ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN TEJIDOS BIOLÓGICOS.

Se han estudiado muestras de ostras (*Crassostrea gigas*) y berberecho (*Cerastoderma edulis*). Antes de eliminar las conchas de los bivalvos, se depuraron con agua de mar limpia y filtrada (0.45 mm) durante 24 horas. El tejido se homogenizó y se dividió en dos partes. Una de ellas se conservó a -20oC y la otra se liofilizó y se conservó a 40C. Se determinó la concentración inicial de los compuestos organoestánnicos, tanto en las muestras fresca como liofilizadas, observándose que el proceso de liofilización es un excelente procedimiento de secado de las muestras que no produce inter-conversión de especies. Los análisis posteriores se realizaron a los 15, 30, 60, 90, 150, 210, 270, 365 y 540 días.

En la Fig. 1 se muestran los contenidos de butilestaño en función del tiempo de conservación. Se observa que los compuestos de butilestaño son estables, tanto en los berberechos como en las ostras frescas a -200C durante 7 meses (210 días). Como se puede observar en la gráfica, el contenido de TBT disminuye, alrededor del 14% después de 270 días, mientras que se produce un aumento correlativo en el contenido de DBT. En el caso de muestras liofilizadas y conservadas a 40C, se observa que la concentración de TBT disminuye a partir de 150 días.

Figura 1. Estabilidad de las especies de butilestaño en: a) *C. gigas* fresca a -200C; b) *C. gigas* liofilizada a 40C; c) *C. edulis* fresca a -200C; d) *C. edulis* liofilizada a 40C.

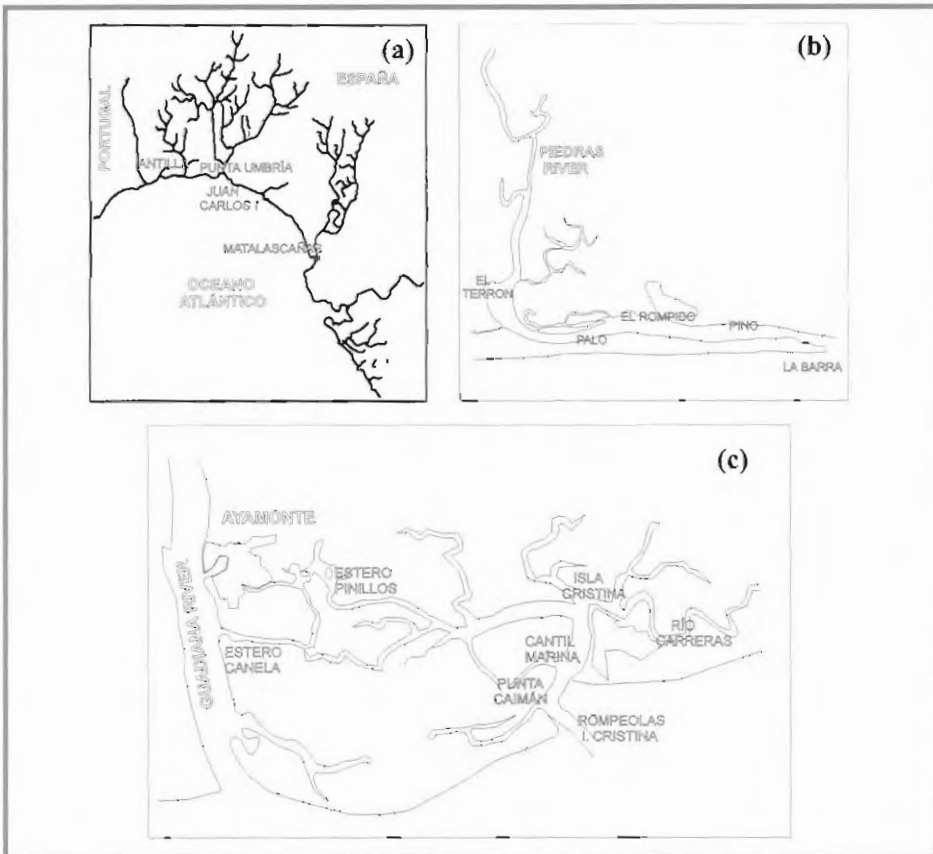


2. VARIACIÓN ESPACIAL EN BIVALVOS DEL SUROESTE ANDALUZ

El muestreo se llevó a cabo en 16 estaciones distribuidas a lo largo de 3 áreas de la costa de Huelva (Fig. 2):

- Costa de Huelva, se consideran playas arenosas (Matalascañas y la Antilla), y los espigones de Juan Carlos I y Punta Umbria.
- Río Piedras posee una gran barrera de arena en la desembocadura lo que provoca un encerramiento del agua. Hay dos fuentes potenciales de compuestos organoestánnicos: el puerto deportivo de El Rompido y el puerto pesquero de El Terrón.
- Ayamonte e Isla Cristina se encuentran en las marismas de dos ríos (río Guadiana y río Carreras, respectivamente) conectados entre sí por canales. En este sistema pueden destacarse los esteros de Canela y Pinillo, los puertos pesqueros de Ayamonte e Isla Cristina y el puerto deportivo de El Cantil.

Figura 2. Área de estudio de la costa de Huelva.



(a) Puntos de muestreo en la Costa de Huelva; (b) puntos de muestreo en el área de Ayamonte-Isla Cristina; (c) puntos de muestreo en el Río Piedras

Figura 4. Concentración media del TBT (\pm SD) (ng g⁻¹, de Sn en peso seco) en *V. decussata* entre febrero de 1991 y noviembre de 1998: (a) Puerto de Isla Cristina; (b) Puerto del Terrón.

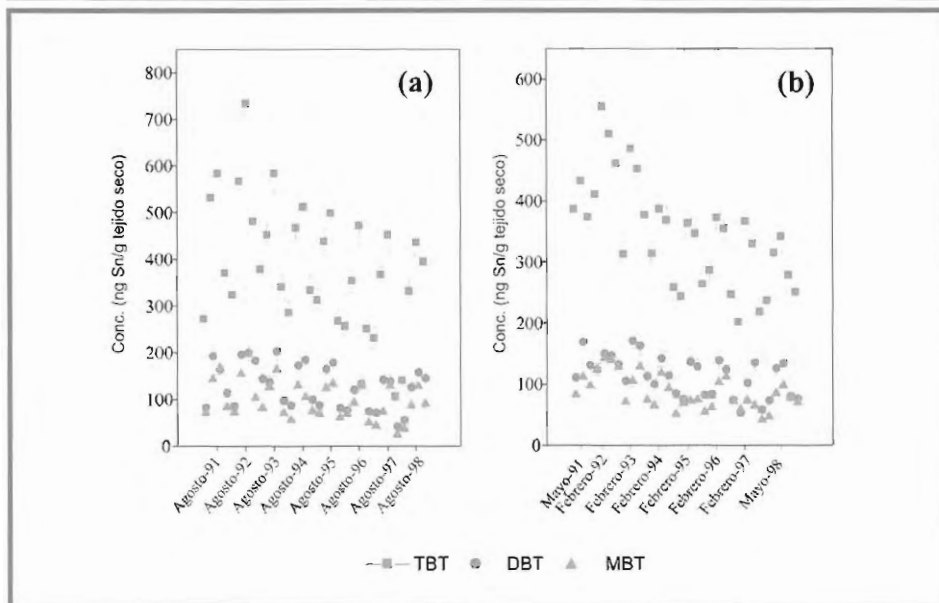


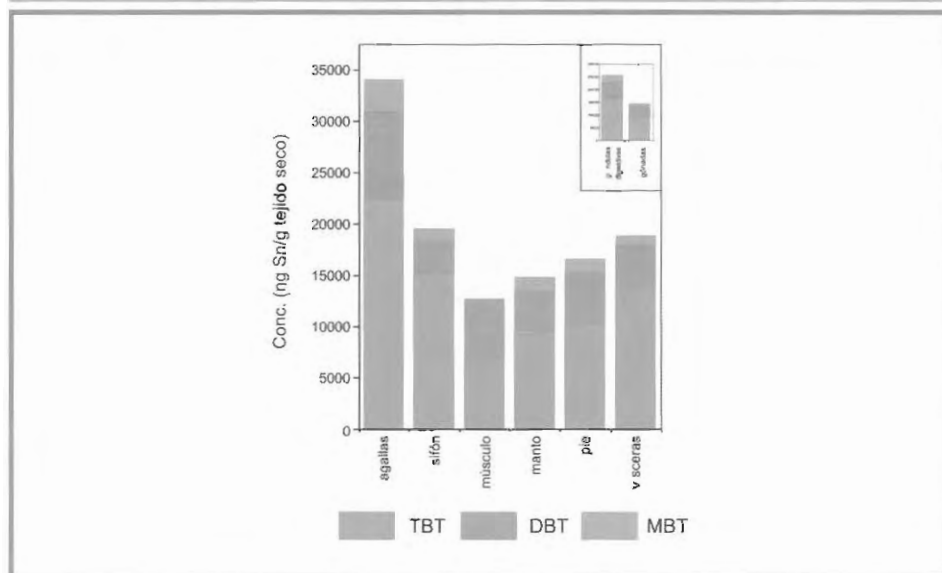
Tabla 1. Factores de Bioconcentración (ng Kg⁻¹ ng·l⁻¹) en moluscos de las costas del Suroeste de España.

ORGANISMO	ESPECIE	BCF
OSTRA	<i>C. angulata</i>	50.000 - >480.000
BERBERECHO	<i>C. edulis</i>	24.000 - 140.000
ALMEJA	<i>V. decussata</i>	18.000 - 100.000
	<i>V. semidecussata</i>	17.000 - 110.000
	<i>C. gallina</i>	> 290.000
	<i>R. philippinarum</i>	> 83.000
MEJILLÓN	<i>M. galloprovincialis</i>	27.000 - > 360.000
LAPA	<i>P. vulgata</i>	47.000 - > 290.000

5. ACUMULACIÓN DEL TBT EN DIFERENTES TEJIDOS

La experiencia de acumulación del TBT se llevó a cabo en almeja fina (*V. decussata*) de 3 años de edad (concha de 35 mm de amplitud). Las almejas se expusieron durante 10 días a la acción del agua de mar que contenía 900 ng Sn l⁻¹ de TBT (500 ml de agua de mar por almeja). Durante el tiempo que duró la experiencia se renovó el agua diariamente y se limpiaron los tanques. Una vez finalizada la experiencia se tomaron 20 individuos, se disecaron y extrajeron las vísceras, agallas, sifón, músculo, manto y pie. Posteriormente, se liofilizaron los diversos tejidos para determinar en ellos, los compuestos organoestánicos. Los resultados se muestra en la Fig. 5, en donde se observa que las mayores concentraciones de TBT se encuentran en las agallas, seguidas por el sifón y las vísceras. En el resto de los tejidos las concentraciones son inferiores. En las vísceras se analizaron las gónadas y las glándulas digestivas independientemente, siendo la concentración del TBT mucho mayor en estas últimas.

Figura 5. Distribución del tributilestaño (TBT), dibutilestaño (DBT) y monobutilestaño (MBT) en diferentes tejidos de *V. decussata* expuesta a 900 ng l⁻¹ (como Sn) de TBT durante 10 días.



CONCLUSIONES

En la evaluación ambiental de la presencia de compuestos organoestánicos en bivalvos, junto a la concentración de las diversas especies químicas presente en los mismos debe tenerse en cuenta los siguientes factores:

- 1) Los compuestos butilados de estaño en ostras y berberecho son estables durante 3 meses y cuando se conservan liofilizada a 40C, y a -200C.
- 2) Los niveles más altos de TBT se encuentra en los puertos, tanto deportivos (Isla Cristina) como pesqueros (El Rompido)
- 3) Se debe monitorizar el muestreo de bivalvos para la determinación del TBT teniendo en cuenta la estación del año (verano o invierno) y el área en donde se realiza (puerto recreativo o puertos pesqueros)
- 4) De los organismos estudiados, las ostras y los mejillones son los que presenta mayor capacidad de acumulación de TBT.
- 5) La tendencia de acumulación de TBT en los distintos tejidos de la *V. decussata* es: agallas > sifón > vísceras > manto > músculo.

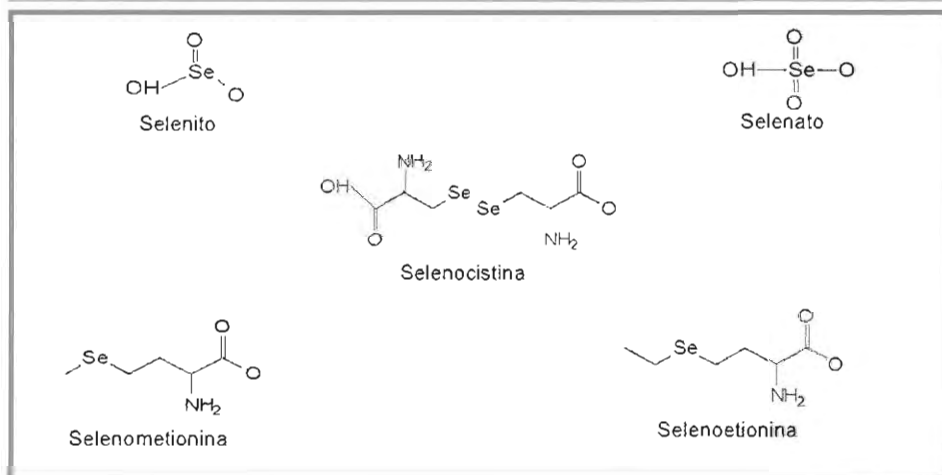
OPTIMIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE SELENIO NO VOLÁTILES EN MUESTRAS DE BIOTA

Marco Antonio Caro de la Torre, Inmaculada Giráldez Díaz
y José Luis Gómez Ariza

Departamento de Química y Ciencias de los Materiales. Escuela Politécnica Superior.
Universidad de Huelva, Campus de La Rábida. Ctra. de Palos de la Ftra. s/n. 21819 Huelva.

El selenio es un elemento esencial para la mayoría de los organismos vivos, en los que desempeñan diversas funciones, como la protección de las membranas. En la naturaleza, el elemento se puede encontrar en diversas especies químicas, tanto inorgánicas como orgánicas, en muestras medioambientales. La toxicidad de este elemento depende de la forma en que se encuentre dentro del organismo, reduciéndose su carácter tóxico cuando se integra en una estructura orgánica, por ejemplo en aminoácidos. En la Fig. 1 se representan las especies químicas que se han estudiado.

Figura 1. Especies estudiadas



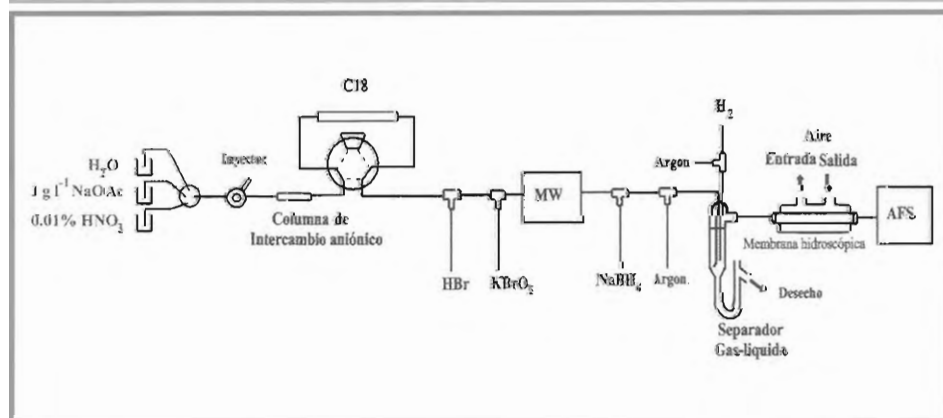
La especiación de compuestos no volátiles de selenio se realiza acoplando la cromatografía líquida de alta resolución con detectores atómicos específicos. Para la separación de las especies inorgánicas (selenito y seleniato) se han empleado columnas de intercambio aniónico y de fase reversas con agentes de pares iónicos, usando ICP-OES o GFAAS como sistema de detección. La especiación de compuestos orgánicos no volátiles suele implicar el empleo de la cromatografía líquida o la cromatografía gaseosa. En esta última técnica es necesario derivatizar los compuestos para transformarlo en formas volátiles lo que complica la metodología analítica presentando, además, peores límites de detección.

La determinación simultánea de selenio inorgánico y de selenoaminoácidos es muy compleja, debido a las diferencias en las características fisicoquímica de estas especies. Algunos autores utilizan una columna de intercambio aniónico fuerte para la separación de los compuestos de selenio tanto inorgánico como orgánico, pero es necesario un desarrollo cromatográfico de 30 min para separar 4 compuestos. Otros separa las especies de selenio usando pares iónicos pero el sistema no es eficiente para las especies de selenio inorgánico.

2. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE SELENIO

Se ha desarrollado un acoplamiento instrumental eficiente para el estudio de 5 compuestos de selenio: selenito, seleniato, selenocisteína, selenometionina y selenoetionina. El acoplamiento HPLC-MW-HG-AFS se muestra en la Fig. 2, estando integrado por un acoplamiento de columnas cromatográficas ("column switching") empleando una válvula de conexión ("valve switching") y dos columnas una de intercambio aniónico para la separación de Se(IV) y Se(VI), y otra de fase reversa (C-18) para Se-metionina, Se-etionina y Se-Cisteína.

Figura 2. Esquema del acoplamiento HPLC-MW-HG-AFS



Los compuestos de selenio que se eluyen de la columna cromatográfica se mezclan "on-line" con un reactivo rédox para destruir los selenoaminoácidos y que se transformen en selenito (SeIV). Se utiliza un loop de PTFE de 6 metros de longitud, que se introduce en un horno microondas doméstico a 150 W. El reactivo rédox consiste de una disolución de KBrO_3 15 mM (flujo = 0.6 ml/min) y una disolución de HBr 47% (flujo = 1.2 ml/min). Después, las especies de selenio transformadas a selenito son enfriadas en un loop que se encuentra inmerso en un baño de hielo. La generación de hidruro se lleva a cabo "on-line" adicionando una disolución de NaBH_4 al 1.5% (p/v) en NaOH al 1% (p/v) con un flujo de 1 ml/min. Los hidruros formados son transportado al separador gas-líquido con la ayuda de un flujo de 100 ml/min de argón, siendo necesario un segundo flujo de 200 ml/min de argón para transportarlo al sistema de detección (fluorescencia atómica, AFS). Se adiciona un flujo de 60 ml/min en el separador gas-líquido para mantener una llama de difusión de hidrógeno en el detector.

3. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se han estudiado los siguientes aspectos de la separación cromatográfica:

- 1) Separación de los selenoaminoácidos mediante un mecanismo en fase reversa
- 2) Separación de selenito y seleniato mediante cromatografía de intercambio aniónico.
- 3) Optimización de la conexión entre columnas

3.1. SELECCIÓN DE LA COLUMNA DE FASE REVERSA

La separación de los selenoaminoácidos se ha llevado a cabo en una columna de fase reversa debido al mecanismo de partición que existe entre la fase estacionaria y los grupos alquilo de los analitos.

Se han probado dos tipos de columnas:

- Columna *Nucleosil C18*: con un diámetro interno de 4 mm y tamaño de partícula de 5 μm . Probándose dos longitudes 150 y 250 mm, respectivamente.
- Columna *Tracer Excel*: con un diámetro interno de 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μm y 100 mm de longitud.

Para las tres columnas se utiliza agua como fase móvil con un flujo de 1 ml/min. Los selenoaminoácidos son eluidos en el siguiente orden: selenocisteína < selenometionina < selenoetionina. El metanol no se utiliza en la fase móvil para aumentar la fuerza de elución de la misma debido a que se produce una distorsión en la línea base de la señal de AFS. Se comprobó que los resultados no son reproducibles cuando se utilizan distintas columnas comerciales tipo *Nucleosil*, por lo que se optó por una columna *Tracer Excel*, en la que los tiempos de retención de estas especies se redujeron empleando un flujo de 1.2 ml/min.

3.2. SELECCIÓN DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

La separación de las especies de selenio se lleva a cabo con una columna de intercambio aniónico, que debe cumplir dos condiciones:

- No interaccionar con los selenoaminoácidos, los cuales deben eluirse en el tiempo muerto de la columna. De esta forma no interfieren en el mecanismo de separación de la fase reversa que se utiliza posteriormente.
- Las especies de selenio inorgánico deben ser completamente retenidas en la columna de intercambio aniónico usando como fase móvil agua, que es la utilizada en la separación de selenoaminoácidos en la columna de C18.

Como columna de intercambio aniónico se utiliza una Hamilton PRP X-100 (250x4.1 mm, 10 μ m) con una disolución de acetato potasio y sulfato potásico como fase móvil para separar selenito y seleniato. La elución de las especies inorgánicas se realiza en 15 minutos. Este tiempo, sumado a los 10 minutos que se precisa para separar los selenoaminoácidos con la columna de fase reversa completa un total de 25 minutos, en los que se logra la separación de las 5 especies de selenio. Para disminuir el tiempo de en la separación cromatográfica de selenito y seleniato se probaron 2 precolumnas de intercambio aniónico:

- Hamilton PRP-X100 de base polimérica: 20x4.1 mm, 10 μ m
- Supelco SAX de base silícica: 20x4.6 mm, 5 μ m

Con la primera precolumna (PRP-X100) se retiene completamente SeMet y parcialmente SeCys y SeEt. Con la segunda precolumna (SAX) los tres selenoaminoácidos se elúan en el tiempo muerto de la columna usando como fase móvil el agua, no produciéndose distorsiones en los picos cromatográficos, y los dos compuestos inorgánicos no se eluyen después de los 10 minutos.

Se estudió la fase móvil necesaria para eluir el selenito y el seleniato de la precolumna SAX. Cuando se utiliza como fase móvil una disolución de acetato potásico se eluyen las dos especies. Por lo tanto, fue necesario emplear una elución con gradiente para lograr la separación óptima de selenito y seleniato. El selenito se eluye con una disolución de acetato al 0.4 g/l, posteriormente el contenido salino se incrementa a 1 g/l en acetato para eluir el seleniato. Los tiempos de retención para el selenito y seleniato son 3.1 y 5.5 minutos, respectivamente. Se observó que los tiempos de retención del selenito y seleniato disminuían, incluso llegaban a solaparse ambos picos, después de un prolongado uso de la precolumna. Este problema se soluciona incluyendo ciclos de regeneración de la precolumna después de cada cromatograma para restaurar la eficacia de la columna. Por ello se bombea una disolución de HNO₃ 0.01% (v/v) durante 3 minutos y posteriormente agua durante otros 3 minutos.

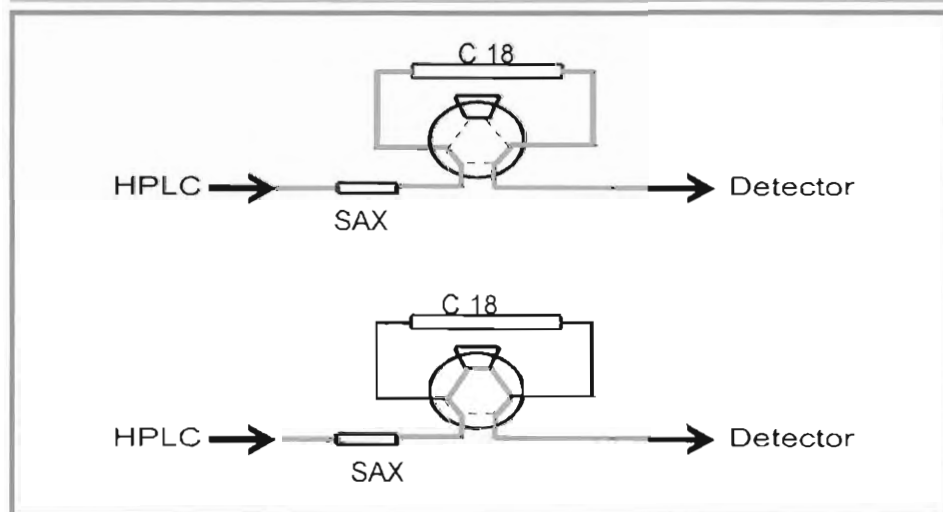
3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CONEXIÓN ENTRE COLUMNAS

La válvula de conexión de columna permite configurar el sistema en dos posiciones, como puede apreciarse en la Fig 3:

Primera posición: el agua, usada como fase móvil, pasa a través de la columna de intercambio aniónico y posteriormente por la columna de fase reversa. En esta posición se inyecta la muestra. El selenito y el seleniato son retenidos en la columna de intercambio aniónico, mientras que los selenoaminoácidos son eluidos en el volumen muerto y son transportado a la columna de fase reversa. En esta segunda columna, estas especies son separadas y el eluyente es transportado "on-line" a la etapa de tratamiento con el microondas y generación de hidruro para la posterior detección mediante AFS. Una vez que los selenoaminoácidos son detectados, la válvula de conexión de columna se rota manualmente a la segunda posición.

Segunda posición: La columna de fase reversa se encuentra en "by-pass", y la fase móvil se bombea a través de la columna de intercambio aniónico. La fase móvil se cambia de agua a disolución de acetato, siguiendo el gradiente de elución que se ha descrito en el apartado anterior, de esta forma se eluyen y detectan selenito y seleniato. Después de la regeneración de la columna de intercambio aniónico, la válvula se cambia a la posición inicial para efectuar el siguiente análisis.

Figura 3. Válvula de conexión de columnas



El tiempo necesario para la separación cromatográfica de las 5 especies de selenio es de 15 minutos. Los tiempos de retención para SeCys, SeMet, SeEt, Se(IV), Se(VI) son 2.3, 4.6, 10.6, 12.7 y 14.5 minutos, respectivamente. En la Fig 4 se muestra un cromatograma de los patrones de estos compuestos a una concentración de 10 ng/mL.

El rango lineal ($n=7$) para las 5 especies de selenio fueron calculados para los rangos de concentración entre 1 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. En todos los casos los valores de los coeficientes de regresión lineal fueron de $r > 0.998$. La repetitividad (RSD) se encuentra entre 3 y 7% RSD, calculada inyectando consecutivamente 5 veces una disolución de 5 ó 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de las especies. Los límites de detección son 0.6, 0.8, 0.9, 0.8 y 0.6 $\mu\text{g l}^{-1}$ la SeCys, SeMet, SeEt, Se(IV) y Se(VI), respectivamente.

4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE SELENIO EN BIOTA

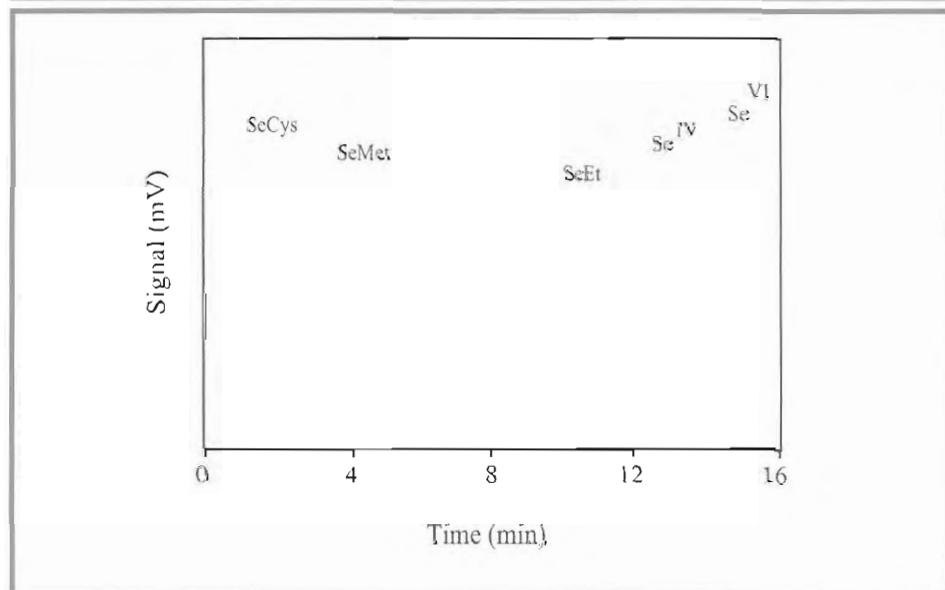
La extracción de la especies de selenio en bivalvos se ha llevado a cabo mediante tratamiento enzimático. Se mezcla 1 gr de tejido de bivalvos liofilizados con 30 mg de la enzima proteasa y 6 ml de agua en un tubo de centrifuga de teflón, la extracción de dichas especies se lleva a cabo durante 24 horas a temperatura ambiente en un agitador mecánico a 3000 rpm. El sobredanante se separa mediante centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm..

4.1. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Durante la extracción de las especies de selenio de las muestras de biota también se coextraen otras muchas sustancias (fundamentalmente lípidos) que interfieren en la determinación cromatográfica, siendo necesario, por tanto su eliminación.

Se está estudiando la eficacia de la separación de los lípidos empleando una extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos seguido de una extracción en fase sólida.

Figura 4. Cromatograma de patrones de especies de selenio con una concentración de 10 ng/mL



4.1.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Es necesario seleccionar adecuadamente el reactivo extractante para separar las sustancias que interfieren en la separación cromatográfica, y permaneciendo en la fase acuosa las especies de selenio.

El extracto del tratamiento enzimático se enriquece con cantidades conocidas de las distintas especies de selenio y se extrae a su vez con un disolvente orgánico en la relación 1:1 durante 10 minutos. Las especies presentes en la fase acuosa se determinan mediante AFS sin hacer uso del sistema cromatográfico.

Se han estudiado dos disolventes orgánicos, hexano y diclorometano. Los resultados obtenidos muestran la ausencia de pérdidas de analito independientemente del disolvente utilizado. Sin embargo, el diclorometano extrae un mayor porcentaje de lípidos que el hexano, lo que se aprecia por el color amarillo tenue de la fase acuosa.

No obstante, el diclorometano no permite extraer todos los lípidos, por lo que es necesario recurrir a la extracción en fase sólida.

4.1.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se emplean 600 mg de adsorbente sólido, en una columna de vidrio. Ésta se acondiciona y se añade la fase acuosa del apartado anterior. Los analitos son posteriormente eluidos con un volumen de disolvente adecuado con flujo de 1 ml min⁻¹, quedando retenidos los lípidos.

Se están estudiado distintos tipos de adsorbentes, así como el tipo y volumen de disolvente para eluir las especies de selenio. Los lípidos deben quedar en el adsorbente.

Los adsorbentes estudiados son los siguientes:

- Adsorbente apolares: C-18, C-18 (EC)
- Adsorbente polares: Diol, CN
- Adsorbentes de intercambio catiónico: SCX
- Adsorbentes de intercambio aniónico: SAX

AVANCES EN EL PROCEDIMIENTO DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO

Daniel Sánchez-Rodas Navarro y José Luis Gómez Ariza

Dpto. de Química y Ciencia de los Materiales. Escuela Politécnica Superior.
Universidad de Huelva. 21819 Palos de la Frontera (Huelva)

1. ANTECEDENTES

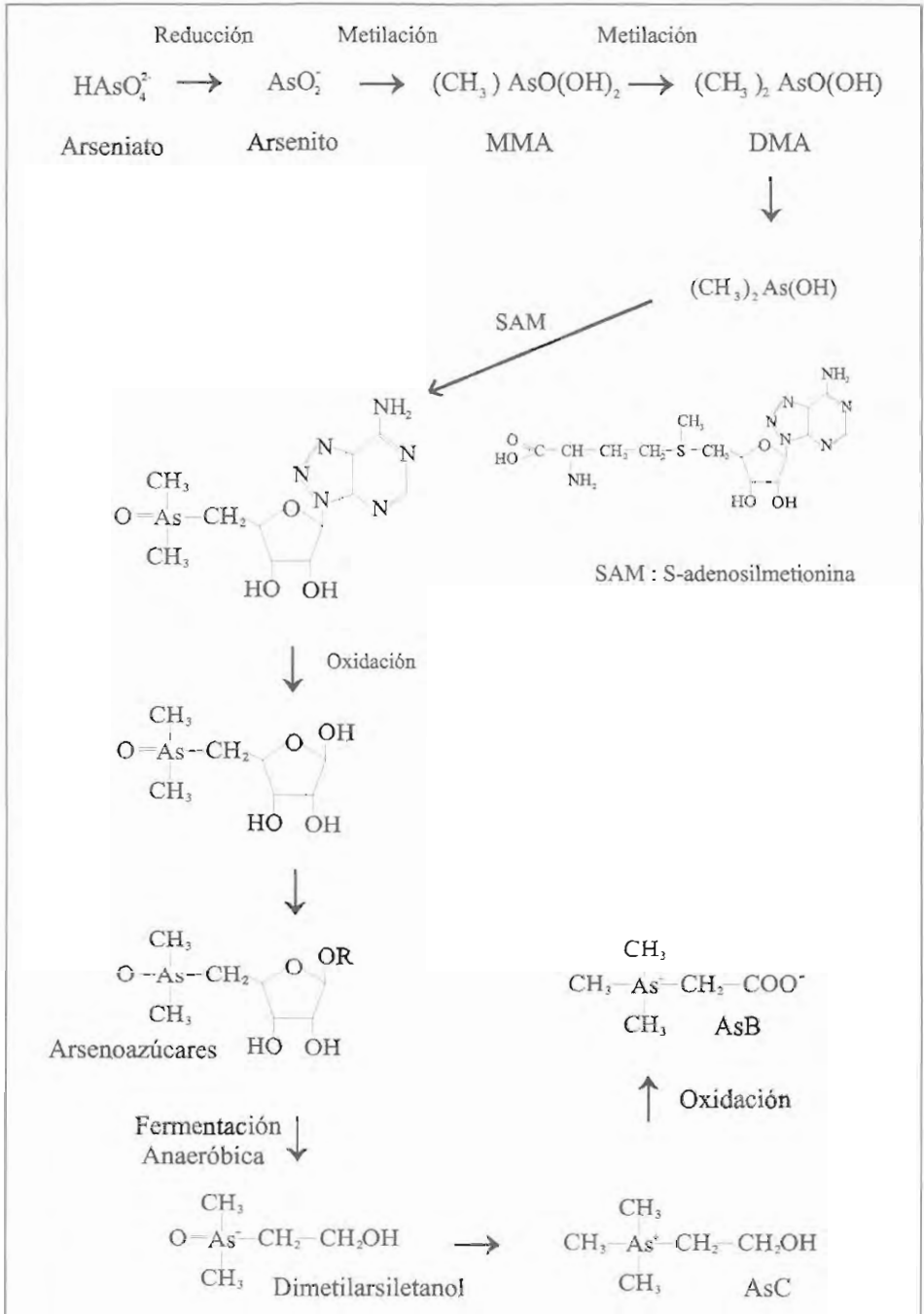
Hasta la fecha, el proyecto había abordado el estudio de las siguientes especies de arsénico en muestras de bivalvos de la costa andaluza:

- Compuestos inorgánicos: arsenito y arseniato
- Compuestos orgánicos: ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA) y arsenobetaina (AsB).

