

Artículo original

**TOXICIDAD AGUDA DEL MERCURIO EN EMBRIONES DE
Helisoma trivolvis (SAY, 1817) (MOLLUSCA: PLANORBIDAE)
ACUTE TOXICITY OF MERCURY TO EMBRYOS OF
Helisoma trivolvis (SAY, 1817) (MOLLUSCA: PLANORBIDAE)**

Giannina Passuni^{1,5}, Rosmary López², José Pino³ & José Iannacone^{4,6}

¹Laboratorio de Biología y Sistemática de Invertebrados Marinos, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM)

²Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

³Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

⁴Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal.

⁵ Correo electrónico: gianninapassuni@yahoo.es

⁶ Correo electrónico: joseiannacone@gmail.com

ABSTRACT

Mercury is a metal very employed at industry and mining in Peru. The aim of current research was to determine embryotoxic lethal acute toxicity of Hg^{2+} , in form of chloride of mercury ($HgCl_2$) on *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) at 24 h exposure. Concentrations assayed were 514, 51.4, 5.14 and 0.51 $ug\ Hg^{2+}\ L^{-1}$, since salt on base of $HgCl_2$ using dechlorinated water as diluents. Snail embryos were considered dead when none rotation movement during since 30 seconds. Percentage of mortality of embryonic stages of *H. trivolvis* increased with each of concentrations crescents of Hg^{2+} at 24 h exposure. At a concentration of 514.4 $ug\ Hg^{2+}\ L^{-1}$ was observed significantly differences in relation to control. Moreover, concentration of 514.4 $ug\ Hg^{2+}\ L^{-1}$ showed differences with relation to other three treatments. LC_{50} was 2.49 $ug\ Hg^{2+}\ L^{-1}$. Embryos of *H. trivolvis* were higher sensible to Hg^{2+} in comparison to other freshwater snail species was concluded.

Key words: ecotoxicology, freshwater environment, mercury chloride, *Helisoma trivolvis*, snail.

RESUMEN

El mercurio es un metal muy utilizado en la industria y en minería en el Perú. El objetivo del presente trabajo fue determinar la toxicidad letal aguda embriotóxica del Hg^{2+} , en forma de cloruro de mercurio ($HgCl_2$) en *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) a 24 h de exposición. Las concentraciones ensayadas fueron 514; 51,4; 5,14 y 0,51 ug de $Hg^{2+}\ L^{-1}$ a partir de la sal a base de $HgCl_2$ usando como diluyente al agua de clorinada. Los embriones de caracol fueron considerados muertos cuando no presentaban movimiento de rotación durante aproximadamente 30 seg. Los porcentajes de mortalidad de estadios embrionarios de *H. trivolvis* aumentaron con cada una de las concentraciones crecientes de Hg^{2+} a las 24 h de exposición. A una concentración de 514,4 ug de $Hg^{2+}\ L^{-1}$ se observaron que existen diferencias significativas con el control. Además, la concentración de 514,4 ug de $Hg^{2+}\ L^{-1}$ mostró diferencias con respecto a los otros tres tratamientos. La CL_{50} fue de 2,49 $ug\ Hg^{2+}\ L^{-1}$. Se concluye que los embriones de *H. trivolvis* son altamente sensibles al Hg^{2+} en comparación a otras especies de caracoles dulceacuícolas.

Palabras clave: ambiente dulceacuícola, caracol, cloruro de mercurio, ecotoxicología, *Helisoma trivolvis*.

INTRODUCCIÓN

El mercurio (Hg^{2+}) es un metal que se encuentra presente en el ambiente natural en pequeñas cantidades en forma de sales. Sin embargo, la industria minera aurífera lo utiliza en grandes cantidades (Mancera-Rodríguez & Álvarez-León 2006). Además es un insumo para fabricar pilas y baterías (Dural et al. 2006). La contaminación por mercurio produce efectos deletéreos en diferentes componentes de la biota acuática (Pritchard 1993, Iannacone & Alvarino 1999). Se han realizado evaluaciones holísticas del efecto del mercurio (Hg^{2+}) y del metilmercurio ($MeHg^{2+}$) en el ambiente acuático (Baker et al. 1985, Pritchard 1993).

