



**CONAMA10**

CONGRESO NACIONAL  
DEL MEDIO AMBIENTE

COMUNICACIÓN TÉCNICA

# **Toxicidad y bioacumulación de los iones fluoruro (F<sup>-</sup>) en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)**

Autor: Marta Inmaculada Martín Miner

Institución: Universidad de Alcalá

e-mail: [marta.martin.miner@gmail.com](mailto:marta.martin.miner@gmail.com)

Otros Autores: Julio A. Camargo (Departamento de Ecología, Universidad de Alcalá); Cristina Gonzalo (Departamento de Ecología, Universidad de Alcalá)

## RESUMEN

En esta investigación hemos estudiado la toxicidad y la bioacumulación del ión fluoruro ( $F^-$ ) en el molusco *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). Este bivalvo es oriundo del Mar Caspio y Mar Negro, y actualmente está considerado como una especie invasora en muchos ecosistemas acuáticos del continente europeo. Por otra parte, la concentración de fluoruros en los ecosistemas acuáticos continentales está incrementándose significativamente como consecuencia de diferentes actividades humanas. Se valoró la toxicidad de los fluoruros en el mejillón cebra mediante bioensayos de toxicidad, obteniéndose concentraciones letales 50 relativamente elevadas cuando se comparan con otras CL50 ya publicadas para otras especies de animales acuáticos. Además se ha analizado el contenido de fluoruros en los tejidos de los animales expuestos, diferenciando tejido blando y tejido duro. Se observó que la bioacumulación de fluoruros era mayor en el tejido blando que en el tejido duro, resultado esperado ya que los bivalvos son animales filtradores. En lo que se refiere a la bioacumulación de fluoruros diferenciando aquellos que permanecieron vivos al final del experimento de aquellos que murieron durante el mismo, cabe destacar en líneas generales, que el contenido en fluoruros fue mayor en aquellos que murieron, indicando que la muerte fue debida a la elevada concentración de fluoruros en el medio acuático. Es concluido que la capacidad invasora del mejillón cebra no quedaría mermada de manera significativa como consecuencia de la contaminación antropogénica por fluoruros en los ecosistemas acuáticos continentales.

**Palabras Clave:** *Dreissena polymorpha*; bioacumulación; fluoruros; toxicidad.

## Introducción

De todos los elementos de la tabla periódica, el flúor es el más electronegativo y el más reactivo (Greenwood y Earnshaw, 1984; Gillespie et al., 1989; Camargo 2003). Debido a su gran reactividad, el flúor no se encuentra en su estado elemental en la naturaleza. En el medio acuático, el flúor se encuentra mayoritariamente como ión fluoruro ( $F^-$ ), pudiendo formar también compuestos orgánicos fluorados, pero siempre con valencia  $-1$  (Greenwood and Earnshaw, 1984; Gillespie et al., 1989; Camargo, 2003). La principal fuente natural de fluoruros en los ecosistemas acuáticos es la erosión de minerales fluorados (CEPA, 1994; Camargo, 2003), fundamentalmente el fluoroapatito ( $Ca_5(PO_4)_3F$ ), la fluorita ( $CaF_2$ ), y la criolita ( $Na_3AlF_6$ ). La segunda fuente natural de fluoruros son los volcanes mediante la liberación a la atmósfera de gases con HF (CEPA, 1994; Camargo, 2003). La liberación global de estos fluoruros se encuentra aproximadamente entre 60 y 6000 kilotoneladas (Symonds et al. 1988; CEPA, 1994; Camargo, 2003). La tercera fuente natural de emisión de fluoruros son los aerosoles marinos. Se ha estimado que esta tercera fuente contribuye en unas 20 kilotoneladas cada año (Symonds et al. 1988; CEPA, 1994; Camargo, 2003).

En el agua, los fluoruros inorgánicos normalmente continúan en solución bajo condiciones de pH y dureza bajas en presencia de materiales como arcillas bentonitas y ácidos húmicos (Pickering et al., 1988; CEPA, 1994; Camargo, 2003). Los fluoruros inorgánicos estando en solución pueden sin embargo ser eliminados de la fase acuosa por precipitación del carbonato cálcico, fosfato cálcico, fluoruro cálcico e incluso fluoruro de magnesio. (Stumm and Morgan, 1996; Camargo, 2003). Los organismos acuáticos que viven en aguas blandas, por lo tanto, pueden estar más afectados por la contaminación por fluoruros que aquellos que viven en aguas duras o agua marina ya que la biodisponibilidad de iones fluoruro (por consiguiente también su acción tóxica) es reducida cuando incrementa la dureza del agua.

Los niveles de fluoruros en el medio acuático varían de acuerdo a la localización y la proximidad de las fuentes de emisión. En la tabla 1 están reflejados los rangos de concentración de fluoruro expresados en mg/l en diferentes localizaciones, tanto generales como específicas.

*Tabla 1: Niveles de fluoruros presentes en los medios acuáticos.*

*Fuente: Camargo, 2003*

|  | Rango (mg F <sup>-</sup> /l) |     | Referencias   |
|--|------------------------------|-----|---|
|  |                              |     |   |
| Agua dulce no contaminada                      | 0,01                         | 0,3 | Dobbs,1974; Martin and Salvadori,1983; Nriagu, 1986; Fuge and Andrews, 1988; Camargo et al., 1992a; CEPA, 1994; Camargo, 1996a; Datta., 2000; Camargo, 2003 |
| Agua marina no contaminada                     | 1,2                          | 1,5 |   |
| Aguas termales y Geiser de Yellowstone Park    | 25                           | 50  | Neuhold and Sigler, 1960; Camargo, 2003   |
| Ríos Madison y Firehole también en Yellowstone | 1                            | 14  |   |
| Aguas termales de Nueva Zelanda                | 1                            | 12  | Mahon, 1964; Camargo, 2003  |
| Agua de los lagos Walter y Pyramid, en Nevada  |                              | >13 | Sigler y Neuhold,1972; Camargo, 2003  |

Algunas actividades humanas pueden incrementar los niveles locales de fluoruros en las aguas superficiales. Entre estas actividades, que incrementan más de 100 veces los niveles naturales, pueden encontrarse las fundiciones de aluminio, plantas de elaboración de fertilizantes fosfatados (Somashakar y Ramaswamy, 1983; Van Craenenbroeck y , 1987; Camargo, 2003), plantas de producción de elementos químicos como fluoruro de hidrógeno, fluoruro de calcio, fluoruro de sodio, y hexafluoruro de azufre (Zingde y Mandalia, 1988; Karunagaran y Subramanian, 1992; CEPA, 1994; Camargo, 2003), las plantas industriales de ladrillos, cerámicas y vidrio (CEPA, 1994; Camargo 1996a; Camargo, 2003), y el uso de fluoruros en pesticidas (Fuge y Andrews, 1988; CEPA,1994; Camargo, 2003) Las descargas de aguas urbanas también puede causar incrementos (alrededor de 5 veces más) en la concentración de fluoruros en los ríos receptores (Sparks et al., 1983; Camargo et al., 1992a; Camargo, 2003).

A pesar de que los fluoruros (F<sup>-</sup>) pueden ser considerados como serios contaminantes en muchos ecosistemas acuáticos, y que su concentración está incrementándose significativamente como consecuencia de las actividades humanas, el conocimiento que existe sobre su toxicidad y bioacumulación en los organismos acuáticos es relativamente escaso.

La acción tóxica de los fluoruros en los ecosistemas acuáticos y terrestres se debe a que los iones fluoruro actúan inhibiendo la actividad enzimática, y por lo tanto, en último término, interrumpiendo procesos metabólicos tales como la glicolisis e incluso la síntesis de proteínas (Kessabi, 1984; Camargo, 2003). No obstante, el mecanismo por el cual se inhibe la actividad enzimática continúa hoy siendo objeto de mera especulación. Se apunta, sin embargo, a que la combinación del fluoruro con iones de calcio y magnesio, que son en muchos casos necesarios como co-factores por diferentes enzimas, podrían ser el mecanismo primario (Kessabi, 1984).

La toxicidad por fluoruros en invertebrados acuáticos sigue una relación directamente proporcional a la concentración de fluoruros en el medio acuático, al tiempo de exposición y a la temperatura del agua. (LeBlanc, 1980; Dave, 1984; Fieser et al., 1986; Kühn et al., 1989; Camargo and Tarazona, 1990; Camargo, 1991b; Camargo et al., 1992a, b; Camargo, 2003).

Los invertebrados de hábitats marinos y de zonas de estuario parecen ser más tolerantes a la toxicidad por fluoruro que los invertebrados de agua dulce. Ello es debido, muy probablemente al elevado contenido en calcio de las aguas de estuario y aguas marinas. (Hemens and Warwick, 1972; Hemens et al., 1975; Pankhurst et al., 1980; Connel and Airey, 1982; McClurg, 1984; Camargo, 2003). Estudios realizados en laboratorio (Camargo, 2002; Camargo, 2003) con larvas de la familia *Hydropsyche* han mostrado que la toxicidad por iones fluoruro en invertebrados acuáticos (larvas de insectos) puede disminuir cuando incrementa el tamaño intraespecífico del cuerpo y el contenido en cloruros en el agua. El efecto producido por los iones cloruro podría ser debido principalmente a una restricción en la incorporación de los fluoruros en el lado citosólico de la membrana celular debido a la presencia de iones cloruro en el lado externo dicha membrana.

Los animales acuáticos como los peces o los invertebrados, pueden absorber fluoruro directamente del agua o en mucho menor grado por vía alimenticia (Neuhold y Sigler, 1960; Hemens y Warwick, 1972; Nell y Livanos, 1988). Dicha absorción de fluoruro es función de la concentración del ión presente en el medio acuático, del tiempo de exposición y de la temperatura del agua (Neuhold y Sigler, 1960; Moore, 1971; Hemens y Warwick, 1972; Wright y Davison, 1975; Milhaud et al., 1981; Pillai y Mane, 1985; Nell y Livanos, 1988). Por consiguiente, aunque pueda ser eliminado (como iones F<sup>-</sup>) mediante los sistemas excretores (Kessabi, 1984), el fluoruro tiende a acumularse en el exoesqueleto de los invertebrados y en el tejido óseo de los peces. La acumulación de fluoruro en tejido duro puede ser considerada como un mecanismo de defensa para evitar la intoxicación por este ión (Sigler y Neuhold, 1972; Kessabi, 1984). Asimismo la acumulación de fluoruro puede jugar también un rol muy importante en el endurecimiento de los tejidos duros (el exoesqueleto de los crustáceos marinos principalmente); ello es debido a la combinación de fluoruro con calcio y fósforo para dar fluoroapatito (Zhang et al., 1993; Sands et al., 1998).