La determinación de estos compuestos se ha realizado mediante una extracción de las muestras liofilizadas con mezclas de metanol/agua y su análisis mediante cromatografía líquida-fotooxidación-generación de hidruros- espectrometría de fluorescencia atómica (HPLC-UC-HF-AFS). Los cromatogramas de las muestras de bivalvos mostraron que en muchas de ellas se detectaba la presencia de un compuesto de arsénico de naturaleza orgánica que no corresponde a ninguno de los patrones disponibles empleados en este estudio.

En la bibliografía está descrita la existencia de especies de arsénico en muestras biológicas de procedencia marina caracterizadas por la unión del arsénico a anillos ribósidos (arsenoazúcares). Estas sustancias se forman por la sustitución de un átomo de P por otro de As, debido a la similitud química de ambos elementos. El proceso de formación de estos arsenorribósidos se inicia con la metilación del arsénico inorgánico que se encuentra presente en las aguas de mar. Distintas algas y microorganismos marinos transforman el arseniato en dimetilarsénico, como resultado de un mecanismo de detoxificación. Dentro de la ruta metabólica, el dimetilarsénico experimenta nuevas reacciones químicas, para producir arsenorribósidos que a su vez, mediante reacciones de fermentación anaerobia y oxidación producen arsenobetaina como producto final. Un esquema propuesto para el ciclo del arsénico en el medio marino se muestra en la Figura 1.

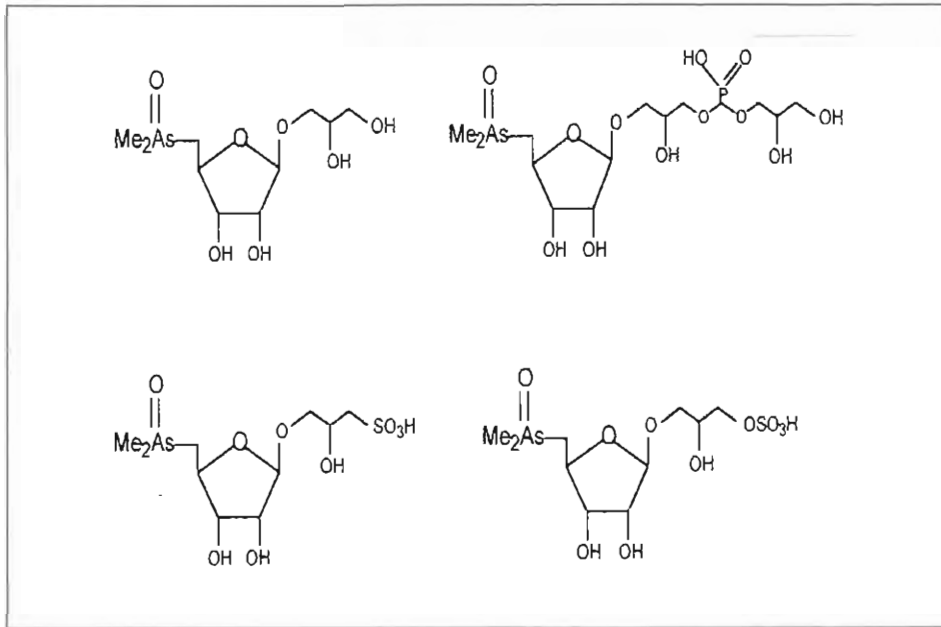
Figura 1. Ruta metabólica del arsénico en el medio marino



Los arsenozúcares más frecuentes detectados en el medio marino son cuatro, todos ellos con una estructura común y diferenciándose en una cadena lateral (Fig. 2):

- (I) 3-[5'-deoxy-5'-8dimethylarsinoyl]-β-ribofuranosyloxy]propylene glycol,
- (II) 3-[5'-deoxy-5'-8dimethylarsinoyl]-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl 2,3-dihydroxypropyl fosfato
- (III) 3-[5'-deoxy-5'-8dimethylarsinoyl]-β-ribofuranosyloxy]-2-ácido hydroxypropanesulfónico
- (IV) 3-[5'-deoxy-5'-8dimethylarsinoyl]-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl hidrógeno sulfato.

Figura 2. Estructura de los arsenozúcares

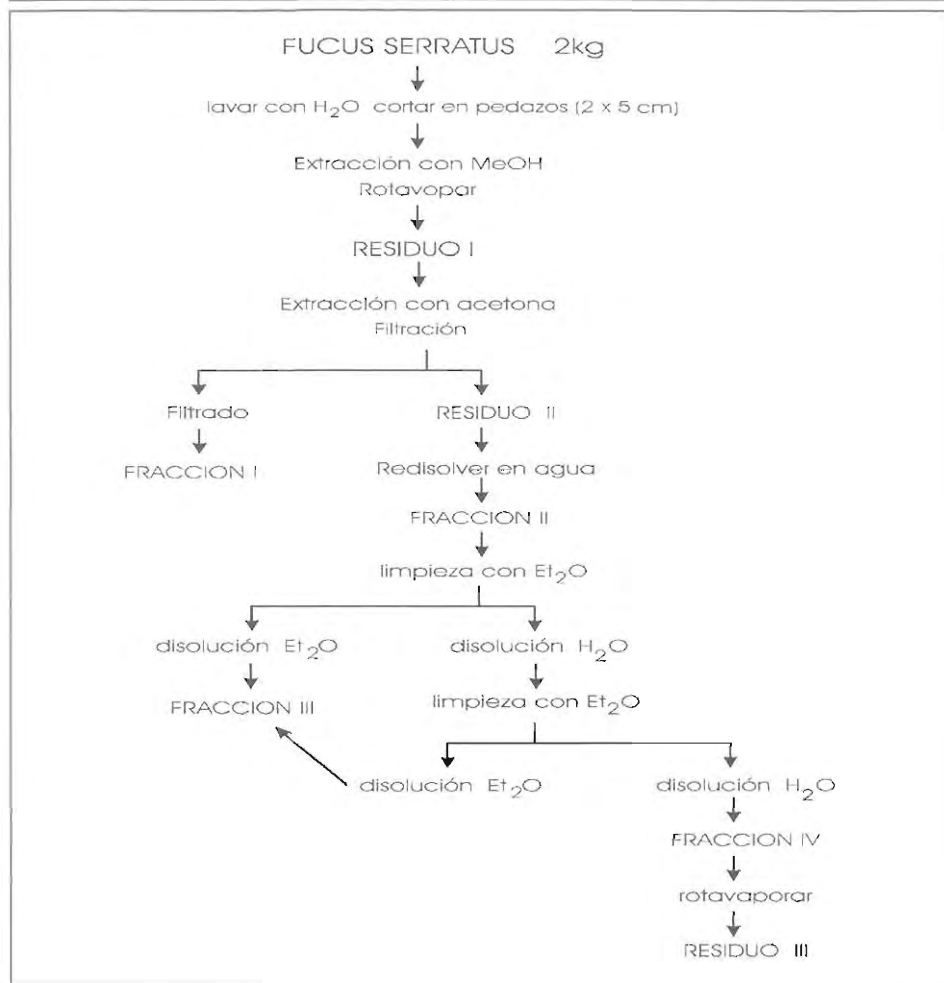


2. AISLAMIENTO DE ARSENOZÚCARES

Debido a que los arsenozúcares no son productos comerciales, es necesario su aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales. Para ello nuestro grupo de investigación trabajó en colaboración con el Dr. FK. Francesconi (Universidad de Odense, Dinamarca) para lograr el aislamiento de los arsenozúcares presentes en las muestras de estudio.

Los arsenozúcares se aislaron a partir de un macroalga (*Fucus serratus*) que crece en la costa danesa. Se tomaron 2 Kg de alga, se cortó en trozos y se extrajo con metanol. La disolución resultante se evapora, separándose un residuo que se extrae con acetona y se filtra. El residuo de la filtración se redisolvió en agua y se lavó varias veces con dietiléter. Después de rotavaporar el agua se obtiene un residuo que contiene los cuatro arsenozúcares. El esquema de la extracción se muestra en la Fig. 3.

Figura 3. Esquema de Extracción de los arsenozúcares



3. PURIFICACIÓN DE LOS ARSENOZÚCARES

El residuo con los cuatro arsenozúcares se redissolvió en agua y se sometió a una separación en columna preparativa de intercambio iónico, empleando como eluyente una disolución amortiguadora de TRIS a pH 8.0. Mediante un colector de fracciones colocado a la salida de la columna se recogieron alícuotas de 10 ml. El arsénico total en cada fracción se midió mediante cámara de grafito-espectroscopía de absorción atómica (GF-AAS). El orden de elución de los compuestos fue I, II, III y IV.

Para separar el TRIS de los arsenozúcares, se tomó cada fracción de arsenozúcar y se purificó en una columna de permeación sobre gel, eluyéndose primero el arse-

noazúcar y después el TRIS. La fracción acuosa conteniendo el arsenoazúcar se llevó a sequedad y se guardó a -20°C .

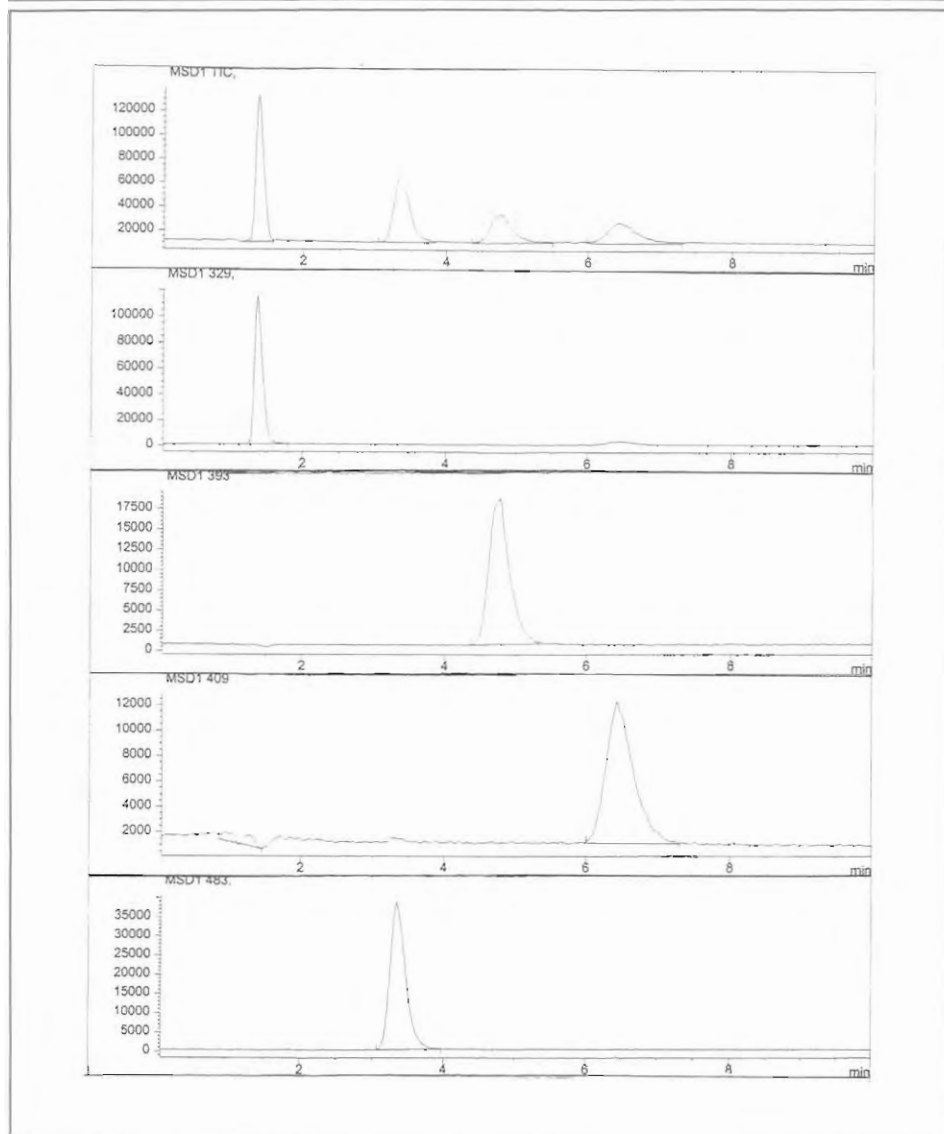
4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La separación cromatográfica y detección de arsenoazúcares se realizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Se empleó una columna de intercambio iónico (Hamilton PRP X-100) y como fase móvil una disolución (30/70) MeOH/20 mM NH_4CO_3 a pH 9.5. Para la detección se seleccionó la masa/carga correspondiente al ión molecular protonado de cada especie:

Arsenoazúcar	m/z
(I) R-OH	329
(II) R-PO ₄	483
(III) R-SO ₃	393
(IV) R-SO ₄	409

La separación, en condiciones isocráticas, se realiza en menos de 10 minutos. Un cromatograma correspondiente a 100 ppb de cada especie se muestra en la Fig 4.

Figura 4. Cromatograma mediante LC-MS de cuatro arsenozúcares

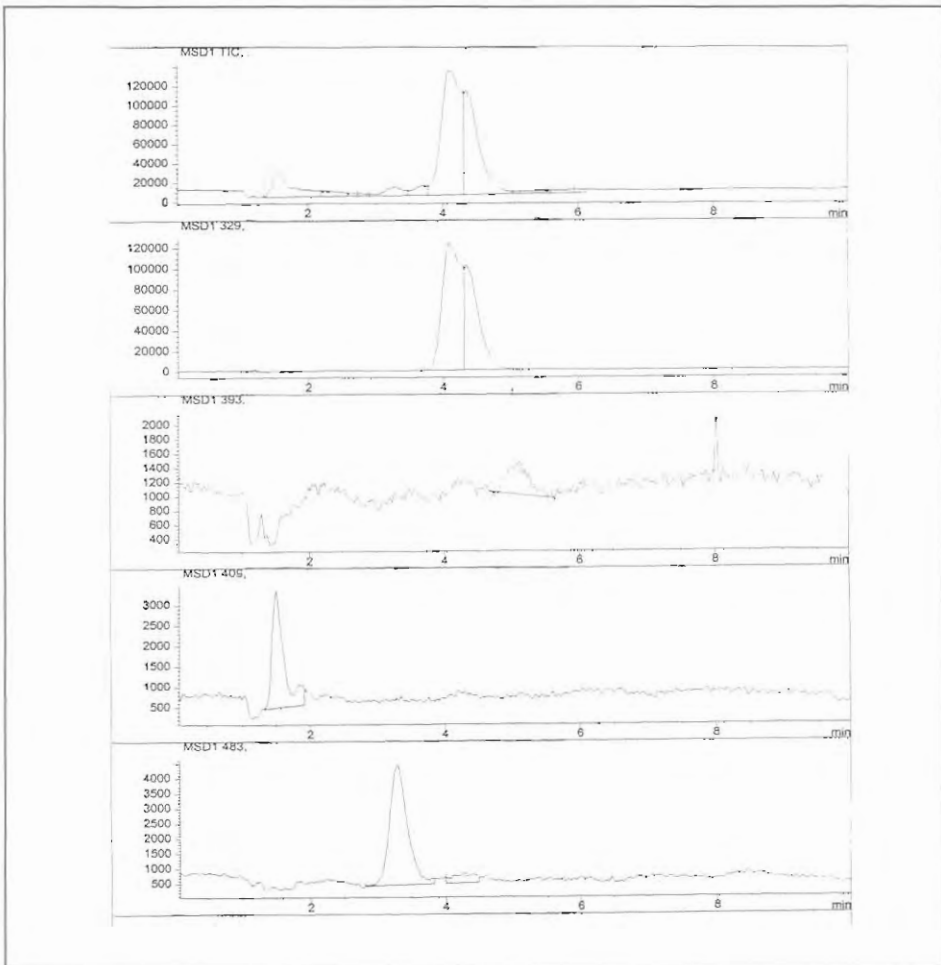


5. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARSENOAZÚCARES EN BIVALVOS

Se analizaron dos muestra liofilizadas de coaquina (*Donax trunculus*) tomadas en la zona de Mazagón en enero y junio del 2000. Para la extracción de los arsenoazúcares se tomaron 0.25 g de muestra y se trataron con 5 ml de agua y ultrasonidos durante 1 minuto. A continuación la muestra se centrifugo a 40000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se inyectó en el LC-MS.

