

# Efecto crónico de los nitratos sobre el caracol de lodo neozelandés (*Potamopyrgus antipodarum*)

Rebeca A Rueda-Jasso<sup>1</sup>, Chris Hickey<sup>2</sup>, Anthea Albert<sup>2</sup>, Antonio Campos-Mendoza<sup>1</sup> y Gordon R Craig<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Acuática, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

<sup>2</sup> National Institute for Water and Atmospheric Research (NIWA), Nueva Zelanda chris.hickey@niwa.co.nz, anthea.albert@niwa.co.nz

<sup>3</sup> GR Craig and Associates Inc., Nanoose Bay, British Columbia, Canadá. gordon@grcraig.com

## Resumen

Los compuestos nitrogenados son contaminantes comunes, cuyas concentraciones han incrementado significativamente en los cuerpos de agua como resultado de las actividades humanas. El presente estudio probó el efecto crónico causado por los nitratos ( $\text{NaNO}_3$ ) en el caracol de lodo neozelandés *Potamopyrgus antipodarum* (organismo aceptado para pruebas toxicológicas agudas y crónicas). Para ello, hembras adultas se sometieron a una exposición crónica a: 1.47, 2.97, 3.41, 6.5, 20.7 y 97.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L durante un periodo de 49 días (4 repeticiones por tratamiento = 40 ♀ por concentración). Los efectos a evaluar fueron a) supervivencia, b) número de recién nacidos (RN) promedio producidos por hembra (vivos y muertos), c) desempeño de las hembras adultas (tiempo de recuperación de su posición original al colocarlas con el opérculo hacia arriba y d) desempeño de los RN (prueba de locomoción). Los resultados evidenciaron que desde el día 42, la concentración 97.5 mg N- $\text{NO}_3$ -N/L causó la mortalidad de más del 50% de los caracoles expuestos e inhibió casi totalmente la actividad reproductiva. Las hembras expuestas a las cuatro concentraciones menores produjeron un número significativamente mayor de crías comparativamente con las expuestas a 20.7 mg N- $\text{NO}_3$ /L. La locomoción de los RN también mostró un efecto dependiente de la concentración de exposición (a mayor concentración menor locomoción); aunque las diferencias se hicieron evidentes a partir de la concentración 6.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L. El tiempo de recuperación de la posición normal de las hembras adultas, de nuevo fue mayor a 20.7 mg N- $\text{NO}_3$ /L comparativamente con lo observado en las concentraciones más bajas. *P. antipodarum* es un organismo sensible que inhibe su reproducción y desempeño a partir de concentraciones de 20.7 mg N- $\text{NO}_3$ /L y la locomoción de los RN a 6.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L.

**Palabras clave:** Calidad del agua, indicadores, nitratos, toxicidad crónica, *P. antipodarum*

## Abstract

The nitrogenous compounds are common contaminants, whose concentrations have significantly increased in the water bodies as result of human activities. The present study tested the chronic effect caused by nitrates ( $\text{NaNO}_3$ ) on the New Zealand mud snail *Potamopyrgus antipodarum* (which has been accepted for acute and chronic toxicological tests). Adults snails were exposed to chronic test to 1.47, 2.97, 3.41, 6.5, 20.7 and 97.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L for 49 days (four replicates per treatment = 40 ♀ per concentration). The evaluating effects were: a) survival, b) average number of new born per female (RN) (alive or death), c) adult performance (recuperation time to go back to original position after been placed with the operculum up) and d) RN performance (locomotion test). The results showed that from day 42, the concentration 97.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L caused more than 50% of mortality to exposed snails and almost total inhibition of the reproductive activity. The females exposed to four lower concentrations produced significantly bigger number of offsprings in comparison to females exposed to 20.7 mg N- $\text{NO}_3$ /L. The RN locomotion also presented a depending effect to concentration of exposition (to higher concentration lower locomotion); although, differences were evident from concentration 6.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L. The recuperation time to normal position of adult females was again higher at 20.7 mg N- $\text{NO}_3$ /L comparatively to the observations at lower concentrations. *P. antipodarum* is a sensible organism, that inhibits its reproduction and performance from concentrations 20.7 mg N- $\text{NO}_3$ /L and RN locomotion at 6.5 mg N- $\text{NO}_3$ /L.