Otros estudios se han centrado en la diferencia de bioacumulación de fluoruro en los diferentes tejidos de los animales acuáticos. Moore (1971) estudió la absorción y el contenido en fluoruro en el cangrejo azul marino *Callinectes sapidus* encontró que el fluoruro se acumulaba principalmente en el exoesqueleto (298 µg F<sup>-</sup>/g peso seco) y menos en el músculo (10 µg F<sup>-</sup>/g peso seco).

Barbaro et al. (1981), trabajando en la laguna de Venecia, encontraron que los tejidos blandos de *Balanus amphitrite* y *Mytillus galloprovincialis* tenían contenidos de fluoruro por encima de 85 µg F<sup>-</sup>/g peso seco. Nell y Livanos (1988) realizaron experimentos de laboratorio con individuos juveniles de dos especies de ostras *Saccostrea commercialis* y *Ostrea angasi*. Ellos mostraron una relación lineal entre los niveles de fluoruro presentes en los tejidos en los tejidos y los niveles de fluoruro en agua de mar: los tejidos blandos contenían desde 45 a 204 µg F<sup>-</sup>/g peso seco, incrementando el fluoruro en el agua desde 0 a 30 mg/l. Además la acumulación de *S. commercialis* también incrementó cuando aumentaba la temperatura del agua.

Los objetivos principales de este estudio han sido los dos siguientes:

1. Analizar la toxicidad por fluoruros en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), mediante el cálculo de concentraciones letales 50 (CL50) para así comprobar diferencias en la tolerancia a los iones fluoruros entre el mejillón cebra y otros invertebrados acuáticos.
2. Determinar el contenido en fluoruros en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), mediante la técnica de fusión alcalina y el uso del electrodo selectivo, para así comprobar diferencias en la bioacumulación de fluoruros entre el tejido blando y el tejido duro (concha).

Las hipótesis de partida eran las siguientes.

- Los efectos tóxicos de los iones fluoruros sobre el mejillón cebra serán más intensos cuanto mayor sea la concentración a la que los animales están expuestos.
- El mejillón cebra será más tolerante que otros invertebrados de agua dulce a la contaminación por fluoruros en el medio en el que vive, debido principalmente a su carácter de especie invasora.
- El tamaño del animal influye en la tolerancia a la toxicidad de los fluoruros en una relación directa.
- En el tejido blando la bioacumulación de fluoruros será mayor que en el tejido duro ya que la absorción de los contaminantes sería más rápida en el primero que en el segundo.
- La bioacumulación de fluoruros será más elevada en aquellos individuos que murieron durante el experimento que en aquellos que permanecieron vivos al final del mismo, puesto que la absorción de una mayor cantidad de fluoruros sería la causa de la muerte.

## **Materiales y métodos**

### *Animales usados en los bioensayos de toxicidad y en la determinación de fluoruros (F)*

La especie usada tanto en los bioensayos de toxicidad como en la determinación de fluoruros fue el mejillón cebra, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Dreissenidae, Bivalvia, Mollusca), recolectado en el Lago Garda (Italia).

Los especímenes necesarios para los experimentos realizados fueron recogidos por personal experto a finales del mes de septiembre de 2008, en el Lago de Garda, situado en el Norte de Italia. Para ello se emplearon equipos de buceo ya que los animales se encuentran a cierta profundidad, adheridos a las rocas del fondo. Una vez muestreados los individuos se trasladaron en recipientes de plástico, refrigerados a 15° C, al laboratorio para llevar a cabo los experimentos. El lago de Garda se encuentra ubicado entre los Alpes y la llanura padana. Sus principales características se exponen en la Tabla 2. Este lago tiene una gran profundidad y destaca la frecuencia e intensidad de los periodos de mezcla. La intensidad de la mezcla vertical cuando el gradiente de densidad es mínimo (Marzo y casi Abril) es el factor más importante en determinar la redistribución y reciclado de las aguas profundas después de que sus características químicas hayan sido modificadas por los procesos de

mineralización (Salmaso et al, 1997). En el presente, el lago parece estar en condiciones oligo-mesotróficas, una situación determinada por la baja concentración de fósforo en la capa eufótica. Debido al carácter oligomítico y la alta concentración en nutrientes de las capas, el actual estado trófico no está inequívocamente definido (Sálmanos et al 1997).

*Tabla 2: Principales características morfométricas e hidrológicas del Lago Garda. Los valores de descarga corresponden al río Mincio en el periodo de años 1951-1987 (Comnità del Garda 1992).*

*Fuente: Salmaso, N. 1997*

|  |       |
|--|-------|
| Área del lago (km <sup>2</sup> )                     | 368   |
| Longitud de la costa (km)                            | 165   |
| Longitud (km)  | 51,9  |
| Anchura máxima (km)                                  | 16,7  |
| Profundidad máxima (m)                               | 350   |
| Profundidad media (m)                                | 133   |
| Volumen (km <sup>3</sup> )                           | 49,03 |
| Caudal de salida (m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )   | 58    |
| Tiempo de renovación teórico (años)                  | 26,8  |
| Altitud del lago (m)                                 | 65    |
| Zona de captación (lago incluido) (km <sup>2</sup> ) | 2260  |
| Altitud máxima de la zona de captación (m)           | 3556  |

De acuerdo con la base de datos de “Especies invasoras a nivel global” de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN 2006), *D. polymorpha* es una de las 100 especies más invasoras del mundo y sus impactos negativos en los ecosistemas y su daño económico, que son bien conocidos. El mejillón cebrá pertenece a una pequeña superfamilia de moluscos bivalvos los cuales están restringidos a hábitats de estuario y dulceacuícolas. (Morton 1969a; Hebert et al., 1989). Hasta el siglo XIX esta especie estaba restringida al Mar negro, el Mar Caspio y el Mar de Azov (Stanczykowska 1977), pero se ha extendido rápidamente por Europa. Su rápida expansión poblacional ha estado unida a la larva veliger libre que posee la especie y a su alta tasa de fecundidad (>30 000 huevos por hembra). En lugares con altas densidades, *D. polymorpha* puede causar pérdidas económicas significativas por obstrucción de los canales en instalaciones hidroeléctricas y sistemas de distribución de agua (Shtegman 1964; Morton 1969b).

Estudios de las poblaciones de *Dreissena polymorpha* en Europa (Kornobis 1977; Stanczykowska 1977) han mostrado que las hembras de esta especie en primer lugar liberan sus huevos cuando la temperatura del agua sobrepasa los 13°C y ese número de huevos es máximo cuando la temperatura asciende hasta 22°C. Los huevos son fertilizados después de la liberación y se desarrolla una larva veliger de 70 µm de largo. Ésta larva flota en el epilimnion durante 10-15 días. Una vez alcanzan los 200 µm, descienden hasta el fondo y se transforman en larvas postveliger. Empezarán así la transformación en individuos adultos. Las larvas postveliger son móviles durante varios días y seleccionan el sustrato apropiado para el asentamiento y la transformación. En las poblaciones europeas el periodo que pasa desde el huevo hasta la etapa juvenil es de al menos 3 semanas.



El mejillón cebra presente en aguas europeas normalmente comienza a reproducirse una vez que ha alcanzado aproximadamente el tamaño de 1cm, después de un año de crecimiento. El tamaño máximo de la concha y la edad son inversamente proporcionales a la temperatura. Asimismo la mayoría de las poblaciones son dominadas por adultos jóvenes. Con respecto a estas características, el Lago St Clair (EEUU) es una excepción por tener adultos de 2-3 años. (Herbert et al., 1989).

En Italia, la primera referencia que se tiene de la aparición de *Dreissena polymorpha* (Pallas,1771) fue en el Lago Garda en 1970. Se postula que fue transportando hasta allí adherido a los cascos de los barcos recreacionales de países del norte de Europa, como Alemania (Guisti y Oppin 1973). Hasta entonces este bivalvo se ha extendido por casi todo el norte de Italia en las cuencas de los ríos con drenaje al Mar Adriático. (Cianfanelli et al. 2007b). Debido a su carácter invasivo, los altos costes económicos causados en varios países europeos y Estados Unidos y su propiedad como bioindicador (acumula y transfiere micro-contaminantes como DDT, metales pesados, PCBs y otros xenobióticos. (Camusso et al.2001; Binelli et al.2004; Ricciardi et al.2004), *Dreissena polymorpha* es el molusco alóctono más ampliamente estudiado y monitorizado. Igual que sucede con otras especies invasoras las futuras medidas solamente pueden ir encaminadas a controlar y contener la expansión de la especie.

#### *Bioensayos de toxicidad*

Tras un periodo de aclimatación de 10 días, se realizaron dos bioensayos de toxicidad en la universidad de Padova. En el primer bioensayo, de toxicidad aguda., los individuos fueron expuestos, en acuarios de cinco litros de capacidad (9 mejillones por acuario), a un rango de 5 concentraciones (concentraciones nominales de 5, 10, 20, 40, y 80 mg F/l) más un control (<0,3 mg F/l) durante 96 horas. Las concentraciones de fluoruros deseadas se obtuvieron mediante la adición de fluoruro de sodio (NaF). El agua utilizado en los diferentes acuarios fue el agua tomada del Lago de Garda, con una dureza de  $106 \pm 14$  mg CaCo<sub>3</sub>/l, y la temperatura ambiental se mantuvo constante a 17°C. El experimento se realizó por triplicado. Se utilizaron para este primer bioensayo, los que tenían un tamaño mayor. Los organismos en los acuarios estuvieron expuestos a las concentraciones correspondientes. Diariamente cada individuo era estimulado con un ligero toque mediante el uso de pinzas, y si no se observaba reacción ante este estímulo (es decir, el individuo no cerraba sus valvas), se consideraba muerto. Aquellos individuos que iban muriendo eran extraídos del acuario y conservados en agua con formol al 4%. Además, para registrar los efectos subletales, se media el tiempo que los organismos tardaban en cerrar las valvas.