En el Perú, existen normas para regular su uso y el nivel máximo permisible según diferentes tipos de agua (Ley General de Aguas, creada por DL N°17752; modificada por DS N° 007-83 SA-1983, y posteriormente ratificada por N°003-2003-SA- CEPES 2003). El Banco Mundial propone 1 μg de $Hg^{2+} L^{-1}$ para los efluentes y la Norma Técnica Peruana (NTP 214.003-87) 1 μg $Hg^{2+} L^{-1}$ para el agua potable. Lamentablemente, estos máximos permisibles no siempre son tomados en consideración y el Hg^{2+} produce intoxicaciones, como en el caso de la población de mineros artesanales de Santa Filomena, Ayacucho, Lima, Perú, en donde el nivel de mercurio en orina de adultos y de mujeres jóvenes sobrepasó el estándar de comparación proporcionado por la OMS (40 - 90 μg $Hg^{2+} L^{-1}$) (Monteagudo 2002).

Los moluscos dulceacuícolas por sus características ecológicas de distribución, diversidad, abundancia y por su actuación directa en la cadena trófica juegan un papel importante en el mantenimiento del ecosistema de humedales. Por ende, se les utiliza en pruebas ecotoxicológicas para la evaluación de riesgos ecológicos (Abd Allah et al. 1997, Iannacone & Alvarino 1999, Iannacone & Alvarino 2002, Reddy et al. 2004, Wepener et al. 2005, Grosell et al. 2006).

Helisoma trivolvis (Say, 1817) (Mollusca: Planorbidae) es un gasterópodo acuático que

ha sido tomado como especie modelo para trabajos de ecotoxicología tanto en estadio de huevos (Tchounwou et al. 1991), embriones (Aboul-Ela & Khalil 1987), juveniles y adultos (Arthur et al. 1987, Camargo & Alonso 2007). *Helisoma trivolvis*, tiene una amplia distribución en la región neotropical (Paraense 1976, Vivar et al. 1990, Simone 2006), encontrándose en el Perú principalmente en la costa norte y central (Paredes et al. 1999, Ramírez et al. 2003). Los embriones de *H. trivolvis*, están individualmente compartimentalizados en cápsulas con masas de huevos que contienen de 5 a 50 embriones (Goldberg 1995), los huevos son telolecitos y presentan segmentación en espiral, el desarrollo embrionario es determinado y directo, donde los estadios desde el cigote al juvenil se desarrollan dentro de la cápsula transparente observándose un característico desarrollo rotacional (Diefenbach et al. 1991). El objetivo del presente trabajo fue determinar la toxicidad letal aguda embriotóxica del Hg^{2+} , en forma de cloruro de mercurio ($HgCl_2$) en *H. trivolvis* a 24 h de exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes de *H. trivolvis* fueron obtenidos de acuarios de la ciudad de Lima, Perú entre los meses de agosto y octubre del 2003. Estos caracoles fueron identificados empleando las ilustraciones proporcionadas por Paredes et al. (1999) y Simone (2006). Posteriormente fueron acondicionados en recipientes de vidrio de 4 L de capacidad conteniendo agua de grifo declorinada reposada por 7 días. El fotoperiodo empleado fue 12hO:12hL, con una temperatura promedio del agua de $20 \pm 1^\circ C$. Para lograr un rápido desarrollo de los caracoles, se les suministró comida para peces en forma de hojuelas (Tetramin®). Luego, se separaron en grupos de 3 a 5 individuos en recipientes cilíndricos de 10 cm. de alto y 10 cm de diámetro, se los adicionó *Elodea* sp., para facilitar las posturas de los caracoles. Diariamente fue constatada la presencia de las

cápsulas, y se las extrajo manualmente con la ayuda de un pincel de punta fina y luego fueron colocadas en placas de Petri conteniendo 20 mL de agua declorinada. Las concentraciones ensayadas fueron 514; 51,4; 5,14 y 0,51 ug de $Hg^{2+} L^{-1}$ a partir de la sal a base de $HgCl_2$ (Merck®) usando como diluyente al agua declorinada. El bioensayo con embriones de *H. trivolvis* fue realizado empleando un promedio de 109 embriones, fluctuando entre 38 a 192 por concentración en seis repeticiones. Cada unidad experimental fue una placa de petri con 20 mL de solución a base de Hg^{2+} . La lectura se realizó a las 24 h de exposición. Los embriones de caracol fueron considerados muertos cuando no presentaban movimiento de rotación durante aproximadamente 30 seg. Los porcentajes de mortalidad para cada una de las concentraciones ensayadas fueron transformadas angularmente y posteriormente analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Zar 1996) a un $p < 0,05$ empleando el programa PAST (*Paleontological Statistics: Estadísticas Paleontológicas*) (Hammer et al. 2008). La CL_{50} fue determinada empleando el EPA Probit Analysis Program (USEPA 1994).