**Key words:** water quality, indicators, nitrates, chronic toxicity, *P. antipodarum*

## Introducción

La calidad de agua es un factor determinante en el bienestar humano. Desde hace aproximadamente 60 años se reconoce la importancia de contar con agua "limpia" (Craig *et al.* 2017). Para determinar la calidad o el grado de contaminación del agua, se han desarrollado pruebas estandarizadas, como la prueba de toxicidad concentración letal 50 (CL50), que determina la concentración de una sustancia que causa 50% mortalidad de la población de prueba en un periodo de 96 horas. La CL50 es una prueba aguda que se ha aplicado como un criterio primario para establecer niveles de tolerancia en los marcos normativos de diversos países. No obstante, para conocer con mayor detalle los efectos de una sustancia tóxica a lo largo de una etapa o del ciclo de vida se aplican las

pruebas crónicas (Alonso y Camargo 2009). Estas generan resultados valiosos pues permiten representar condiciones similares a las del ambiente en donde un tóxico esta presente en concentraciones moderadas por periodos prolongados. En países con normativas estrictas se ha iniciado el uso de límites de tolerancia crónicos.

La presencia de compuestos nitrogenados ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ) se han asociado a la pérdida de hábitat y amenaza para las comunidades acuáticas en particular de peces. Aunque la fuente más frecuente de nitrógeno inorgánico resultante de las actividades antropogénicas son los nitratos (Soucek y Dickinson, 2012), estos han recibido poca atención comparativamente con el amonio y los nitritos, lo cual es debido a la marcada toxicidad de estos últimos (Camargo y Alonso, 2006).

El caracol de lodo neozelandés (*Potamopyrgus antipodarum*) es un organismo de agua dulce, que ha invadido numerosos ecosistemas (Alonso y Castro-Diez, 2008). *P. antipodarum* es un organismo adecuado para

✉ Dra. Rebeca Aneli Rueda Jasso, rebeca.rueda@gmail.com

Laboratorio de Biología Acuática, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. CP 58030 Morelia, Michoacán, México.

la realización de pruebas toxicológicas e incluso existen protocolos estandarizados para determinación de disruptores endocrinos utilizando a esta especie (OECD, 2010). El presente estudio realizó una prueba crónica para conocer el efecto de los nitratos en la supervivencia, en la capacidad reproductiva y desempeño de las hembras adultas y de los recién nacidos.

## Materiales y métodos

Los organismos de prueba (adultos de *P. antipodarum*) se colectaron en el lago Rotorua, Nueva Zelanda (38°02'04.88"S, 176°15'29.56"E) y se transportaron al laboratorio (NIWA). Se seleccionaron grupos de 10 adultos con talla entre 3.52 a 3.94 mm, que se distribuyeron al azar en frascos de vidrio (FV) de 500 mL, con tapa de malla nylon (660 µm) para evitar los escapes. Cada FV contó con un sistema de aireación de fondo, con burbuja fina. Cuatro FV se colocaron sumergidos en un recipiente plástico con 5 L de solución de exposición (SE) (agua del sitio de colecta + tóxico). La SE recirculó del recipiente hacia el FV a un intervalo de 500 mL cada 45 min. Las concentraciones nominales fueron 0, 1, 2, 5, 20 y 100 de mg N-NO<sub>3</sub>/L, con cuatro repeticiones cada concentración. Estas se prepararon a partir de una solución madre de 300 ppm de NaNO<sub>3</sub> (GR Merck, Alemania).

Las pruebas se realizaron en un cuarto aislado con un fotoperiodo 16 Luz: 8 Oscuridad y temperatura 20.5 ± 0.5 °C. Los organismos se alimentaron cada 48 h, con 30 µg de la mezcla 50:50% alga *Spirulina* liofilizada (Lifestream, Nueva Zelanda) y hojuela molida *Sera Flora* (Sera, Alemania), previamente diluida en agua. La aireación se detuvo durante 30 min para facilitar la alimentación.

## Supervivencia y producción promedio de crías por hembra

Cada semana se realizó el recambio de la solución de exposición, se contabilizó y separó a las hembras adultas muertas. En tanto que el agua extraída de cada FV se filtró (con un tamiz de 100 µm), se separaron y contaron los recién nacidos (RN) y se pasaron a recipientes de 50 mL con agua limpia. Con ayuda de un microscopio estereoscópico, se contabilizaron los RN como vivos o muertos y se calculó la producción de RN en función del número de hembras sobrevivientes.