El segundo bioensayo de toxicidad se realizó a tenor de la baja mortalidad observada en el primer bioensayo, esto es, con el objetivo de conocer las concentraciones con efectos letales para los individuos. Por este motivo se incrementaron las concentraciones (concentraciones nominales de 120, 160, 200 y 240 mg F/l) así como el tiempo de exposición, que fue de 18 días de duración. Nuevamente el experimento se realizó por triplicado. En cada uno de los acuarios fueron introducidos 5 individuos, de tamaño menor a los del primer experimento. El procedimiento para la comprobación de la mortalidad y la conservación de los individuos fueron las mismas que en el primer bioensayo, así como las condiciones ambientales de temperatura y dureza del agua.

### *Determinación del contenido en fluoruro en los tejidos de *Dreissena polymorpha*.*

Se ha determinado el contenido en fluoruros (F<sup>-</sup>) en los tejidos de *Dreissena polymorpha*, distinguiéndose entre organismos vivos y muertos, y entre tejido blando y tejido duro (valvas). Para ello se ha empleado la técnica de la fusión alcalina (Baker, 1972; McQuaker y Gurney, 1977; Malde et al., 2001) y el electrodo selectivo de iones fluoruro. Se añadieron 5 mL de hidróxido sódico (8M) en los crisoles de níquel de capacidad 70 mL. Los crisoles se introdujeron en una estufa a 150°C durante dos horas y posteriormente en un horno mufla durante 2 horas más para obtener la muestra en forma de cenizas. Estas cenizas resultantes se diluyeron en 50 ml de agua destilada. El pH se redujo hasta valores de 8-9 mediante la adición de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH, 99.5-100.5%, M=60.05, 1 l ≈ 1.052 kg) y entonces las muestras fueron filtradas usando filtros de un tamaño de poro de 0.45 μm (*GE Water & Process Technologies*). Una vez más el pH fue tamponado hasta valores de 6,5-7 con ácido acético. Se añadió el reactivo TISAB (*Total Ionic Strength Adjustment Buffer*) en proporción 1:1 y fue medido el contenido en fluoruro con el electrodo selectivo de iones ISE F800 (0.02 mg F<sup>-</sup>/l to saturation, exactitude ±0.1%, WTW).

### *Tratamiento y análisis de los datos*

Se emplearon varios programas informáticos: para la realización de tablas, gráficos, etc. la aplicación empleada fue Microsoft Excel 2003; para el análisis estadístico de los datos y el cálculo de las concentraciones letales cincuenta (CL50) el programa elegido y utilizado fue Statgraphics 5.1.

## **Resultados**

### *Toxicidad por fluoruros (F<sup>-</sup>) en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)*

En el primer bioensayo, los valores de las concentraciones letales 50 (CL50) no son indicativos del nivel de toxicidad por fluoruros (F<sup>-</sup>) en *Dreissena polymorpha*, debido a que para ninguna concentración y ningún tiempo de exposición la mortalidad fue de al menos el 50% de la población.

Los valores de las CL50 para el segundo bioensayo fueron calculados mediante el programa estadístico Statgraphics 5.1. Para hallar dichas concentraciones se realizó un análisis probit cuyos resultados se muestran a continuación en la tabla 3. A 24 horas no existía normalidad de los datos, por lo tanto no se pudo realizar un análisis probit, por ello no se presentan dichos valores. En este experimento las concentraciones reales variaron entre 84-201 mg F<sup>-</sup>/l.

*Tabla 3: Concentraciones letales 50 para el segundo bioensayo, calculadas a partir de las concentraciones reales medias.*

| <b>Tiempos de exposición</b> | <b>CL50 (mgF/l)<br/>Concentraciones reales</b> |
|------------------------------|--|
| 48 horas                     | 171,7 (169,103 – 174,391)                      |
| 72 horas                     | 171 (168,496 – 173,567 )                       |
| 96 horas                     | 171 (168,496 – 173,567 )                       |

Debido a que en los intervalos de confianza al 95% existe solapamiento entre los valores, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en la toxicidad por fluoruros con relación al tiempo de exposición al que se sometieron a los mejillones en el segundo bioensayo.

Estos dos experimentos se realizaron con individuos de tamaños significativamente diferentes, siendo los animales del experimento primero más grandes (tamaño medio de longitud de  $1,29 \pm 0,19$  cm) que los organismos del segundo experimento ( $0,97 \pm 0,19$  cm). En función de los resultados obtenidos en ambos experimentos, los individuos de mayor tamaño parecen ser menos tolerantes a la contaminación por fluoruros en el medio acuático que los de menor tamaño. Este hecho puede explicarse por la existencia de un 22% de mortalidad a las 96h en una de las réplicas del control ( $<0,3$  mg F/l) en el primer bioensayo, mientras que en el segundo bioensayo no hubo mortalidad en el control. Estas concentraciones son las únicas para las que sería significativo comparar los valores ya que los bioensayos se realizaron a concentraciones diferentes.

Los efectos subletales se han valorado en función del tiempo que los individuos tardaban en cerrar sus valvas tras ser estimulados con pinzas de laboratorio. El cierre de las valvas sirve de defensa a muchos bivalvos, al aislarse de los contaminantes o tóxicos presentes en el medio. Esta medida era tomada diariamente. Aquellos animales que como mecanismo de defensa tenían las valvas cerradas en el momento de producirse el estímulo obtuvieron valores de tiempo 0 segundos, y por lo tanto no fueron empleados en los análisis estadísticos posteriores.

Con estos datos y ayuda del programa estadístico Statgraphics, se realizaron los análisis por separado de cada experimento. En cada experimento se realizaron cuatro análisis de la varianza (ANOVA) de una vía: uno para cada momento de toma de datos (24, 48, 72 y 96 horas). Para ambos bioensayos, los resultados indicaron que no existen diferencias significativas (95 % de confianza) en el tiempo que tardan en cerrar las valvas ante un estímulo los animales expuestos a las distintas concentraciones, no siendo por lo tanto un efecto subletal de la toxicidad por fluoruros.

*Bioacumulación de fluoruros (F) en los tejidos de Dreissena polymorpha (Pallas, 1771)*

Las tablas 4 y 5 recogen los resultados de las determinaciones del contenido en fluoruros para los tejidos duro y blando, respectivamente. Estas determinaciones se realizaron en organismos muertos a lo largo de los experimentos, y en aquellos que permanecían vivos al final de los mismos. Los análisis estadísticos se realizaron diferenciando por tejidos, a 48 horas con animales muertos y a 96 horas con animales que permanecieron vivos al final del experimento, ya que para dichos tiempos existía un set de datos suficiente.

*Tabla 4: Contenido medio de fluoruros (F) en los mejillones cebra que murieron a las 48 horas.*

| Tejido | Concentración (mg F/l) | Contenido medio de fluoruros (F) (mg F/kg ps) |
|--------|------------------------|---|
| Duro   | 10                     | 95,505 ± 0,255                                |
|        | 20                     | 92,78 ± 0,21                                  |
|        | 80                     | 535,875 ± 0,635                               |
|        | 200                    | 2940,57 ± 0,365                               |
|        | 240                    | 4137,03 ± 572,98                              |
| Blando | 10                     | 2441,11 ± 18,64                               |
|        | 20                     | 3702, 18 ± 15,235                             |
|        | 80                     | 3338,9 ± 22,33                                |
|        | 200                    | 20331,5 ± 55,72                               |
|        | 240                    | 24555,0 ± 4970,54                             |

Tras realizar dos análisis de la varianza, uno para el tejido blando y otro con tejido duro, puede concluirse que existen diferencias significativas al 95% de confianza entre las medias de las distintas concentraciones, es decir que tanto en el tejido duro como en el tejido blando, el aumento de la concentración de fluoruros en medio acuático implica un aumento del contenido en fluoruros en los tejidos del mejillón cebra *Dreissena polymorpha*.

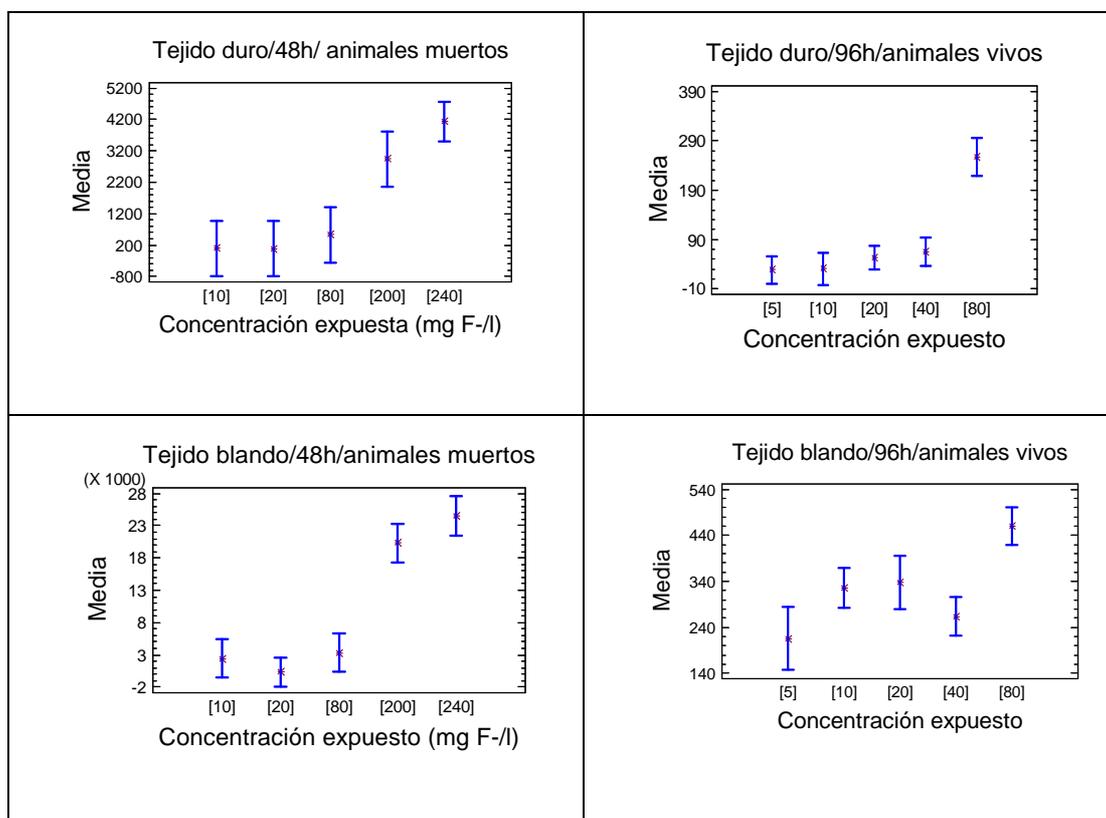
Por otro lado, los contenidos medios en fluoruros acumulados en los individuos que permanecieron vivos al cabo de las 96 horas en el primer bioensayo, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Contenido medio de fluoruros (F) en los mejillones cebra que permanecieron vivos a las 96 horas del experimento.

| Tejido | Concentración (mg F/l) | Contenido medio de fluoruros (F) (mg F/kg ps) |
|--------|------------------------|---|
| Duro   | 5                      | 28,11 ± 1,36                                  |
|        | 10                     | 30,645 ± 2,09                                 |
|        | 20                     | 53,22 ± 2,84                                  |
|        | 40                     | 65,788 ± 3,38                                 |
|        | 80                     | 257,17 ± 79,69                                |
| Blando | 5                      | 216,254 ± 52,45                               |
|        | 10                     | 325,60 ± 22,06                                |
|        | 20                     | 337,54 ± 35,07                                |
|        | 40                     | 263,933 ± 38,75                               |
|        | 80                     | 461,075 ± 26,13                               |

Tras realizar análisis de la varianza, los resultados fueron los esperados, demostrándose que el contenido en fluoruros en los tejidos de *Dreissena polymorpha* aumenta cuando lo hace la concentración de este anión en el medio acuático.