Los resultados que se obtuvieron indican que la especie desconocida que se observó en las experiencias anteriores corresponde a uno de los cuatro arsenoazúcares, concretamente al (II), un dimetilarsinoil-fosfato ribósido. El cromatograma correspondiente se representa en la Fig 5.

Figura 5. Cromatograma mediante LC-MS de una muestra de coaquina



DETERMINACIÓN DE ESPECIES VOLÁTILES DE SELENIO (DIMETILSELENIO, DIMETILDISELENIO, DIETILSELENIO) EN SEDIMENTOS MEDIANTE PREEVAPORACIÓN Y DETERMINACIÓN POR GC-MS

A. Velasco-Arjona, I. Giráldez, D. Sánchez-Rodas,
E. Morales y J.L. Gómez-Ariza

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales.
Escuela Politécnica Superior, Campus de La Rábida, Universidad de Huelva, Huelva

Aunque las especies orgánicas de selenio son menos tóxicas que las inorgánicas, puede absorberse fácilmente en los tejidos humanos produciendo serios trastornos. Muchas de estas especies orgánicas se originan en la naturaleza como consecuencia de diversos mecanismos de detoxificación, transformándose los seleniuros inorgánicos (muy tóxicos) en especies metiladas. Existe una clara evidencia de la producción de especies orgánicas volátiles de selenio, especialmente dimetilselenio (DmeSe) y dimetildiselenio (DMeDSe) a partir de seleniuros inorgánicos, así como selenocistina y selenometionina por la acción de los hongos, plantas y animales en el medio ambiente. El DMeDSe se ha encontrado también en niveles de 0.08 a 0.98 mg m³ en el aliento humano. Por todo ello es necesario el desarrollo de métodos analíticos para la especiación química de compuestos volátiles de selenio en este tipo de muestras.

Los seleniuros volátiles se han analizado, fundamentalmente, por cromatografía de gases, especialmente en muestras de aire, las cuales se inyectan directamente en el cromatógrafo o se atrapan sobre un sorbente para su posterior desorción mediante el uso de un disolvente o de un programa de temperatura. También se han propuesto diversos sistemas GC-AAS con una etapa de purga y atrapamiento previa, especialmente para el estudio de DMeSe, dietilselenio (DEtSe) y DMeDSe, y el sistema GC-GF-AAS para determinar 0.1 ng de DMeSe y DEtSe y 0.2 ng de DMeDSe. Este mismo límite de detección (0.1 ng) se ha alcanzado para DMeSe y DMeDSe empleando GC-QF-AAS.

Los métodos propuestos para la determinación de compuestos volátiles en muestras sólidas generalmente implica el uso de la cromatografía de gases acoplada con un sistema de espacio de cabeza dinámico o estático. Sin embargo estas técnicas presentan varios inconvenientes, el espacio de cabeza dinámico proporciona recuperaciones bajas, lo que se ha comprobado mediante experiencias de fortificación en muestras de peces y sedimentos. La aplicación del espacio de cabeza estático a muestras de sedimentos presenta problemas derivados de la dependencia del equilibrio de partición de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase gaseosa de las características de la propia

matriz, que dificulta su aplicación a muestras ambientales con contenidos elevados de materia orgánica.

En este estudio se han optimizado varios métodos de extracción de especies de selenio: DMeSe, DMeDSe y DEtSe, a partir de sedimentos empleando la preevaporación como técnica extractiva y el acoplamiento GC-MS como sistema analítico de especiación.

PROCEDIMIENTO

EXTRACCIÓN SIN PRECONCENTRACIÓN (FIG. 1A)

Se colocan 5 g de muestra en la cámara inferior del módulo de preevaporación, colocando un espaciador entre este compartimento y la membrana, con objeto de dejar un espacio vacío entre la superficie de la muestra y la membrana. El módulo se cierra después de colocar la membrana y la cámara superior. Los analitos y el patrón interno se inyectan en el compartimento inferior y la mezcla se agita con un agitador magnético. Finalmente, el módulo de preevaporación se coloca en una bañía de agua a 70°C.

Después de 3 min, se abre la válvula de tres vías y una corriente de helio arrastra los analitos preevaporados al cromatógrafo de gases.

EXTRACCIÓN CON PRECONCENTRACIÓN EN FASE SÓLIDA (FIG. 1B)

Durante la extracción, una corriente de nitrógeno arrastra a los analitos de la cámara superior a una columna de adsorción colocada en un bañía de hielo (0°C). Después de 7 min, la válvula se abre y la columna de preconcentración se calienta eléctricamente a 150°C, lo que provoca una desorción de los analitos que se conducen al cromatógrafo de gases mediante corriente de He.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y ELECCIÓN DEL PATRÓN INTERNO

Se ha probado varias rampas de temperatura de 5 a 20°C min⁻¹. Las temperaturas iniciales y finales fueron 35 y 250°C. El inyector se calentó a 280°C y se inyectó 5 ml de una mezcla de tres compuestos orgánicos de selenio en el modo splitless (tiempo de purga 0.5 min). La rampa óptima de temperatura fue de 10°C min⁻¹.

Para la elección del patrón interno se probaron varios reactivos, comprobándose sus tiempos de retención. El 1-bromopentano se eligió como patrón interno más adecuado, al proporcionar un pico bien resuelto respecto a las señales de selenio y reducir considerablemente la RSD de los resultados al emplearlo en la cuantificación.

OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES

En todas las experiencias se emplearon 5 g de tierra de diatomea como matriz sólida para la cámara inferior, fortificándola con 15 ng de DmeSe, 25 ng de DetSe y 20 ng de DMeDSe en agua destilada.

PROCEDIMIENTO A

En la Tabla 1 se muestran todas las variables estudiadas para la extracción de compuestos orgánicos de selenio, señalándose los rangos y valores óptimos.

El módulo de preevaporación se acopla con el sistema cromatográfico y su compartimento superior se introduce en el loop de la válvula de inyección (Fig. 1A). El proceso de preevaporación se intensifica con la ayuda de un baño de agua a temperaturas entre 30 y 85°C. Las áreas de los picos aumenta con la temperatura hasta alcanzar un máximo a 70°C (Tabla 2). Temperaturas superiores no mejora la extracción y, por tanto, la precisión disminuye, probablemente por la dificultad de estabilizar la temperatura del baño.

Se ha optimizado el tiempo necesario para preconcentrar los analitos sobre el gas estático en el compartimento superior. La señal se obtiene incluso sin llevar a cabo una etapa de preconcentración debido a la alta volatilidad de los analitos. Se han probado varios tiempos de preconcentración desde 0 a 10 min (Tabla 1), encontrándose el valor óptimo a los 3 min.

La Fig. 2A muestra el cromatograma obtenido para una muestra fortificada con 20 ng de Se en las diferentes especies ensayadas u el patrón interno.

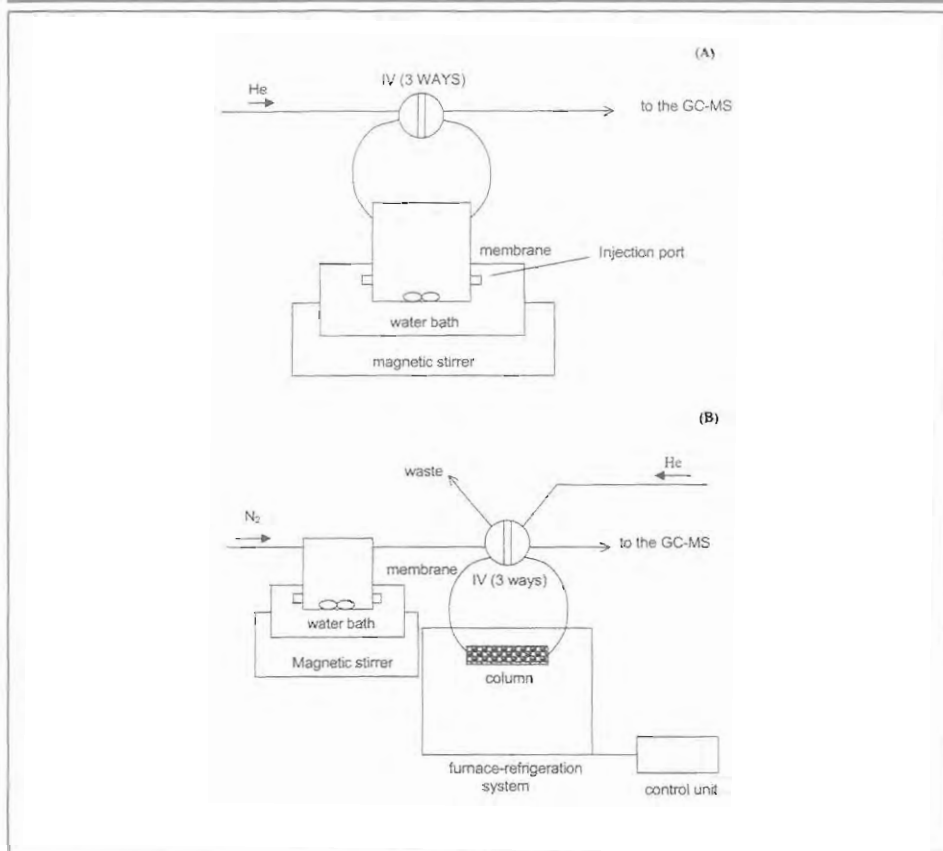
Tabla 1.- Optimización de variables

Parámetro	Rango	Valor óptimo
Temperatura del baño, °C	30 - 85	70
Tiempo de preconcentración, min ^a	0 - 10	3
Tiempo de preconcentración, min ^b	0 - 15	7
Temperatura de la trampa, °C	-50 - 25	0
Temperatura en la purga, °C	50 - 250	150
Flujo de He, ml min ⁻¹	14 - 60	52
Flujo de N ₂ , ml min ⁻¹	4 - 50	35

^a Procedimiento A

^b Procedimiento B

Figura 1. Esquema del acoplamiento instrumental del módulo de pervaporación al sistema GC-MS. A) Procesamiento sin preconcentración; B) Procedimiento con preconcentración.



PROCEDIMIENTO B

Se probaron flujos de nitrógeno de 4 a 50 ml min⁻¹ calentando la cámara de pervaporación a 70 °C. La temperatura de la trampa absorbente se fija a 0°C llevando a cabo la desorción a 200°C con un flujo de He de 52ml min⁻¹. El control del flujo se realiza con una válvula de aguja que regula el flujo de gas. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El valor óptimo de flujo se encontró en torno a 35 ml min⁻¹. El uso de flujos pequeños limitan el transporte completo de los analitos a la trampa, pero los flujos muy elevados tampoco hacen posible una buena absorción de los mismos.

Los tiempos de preconcentración en la columna de Tenax se modificaron de 0 a 15 min. Obteniéndose valores elevados de área de pico en el intervalo de 7 a 10 min, por lo que se selecciona el tiempo de preconcentración de 7 min.

Con objeto de optimizar la temperatura de la trampa, se probaron tres alternativas: (i) sumergir la columna de preconcentración en mezcla criogénica CO₂(s) /etanol (tem-

peratura alrededor de -50°C), (ii) emplear un baño hielo/agua (temperatura de 0°C), y (iii) mantenerlo a temperatura ambiente (25°C). Con los dos primeros procedimientos se obtuvieron la misma área de pico, pero con la tercera experiencia el área se reducía, por lo que se elige la segunda opción que genera resultados optimios a un precio más reducido y con un dispositivo experimental más simple.

Se probaron temperaturas de desorción entre 50 y 250°C aumentando la temperatura hasta alcanzar un valor constante para temperaturas superiores a 150°C , tomándose este valor como óptimo. Con objeto de encontrar el mejor valor de flujo de He se estudió el rango entre los valores mínimos y máximo del mismo que estabilizaba la presión de la columna ($50\text{-}250\text{ ml min}^{-1}$), comprobándose que cuanto mayor era el flujo utilizado mayor era el área de los picos.

La Fig. 2.B muestra el cromatograma que se obtiene para una muestra fortificada con 20 ng de Se de cada analito y patrón interno.

Tabla 2. Valores de área de pico en procesos de pervaporación estimulados por calentamiento del módulo en el baño de agua

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Área relativa de pico* \pm SD (%)		
	DMeSe	DEtSe	DMeDSe
30	75 \pm 4.0	52 \pm 3.6	51 \pm 4.4
40	80 \pm 3.8	72 \pm 4.8	70 \pm 3.9
50	89 \pm 5.2	81 \pm 2.9	80 \pm 4.5
60	98 \pm 3.7	95 \pm 4.1	92 \pm 4.2
70	97 \pm 3.9	99 \pm 3.7	98 \pm 4.1
80	100 \pm 5.1	97 \pm 6.0	100 \pm 5.5
85	99 \pm 5.8	100 \pm 5.7	98 \pm 6.6

*Área Relativa de pico = (área de pico/área máxima del pico) x 100

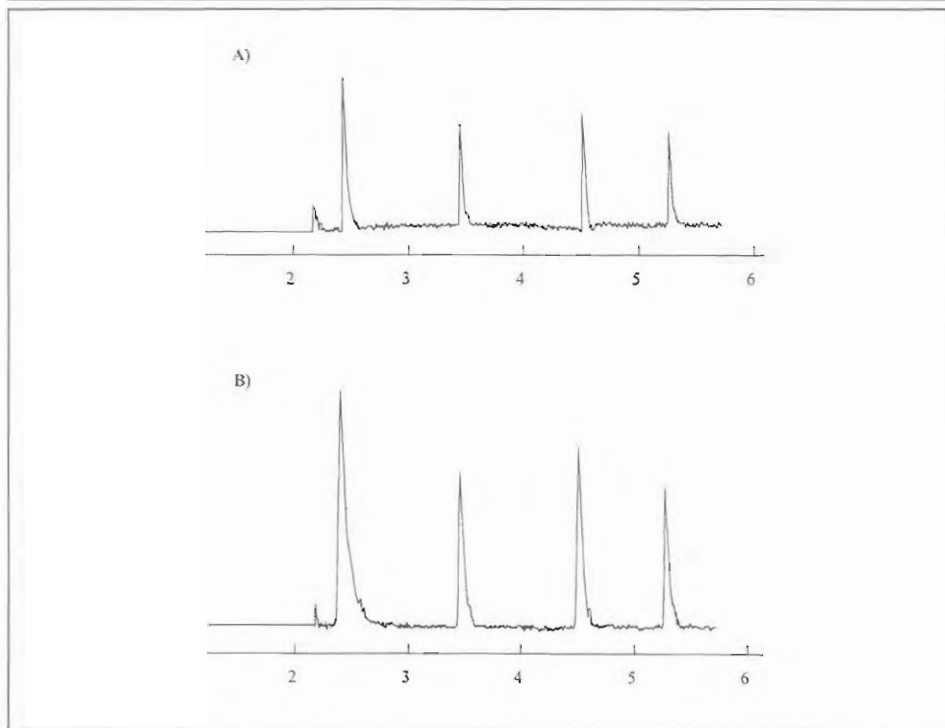
Tabla 3.- Valores de area de pico con diferentes flujos de nitrógeno

Flujo de N_2 (ml min^{-1})	Área relativa de pico* \pm SD (%)	
	DMeSe	DEtSe
4	79 \pm 4.0	48 \pm 3.4
10	87 \pm 3.8	70 \pm 4.2
20	97 \pm 4.4	80 \pm 2.9
30	98 \pm 3.7	97 \pm 4.7
35	97 \pm 3.9	100 \pm 4.1
40	100 \pm 4.3	94 \pm 5.2
50	90 \pm 5.6	87 \pm 4.6

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Con objeto de comprobar la eficiencia de la pervaporación, así como de los sistemas de preconcentración y desorción, se llevó a cabo una curva de calibrado correspondiente a cada especie química estudiada, empleando una inyección directa en el cromatógrafo. Estas curvas se compararon con las obtenidas introduciendo patrones en el módulo de pervaporación y empleando los procedimientos de análisis con y sin preconcentración (Tabla 4).

Figura 2. A) Cromatograma obtenido sin preconcentración (muestra fortificada con 20 ng de Se de cada analito). B) Cromatograma obtenido después de una etapa de preconcentración (muestra fortificada con 20 ng de cada analito).