## Calidad del agua

Previo al proceso de renovación de la solución de exposición se tomaron muestras de agua para evaluar los parámetros fisicoquímicos del agua: pH (potenciómetro Orion modelo 290 A), O<sub>2</sub>, salinidad y conductividad (Hatch HQ40d), dureza (titulación con EDTA) y a concentración de NH<sub>3</sub> y NO<sub>3</sub> (método Lachat, en un analizador de flujo).

## Desempeño de los RN

Este se evaluó con una prueba de locomoción, en la cual se introdujo individualmente un organismo en un tubo capilar (por succión, con ayuda de una micropipeta); en seguida por gravedad se ubicó al organismo en el extremo de la columna de agua. Posteriormente, bajo el microscopio se colocó en forma horizontal el capilar, ajustando el borde del agua con la reglilla del ocular y se aplicó una fuente de luz LED para provocar la respuesta de fototropismo negativo del RN. Se midió el desplazamiento del RN durante un minuto. Para el análisis de datos se utilizó el programa CETIS (Comprehensive Environmental Toxicity Information System program) versión 1.8.8.2.

## Desempeño de las hembras adultas

Al final de experimento, las hembras se colocaron en forma individual en una caja de Petri, con agua cubriendo completamente a los organismos y con unas pinzas se les colocó con el opérculo hacia arriba. Para cada individuo se contabilizó el tiempo que tardaron en regresar a su posición original, teniendo como máximo tres minutos.

## Resultados y discusión

La **Tabla 1** presenta los parámetros fisicoquímicos del agua cuantificados en cada una de las concentraciones en las que se realizó la exposición crónica (promedios ± error estándar). La calidad del agua se mantuvo estable durante el periodo experimental. Las concentraciones de exposición fueron 1.47, 2.97, 3.41, 6.5, 20.7 y 97.5 mg N-NO<sub>3</sub>/L, las cuales correspondieron a las concentraciones nominales. El grupo control presentó una concentración baja de nitratos (1.47 mg N-NO<sub>3</sub>/L), los cuales pueden ser resultado del alimento sin consumir y de las heces.

En todos los tratamientos se observó que las

**Tabla 1.** Parámetros de calidad del agua durante la exposición crónica de los adultos de *P. antipodarum* a NaNO<sub>3</sub> (concentraciones objetivo).

Parámetro	Concentración (mg NO <sub>3</sub> -N/L)					
	0	2	5	10	20	100
Temp °C	21.3 ± 0.7	21.2 ± 0.8	21.1 ± 0.8	21.1 ± 0.8	21.1 ± 0.8	21.1 ± 0.8
Sal ‰	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.37 ± 0.14
Cond µS	102.0 ± 6.2	116 ± 9.8	127.3 ± 28.3	160.8 ± 29.1	258.2 ± 30	850.8 ± 38.5
NO <sub>3</sub> -N*	1.30 ± 0.38	3.15 ± 1.47	3.39 ± 0.54	6.49 ± 1.25	21.3 ± 4.49	98.4 ± 7.31

Valores presentados como promedio ± error estándar y concentraciones en mg NO<sub>3</sub>-N/L

concentraciones de nitratos (N-NO<sub>3</sub>) variaron ligeramente al evaluar la calidad del agua previo al momento del recambio; esta variación pudo ser el resultado de la descomposición del alimento no consumido y heces de las hembras.

La mortalidad de los adultos de *P. antipodarum* aumentó conforme se incrementó la concentración a la que estuvieron expuestas (figura 1). La concentración 97.5 mg N-NO<sub>3</sub>/L causó mortalidad del 50% de los organismos expuestos y los organismos restantes presentaron una inhibición casi total de la reproducción y por ello los escasos datos no se incluyeron en el resto de los análisis. Las mortalidades registradas en los grupos expuestos a 2.97, 3.41 y 6.5 mg N-NO<sub>3</sub>/L fueron muy similares, si bien a 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L ya se observa un efecto significativo.

Los resultados de mortalidad se complementaron con los valores calculados de concentración efectiva (EC) (CETIS), que causan 10, 20 y 50 por ciento de mortalidad, así como los correspondientes límites de confianza (tabla 2). En ellos se observa que un mayor tiempo de exposición la EC 10 y 20 disminuye marcadamente.