Los resultados de dichos análisis, aparecen representados gráficamente en las figura 1. En los gráficos que componen dicha figura se resalta el aumento en el contenido en fluoruros en los tejidos de los animales además de verse los diferentes grupos de comportamiento que siguen los datos. En estas gráficas, en el eje de abscisas se representan los valores de la concentración a la que fueron expuestos los animales, mientras que en el eje de ordenadas la media del contenido en fluoruros, expresada en mg F/Kg ps.



*Figura 1: Evolución del contenido en fluoruros con relación a la concentración expuesta en animales muertos a las 48 horas del experimento y en animales vivos a las 96 horas del experimento.*

En las dos gráficas referidas al tejido blando existen dos valores de (uno en cada gráfica) que no parecen seguir la tendencia general del resto de datos. Consideramos que estos datos anómalos son debidos a que la cantidad de biomasa fue insuficiente para la realización de la determinación, lo cual generalmente produce datos erróneos en la medida del electrodo.

Para poder comparar la bioacumulación de iones fluoruro ( $F^-$ ) entre mejillones vivos y muertos, únicamente pueden utilizarse aquellos valores relativos a las concentraciones a las que al término de los experimentos (96 horas para el primer experimento, y 18 días para el segundo) existían ambos. De nuevo, se analizaron por separado el tejido blando y el duro. Los resultados de la determinación del contenido en fluoruros se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6: Contenido medio de fluoruros en el tejido blando de los mejillones cebrá vivos (en azul) y muertos (en rojo)

| Tejido blando          | Tiempo de exposición   |  |
|------------------------|--|--|
|                        | 96h  | 18 días  |
| Concentración Expuesto |  |  |
| 20 mg F/l              | 337,546 ± 92,78 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>1000,86 ± 17,11 mg F <sup>-</sup> /Kg ps     | -  |
| 40 mg F/l              | 263,933 ± 139,731 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>1688,48 ± 245,018 mg F <sup>-</sup> /Kg ps | -  |
| 120 mg F/l             | -  | 2622,51 ± 853,911 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>23458,90 ± 538 mg F <sup>-</sup> /Kg ps  |
| 200 mg F/l             | -  | 4771,24 ± 1915,91 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>12551,4 ± 74,88 mg F <sup>-</sup> /Kg ps |

Tabla 7: Contenido medio de fluoruros en el tejido duro de los mejillones cebrá vivos (en azul) y muertos (en rojo)

| Tejido Duro            | Tiempo de exposición   |  |
|------------------------|--|--|
|                        | 96h  | 18 días  |
| Concentración Expuesto |  |  |
| 20 mg F/l              | 53,22 ± 7,51 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>114,8 ± 0,296 mg F <sup>-</sup> /Kg ps      | -  |
| 40 mg F/l              | 65,788 ± 7,56 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>138,415 ± 12,3357 mg F <sup>-</sup> /Kg ps | -  |
| 120 mg F/l             | -  | 1116,95 ± 225,677 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>4142,3 ± 10,6224 mg F <sup>-</sup> /Kg ps  |
| 200 mg F/l             | -  | 2153,18 ± 545,686 mg F <sup>-</sup> /Kg ps<br>6613,45 ± 12,0279 mg F <sup>-</sup> /Kg ps |

Para la comparación del contenido en fluoruros (F<sup>-</sup>) entre animales vivos y muertos se realizaron 8 análisis estadísticos de comparación de medias mediante la t de Student. Los resultados de dichos análisis determinaron la existencia de diferencias significativas entre las medias de los animales vivos y muertos para todos los tiempos de exposición y concentraciones con un nivel de confianza del 95%. El contenido en fluoruros (F<sup>-</sup>) fue mayor en los individuos muertos que en aquellos que permanecieron vivos al término de los experimentos. Esto parece indicar que la contaminación por fluoruros (F<sup>-</sup>) en el agua la causa de la muerte de los animales. Estas diferencias

significativas se muestran gráficamente en las figuras 2 y 3. Las gráficas reflejan los valores medios de bioacumulación de fluoruros en los tejidos de las muestras de mejillón cebra analizadas. Se puede observar que no se solapan los valores medios.

## TEJIDO BLANDO

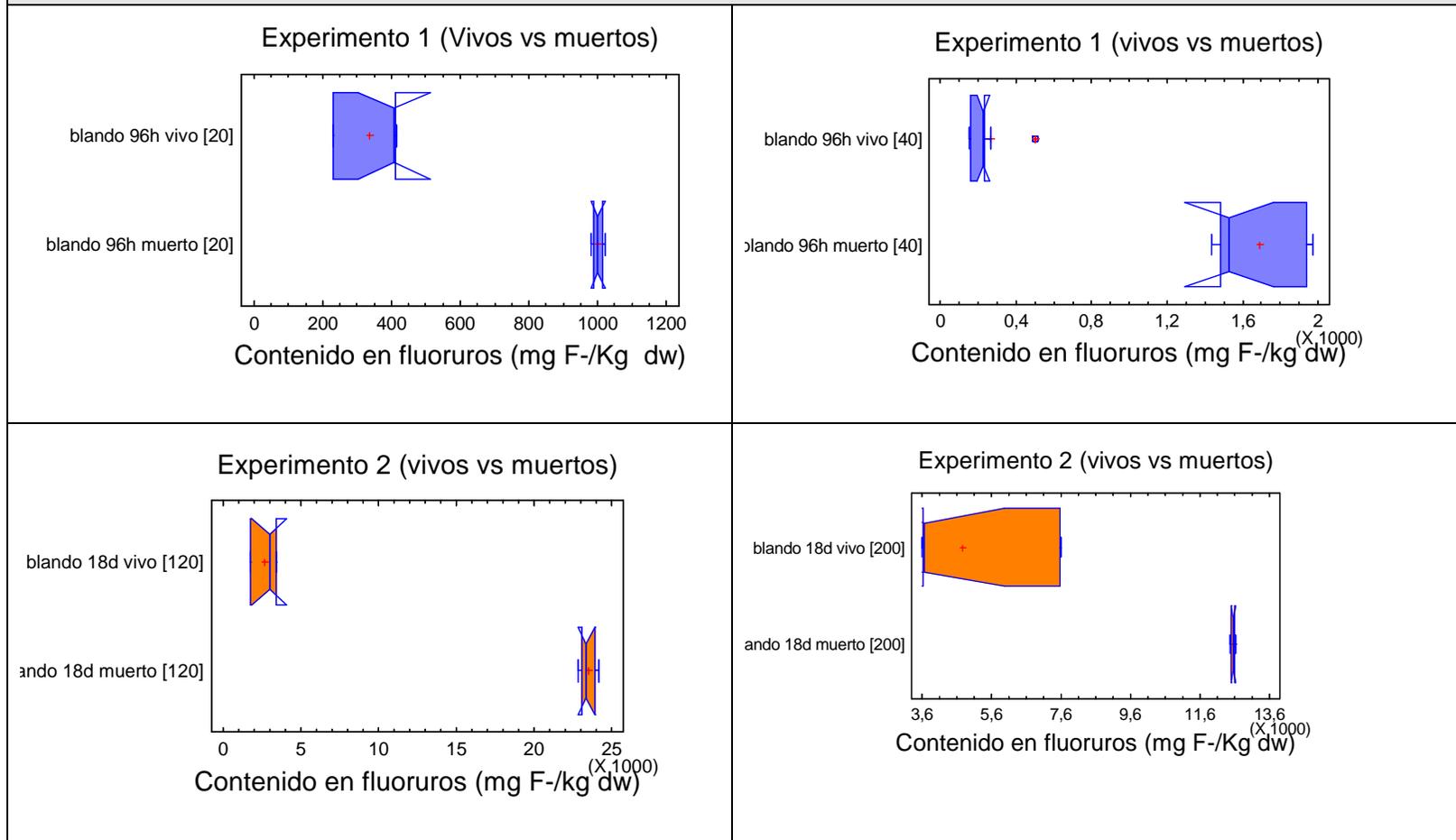


Figura 2: Contenido medio de fluoruros (F) en el tejido blando de animales muertos y vivos