RESULTADOS

En *H. trivolvis*, el número promedio de huevos por cápsula fue de 18,8. Al observar las cápsulas en el control a las 12 h, éstas se encontraban en el estadio de 1 a 2 blastómeros (primer clivaje, durando este estadio de 4 a 7 h). Los sucesivos clivajes hasta el estadio de blástula demoraron de 16 a 24 h.

Los porcentajes de mortalidad de estadios embrionarios de *H. trivolvis* aumentaron con cada una de las concentraciones crecientes de Hg^{2+} a las 24 h de exposición (Tabla 1). A una concentración de 514,4 ug de $Hg^{2+} L^{-1}$ se observaron que existen diferencias significativas con el control. Además, la concentración de 514,4 ug de $Hg^{2+} L^{-1}$ mostró diferencias con respecto a los otros tres tratamientos (Tabla 1). La CL_{50} fue de 2,49 ug $Hg^{2+} L^{-1}$. Los huevos sometidos a la

concentración de 514,4 ug de $Hg^{2+} L^{-1}$, mostraron una coloración marrón y en muchos casos los embriones presentaron una fragmentación celular. Los efectos del $HgCl_2$ sobre los embriones a las concentraciones menores de 514,4 ug de $Hg^{2+} L^{-1}$, no mostraron una malformación visible pero si presentaron un retardo en el crecimiento (datos no publicados).

DISCUSIÓN

La contaminación dulceacuícola ocasionada por las actividades antropogénicas constituye uno de los problemas de mayor importancia en nuestros tiempos (Benton et al. 2002, Iannacone & Alvarino 2002). Muchas especies propuestas como herramientas para bioensayos ecotoxicológicos, requieren como requisitos para su uso no solo que sean sensibles, sino que sean ensayos reproducibles con poca variabilidad en su respuesta. Entre los criterios usados para validar un bioensayo tenemos: facilidad de uso que incluye rapidez del bioensayo, simplicidad en la manipulación, disponibilidad del material biológico, poco volumen de muestra y facilidad en la observación y conteo de los organismos afectados (muertos o inmóviles) (Iannacone & Alvarino 2003). *H. trivolvis* es un molusco dulceacuícola apto para bioensayos debido a que le aplica todos estos parámetros óptimamente, destacándose la transparencia de la cápsula embrionaria para una facilidad en la observación. Sin embargo se debe tener en cuenta dos aparentes desventajas, que los huevos y embriones al estar protegidos en cápsulas y presentar alimentación lecitotrófica, presentan baja interacción con el agua circundante, y como consecuencia el contacto con el Hg^{2+} se vería disminuida, y por ende podría causar una menor mortalidad (Hirt & Dimitrovic 2002).

La CL_{50} del Hg^{2+} obtenida a 24 h de exposición para *H. trivolvis*, presentó mayor toxicidad que la observada en *Amnicola* sp. ($CL_{50-24h} = 80$ ug L^{-1}), *Aplexa hypnorum* (Linnaeus, 1758) (CL_{50} .

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de *H. trivolvis* expuestas al mercurio a 24 h de exposición.

ug de Hg ²⁺ L ⁻¹	Porcentaje de mortalidad
Control	11,30 (0)*a
0,51	11,33(0)a
5,14	19,20 (8,91)a
51,4	13,33(2,29)a
514,4	88,46 (86,99)b
CL ₅₀	2,49 ug de Hg ²⁺ L ⁻¹

Letras iguales en una misma columna indican que los promedios son estadísticamente iguales a un $p < 0,05$ según la prueba de Tukey (Zar, 1996).

* = valores ajustados con la fórmula de Abbott.