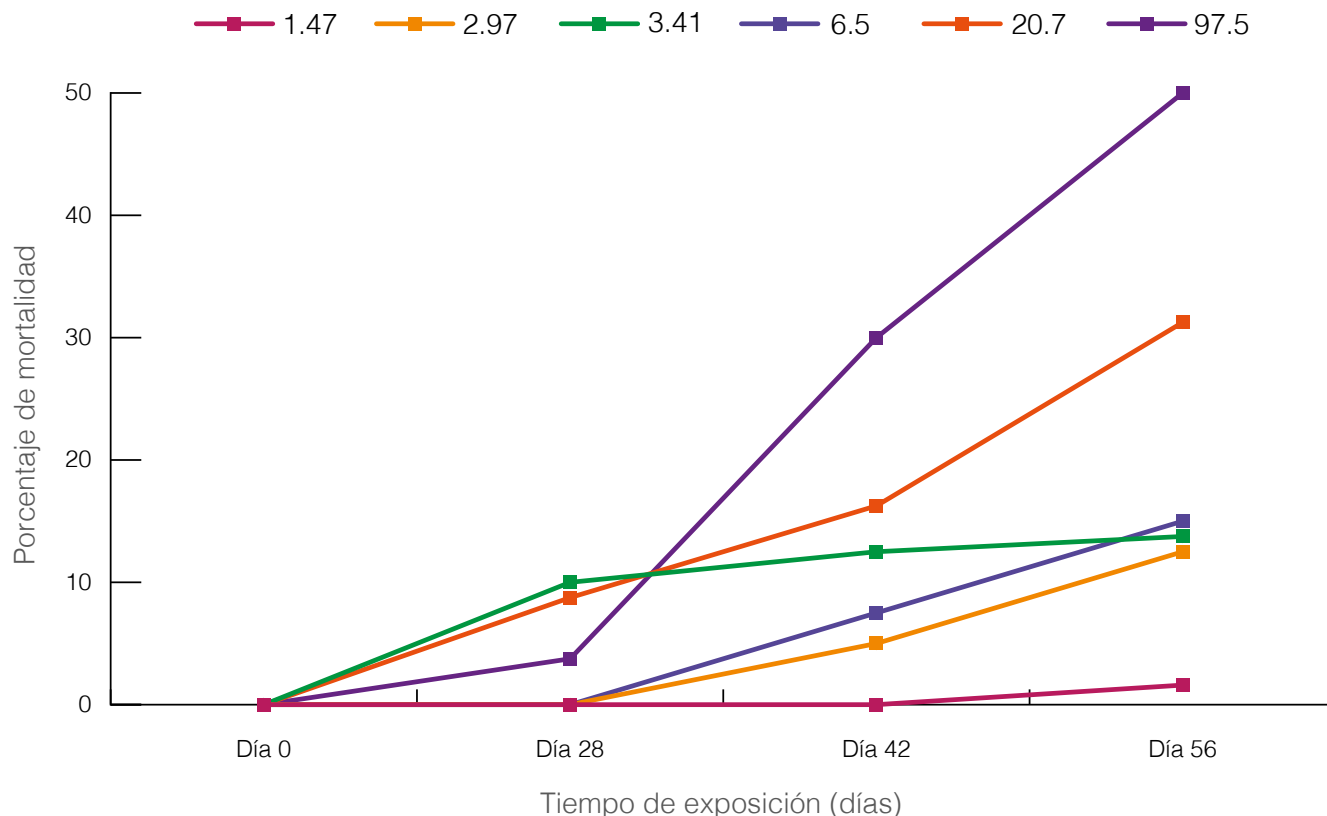
Los resultados del presente estudio coinciden parcialmente con lo observado por Camargo y Alonso (2013), quienes registraron en una exposición crónica en

**Tabla 2.** Resultados de concentración efectiva calculada (EC) en 10, 20 y 50% de los organismos de prueba y límites de confianza (Programa CETIS).

Day	Level	mg/L	LCL	UCL
28	EC10	7.61	2.16	14.98
	EC20	23.06	11.12	47.28
	EC50	>97.5	na	na
56	EC10	2.78	1.02	2.06
	EC20	9.57	5.32	15.14
	EC50	~100	na	na

*P. antipodarum* que concentraciones 44.9, 81.8 y 156.1 mg N-NO<sub>3</sub>/L no es letal para los organismos, aunque si alteran su desempeño, evaluado este como capacidad reproductiva y velocidad de desplazamiento.