## TEJIDO DURO

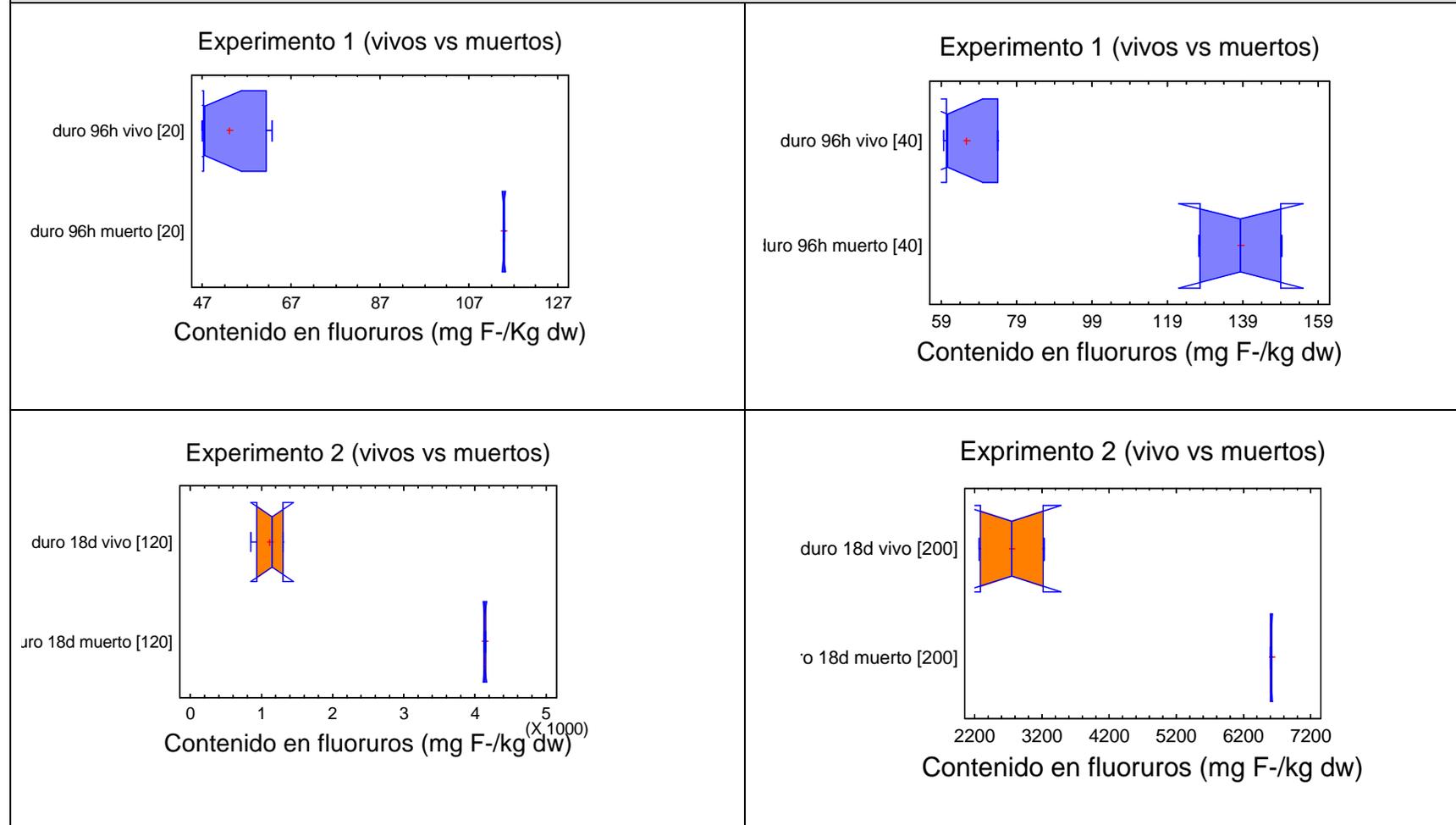


Figura 3: Contenido medio de fluoruros (F) en el tejido duro de animales muertos y vivos

Para comparar la cantidad de fluoruros (F<sup>-</sup>) presente en los diferentes tejidos de *Dreissena polymorpha* se han empleado los datos referentes a las concentraciones de 20 y 40 mg F<sup>-</sup>/l a 96 horas para el primer bioensayo, y la concentraciones de 120 y 200 mg F<sup>-</sup>/l a 18 días para el segundo.

La cantidad de fluoruros presente por tejidos (duro y blando) queda reflejada en las tablas 8 y 9, ahora diferenciando en los animales que estaban vivos al final de los experimentos, de aquellos que murieron al final de los mismos:

*Tabla 8: Contenido medio de fluoruros en los individuos vivos diferenciando tejidos: tejido duro (rosa), tejido blando (verde).*

| Animales vivos         | Tiempo de exposición   |   |
|------------------------|--|---|
|                        | 96h  | 18 días   |
| Concentración Expuesto |  |   |
| 20 mg F/l              | 53,2257 ± 7,51453 mg F/ Kg ps<br>337,541 ± 92,7884 mg F/ Kg ps | -   |
| 40 mg F/l              | 65,788 ± 7,561 mg F-/Kg ps<br>263, 933 ± 139,731 mg F-/Kg ps   | -   |
| 120 mg F/l             | -  | 1116,95 ± 225,677 mg F-/ Kg ps<br>2622 ± 853,911 mg F-/Kg ps    |
| 200 mg F/l             | -  | 2753,18 ± 545,686 mg F-/Kg ps<br>4771,24 ± 1915,91 mg F-/ Kg ps |

*Tabla 9: Contenido medio de fluoruros en los individuos muertos diferenciando tejidos: tejido duro (rosa), tejido blando (verde).*

| Animales muertos       | Tiempo de exposición  |  |
|------------------------|---|--|
|                        | 96h   | 18 días  |
| Concentración Expuesto |   |  |
| 20 mg F/l              | 114,8 ± 0,29 mg F-/ Kg ps<br>1000,86 ± 17,11 mg F- / Kg ps    |  |
| 40 mg F/l              | 138,415 ± 12,3357 mg F-/ Kg ps<br>1688,48 ± 245,018 mg F-/ ps |  |
| 120 mg F/l             |   | 4142,3 ± 10,62 mg F-/Kg ps<br>23458,8 ± 538,111mg F-/ Kg ps  |
| 200 mg F/l             |   | 6613,42 ± 12,02 mg F-/ Kg ps<br>12551,4 ± 74,88 mg F-/ Kg ps |

Para la comparación del contenido en fluoruros en los diferentes tejidos, se realizaron 8 análisis de comparación de medias (t de Student). Los resultados de estos ocho análisis mostraron que las medias son significativamente diferentes (con un nivel de confianza del 95%) para cada concentración y tiempo de exposición, según los tejidos de los animales; siendo además mayor significativamente el contenido en fluoruros en el tejido blando que en la concha.

Las diferencias significativas se aprecian con mayor claridad en los gráficos contenidos en las figuras 4 y 5.

### Animales vivos

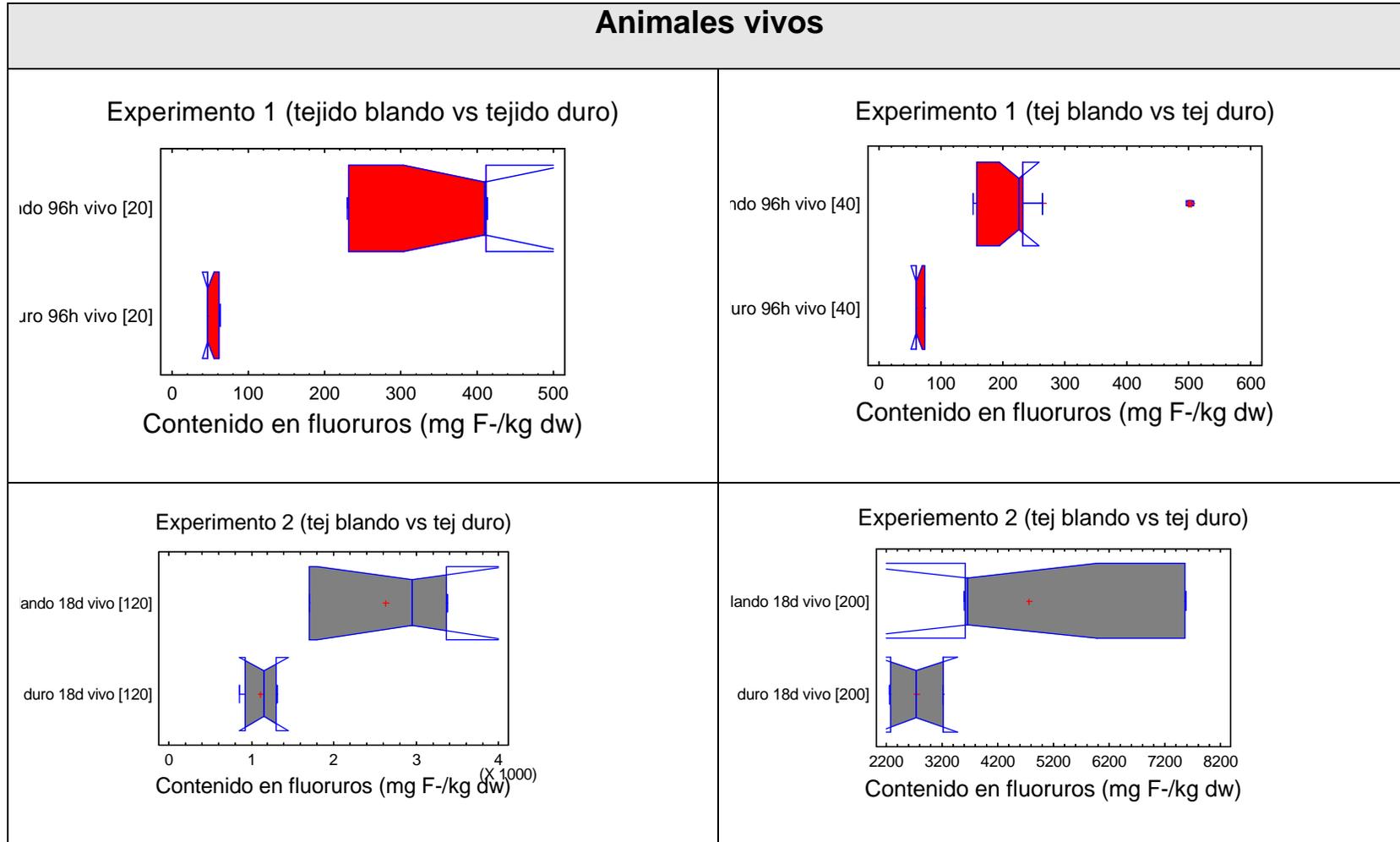


Figura 4: Contenido medio en fluoruros (F) en los diferentes tejidos (duro y blando) en animales que permanecieron vivos al final del experimento