Es necesario llevar a cabo una cuidadosa selección del disolvente con objeto de evitar su coelución con los analitos. Por tanto, se probaron varios disolventes inyectando alícuotas de 5 ml en el espacio de cabeza. Ninguno de los disolventes probados podría usarse para todos los analitos y por tanto es necesario utilizar dos curvas de calibración, una en n-pentano (para DmeSe y DetSe) y otra en n-decano (para DMeSe), Tabla 4. La precisión se mejora utilizando 1-bromopentano como patrón interno, que se añade a la muestra por el puerto de inyección. Los límites de detección se calcularon como $3sm+sB$ (sm = desviación estándar de la media; sB = desviación estándar del blanco), evaluando 7 blancos.

En el cromatógrafo se introdujeron alícuotas de 1 ml que se analizaron por GC-MS. Las curvas de calibración fueron lineales para cantidades de selenio (como Se) inferiores a 41 ng (coeficiente de correlación, $r = 0.998$) para el DMeSe, 61 ng ($r=0.997$) for DEtSe y 37 ng ($r=0.998$) para DMeSe. Los límites de detección se estimaron en 0.5 ng, 0.7 ng y 0.5 ng para DMeSe, DEtSe y DMeDSe, respectivamente. Las sensibilidades (pendiente de las curvas de calibración) fueron 95.3 ± 3.1 , 106 ± 3.3 y 253 ± 4.3 mg⁻¹ de Se para DMeSe, DEtSe y DMeDSe, respectivamente. Las disoluciones se analizaron al menos cinco veces con desviaciones estándar relativas inferiores al 8% cuando se usaba la altura de los picos. La respuesta del detector empleando el área de los picos era generalmente inferior al 5%. Por esta razón se emplearon las áreas en estudios posteriores.

Tabla 4.- Características del método de pervaporación

Analito	Rango lineal (ng Se)	Sensibilidad (pendiente curva de calibración)	r	Limite de detección (ng Se)
A) Sin preconcentración				
DMeSe	<82	76.4	0.996	2.8
DMeDSe	<83	181	0.997	3.3
DEtSe	<96	78.2	0.995	2.9
B) con preconcentración				
DMeSe	<86	98.2	0.998	0.3
DMeDSe	<75	246	0.999	0.5
DEtSe	<91	112	0.998	0.6
C) Características del método de inyección directa				
DMeSe	<90	95	0.998	0.5
DMeDSe	<81	253	0.998	0.5
DEtSe	<102	106	0.997	0.7

Las curvas de calibración obtenidas mediante el procedimiento sin preconcentración (Tabla 4A) eran lineales para cantidades de las especies de selenio (como Se) inferiores a 72 ng ($r = 0.996$) para DMeSe, 96 ng ($r=0.995$) para DEtSe y 71 ng ($r=0.997$) para DMeSe. Los límites de detección son 2.8 ng, 2.9 ng y 3.3 ng para DMeSe, DEtSe y DMeSe, respectivamente. Las sensibilidades (pendiente de la curva de valoración) fueron 76.4, 78.2, y 181 μg^{-1} de Se para DMeSe, DEtSe y DMeSe, respectivamente. Se obtuvieron reproducibilidades inferiores al 9% al analizar cinco muestras fortificadas con 20 ng de cada una de las especies organoselénicas en días diferentes.

Las curvas de calibración empleando el procedimiento con preconcentración (Tabla 4B), empleando patrones a cinco concentraciones diferentes (tres replicados de cada una) eran lineales para cantidades de compuestos de selenio (expresadas como Se) inferiores a 32 ng ($r = 0.998$) para DMeSe, 51 ng ($r=0.998$) para DEtSe y 40 ng ($r=0.999$)

para DMeDSe, respectivamente. Los límites de detección estimados fueron de 0.3, 0.6 y 0.5 ng para DMeSe, DEtSe y DMeDSe, respectivamente. Las sensibilidades (pendiente de la curva de calibración) que se obtienen por este método fueron 98.2, 112 y 246 μg^{-1} de Se para DMeSe, DEtSe y DMeDSe, respectivamente. Se obtuvieron reproducibilidades inferiores al 7% mediante el análisis de muestras fortificadas con 20 ng de especies organoselénicas en diferentes días.

Los valores obtenidos se han comparado con los correspondientes a la inyección directa (Tabla 4C). Aunque los límites de detección eran muy similares, la pervaporación permite la determinación directa de analitos en sedimentos sin tratamientos preliminares (por ejemplo, la extracción de los analitos en un disolvente apropiado) lo que evita la precocnetración final de la disolución de la muestra para obtener una concentración de analito que supere los límites de detección.

APLICACIÓN A MUESTRAS NATURALES

El método propuesto se ha validado estudiando las recuperaciones obtenidas en diversas muestras fortificada, ante la ausencia de materiales de referencia que contengan especies volátiles de selenio. Se han utilizado cinco sedimentos y un lodo de depuradora procedentes de áreas del suroeste andaluz. Los resultados de recuperación se muestran en la Tabla 5, correspondientes a fortificaciones con 15 ng de DMeSe, 25 ng de DEtSe y 20 ng de DMeDSe. Los resultados se han obtenido mediante técnicas de calibración externa y se muestran en la Tabla 5, en general, las recuperaciones son superiores al 83% para la mayoría de las especies organoselénicas.

CONCLUSIONES

La pervaporación puede usarse para la determinación de especies volátiles de selenio en muestras complejas, ya que no es necesario un contacto directo entre la muestra y la membrana, de esta forma no se producen obstrucciones de los poros del polímero.

El método propuesto tiene las siguientes ventajas:

- a) Al compararlo con el procedimiento de espacio de cabeza dinámico: (i) puede ser fácilmente automatizado con una inversión mínima en equipos y mantenimiento, (ii) mejores recuperaciones y repetibilidad.
- b) Al compararlo con el espacio de cabeza estático: disminución del tiempo de análisis, ya que no es necesario alcanzar las condiciones de equilibrio
- c) Respecto al método de purga y atrapamiento: (i) con la pervaporación no es necesario la condensación del agua, ya que el agua no pasa a través de la membrana hidrofóbica, (ii) la muestra puede introducirse en el módulo de separación de forma automática, de manera continua o por inyección.

El número de métodos propuestos para los compuestos orgánicos de selenio en muestras de sedimentos son muy escasos, debido a la rápida transferencia de estos compuestos a la atmósfera que reduce su presencia en muestras sólidas naturales, lo que

CONTAMINACIÓN DE METALES DETECTADOS POR TÉCNICAS ATÓMICAS

obliga al uso de procedimientos de especiación muy sensibles con etapas de preconcentración.

Tabla 5.- Aplicaciones a muestras naturales fortificadas^a

Muestra	DMeSe			DMeDSe			DEtSe		
	Añadido (ng Se)	Encontrado (ng Se)	Recup., % (RSD, %) ^b	Añadido (ng Se)	Encontrado (ng Se)	Recup.% (RSD, %)	Añadido (ng Se)	Encontrado (ng Se)	Recup., % (RSD, %) ^b
Rio Tinto		14.2	94.6(4.6)		22.0	110(3.4)		25.3	101(5.3)
Ayamonte		13.0	86.7(4.8)		19.1	95.5(4.1)		26.2	105(4.1)
Laguna de El Portil	15	15.2	101(4.3)		19.0	95.0(5.1)		24.3	97.2(3.0)
Puerto de El Rompido		13.1	87.3(3.9)		20.9	104(4.0)		23.7	94.8(4.6)
Puerto Punta Umbria		16.3	108(3.2)		16.6	83.0(3.9)		22.3	89.2(1.9)

a. Resultados obtenidos utilizando el módulo de pervaporación con preconcentración en columna

b. n=3

AISLAMIENTO DE SECUENCIAS DE DNA QUE CODIFICAN LAS METALOTIONEÍNAS EN DISTINTAS ESPECIES DE MOLUSCOS BIVALVOS

Gabriel Dorado, M^a Victoria Funes y Juan López Barea

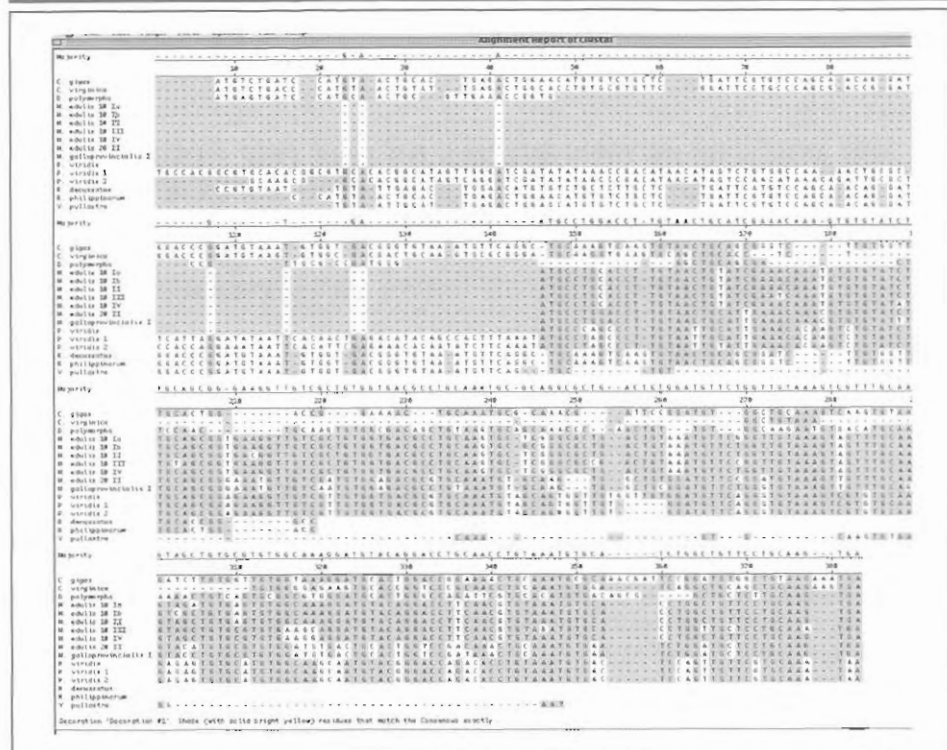
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, km. 396-a. 14071 CÓRDOBA

Con el fin de clonar los cDNAs correspondientes a los genes que codifican las proteínas conocidas como metalotioneínas (MTs) de varios moluscos bivalvos del litoral suratlántico español, entre los que se encuentran *Chamelea gallina* y *Crassostrea angulata*, se han ensayado diferentes estrategias experimentales basadas en la amplificación de DNA de tales organismos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; del inglés, "Polymerase Chain Reaction"). Como primer paso de la mencionada estrategia se ha llevado a cabo una comparación de las secuencias de las metalotioneínas depositadas en la base de datos pública GenBank, que se puede encontrar en la dirección <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

La Figura 1 muestra el alineamiento de secuencias codificantes de cDNAs (CDSs u ORFs; del inglés, "Complete coding Sequences" u "Open Reading Frames", respectivamente) de las metalotioneínas de distintos moluscos bivalvos, realizada con el algoritmo Clustal de la aplicación MegAlign 4.05/99 del paquete LaserGene99, Mac OS (DNASTar, Madison, WI, USA <<http://www.dnastar.com>>). La figura incluye las secuencias de dos especies de ostras *Crassostrea gigas* y *C. virginica*, las de tres especies de almejas *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* y *Venerupis pullastra*, así como seis secuencias del mejillón *Mytilus edulis* y otra de *Mytilus galloprovincialis*, una de *Dreissena polymorpha*, y tres de *P. viridis*. Se aprecia una marcada divergencia entre ellas, aunque hay algunas zonas comunes conservadas que se muestran sombreadas en amarillo en la Figura 1. Estas zonas se encuentran localizadas en la región que codifica tales proteínas, situadas tras el triplete ATG de inicio de la traducción del mRNA, en la posición 146, y que acaban en posición 381 con el triplete TGA de fin de mensaje.

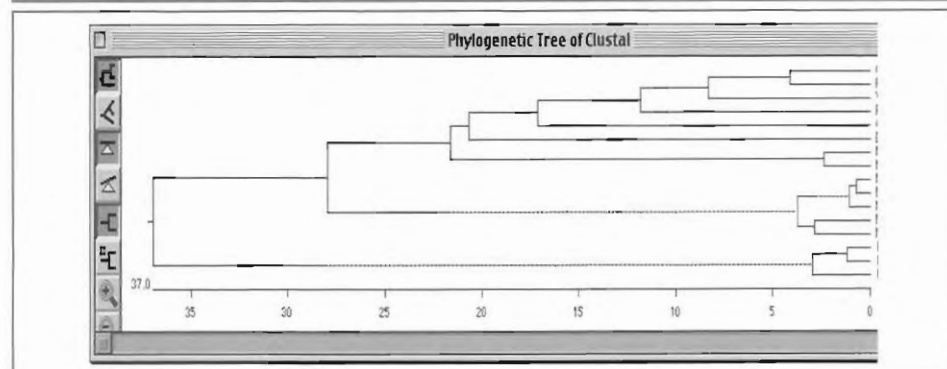
Las analogías y diferencias entre las secuencias quedan reflejadas en el correspondiente dendrograma (Figura 2), que muestra un árbol filogenético en que las diferentes secuencias se agrupan por semejanza evolutiva. Las secuencias de *P. viridis* se separaron de las demás hace tiempo; las MTs pequeñas del mejillón *M. edulis* divergieron más tarde, y la MT grande de *M. edulis* y la de *M. galloprovincialis* aún después. Las restantes secuencias de metalotioneínas de moluscos bivalvos se han ido separando desde entonces, siendo las más parecidas entre sí las de las MTs de *C. gigas* y la de *R. philippinarum*.

Figura 1. Alineamiento de cDNAs (CDS) de metalotioneínas de moluscos bivalvos.



Se muestra el alineamiento mediante el algoritmo "Clustal" de 16 secuencias de metalotioneínas, correspondientes a nueve especies de moluscos bivalvos publicados en GenBank. Las regiones más conservadas se indican en color amarillo.

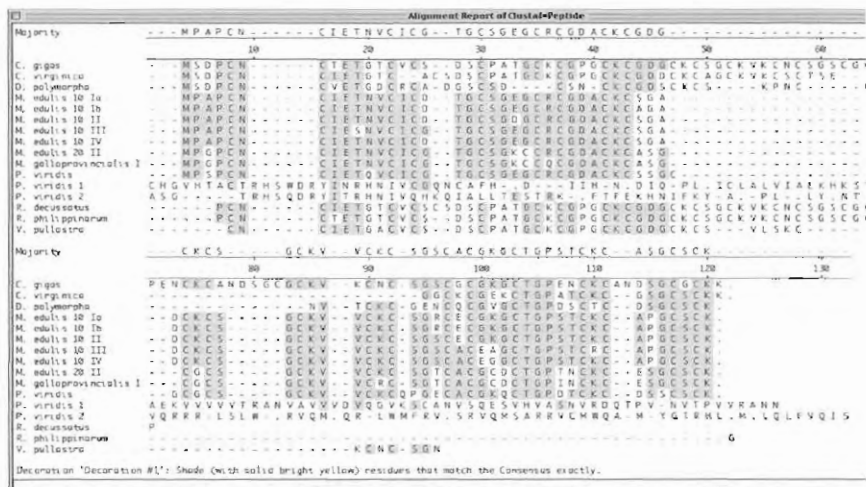
Figura 2. Dendrograma de cDNAs (CDS) de metalotioneínas de moluscos bivalvos.



Se representa el árbol filogenético correspondiente al alineamiento de la Fig. 1, indicando el tiempo evolutivo en unidades arbitrarias. Se aprecian dos grandes agrupaciones, una de las cuales está a su vez subdividida en dos partes.

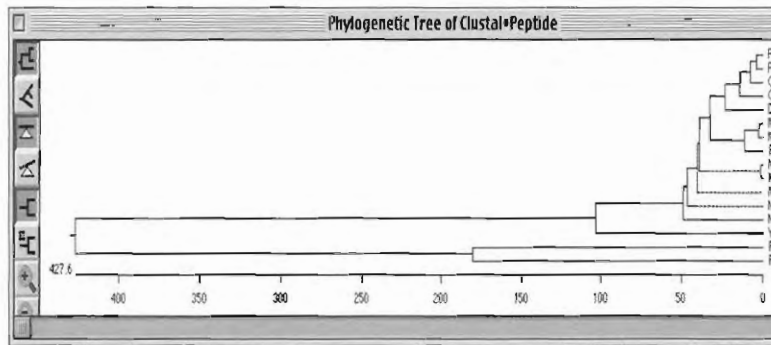
Dada la alta redundancia del código genético universal, con varios tripletes que codifican un mismo aminoácido, las semejanzas se acentúan al comparar los péptidos codificados por las secuencias, lo que se muestra en la Figura 3. Este mayor parecido de las secuencias protéicas debe generar un árbol filogenético más preciso que se muestra en la Figura 4.