^{24h} = 370 ug L⁻¹), *Physa venustula* (Gould, 1847) (CL_{50-48h} = 50 ug L⁻¹), *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1819) (CL_{50-24h} > 7380 ug L⁻¹), *Lymnaea luteola* (Lamarck, 1819) (CL_{50-24h} = 135 ug L⁻¹) y en *Lymnaea acuminata* (Lamarck, 1822) (CL_{50-24h} = 23 ug L⁻¹) (Iannacone & Alvarino 1999, BII 2002, Alvarino & Iannacone 2004, Mathur et al. 2006, Khangarot et al. 2007), evidenciando que los embriones de *H. trivolvis* son altamente sensibles al Hg²⁺ en comparación a otras especies de caracoles dulceacuícolas.

La más baja concentración de Hg²⁺ ensayada (0,51 ug Hg²⁺ L⁻¹) fue 2,5 veces mas alta que el límite permisible dictado por la ley peruana para las aguas de Clase VI (0,2 ug Hg²⁺ L⁻¹) que son aguas en áreas recreativas para la preservación de la vida acuática y la pesca comercial y recreativa. En adición, se debe tener en cuenta que los huevos al estar protegidos en cápsulas lo hace mas lento la difusión de cualquier toxico, y al ser *H. trivolvis* alimento de varios invertebrados, el Hg se bioacumularía y biomagnificaría lo largo de la cadena trófica dulceacuícola (Alexander & Covich 1991, Dillon 2000, Chase 2003).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd Allah, A.T.; Wanas, M.Q.S. & Thompson, S.N. 1997. Effect of heavy metals on survival and growth of *Biomphalaria*

glabrata Say (Gastropoda: Pulmonata) and interaction with schistosoma infection. J. Moll. Stud., 63: 79-86.

Aboul-Ela, I.A. & Khalil, M.T. 1987. The chronic toxicity of three pollutants upon the freshwater snail *Helisoma trivolvis*. Proc. Zool. Soc. A. R. Egypt, 13:17-29.

Alvarino, L. & Iannacone, J. 2004. Efecto ecotoxicológico del mercurio sobre *Pomacea canaliculata* (Lamarck) (Mollusca: Ampullariidae), procedentes del distrito de Aucayacu, Huánuco, Perú. Wiñay Yachay (Perú), 8: 92-98.

Alexander, J. E. J. & A. P. Covich. 1991. Predation risk and avoidance behavior in two freshwater snails. Biological Bulletin Woods Hole, 180:387-393.

Arthur, J.W.; West, C.W.; Allen, K.N. & Hedtke, S.F. 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38:324-331.

Baker, R.; Lavie, B. & Nevo, E. 1985. Natural selection for resistance to mercury pollution. Experientia, 41: 697-699.

Benton, M.J.; Malott, M.L.; Trybula, J.; Dean, D.M. & Guttman, S.I. 2002. Genetic effects of mercury contamination on aquatic snail populations: allozyme genotypes and DNA strand breakage. Environ. Toxicol. Chem., 21: 584-589.

BII [Beak Internacional Incorporated]. 2002. *Literature review of environmental toxicity of mercury, cadmium, selenium and antimony in metal mining effluents*. Ref. 22069.1. Ontario, Canada. 142 p.

Camargo, J.A. & Alonso, A. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. Ecosistemas, 16: 1-13.

Diefenbach, T. J.; Koehncke, N. K. & Goldberg, J. I. 1991. Characterization and development of rotational behavior in *Helisoma* embryos: role of endogenous serotonin. J. Neurobiol., 22:922-934.