### Animales muertos

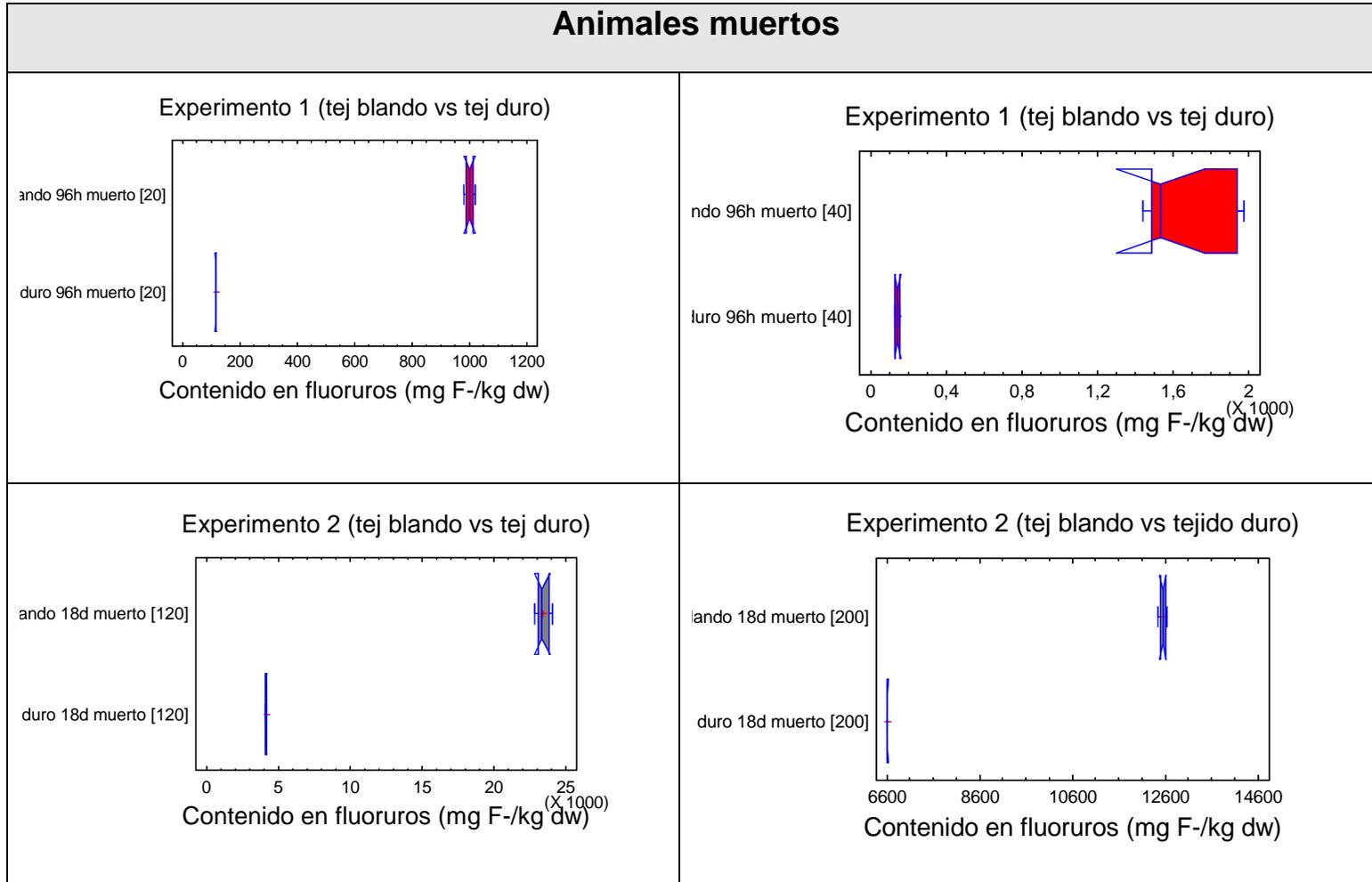


Figura 5: Contenido medio en fluoruros (F) en los diferentes tejidos (duro y blando) en animales que murieron.

## Discusión

Mediante el análisis estadísticos de los resultados obtenidos, hemos comprobado que la toxicidad por fluoruros (la mortalidad) en *Dreissena polymorpha* aumenta con la concentración de fluoruros en el medio acuático, el tiempo de exposición. Esto concuerda con los resultados de otros autores para otras especies (LeBlanc, 1980; Dave, 1984; Fieser et al., 1986; Kühn et al., 1989; Camargo y Tarazona, 1990; Camargo, 1991b; Camargo et al, 1992a, b; Camargo, 2003). En este caso, el efecto de la temperatura no ha sido considerado en los experimentos, ya que se han realizado a temperatura constante.

Estudios realizados en laboratorio con anterioridad sugerían que la toxicidad por iones de flúor en invertebrados acuáticos (concretamente en larvas de insectos) podría disminuir conforme aumentaba el tamaño del cuerpo del animal y el contenido en cloruros en el agua (Camargo, 2002; Camargo 2003). Estos estudios fueron llevados a cabo con larvas de la especie *Hydropsyche tibialis* un tricóptero de aguas continentales. Sin embargo, en el caso del mejillón cebra nuestros resultados parecían indicar que la toxicidad por fluoruros podría ser más elevada en aquellos animales con mayor tamaño corporal que en aquellos con un tamaño corporal menor. El efecto de los aniones cloruros no ha sido testado en los bioensayos realizados, no obstante, sería interesante realizar dicho comprobación en futuros trabajos de investigación.

Otro factor que influye en la toxicidad por fluoruros ( $F^-$ ) de los invertebrados acuáticos es si se trata de especies dulceacuícolas o marinas. Aquellos animales que viven en aguas salobres o marinas parecen ser más tolerantes que aquellos que viven en aguas continentales. Algunos autores han realizado trabajos de investigación con anterioridad mostrando que hay especies que habitan en zonas de estuario sobre las que no se muestran efectos tóxicos de la contaminación por fluoruros. Dos especies de crustáceos fueron estudiadas por Hemens y Warwick (1972), dichas especies *Penaeus indicus* y *P. monodon* no mostraron efectos tóxicos, tras 96 horas de exposición a una concentración máxima de 100 mg  $F^-/l$ . Posteriormente, Hemens et al. (1975) trabajó con dos especies de crustáceos de estuario, *Tyloplax blephariskios* y *Penaeus indicus*, con exposiciones de 5,5 mg  $F^-/l$ , los cuales tras 113 días de exposición no acusaron efectos letales o deterioros físicos en. Resultados similares se obtuvieron con la especie de anémona *Anthopleura aureoradiata*, con el mejillón *Mytilus edulis* y con la especie de krill rojo *Munida gregaria* (Pankhurst et al., 1980). Por el contrario algunos invertebrados marinos y estuarinos pueden presentar una sensibilidad relativamente alta a la toxicidad por iones fluoruro. Es el caso de las especies como *Perna perna* o mejillón marrón, que registró una mortalidad del 30% después de 120 horas de exposición a una concentración de fluoruro inicial de 7,2 mg  $F^-/l$  (Hemens y Warwick, 1980). Además otra especie de crustáceo, *Artemia salina* expuesta a una concentración de fluoruros de 5 mg  $F^-/l$  durante 288 horas acusó atrofia en su crecimiento de manera significativa (Pankhurst et al., 1980).

El mejillón cebra, *Dreissena polymorpha* se extiende por zonas de aguas continentales aunque también puede habitar en zonas de desembocadura de los ríos. Concretamente en la Península Ibérica es conocida su presencia por el Delta del Ebro, zona húmeda en donde pueden encontrarse tanto aguas dulces como aguas salobres. La CL50 estimada en este estudio, en comparación con la de otros organismos (tabla 10) de agua dulce, es algo más elevada, en otras palabras, el mejillón cebra parece ser bastante tolerante a la contaminación por fluoruros en el medio acuático.

Tabla 10: Valores de las concentraciones letales 50 (CL50) a diferentes tiempos de exposición de invertebrados marinos y dulceacuícolas.

| Especies                        | Temperatura °C | Dureza Total (mg CaCO <sub>3</sub> /l) | CL50 (mg F/l)        | Referencia bibliográfica |
|---------------------------------|----------------|--|----------------------|--------------------------|
| <i>Daphnia magna</i>            | 23,2           | 173                                    | 154 (48h)            | LeBlanc, 1980            |
|                                 | 20             | 250                                    | 98 (48h)             | Dave, 1984               |
|                                 | 15             | 169,3                                  | 304 (48h)            | Fieser et al.,1986       |
|                                 | 20             | 169,3                                  | 251 (48h)            | Fieser et al.,1986       |
|                                 | 25             | 169,3                                  | 200 (48h)            | Fieser et al.,1986       |
| <i>Chimarra marginata</i>       | 15,2           | 15,6                                   | 120 (48h)            | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 79,7 (72h)           | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 44,9 (96h)           | Camargo y Tarazona, 1990 |
| <i>Cheumatopsyche pettiti</i>   | 18             | 40,2                                   | 128 (48h)            | Camargo et al., 1992a    |
|                                 | 18             | 40,2                                   | 73,2 (72h)           | Camargo et al., 1992a    |
|                                 | 18             | 40,2                                   | 42,5 (96h)           | Camargo et al., 1992a    |
| <i>Hydropsyche bulbifera</i>    | 15,2           | 15,6                                   | 79,2 (48h)           | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 44,9 (72h)           | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 26,3 (96h)           | Camargo y Tarazona, 1990 |
| <i>Hydropsyche lobata</i>       | 15,2           | 15,6                                   | 78,2 (72h)           | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 48,2 (96h)           | Camargo y Tarazona, 1990 |
| <i>Hydropsyche pellucidula</i>  | 15,2           | 15,6                                   | 112 (48h)            | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 59,1 (72h)           | Camargo, 1991b           |
|                                 | 15,2           | 15,6                                   | 38,5 (96h)           | Camargo y Tarazona, 1990 |
| <i>Hydropsyche bronta</i>       | 18             | 40,2                                   | 52,6 (48h)           | Camargo et al., 1992a    |
|                                 | 18             | 40,2                                   | 25,8 (72h)           | Camargo et al., 1992a    |
|                                 | 18             | 40,2                                   | 17 (96h)             | Camargo et al., 1992a    |
| <i>Hydropsyche occidentalis</i> | 18             | 40,2                                   | 102 (48h)            | Camargo et al., 1992a    |
|                                 | 18             | 40,2                                   | 53,5 (72h)           | Camargo et al., 1992a    |
|                                 | 18             | 40,2                                   | 34,7 (96h)           | Camargo et al., 1992a    |
| <i>Mysidopsis bahía</i>         |                | Agua marina                            | 10,5 (96h)           | LeBlanc, 1984            |
| <i>Penaeus indicus</i>          |                | Agua marina                            | 1118 (96h)           | McClurg, 1984            |
| <b><i>Dreissena</i></b>         | <b>17</b>      | <b>106 ± 14</b>                        | <b>221,991 (48h)</b> |                          |

|                   |    |          |             |
|-------------------|----|----------|-------------|
| <i>polymorpha</i> | 17 | 106 ± 14 | 220,0 (72h) |
|                   | 17 | 106 ± 14 | 220,0 (96h) |

En lo referente a los efectos subletales que se midieron en este estudio, puede afirmarse que el aumento del tiempo que tardan los mejillones en cerrar las valvas no ha resultado ser un efecto subletal de la toxicidad por fluoruros. Además, existen otros motivos por los que los bivalvos recurren a este mecanismo de defensa. Por ello el tiempo que tardan en cerrar sus valvas es un parámetro que puede ser muy variable dependiendo de multitud de factores. En este sentido, este tipo de efectos subletales deberían ser monitorizados de manera continua, utilizando por ejemplo cámaras de video.