Figura 3. Alineamiento de cDNAs (CDSs) de metalotioneinas de moluscos bivalvos.



Se indica el alineamiento de los péptidos generados a partir de las secuencias mostradas en la Fig. 1, empleando también el algoritmo "Clustal" y el mismo código de color para la secuencia consenso.

Figura 4. Dendrograma de cDNAs (CDSs) de metalotioneinas de moluscos bivalvos.



Árbol filogenético correspondiente al alineamiento de la Fig. 3, indicando el tiempo evolutivo en unidades arbitrarias. Se aprecian dos grandes agrupaciones.

Conviene destacar que la secuencia peptídica consenso de las metalotioneínas de moluscos bivalvos publicadas en GenBank contiene un total de 21 cisteínas (Cys), 18 de las cuales están organizadas en nueve series de dos cisteínas separadas por un aminoácido cualquiera. Esta divergencia tan acentuada de las secuencias de metalotioneínas, podría deberse a dos hechos que no son mutuamente excluyentes:

- 1) La existencia de diferentes familias génicas de metalotioneínas, como parecen sugerir los alineamientos de los CDSs.
- 2) La presencia de dominios o motivos más laxos que los que existen en otras proteínas más conservadas. Ello podría indicar que la naturaleza ha podido seleccionar en esta ocasión diferentes modos de interacción metal-péptido, sin tener que restringirse, como en otros casos, a una única secuencia ultraconservada.

La divergencia antes indicada planteaba nuevos problemas a la estrategia de clonación de tales mRNAs (cDNAs) inicialmente pensada. No obstante, aunque la secuencia nucleotídica consenso de las MTs ya secuenciadas es muy degenerada, se observaban en ella algunos hechos significativos que se muestran en la Figura 5 y que podrían facilitar nuestra tarea. En efecto, de las veintiuna cisteínas conservadas a nivel de proteína, en dieciocho de ellas se mantiene la secuencia consenso. Todas están codificadas por un triplete TGY, donde Y corresponde a las dos bases pirimidinas existentes (C o T; del inglés, "pYridimidine"), de acuerdo con los dos codones codificantes que existen en el código genético para los residuos cisteína, TGC y TGT. La secuencia consenso poseía además otros codones más degenerados, tales como WSN, NSN y DSN que se encontraban en 1, 4 y 6 posiciones, respectivamente, que también podrían codificar Cys.

```

5'-WBNNNSGVNC CNTG YAAYTGYRTNVRNDSN RRNRNKRNN NNTGYDVNDV 50
NDSNWSNHVN DVNRMNBSNT GYHVNTGYGG NNVDVNTGY MARTGYDSND 100
VNSVNRRTG YRVNTGYDVNNSNWRNWWNG TNDNNTGYHV NTGYDSNGRN 150
NVNTGYVMNT GYGRNDNNVR NTGYACNGGN NSDNDNNWNT GYMVNTGYRV 200
NNSNDSNTGY DSNTGYAAR-3' 219
    
```

Figura 5. Secuencia consenso de metalotioneínas de moluscos bivalvos. Se muestra el grado de degeneración empleando los códigos de la "IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)" en <<http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/jcbn>>. Se subrayan doblemente las regiones más conservadas, mostrando en rojo y negrita los 18 tripletes TGY (Cys). Códigos IUBMB/IUPAC: A = Adenosine; B = C, G or T; C = Cytidine; D = A, G or T; G = Guanosine; H = A, C or T; I = Inosine (non-standard "wildcard" base); K = G or T (Keto); M = A or C (aMino); N = A, C, G or T (aNy base); R = A or G (puRine); S = G or C (Strong-3H bonds); T = Thymidine; V = A, C or G; W = A or T (Weak-2H Bonds); Y = C or T (pYridimidine).

Debido a la alta degeneración de la secuencia consenso obtenida con los alineamientos antes indicados, fue necesario diseñar también cebadores o iniciadores muy degenerados para llevar a cabo la amplificación del DNA mediante PCR. Siempre que fue posible, se trató de concentrar los cebadores en los segmentos más conservados (que se muestran subrayados en la Figura 5), que en muchos casos coincidieron con los 18 tripletes TGY (codificantes de Cys). Éste es un aminoácido muy abundante en las metalotioneí-

nas, que está probablemente implicado en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína nativa, gracias a los enlaces que forman los grupos —SH de sus cisteínas con los metales. Por otra parte, se procuró también diseñar los cebadores en zonas que presentaran metioninas, ya que éstas carecen de redundancia. Por la misma razón, se trató de evitar los tripletes codificantes más degenerados (arginina, leucina y serina).

Con todas estas ideas en mente procedimos a diseñar veintidos cebadores, a los que se les incluyó la inosina en ciertas posiciones, para reducir en lo posible su grado de degeneración. En efecto, la inosina es una base nitrogenada que no está presente en el DNA de forma natural pero que aparea con cualquier base enfrentada a ella por lo que se usa a modo de comodín. Para lograr un diseño óptimo de los cebadores se empleó el programa Oligo 6.63/00 de Molecular Biology Insights (Cascade, CO, EUA; <<http://www.mbinsights.com>> y <<http://www.oligo.net>>). Los iniciadores utilizados se muestran en la Tabla 1, pudiéndose realizar diversas combinaciones entre ellos a fin de elegir las correspondientes parejas para llevar a cabo la PCR. Los cebadores con números impares hibridan en el extremo 5' de la secuencia consenso mostrada en la Figura 5, avanzando en posición hacia el extremo 3'; son los llamados cebadores "directos". Por su parte, los cebadores denominados "reversos" tienen números pares e hibridan en el extremo 3' de la secuencia consenso, avanzando en posición hacia el extremo 5'. Hasta la fecha se han usado muchas de las numerosas combinaciones que podrían hacerse con todos los cebadores directos y reversos mostrados en la Tabla 1. A continuación se resumen los principales resultados obtenidos usando esta estrategia.

La Figura 6 muestra un fragmento corto de 14 pares de bases obtenido mediante esta estrategia (5'-GGCCGTGTAAGT-3') a partir de RNA total de *Chamelea gallina* con los cebadores degenerados Met•31 y Met•26 mostrados en la Tabla 1. Como era de esperar, el BLAST (del inglés, "Basic Local Alignment Search Tool") realizado con dicha secuencia en la base GenBank en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>>, usando GeneQuest 4.05/99 (LaserGene; DNASTar), no generó resultados positivos. Ello se debe al hecho de que es una secuencia muy pequeña como para que su identidad parcial sea considerada estadísticamente significativa —y aún menos biológicamente significativa— por el algoritmo BLAST ("Gapped BLAST" 2.1.1/00). Sin embargo, la traducción de dicha secuencia en su fase correcta, genera un posible péptido con cinco residuos que contiene dos cisteínas (40'00%) separadas por otro aminoácido: NH₃-...-GlyProCysAsnCys-...-COOH, motivo característico repetido nueve veces en las metalotioneínas, lo que sugiere que podría corresponder a un cDNA de metalotioneína. Actualmente se está utilizando dicha secuencia para tratar de obtener el correspondiente cDNA completo, como se indica más adelante.

Tabla 1. Cebadores degenerados para metalotioneina de moluscos bivalvos.

Cebadores directos sin y con inosinas (5' → 3')	Cebadores reversos sin y con inosinas (5' → 3')
Met•29 (26 meros; posición 1) Sin I: WBNNNSGVNCCNTGYAAYTYRRTNVR Con I: WBINSIGVICITGYAAYTYRRTNVR	Met•34 (30 mer; posición 190) Sin I: YTTRCANSHRCANSHNSNBYRCANBKRC Con I: YTTRCAISHRCAISHINSIBYRCABKRC
Met•31 (30 mer; posición 9) Sin I: NCCNTGYAAYTYRRTNVRNDSNRRNRNKR Con I: NCCITGYAAYTYRRTVIDRISIRIRINKR	Met•36 (30 mer; posición 172) Sin I: NBYRCANBKRCANBWNHNSNCCNGTRCA Con I: NBYRCAIBKRCABWINHNSICCIGTRCA
Met•33 (30 mer; posición 15) Sin I: YAAAYTYRRTNVRNDSNRRNRNKRNNNTG Con I: YAAAYTYRRTVIDRISIRIRINKRININTG	Met•38 (30 mer; posición 160) Sin I: NBWNHNSNCCNGTRCANYBNNHNYCRCA Con I: NBWINHNSICCIGTRCAYBINHNYCRCA
Met•35 (30 mer; posición 27) Sin I: NDSNRRNRNKRNNNTGYDVNDVNSNWS Con I: NDSIRIRINKRINITYDVVIDVNSNWS	Met•40 (30 mer; posición 154) Sin I: NSNCCNGTRCANYBNNHNYCRCAKBRCA Con I: NSNICCIGTRCAYBINHNYCRCAKBRCA
Met•37 (30 mer; posición 48) Sin I: NDVNSNWSNHVNDVNRMBNSNTGYHVNTG Con I: NDVIDSIWVIRVIRMBISITGYHVNTG	Met•42 (30 mer; posición 136) Sin I: NYCRCANBKRCANBNNYCNSHRCANBDRCA Con I: NYCRCABKRCABNYCNSHRCAIBDRCA
Met•39 (30 mer; posición 51) Sin I: NDSNWSNHVNDVNRMBNSNTGYHVNTGYGG Con I: NDSIWSIHVIDVIRMBISITGYHVNTGYGG	Met•44 (30 mer; posición 115) Sin I: RCANBDRCANNHACNBWNYWNSNBBHRCA Con I: RCAIBDRCAINHACIBWYWISNBHRCA
Met•41 (30 mer; posición 60) Sin I: NDVNRMBNSNTGYHVNTGYGGNNVNDVNTG Con I: NDVIRMBISITGYHVNTGYGGINVIDVNTG	Met•46 (30 mer; posición 109) Sin I: RCANNHACNBWNYWNSNBBHRCANBYRCA Con I: RCAINHACIBWYWISNBHRCAIBYRCA
Met•43 (30 mer; posición 66) Sin I: NBSNTGYHVNTGYGGNNVNDVNTGYMARTG Con I: NBSITGYHVITGYGGINVIDVITGYMARTG	Met•48 (30 mer; posición 94) Sin I: NSNBHRCANBYRCANYNBSNBHNSHRCA Con I: NSNBHRCAIBYRCAYIYBSIBHNSHRCA
Met•45 (30 mer; posición 87) Sin I: NTGYMARTGYDSNDVNSVNRNTGYRVNTG Con I: NTGYMARTGYDSIDVISVIRRTGYRVNTG	Met•50 (30 mer; posición 88) Sin I: RCANBYRCANYNBSNBHNSHRCAKRC Con I: RCAIBYRCAYIYBSIBHNSHRCAKRC
Met•47 (30 mer; posición 114) Sin I: NTGYDVNSNWRNVNTGNDNNTGYHVNTG Con I: NTGYDVNSIWRVWIGTIDNNTGYHVNTG	Met•52 (30 mer; posición 76) Sin I: NBSNBHNSHRCAKRCANBHNBNCCRCA Con I: NBSIBHNSHRCAKRCABHNSIBHNSHRCA
Met•49 (30 mer; posición 132) Sin I: NDNNTGYHVNTGYDSNGRNVNTGYVMNTG Con I: NDNITGYHVITGYDSIGRNVITGYVMNTG	Met•54 (30 mer; posición 70) Sin I: NSHRCAKRCANBHNBNCCRCANBDRCA Con I: NSHRCAKRCABHNSIBHNSHRCAIBDRCA

Listado completo de los 22 cebadores degenerados (11 directos y 11 reversos), diseñados a partir de la secuencia consenso mostrada en la Figura 5. Se indica la secuencia "nativa", y la sintetizada con inosinas (I) para llevar a cabo las ampliaciones del cDNA mediante PCR.

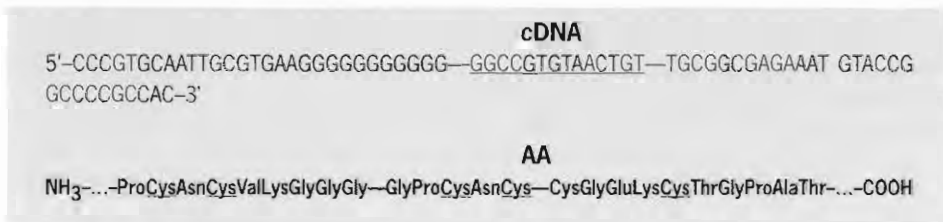


Figura 6. Secuencia obtenida por PCR con cebadores degenerados. Se muestra la pequeña secuencia de 14 pares de bases (5'-GGCCGTGTAAGTGT-3') obtenida por PCR con los cebadores degenerados Met•31 y Met•26, a partir de RNA total de *Chamaelea gallina*. El posible péptido resultante es rico en residuos Cys (40 %), separados por otro aminoácido. Códigos IUBMB/IUPAC: Ala, Alanine; Asn, Asparagine; Cys, Cysteine; Glu, Glutamic acid; Gly, Glycine; Lys, Lysine; Pro, Proline; Thr, Threonine; Val, Valine.

Por otra parte, se ha obtenido un fragmento mayor de 79 pares de bases a partir de RNA total de *Crassostrea angulata* con los cebadores degenerados Met•25 y Met•26 cuya secuencia se muestra en la Tabla 1. Su traducción en fase a péptido genera una proteína con un total de veintiseis aminoácidos con ocho residuos cisteína (al menos seis de ellos también separados por un aminoácido cualquiera) lo que supone un 30'77% del total de aminoácidos, como muestra la Figura 7. En este caso, la comparación BLAST produjo resultados positivos, que se muestran en la Figura 8. Se trata indiscutiblemente de semejanzas con plena significación biológica. Así, el fragmento clonado presenta una alta identidad con secuencias de cDNA procedentes de otros cinco moluscos bivalvos: *Ruditapes decussatus* (100% para 79 bases), *Ruditapes philippinarum* y *Crassostrea gigas* (98'7% para 79 bases), *Venerupis pullastra* (95'8% para 72 bases) y *Crassostrea virginica* (92'3% para 26 bases). Estos porcentajes aumentan significativamente al comparar los correspondientes péptidos (no mostrado), confirmando la significación biológica de la homología.

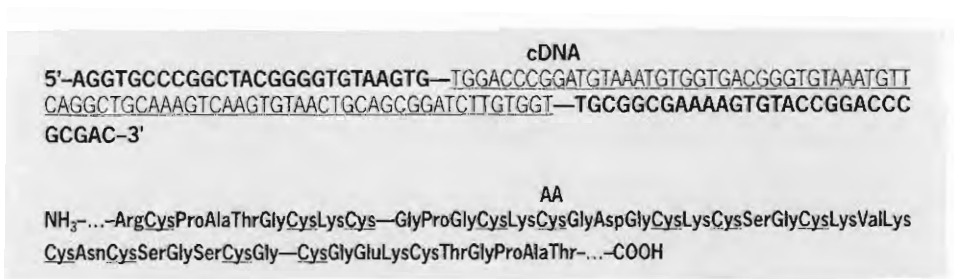


Figura 7. Secuencia obtenida por PCR con cebadores degenerados. Se muestra la secuencia de 79 pares de bases obtenida por PCR con los cebadores degenerados Met•25 y Met•26, a partir de RNA total de *Crassostrea angulata*. El péptido resultante es también rico en residuos Cys (31 %), la mayoría separados por cualquier aminoácido. Los Códigos IUBMB/IUPAC aparecen en la Figura 6.

Por otra parte, la secuencia específica de 79 pb obtenida de *C. angulata* se utilizará para clonar el cDNA completo de dicha metalotioneína, con la metodología de Amplificación Rápida de Extremos de cDNA por PCR (RACE-PCR; del inglés, "Rapid Amplification of Cdna Ends-PCR"). La estrategia de la misma se indica en la Figura 9 y está basada en el "Marathon cDNA Kit" de Clontech (Palo Alto, CA, EUA; <<http://www.clontech.com>>).

Figura 8. Comparación BLAST de la secuencia de 79 pb aislada por RACE-PCR a partir del molusco bivalvo *Crassostrea angulata*.

Básicamente consiste en generar una biblioteca de fragmentos de cDNA ("cDNA Library") de doble cadena (ds-cDNA), por retrotranscripción de RNA total a cDNA, síntesis de la segunda cadena y posterior ligación de los correspondientes adaptadores en los extremos. Así, empleando un cebador interno específico (correspondiente al segmento conocido) y otro externo (del adaptador), es posible amplificar por PCR los extremos 5' y 3' del cDNA. Además, los adaptadores están diseñados de forma que la amplificación inicial es asimétrica (aritmética; no exponencial) y sólo puede comenzar a partir del cebador específico interno. Las subsecuentes amplificaciones son simétricas (logarítmicas) y por tanto exponenciales. Con ello se consigue favorecer muy significativamente la especificidad de la reacción, ya que ésta sólo se inicia a partir de secuencias específicas. Además, luego se puede llevar a cabo una segunda PCR anidada, para confirmar la primera y, sobre todo, asegurar el éxito de la estrategia. Por otra parte, los cebadores externos e internos se diseñan para que produzcan amplicones solapantes, de modo que posteriormente podrá regenerarse el cDNA completo en una reacción estándar de PCR con los cebadores de los adaptadores, o bien trabajar independientemente con ambas mitades del cDNA. Finalmente, el producto puede ser secuenciado directamente o clonado para posteriores manipulaciones.