- Dillon, R. T., Jr. 2000. *The ecology of freshwater molluscs*. Cambridge University Press. United Kingdom. 509 p.
- Dural, M.; Goksu, M.Z.; Osak, A.A. & Derici, B. 2006. Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 and *Mugil cephalus* L, 1758 from the Camlik lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environ. Monit. Assess.*, 118: 65-74.
- Chase, J. M., 2003. Experimental evidence for alternative stable equilibria in a benthic pond food web. *Ecol. Letters*, 6: 733-741.
- Goldberg, J. 1995. Neuronal development in embryos of the mollusk, *H. trivolvis*: multiple roles of serotonin. *Adv. Neur. Sci.*, 2: 67-87.
- Grosell, M., Gerdes, R.M. & Brix, K.V. 2006. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates- *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 97-104.
- Hammer, O.; Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2008. PAST: *Paquete de programas de estadística paleontológica para enseñanza y análisis de datos*. Disponible en http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/spain.htm leído el 15 de enero del 2008.
- Hirt, M.L. & Domitrovic, A. H. 2002. Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a bicloruro de mercurio en ensayos agudos y subletales. *Rev. Ictiol.*, 10: 37-52.
- Iannacone J. & Alvarino L. 1999. Ecotoxicidad aguda de metales pesados empleando juveniles del caracol de agua dulce *Physa venustula* (Gould, 1847) (Mollusca). *Gayana*, 63: 101-110.
- Iannacone, J. & L. Alvarino. 2002. Efecto del detergente doméstico Alquil Aril Sulfonato de Sodio Lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. *Ecol. Apl.*, 1:81-87.
- Iannacone, J. & L. Alvarino. 2003. Efecto ecotoxicológico agudo del mercurio sobre larvas del "muy muy" *Emerita analoga* (Stimpson) (Decapoda: Hippidae) procedentes de cuatro localidades de Lima. *Ecol. Apl.*, 2:111-115.
- Khargarot, B.S.; Mathur, S. & Durve, V.S. 2007. Comparative toxicity of heavy metals and interactions of metals on a freshwater pulmonate snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 10: 367-375.
- Mancera-Rodríguez, N.J. & Álvarez-León, R. 2006. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biol. Colomb.*, 11: 3-23.
- Mathur, S.; Khargarot, B.S. & Durve, V.R. 2006. Acute toxicity of mercury, copper and zinc to a freshwater pulmonate snail, *Lymnaea luteola* (Lamarck). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 9: 381-389.
- Monteagudo, M. F.A. 2002. *Evaluación de la contaminación por mercurio en población de mineros artesanales de oro de la comunidad de Santa Filomena-Ayacucho-Perú durante el periodo agosto 2000-septiembre 2001*. Tesis (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 81p.
- Paraense, W.L. 1976. *Helisoma trivolvis* and some of its synonyms in the Neotropical region (Mollusca: Planorbidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 36: 187-204.
- Paredes, C.; Huamán, P.; Cardoso, F.; Vivar, R. & Vera, V. 1999. Estado actual del conocimiento de los moluscos acuáticos en el Perú. *Rev. peru. Biol.*, 6: 5-47.
- Pritchard, J.B. 1993. Aquatic Toxicology: past, present, and prospects. *Environ. Health Perspect.*, 100: 249-257.
- Ramírez, R.; Paredes, C. & J. Arenas. 2003. Los moluscos del Perú. *Rev. Biol. Trop.*, 51(Suppl 3): 225-284.

- Reddy, A.; Ponder, E.L. & Fried, B. 2004. Effects of copper sulfate toxicity on cercariae and metacercariae of *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis* and on the survival of *Biomphalaria glabrata* snails. J. Parasitol., 90: 1332-1337.
- Simone, L.R.L. 2006. *Land and freshwater mollusks of Brazil*. EGB. Fapesp. São Paulo. 390 p.
- Tchounwou, P.B.; Englande, A.J. & Malek, E.A. 1991. Toxicity evaluation of Bayluscide and malathion to three developmental stages of freshwater snails. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 21; 351-358.
- USEPA. 1994. *User's guide: Probit Program version 1,5*. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Ecological Monitoring Research Division, Cincinnati, Ohio, USA.
- Vivar, R.; Pachas, L. & Huamán, P. 1990. Estudio anatómico de *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) colectado en algunas localidades del Perú. Bol. Lima (Perú), 69: 65-71.
- Wepener, V.; van Vuren, J.H.J.; Chatiza, F.P.; Mbizi, Z.; Slabbert, L. & Masola, B. 2005. Active biomonitoring in freshwater environment: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. Phys. Chem. Earth, 30: 751-761.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Third edition. Prentice-Hall International. Englewood Cliffs, New Jersey, USA. 662 p.
- Fecha de recepción: 27 de febrero del 2008.
Fecha de aceptación: 25 de marzo del 2008.