La dureza del agua es otro factor que influye en la tolerancia de los animales acuáticos frente a la contaminación por fluoruros en el medio, viéndose más afectados por la contaminación por fluoruros aquellos organismos que viven en aguas relativamente blandas (Camargo, 2003). Los mejillones cebra usados en este estudio, procedentes del Lago de Garda (Italia), vivían en aguas semiduras, con una dureza de  $106 \pm 14$  mg  $\text{CaCO}_3$ . Las aguas se consideran dura a partir los 120 mg  $\text{CaCO}_3$ /l. Esta especie de bivalvo, *Dreissena polymorpha* requiere para el desarrollo de sus huevos altas concentraciones de calcio (aproximadamente 1meq/l) (Sprung, 1987). Esto podría restringir la especie a aguas duras, facilitando que estos animales toleren mejor la contaminación por fluoruros. Parece ser que este requerimiento es el motivo por el cual esta exitosa especie invasora aún no ha colonizado muchas zonas europeas de los Países Escandinavos, debido a que sus aguas tienen bajo contenido en carbonatos. En otras palabras, la dureza del agua parece limitar la distribución del mejillón cebra en algunos lugares del mundo como puede ser en Norteamérica (Strayer, 1991).

Los invertebrados acuáticos absorben los iones fluoruros principalmente de agua, de forma directa (Neuhold y Sigler, 1960; Hemens y Warwick, 1972; Nell y Livanos, 1988, Camargo, 2003). Nuestro resultados indican que así sucede con el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*. Los mejillones cebra expuestos concentraciones crecientes de fluoruro en el medio acuático, mostraron contenidos de fluoruros en sus tejidos (duro y blando) en aumento, conforme a dicho incremento en la concentración de fluoruros en el medio al que estaban expuestos. Al igual que ocurrió para con la toxicidad, la cantidad de iones fluoruro que los animales acuáticos absorben y acumulan está en función de la concentración en el medio, el tiempo de exposición y la temperatura del agua (Neuhold y Sigler, 1960; Moore, 1971; Hemens y Warwick, 1972; Wright y Davidson, 1975; Milhaud et al., 1981; Pillai y Mane, 1985; Nell y Livanos, 1988, Camargo, 2003). En numerosos invertebrados acuáticos el fluoruro que no es eliminado tiende a acumularse en el exoesqueleto, esto puede implicar un mecanismo defensivo contra la intoxicación por fluoruros (Sigler y Neuhold, 1972; Kessabi, 1984; Camargo, 2003) y/o que dichos aniones puedan jugar un rol importante en el endurecimiento de los tejidos duros, principalmente en los crustáceos (Zhang et al., 1993; Sands et al., 1998; Camargo, 2003). Sin embargo, en el caso del mejillón cebra, la mayor bioacumulación de iones fluoruro se ha detectado en el tejido blando. Este hecho puede deberse a que los mejillones cebra, son animales filtradores por lo que la contaminación del agua pasa directamente a su tejido blando, donde se acumula en mayor cantidad.

Resultados similares se han encontrado en otros organismos (Babaro et al., 1981; Nell y Livanos, 1988). Hasta el momento estos estudios han sido realizados con animales marinos. Babaro et al. (1981) halló en el tejido blando de *Balanus amphitrite* y el mejillón mediterráneo *Mytillus galloprovincialis* contenidos en fluoruros superiores a 85  $\mu\text{g F}^-/\text{g}$  peso seco. Otras investigaciones realizadas con dos especies de ostras, *Saccostrea commercialis* y *Ostrea angasi* indicaron una relación lineal entre el nivel de fluoruro ( $\text{F}^-$ ) en los tejidos y los niveles de fluoruros presentes en el agua de mar (Nell y Livanos, 1988). Los tejidos blandos de estas dos especies de ostras contenían desde 45 hasta 204  $\mu\text{g F}^-/\text{g}$  peso seco con concentraciones de fluoruro en el agua de mar que iban de 0 a 30 mg/l. Este hecho, se produce también en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*, de acuerdo con nuestros resultados, un aumento en la concentración de iones fluoruro en el agua produce un incremento en el contenido de fluoruros en los tejidos del animal, existiendo una relación directa. Asimismo el contenido en *S. commercialis* incrementaba al hacerlo también la temperatura del agua como consecuencia del incremento del metabolismo. Al igual que en estos animales marinos, *Dreissena polymorpha* acumula mayor cantidad de fluoruros en su tejido blando que en la concha. Para estudios posteriores resultaría interesante analizar el efecto producido por la temperatura del agua con relación a la cantidad de fluoruros acumulados en los tejidos de estos bivalvos u otros de agua dulce. Para estos posibles estudios posteriores debe tenerse en cuenta que el crecimiento del mejillón cebra no se produce por debajo de los 10°C, y que para la liberación de las larvas y su desarrollo se necesitan aguas cálidas (Staczykowska, 1977; Lewandowski, 1982a; Sprung, 1987).

Estudios realizados anteriormente han estimado que tanto invertebrados como peces presentes en zonas de estuario podían acumular cantidades relativamente elevadas de fluoruros ( $\text{F}^-$ ) en sus cuerpos tras 72 días de exposición a una concentración de 52 mg  $\text{F}^-/\text{l}$  (Hemens y Warwick, 1972; Camargo, 2003). Algunas de estas especies eran *Tylodiplax blephariskios*, *Palaemon pacificus*, *Penaeus indicus* y *Mugil cephalus*. El segundo experimento del presente estudio tuvo una duración 18 días, al final de los cuales los mejillones cebra que permanecieron vivos acumularon una alta cantidad de iones fluoruro en sus tejidos. Este hecho podría indicar la posibilidad de que se produzca una bioconcentración y biomagnificación de fluoruros a lo largo de la cadena trófica, constituyendo un riesgo potencial para los ecosistemas acuáticos, e incluso, para la salud humana. El mejillón cebra no es un elemento común en la dieta europea actualmente pero se encuentra en las bases de las cadenas tróficas de muchos ecosistemas acuáticos continentales.

En ecosistemas marinos se han estudiado ya algunos organismos que pueden ser usados como indicadores biológico: *Balanus amphitrite* (Babaro et al., 1978) y *Mytillus galloprovincialis* (Fossato y Siviero, 1974). Los mejillones cebra *Dreissena polymorpha*, debido a que son capaces de acumular fluoruros en sus tejidos en relación con la concentración de éstos en el ambiente, podrían ser usados como indicadores biológicos de contaminación de las aguas, además pudiendo ser empleados en programas de monitoreo ambiental en aquellos ecosistemas acuáticos en los que ya se encuentre presente. Muchos autores así lo consideran, ya que esta especie de molusco posee una rápida habilidad para acumular una gran variedad de contaminantes (de Kock y Bowner, 1993).

Anteriores estudios de investigación sugirieron que los moluscos, en concreto *Mytillus galloprovincialis*, no acumulan iones fluoruro de manera proporcional a la concentración

de dicho elemento en el medio. Una posible explicación de este hecho reside en que en situaciones de estrés, encontrándose los animales al límite de su supervivencia, son capaces de cerrar las valvas e impedir la entrada de contaminantes (Babaro et al., 1981). En el caso de *Dreissena polymorpha* este comportamiento se pudo observar en el experimento. Animales presentes en los acuarios permanecían con las valvas cerradas, mientras que otros las mantenían abiertas, de manera que estos últimos llevaban a cabo la filtración y por lo tanto también la acumulación de fluoruros. Sin embargo, en último término, la necesidad de alimentarse pueden acabar teniendo más peso que la propia presencia de contaminantes (por ejemplo, iones de flúor) en el medio acuático, de forma que los animales terminarían por abrir sus valvas en algún momento para alimentarse.

Por otra parte, que la bioacumulación fuese mayor en los individuos que murieron durante los experimentos con respecto a los valores encontrados en los tejidos de aquellos que se mantuvieron vivos, parece indicar que el motivo de la muerte fue efectivamente la intoxicación por este ión.

## Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y a la discusión realizada de los mismos, podemos concluir que el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* es más tolerante a los efectos tóxicos producidos por el ión fluoruro ( $F^-$ ) que otros invertebrados acuáticos estudiados con anterioridad por otros autores. Se confirma la hipótesis de partida de que el mejillón cebra, al ser una exitosa especie invasora, exhibe un mayor rango de tolerancia con relación a las condiciones ambientales.

En lo referente a la bioacumulación de fluoruros en tejidos del mejillón cebra, podemos afirmar que el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* acumula mayor cantidad de fluoruros en el tejido blando que en el tejido duro (la concha).

Asimismo, los individuos que murieron al final de los experimentos acumularon mayor cantidad de fluoruros que aquellos que permanecieron vivos, debido a que los primeros probablemente absorbieron y posteriormente bioacumularon mayor cantidad de fluoruros en sus tejidos.

Finalmente, por todos estos motivos, el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* puede ser un buen bioindicador potencial para monitorizar la contaminación por fluoruros en los ecosistemas acuáticos continentales, en los cuales ya se encuentre presente.

## Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto de investigación CGL2006-06804/BOS) los fondos que nos han permitido la realización de este trabajo de investigación. También queremos agradecer al Ministerio de Educación los fondos que posibilitaron la estancia de Cristina Gonzalo en la Universidad de Padua (Italia), gracias a una beca F.P.U. Igualmente damos las gracias a dicha Universidad de Padua, y en

especial a la Profesora Sandra Casellato y al técnico de laboratorio Luciano Masiero, por el apoyo logístico facilitado.