Dado que la pequeña secuencia de 14 pares de bases obtenida hasta la fecha a partir de RNA total de *Chamelea gallina* no se presta al procedimiento "RACE-PCR" descrito arriba, al no tener tamaño suficiente para diseñar cebadores suficientemente específicos para dicho procedimiento, se ha llevado a cabo la estrategia que se describe en la Figura 10. Se trata de usar dicha secuencia como sonda de DNA para realizar con ella una captura magnética de los fragmentos de interés, a partir de una biblioteca de fragmentos de restricción de DNA genómico, o de una biblioteca de cDNAs con adaptadores.

En el primer caso se podrán clonar segmentos del gen cromosómico (con los probables intrones característicos de los genes de organismos eucariontes); en el segundo caso, se podrá clonar el cDNA de dicho gen. Para ello se procede inicialmente como se ha descrito anteriormente en método "RACE-PCR", pero en este caso se lleva a cabo una hibridación, en vez de una amplificación mediante PCR. Para ello se diseña un DNA de cadena sencilla (ssDNA) que corresponda a la secuencia conocida o parte de ella. Este DNA (denominado "sonda") se sintetiza uniendo moléculas de biotina en su extremo 5', de forma que podrá ser posteriormente capturado al unirse a la estreptavidina que tapiza unas pequeñas bolitas paramagnéticas (hierro cubierto de látex o similar). En efecto, la estreptavidina es una proteína tetramérica aislada de un hongo estreptomiceo (del género *Streptomyces*) que tiene la curiosa propiedad de presentar una enorme afinidad hacia la biotina, por lo que se usa como reactivo al ser capaz cada molécula de estreptavidina de unir a la vez hasta cuatro moléculas de biotina. El procedimiento experimental que se usa en esta estrategia de captura magnética es como sigue:

- 1) La biblioteca de cDNA de doble cadena, donde están incluidas todas las secuencias que se espresan en forma de un mRNA, se desnaturaliza. Este tratamiento térmico consigue que se separen las dos cadenas de cada fragmento.
- 2) La biblioteca así desnaturalizada se deja hibridar con la sonda específica biotinilada, se trata con las bolitas recubiertas de estreptavidina, y se aplica un imán para secuestrar las sondas con el DNA hibridado.
- 3) Una vez separadas las secuencias que se unen específicamente a la sonda se llevan a cabo reacciones de PCR con los cebadores complementarios de los adaptadores.
- 4) El producto de PCR así obtenido puede ser secuenciado directamente o bien ser clonado como en el caso del método "RACE-PCR" descrito anteriormente. Los adaptadores están diseñados de forma que contengan sitios específicos de restricción, para favorecer su posterior clonación en vectores apropiados.

En un futuro próximo esperamos obtener la secuencia completa de la metalotio-neína de chirla, y en cualquier caso se desarrollará la metodología RT-PCR-GeneScan para determinar la expresión del gen que codifica esta proteína en *Crassostrea angulata* como biomarcador de alerta temprana a la exposición a metales de transición en bivalvos.

RESPUESTA DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN COQUINAS DE FANGO (*SCROBICULARIA PLANA*) TRANSPLANTADAS AL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR

Antonio Romero Ruiz¹, Oscar Amezcua Rodríguez², Antonio Rodríguez-Ariza¹, José Alhama Carmona¹, José Naranjo Márquez², José Luis Muñoz Pérez², José Luis Gómez Ariza³ y Juan López-Barea¹

1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, edificio C6, carretera N-IV, km. 396-a. 14071 CÓRDOBA
2. CICESM "El Toruño", Apto. 16, 11500 El Puerto de Santa María, Cádiz
3. Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Universidad de Huelva

En este trabajo se han estudiado los posibles efectos biológicos del vertido tóxico de Aznalcóllar, ocurrido en Abril de 1998, en los recursos pesqueros y marisqueros de Estuario del Guadalquivir. La parte derecha de la Figura 1 muestra el cauce final del río Guadalquivir, desde la convergencia del Río Guadiamar (Brazo de la Torre), y el Estuario propiamente dicho. Como zona posiblemente afectada por el vertido de Aznalcóllar, ocurrido en Abril de 1998, usamos las instalaciones de PISTRESA, frente al Brazo de la Torre que se muestran de forma detallada en la parte izquierda de la figura. Como bioindicadores usamos tres especies de interés pesquero y marisquero presentes en el tramo final del Guadalquivir y su Estuario: un molusco bivalvo, la coquina de fango (*Scrobicularia plana*), conocido por su gran capacidad de acumular metales pesados, un crustáceo: el camarón (*Palaemonetes varians*), y dos peces, el lenguado (*Solea senegalensis*), y la lisa o albur (*Mugil sp.*).

En este estudio nos hemos centrado en los experimentos realizados con coquinas de fango transplantadas desde el río Barbate (zona usada como referencia) al Estuario del Guadalquivir, cuyas muestras se resumen en la Tabla 1, dejando para más adelante la comparación de distintas zonas con coquinas de fango y los estudios de trasplantes realizados con camarones y peces. En los lotes 1 y 2 se transplantaron coquinas de fango al canal de entrada de agua a PISTRESA. Por contra, en el lote 3 además de a PISTRESA se transplantaron en paralelo las coquinas en un estero del CICESM "El Toruño" como control.

Antes de analizar las distintas muestras, pusimos a punto los protocolos de extracción y ensayo de los distintos biomarcadores que se iban a usar en el estudio adaptándolos a las coquinas de fango a partir de las condiciones ya optimizadas por nuestro grupo en chirlas. De esta forma, demostramos que los extractos crudos debían dializarse, y que este proceso debía realizarse con tripa de diálisis en vez de con centríco-

nes, dado que de esta otra forma se perdía mucha más actividad. Los ensayos de chirlas se adaptaron a las coquinas de fango determinando el volumen de extracto adecuado a cada ensayo. Se compararon además los resultados obtenidos al procesar cuerpos enteros y glándulas digestivas. Aunque al analizar la glándula digestiva se obtenían valores superiores a los obtenidos con cuerpos enteros, los aumentos de actividad detectados no compensaban el esfuerzo necesario para diseccionar y extraer las glándulas en cada muestra recibida.

Figura 1.

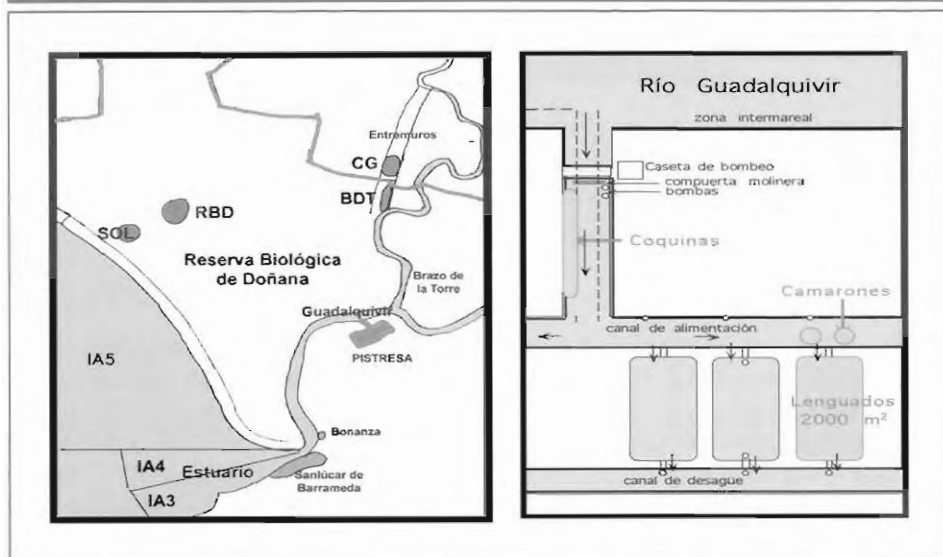


Figura 1. Izda: Zonas de muestreo en el Estuario del Guadalquivir y PISTRESA, frente a la desembocadura del Brazo de la Torre. Se indican zonas del litoral de Doñana (IA5) y del Estuario (IA4 e IA3) y la Reserva de Doñana, Cangrejo Grande (CG) y Cangrejo Chico (BDT), en Entremuros, y Fuente del Duque (RBD) y Laguna de Santa Olalla (SOL), en la Reserva. Dcha: Instalaciones de PISTRESA. Los esteros toman agua del Guadalquivir por un canal de entrada, sometido a la influencia mareal, donde se transplantaron las coquinas de fango, inmediatamente tras las bombas de la compuerta de entrada, donde se transplantaron los camarones. Los camarones se transplantaron en jaulas situadas en un canal de alimentación junto a la compuerta de entrada a un estero de 2000 m², donde se transplantaron los lenguados.

Se ensayaron los siguientes biomarcadores moleculares de contaminación ambiental:

- 1) Actividades de diversas enzimas antioxidativas primarias y auxiliares y detoxificadoras: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH), 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa (6-PGDH), glutatión transferasa citosólica (GST), glutatión reductasa (GRasa), glioxalasa I y II (Glyox-I, Glyox-II), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Estas enzimas catalizan la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, la regeneración del NADPH o la detoxificación de compuestos orgánicos electrófilos, respectivamente.

- 2) Contenido de metalotioneinas (MTs), ensayado con el ensayo colorimétrico de Viarengo, ya explicado en el Capítulo 8.
- 3) Niveles de peroxidación lipídica, midiendo los niveles de malondialdehído (MDA), ensayado tras su reacción con el ácido tiobarbitúrico.
- 4) Contenido intracelular y estado redox del glutatión (GSH, GSSG, 2 GSSG/GSH), ensayado según se ha descrito en el Capítulo 7.

Cada extracto crudo se obtuvo por triplicado y en cada uno se ensayó por triplicado cada biomarcador, es decir, se tienen nueve “repeticiones” del mismo ensayo.

Tabla 1. Lotes de coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantados al estuario (lotes 1,2 y 3) y a las instalaciones del CICEM El Toruño (Lote 3), y los muestreos realizados en cada uno de ellos.

Coquinas de fango		
Lote 1 PISTRESA	FECHA	CÓDIGO
Siembra	09/07/99	—
Muestreo 0	09/07/99	09.07.99/ Coq 00
Muestreo 1	27/07/99	27.07.99 Coq 01
Muestreo 2	05/11/99	05.11.99/Coq 02
Muestreo 3	25/11/99	25.11.99/Coq 03
Muestreo 4	25/1/00	25.01.00/Coq 04
Muestreo 4'	7/2/00	7.2.00/Coq 04'
Muestreo 5	10/3/00	10.3.00/Coq 05
Lote 2 PISTRESA	FECHA	CÓDIGO
Muestreo 0	13/03/00	13/03/00COQ 00
Muestreo 1	29/03/00	29/03/00COQ 01
Muestreo 2	11/04/00	11/04/00COQ 02
Muestreo 3	11/05/00	11/05/00COQ 03
Muestreo 4	13/06/00	13/06/00COQ 04
Lote 3 PEMARES Y PISTRESA	FECHA	CÓDIGO
Muestreo 0	13/03/00	13/03/00COQ 00
Muestreo 1	30/03/00	30/03/00COQ 01
Muestreo 2	10/04/00	10/04/00COQ 02

La Figura 2 muestra la evolución de los niveles de diversos biomarcadores en las coquinas de fango del lote 1 transplantadas a PISTRESA durante 8 meses. Se observa que varios parámetros subían a los 16 días de exposición, disminuyendo luego a los valores de partida. Esto ocurría en las actividades G6PDH, 6PGDH, Gasa, Giox II y CAT, mientras que la GST subió a los 16 días del trasplante y se mantuvo alta el resto del experimento.

Los aumentos paralelos observados al mismo tiempo en tantos biomarcadores moleculares diferentes y su posterior disminución hasta alcanzar los valores iniciales nos hicieron dudar si dicho comportamiento podía deberse a los efectos de los contaminantes aún presentes en el Estuario tras el vertido de Aznalcóllar y su limpieza subsiguiente o, por el contrario, debería atribuirse a cambios relacionados con el estrés que podrían sufrir las coquinas de fango asociado a su trasplante. Para comprobar estas dos posibles alternativas se realizó el experimento del lote 3, al que se refieren los restantes resultados de esta presentación. En dicho experimento se transplantaron en paralelo coquinas de fango desde la zona de referencia del río Barbate a PISTRESA y a un estero del CICEM El Toruño que sirvió como control.

La Figura 3 muestra las diferentes actividades citosólicas analizadas durante un mes en el lote 3, mostrando en histogramas claros los resultados de los controles mantenidos en el CICEM y en histogramas oscuros los obtenidos en los bivalvos transplantados a PISTRESA. A diferencia de lo observado en el lote 1, en el 3 no aumentó casi ninguna de las actividades citosólicas analizadas, y aunque había diferencias respecto al control no eran estadísticamente significativas, debido a las altas desviaciones estándar encontradas.

Figura 2. Actividades citosólicas ensayadas en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir

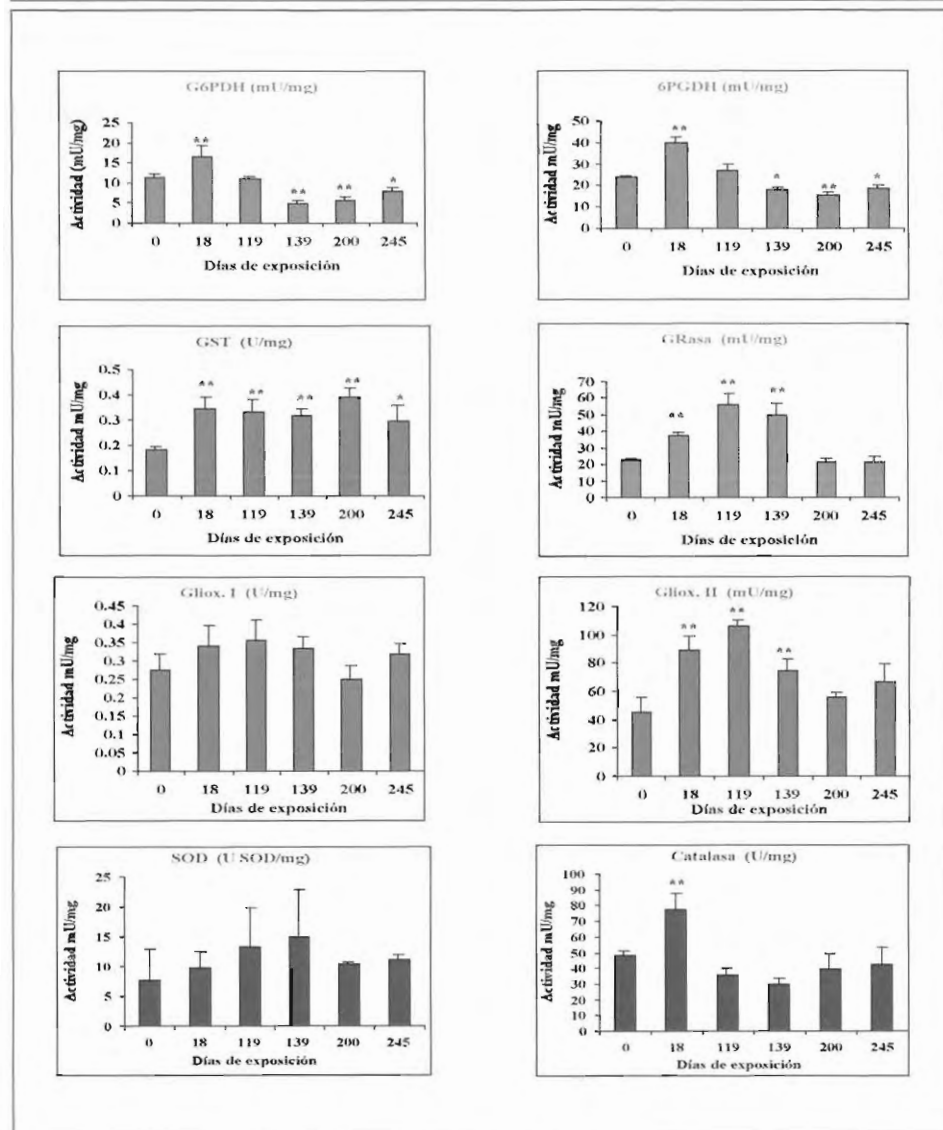


Figura 2. Actividades citosólicas ensayadas en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir (Lote 1). La significación estadística frente al control inicial se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como: *P<0.05, **P<0.01.