La producción de recién nacidos (RN) en las concentraciones 1.47 (control), 2.97, 3.41 y 6.5 mg N-NO<sub>3</sub>/L fue comparativamente similar entre estos grupos (sin diferencias estadísticas). Los organismos expuestos a la concentración 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L produjeron significativamente menor número de RN (figura 2). El conteo de RN muertos fue el más bajo en el grupo control y no se observaron diferencias entre el resto de los tratamientos. No obstante, en la



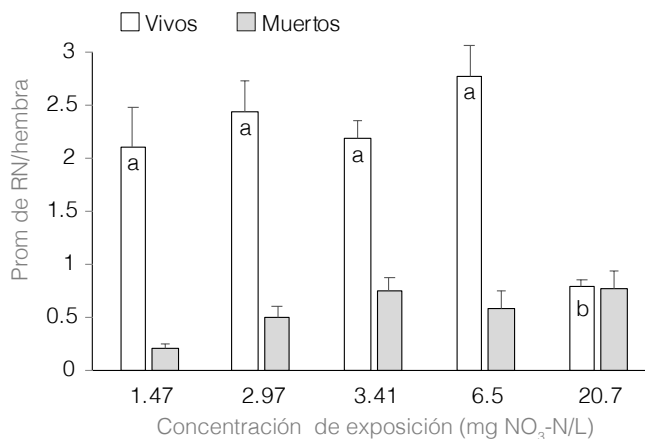
**Figura 1.** Supervivencia de las hembras adultas de caracol de lodo neozelandés (*P. antipodarum*) durante 49 días de exposición crónica a NaNO<sub>3</sub>, expuestas a cinco concentraciones promedio y un grupo control.

concentración 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L se registraron números similares de RN vivos y muertos (**figura 2**).

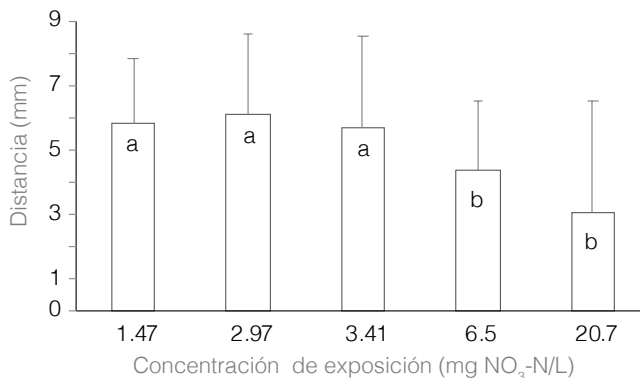
El número de RN producidos por *P. antipodarum* expuestos a concentraciones de 21.4, 44.9, 81.8 y 156.1 mg N-NO<sub>3</sub>/L en los experimentos realizados por Alonso y Camargo (2013) fue significativamente menor al grupo control. Esto es similar a lo que se observó en el presente estudio, aunque las concentraciones menores parecen no tener un efecto marcado e incluso pudiera pensarse que concentraciones de 6.5 mg N-NO<sub>3</sub>/L estimulan la reproducción, quizás como un mecanismo de defensa ante el estrés provocado por los nitratos.

Los resultados de desempeño de los RN en las pruebas de locomoción mostraron que los organismos nacidos en la concentración 6.5 y 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L presentaron desplazamientos significativamente menores con respecto a los organismos provenientes de las otras concentraciones (**figura 3**). Una situación similar se registró cuando se evaluó la velocidad de desplazamiento de adultos de la misma especie, los cuales disminuyeron su velocidad con respecto al grupo control después de 25 y 38 días de exposición continua a los nitratos (Alonso y Camargo 2013).