## Bibliografía

- Babaro, A., Francescon, A., Polo, B., 1981. Fluoride accumulation in aquatic organisms in the Lagoon of Venice. *Fluoride* 14, 102-107.
- Baker, R.L., 1972. Determination of fluoride in vegetation using the specific ion electrode. *Analytical Chemistry*, 44, 1326-1327.
- Binelli, A., Bacchetta R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A., Vailati, G., 2004. DDT in Zebra Mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquatic toxicology* 69, 175-188.
- Camargo, J.A., 1991b. Ecotoxicological study of the influence of an industrial effluent on a net-spinning caddisfly assemblage in a regulated river. *Water Air Soil Pollut.* 60, 263-277.
- Camargo, J. A., 1996a. Comparing levels of pollutants in regulated rivers with safe concentrations of pollutants for fishes: a case study. *Chemosphere* 33, 81-90
- Camargo, J.A., 2002. Ameliorating effects of body size and sodium chloride on the intraspecific tolerance of net-spinning caddisfly larvae to fluoride toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 579-585.
- Camargo, J.A., 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 50, 251-264
- Camargo, J.A., Tarazona, J.V., 1990. Acute toxicity to freshwater macroinvertebrates of fluoride ion (F<sup>-</sup>) in soft water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 883-887.
- Camargo, J.A., Ward, J.V., Martin, K.L., 1992a. The relative sensitivity of competing hydropsychid species to fluoride toxicity in the Cache la Poudre River (Colorado). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 107-113.
- Camargo, J.A.; García de Jalón, A., Muñoz, M.J., Tarazona, J.V., 1992b. Sublethal effects of sodium fluoride (NaF) on net-spinning caddisflies (Trichoptera). *Aquatic insects* 14, 13-30
- Camusso, M., Balestrini, R., Binelli, A., 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal Contamination in the largest subalpine lakes. *Chemosphere* 44, 263-270.
- Canadian Environmental Protection Act, 1994. Priority Substances List Supporting Document Of Inorganic Fluorides. Prepared by Eco-Health Branch&Environment Canada, Ottawa (Ontario)
- Dave, G., 1984. Effects of fluoride on growth, reproduction and survival in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C, 425-431.

- De Kock, W.C., Bowmer, C.T., 1993. Bioaccumulation, biological effects and food chain transfer of contaminants in zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. In *Zebra mussels Biology, Impacts and Control*, ed. T. Nalepa & D. Schloesser. Lewis, Ann Arbor, MI, USA, 503-533.
- Dobbs, G. G., 1974. Fluoride and the environment. *Fluoride* 7, 123-135.
- Fieser, A.H., Sykora, J.L., Kostalos, M.S., Wu, Y.C., Weyel, D.W., 1986. Effects of fluorides on survival and reproduction of *Daphnia magna*. *J. Water Pollut. Control Fed.* 58,82-86.
- Fossato, V., U., Siviero, E., 1974. Oil pollution monitoring in the Lagoon of Venice using the mussel *Mytillus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 46: 247-257.
- Fuge, R., Andrews, M. J., 1988. Fluorine in the UK environment. *Environ. Geochem. Health* 10, 96-104.
- Gillespie, R. J., Humphries, D. A., Baird, N. C., Robinson, E. A., 1989. *Chemistry*, second ed. Allyn and Bacon, Boston
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A., 1984. *Chemistry of the Elements*. Pergamon Press. Toronto.
- Hebert, P.D.N., Muncaster, B.W., Mackie, G.L., 1989. Ecological and Genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusk in the Great Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 46.
- Hemens, J., Warwick, R.J., 1972. The effects of fluoride on estuarine organisms. *Water Res.* 6, 1301-1308.
- Hemens, J., Warwick, R.J., Oliff, W.D., 1975. Effect of extended exposure to low fluoride concentration on estuarine fish and crustacean. *Prog. Water. Technol.* 7, 579-585.
- IUCN (2006) Global Invasive Species Database. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species.
- Karunakaran, V.M., Subramanian, A., 1992. Fluoride pollution in the Uppanar, Estuary. Cuddalore, South India. *Mar. Pollut. Bull.* 24, 515-517.
- Kessabi, M., 1984. Métabolisme et biochimie toxicologique du fluor: Une revue. *Rev. Méd. Vét.* 135, 497-510.
- Kornobis, S., 1977. Ecology of *Dreissena polymorpha* (Pall.) (Dreissenidae, Bivalvia) in lakes receiving heated water discharges. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 24: 531-545.
- Kühn, R., Pattard, M., Pernak, K.D., Winter, A., 1989. Results of the harmful effects of water pollutants to *Daphnia magna* in the 21 day reproduction test. *Water Res.* 23, 501-510.
- LeBlanc, G.A., 1980. Acute toxicity of priority pollutants to water flea (*Daphnia magna*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 684-691

- LeBlanc, G.A., 1984. Interspecies relationships in the acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 47-60.
- Mahon, W. A. J., 1964. Fluorine in the natural thermal waters of New Zealand. *New Zealand J. Sci.* 7, 3-28.
- Malde, M. K., Bjorvatn, K., Julshamn, K., 2001. Determination of fluoride in food by the use of alkali fusion and fluoride ion-selective electrode. *Food Chemistry* 73, 373-379.
- Martin, J. M., Salvadori, F., 1983. Fluoride pollution in French rivers and estuaries. *Estuarine Coastal Shelf Science* 17, 231-242.
- McClurg, T.P., 1984. Effects of fluoride, cadmium and mercury on the estuarine prawn *Penaeus indicus*. *Water SA* 10, 40-45.
- McQuaker, N.R., Gurney, M., 1977. Determination of total fluoride in soil and vegetation using an alkali fusion-selective ion electrode technique. *Analytical Chemistry*, 49, 53-56.
- Milhaud, G., Bahri, L., Dridi, A., 1981. The effects of fluoride on fish in Gabes Gulf. *Fluoride* 14, 161-168.
- Moore, D.J., 1971. The uptake and concentration of fluoride by blue crab, *Callinectes sapidus*. *Chesapeake Sci.* 12, 1-13.
- Morton, B. 1969a. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I General anatomy and morphology. *Proc. Malac. Soc. Lond.* 38:301-321.
- Morton, B. 1969b. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall III. Population dynamics. *Proc. Malac. Soc. Lond.* 38: 471-428.
- Nell, J.A., Livanos, G., 1988. Effects of fluoride concentration in seawater on growth and fluoride accumulation by Sidnet Rocantiak oyster (*Saccostrea commercialis*) and flat oyster (*Ostrea angasi*) spat. *Water Res.* 22, 749-753.
- Neuhold, J.M., Sigler, W.F., 1960. Effects of sodium fluoride on carp and rainbow. *Trans. Am. Fish. Soc.* 89, 358-370.
- Neuhold, J.M., Sigler, W.F., 1962. Chlorides affect the toxicity of fluoride in rainbow trout. *Science* 135, 732-733.
- Nriagu, J. O., 1986. Chemistry of the river Niger: I. Major ions. *Sci. Total Environ.* 58, 81-88.
- Pankhurst, N.V., Boyden, C.R., Wilson, J.B., 1980. The effect of fluoride effluent on marine organisms. *Environ. Pollut.* 23, 299-312.
- Pickering, W. F., Slavek, J., Waller, P., 1988. The effect of ion exchange on the solubility of fluoride compounds. *Water Air Soil Pollut.* 39, 323-336
- Pillai, K.S., Mane, U.H., 1985. Effect of fluoride effluent on fry of *Catla catla*. (Hamilton). *Fluoride* 18, 104-110.

- Ricciardi, A., Atkinson, S.A., 2004. Distinctiveness magnifies the impact of biological invaders in aquatic ecosystems. *Ecology letters* 7, 781-784.
- Salmaso, N., Decet, F., Mosello, R., 1997. Chemical characteristic and trophic evolution of the deep subalpine Lake Garda (Northern Italy). *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 56: 51-76.
- Sands, M., Nicol, S., McMinn, A., 1998. Fluoride in Antarctic marine crustaceans. *Mar. Biol.* 132, 591-598.
- Shtegman, B.K., 1964. Biology and control of *Dreissena*. *Trudy Instituta Biologii Vnutrennikh Vod, Akademia nauk SSSR.* 1: 1-145.
- Sigler, W. F., Neuhold, J. M., 1972. Fluoride intoxication in fish: A review. *J. Wildlife Diseases* 8, 252-254.
- Somashekar, R. K., Ramaswamy, S.N., 1983. Fluoride concentration in the water of the river Cauvery, Karnataka, India. *Int. J. Environ. Stud.* 21, 325-327.
- Sparks, R.E., Sandusky, M.J., Paparo, A.A., 1983. Identification of the water quality factors which prevent fingernail clams from reconolonizing the Illinois River phase III. Water Resource Centre, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL.
- Sprung, M., 1987. Ecological requeriments of developing *Dreissena polymorpha* eggs. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 79: 69-86.
- Stanczykowska, A. 1977. Ecology of *Dreissena polymorpha* (Pall.) (Bivalvia) in lakes. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 24: 461-530.
- Strayer, D., 1991. Projected distribution of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1389-1395.
- Stumm, W., Morgan, J. J., 1996. *Aquatic Chemistry*, third ed. John Wiley, New York.
- Symonds R. B., Rose, W. I., Reed, M. H., 1988. Contribution of Cl<sup>-</sup> and F<sup>-</sup> bearing gases to the atmosphere by volcanoes. *Nature* 334, 415-418.
- Van Craenenbroeck, W., Marivoet, J., 1987. A comparison of simple methods for estimating the mass flow of fluoride discharged into rivers. *Water Sci. Technol.* 19, nell729-740.
- Wright, D.A., Davidson, A.W., 1975. The accumulation of fluoride by marine and intertidal animals. *Environ. Pollut* 8, 1-13
- Zhang, H., Xianhao, C., Jianming, P., Weiping, X., 1993. Biogeochemistry research of fluoride in Antarctic Ocean. I. The study of fluoride anomaly in Krill. *Antarctic Res.* 4, 55-61.
- Zingde, M.D., Mandalia, A.V., 1988. Study of fluoride in polluted and unpolluted estuarine environments. *Estuarine Coastal Shelf Science* 27, 707-712.