Figura 3. Actividades citosólicas ensayadas en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas durante un mes al Estuario del Guadalquivir.

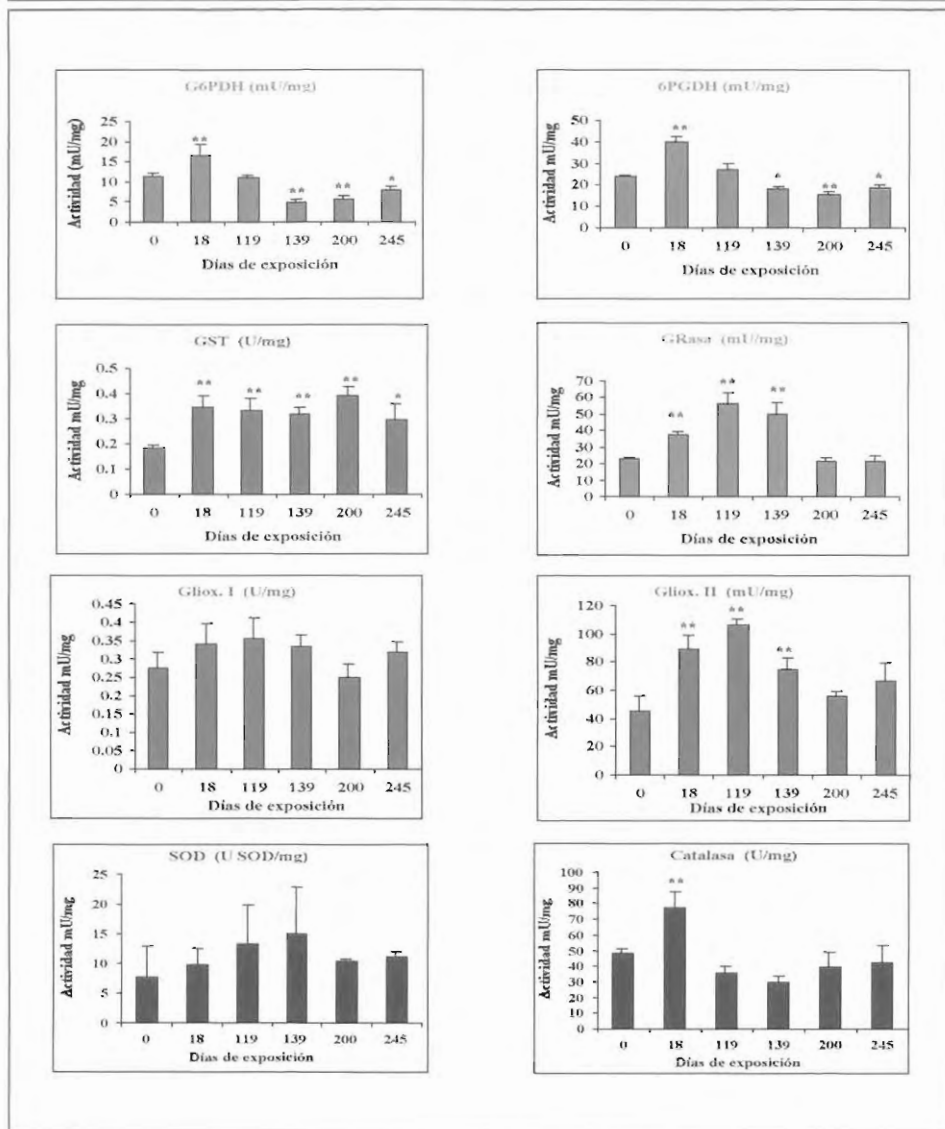


Figura 3. Actividades citosólicas ensayadas en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas durante un mes al Estuario del Guadalquivir (histogramas claros) y al CICEM El Toruño (histogramas oscuros) (Lote 3). La significación estadística frente al control inicial se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Aunque los biomarcadores citosólicos analizados no mostraron efectos significativos asociados a su trasplante al Estuario, los animales transplantados mostraban signos inequívocos de que habían sufrido estrés oxidativo. La Figura 4 muestra que al analizar la peroxidación lipídica midiendo los niveles de malondialdehído (MDA), las coquinas transplantadas al CICEM mantenían niveles bajos y estables de MDA, mientras que las transplantadas al Estuario tenían a los 16 días casi tres veces más MDA, sugiriendo que podían estar sometidas a estrés oxidativo por los metales del vertido de Aznalcóllar. En efecto, muchos metales generan especies reactivas de oxígeno, que dañan las biomoléculas. Así, las cadenas de los ácidos grasos se peroxidizan y se rompen en varios aldehídos, como el malondialdehído, excelente indicador de daños oxidativos.

Figura 4. Concentración de malondialdehído en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) transplantadas un mes al Estuario del Guadalquivir y al CICEM El Toruño.

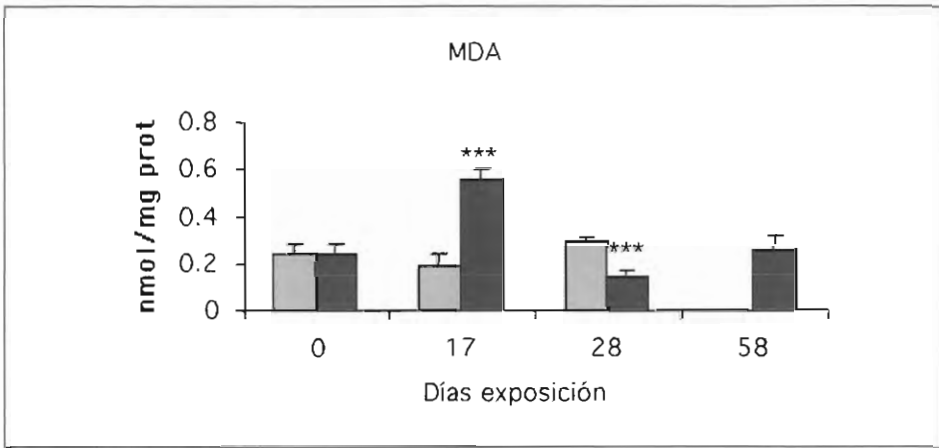


Figura 4. Concentración de malondialdehído en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) transplantadas un mes al Estuario del Guadalquivir (hist. oscuros) y al CICEM El Toruño (hist. claros) (Lote 3). La significación estadística frente al control inicial se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

La idea antes expuesta se confirmó al analizar el contenido y el estado redox del glutatión en las coquinas del lote 3, que se muestra en la Figura 5. Tras 16 días de haber sido transplantadas al Estuario, las coquinas de fango tenían un contenido significativamente menor de GSH que los controles transplantados al CICEM y mayor contenido de GSSG que ellos, lo que había provocado en estos animales un aumento muy significativo del estado redox del glutatión intracelular. Estos resultados indicaban que los animales llevados al Estuario habían sufrido un fuerte estrés oxidativo. Tras aumentar a los 16 días los niveles de MDA y de GSSG, los niveles de estos dos compuestos bajaron significativamente al mes en los animales expuestos, quizás como defensa frente al estrés oxidativo. Por el momento, desconocemos el mecanismo de esta respuesta antioxidativa, pues los niveles de las enzimas antioxidativas que se ensayaron en dichas muestras apenas variaron.

Figura 5. Concentración glutatión reducido (GSH), oxidado (2x GSSG) y estado redox (2x GSSG/GSH) en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir (hist. claros) y al CICEM El Toruño

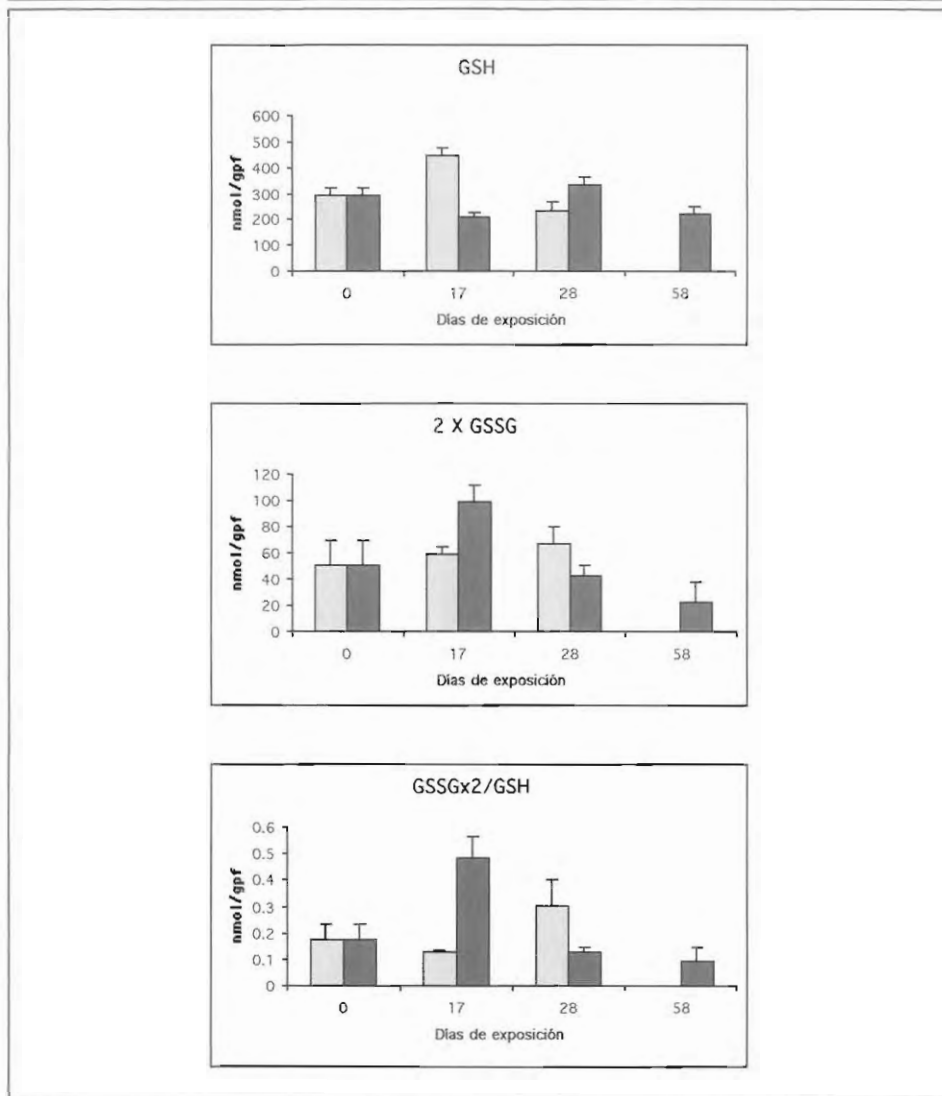


Figura 5. Concentración glutatión reducido (GSH), oxidado (2x GSSG) y estado redox (2x GSSG/GSH) en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir (hist. claros) y al CICEM El Toruño (hist. oscuros) (Lote 3). La significación estadística frente al control inicial se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Recientemente se han medido las metalotioneínas por el método del Viarengo en el tercer lote, con los resultados que se muestran en la Figura 6. Los resultados no muestran ninguna inducción clara con respecto a los respectivos controles. Esto concuerda con publicaciones de diversos autores, que indican que las metalotioneínas sólo se inducen a tiempos muy cortos. Para comprobar esta hipótesis e intentar reproducir los resultados, se están repitiendo los experimentos modificándose la secuencia de muestreos, comenzando el primer día de exposición y no el decimoséptimo.

Figura 6. Niveles de metalotioneínas en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir y al CICEM El Toruño.

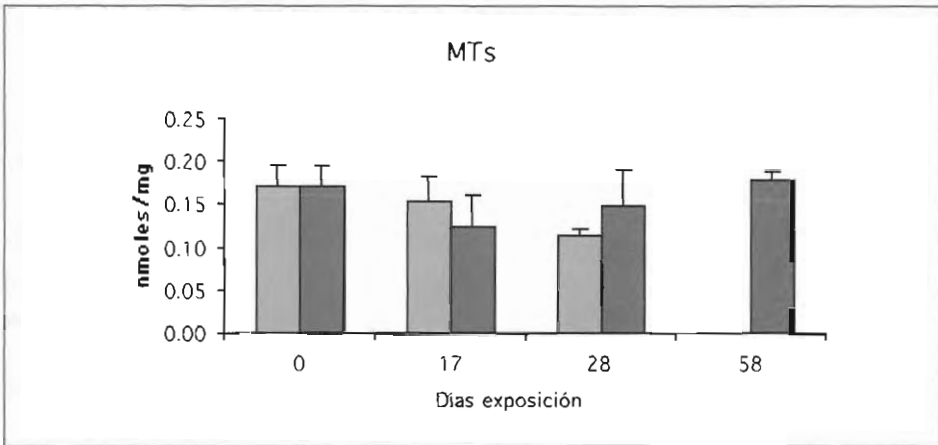


Figura 6. Niveles de metalotioneínas en coquinas de fango (*Scrobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir y al CICEM El Toruño (Lote 3). La significación estadística frente al control inicial se determinó por análisis de varianza con el programa InStat 2.01 y se expresa como: *P<0.05, **P<0.01.

La Figura 7 muestra los niveles de algunos metales analizados por el grupo de la Universidad de Huelva en el lote 3. En los animales trasplantados al estuario se acumulaban algunos metales, como As total, Fe, Cd y Cu, hasta los 30 días de exposición, disminuyendo luego desde ese momento hasta los 60 días del trasplante. No se encontraron diferencias notables en los contenidos de Cr y Mn entre animales control y problema.

Figura 7. Concentración de metales en coquinas de fango (*Srobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir.

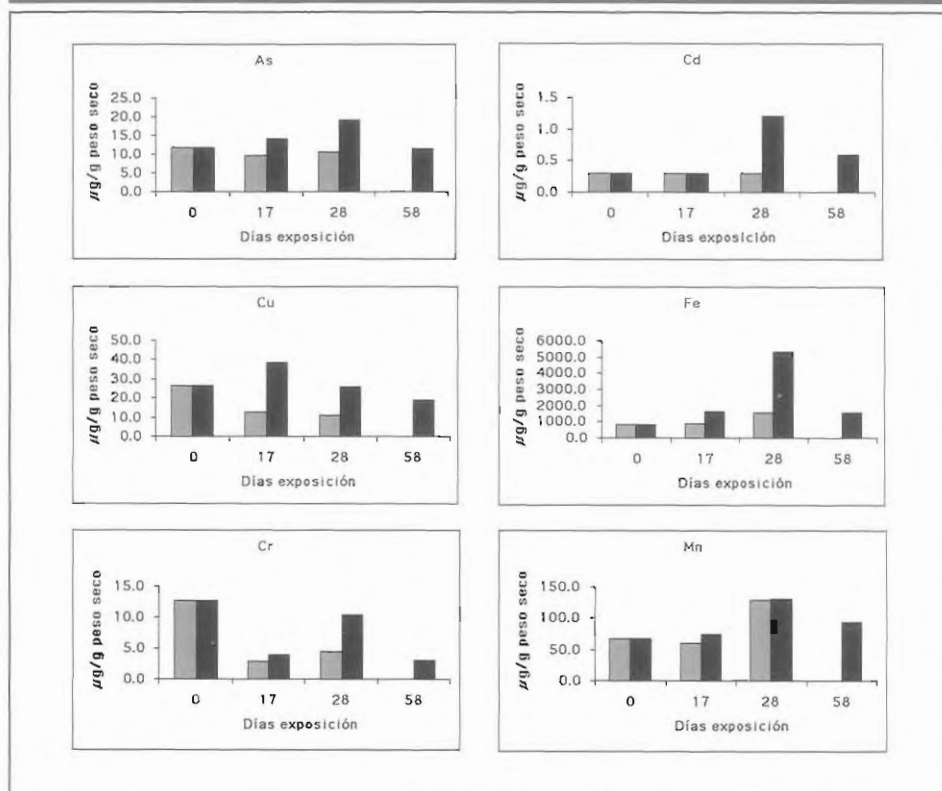


Figura 7. Concentración de metales en coquinas de fango (*Srobicularia plana*) trasplantadas al Estuario del Guadalquivir (Lote 3). Los resultados se expresan en μg de metal por g de peso seco

En conclusión, los organismos trasplantados al estuario del Guadalquivir (frente a la desembocadura del Guadiamar) parecen sufrir estrés oxidativo como indican varios biomarcadores, en paralelo con la acumulación de varios metales con propiedades redox. Nuestros resultados confirman la validez de estos biomarcadores como señales de alerta temprana a la contaminación ambiental.

GANADERÍA

PESCA Y ACUICULTURA

POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIA

FORMACIÓN AGRARIA

CONGRESOS Y JORNADAS

R.A.E.A

ISBN 84-8474-053-6



9 788484 740537

P.V.P.: 31 €



JUNTA DE ANDALUCÍA

Consejería de Agricultura y Pesca