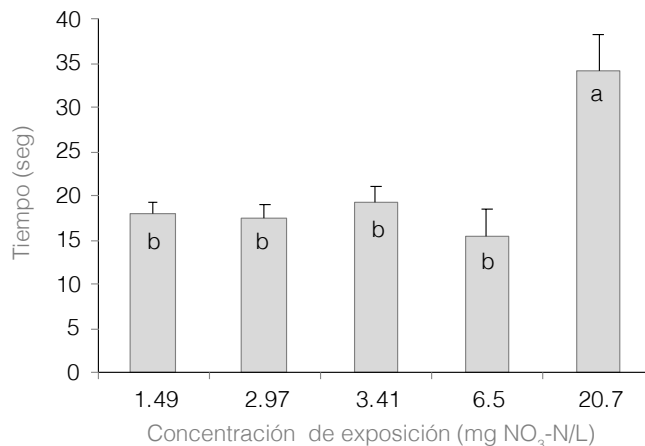
El desempeño de las hembras adultas, evaluado como la capacidad de regresar a su posición original cuando se les colocó con el opérculo hacia arriba mostró que en la concentración de 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L fue mayor el tiempo para completar este proceso. Por su parte, los organismos expuestos a menores concentraciones y el grupo control mantuvieron tiempos de respuesta similares (**figura 4**). En las observaciones al microscopio estereoscópico durante esta prueba se observó una evidente debilidad de las hembras para enderezarse, la cual se manifestó como un esfuerzo repetido por alcanzar la superficie de la caja de Petri. En las hembras de la concentración 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L, el pie no lograba alcanzar la superficie, lo cual difirió comparativamente con las hembras del grupo control o expuestas a concentraciones bajas que estiraban el pie, lo pegaban a la superficie y volteaban a su posición original en segundos. Respuestas similares a esta fueron las observadas por Alonso y Camargo (2013) en el que los organismos de la misma especie, que disminuyeron la velocidad de desplazamiento por efecto del estrés crónico de los nitratos. No obstante, dados los escasos estudios realizados en moluscos sobre el efecto los compuestos nitrogenados, son limitadas las comparaciones que pueden hacerse. Sin embargo, estudios realizados en peces han identificado diferentes niveles de sensibilidad a los nitratos, si bien la mayoría de las pruebas fueron agudas. En el caso de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), la exposición crónica a los nitratos (80 a 100 mg/L) durante tres meses, modificó su patrón de nado y provocó mayor número de peces que nadaron de lado conforme aumento el tiempo de exposición, aunque la velocidad no se vio alterada (Davidson *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Promedio de recién nacidos vivos y muertos por hembra del de caracol (*P. antipodarum*) durante la exposición crónica a nitratos (mg NO<sub>3</sub>-N/L) (49 días). Super índices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Distancia promedio (mm) recorrida por los recién nacidos del caracol (*P. antipodarum*) durante la exposición crónica a NaNO<sub>3</sub> (49 días). Letras como super índices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.** Prueba de desempeño (tiempo en recuperar su posición normal al colocarlas con el opérculo hacia arriba) realizada a las hembras adultas al final de periodo de exposición (49 días) a los nitratos. Super índices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

*P. antipodarum* es un organismo sensible a los nitratos que a partir de concentraciones de 20.7 mg N-NO<sub>3</sub>/L presentan mortalidad y disminución de la capacidad reproductiva (medida como disminución en la producción de crías). Cuando la exposición es menor, las hembras adultas sobreviven y se reproducen, sin embargo, se observa que aun bajas concentraciones afectan el desempeño de los adultos (tiempo en recuperar su postura normal) y la locomoción de los recién nacidos.

En su mayor parte, la información que existe sobre el efecto tóxico de los nitratos en diversos grupos, incluye pruebas agudas (CL50), en las cuales se determina la concentración de un compuesto que mata al 50% de los organismos de prueba. Sin embargo, las pruebas crónicas representan mejor lo que ocurre en el ambiente, donde concentraciones moderadas (compuestos que disminuyen su concentración por dilución en los cuerpos de agua) afectan por periodos prolongados a los organismos. Los efectos crónicos, particularmente aquellos que afectan el crecimiento, desarrollo y reproducción impactan a las poblaciones de manera sutil, pero no por ello menos contundente. Por lo anterior, es relevante complementar la información existente de los efectos agudos con las respuestas crónicas, para de esta manera tener herramientas de decisión más completas respecto a los niveles de tolerancia de los nitratos y de cualquier otro compuesto.

## Referencias

- Alonso A, Camargo JA** (2008) Ameliorating effect of chloride on nitrite toxicity to freshwater invertebrates with different physiology: a comparative study between amphipods and planarians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(2): 259-265.
- Alonso Á, Camargo JA** (2009) Long-term effects of ammonia on the behavioral activity of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(4): 796-802.
- Alonso A, Castro-Diez P** (2008) What explains the invading success of the aquatic mud snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)? *Hydrobiologia*, 614(1): 107-116.
- Alonso A, Camargo JA** (2013) Nitrates causes deleterious effects on the behaviour and reproduction of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 5388-5396.
- Andrews JF** (1993) Modeling and simulation of wastewater treatment processes. *Wat. Sci. Tech.* 28(11/12): 141-150
- Camargo JA, Alonso Á** (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 32(6): 831-849.
- Craig G, Pica-Granados Y, Rueda-Jasso RA** (2017) La Evolución de los criterios de calidad del agua para la vida acuática. En: *Ramírez-Romero et al., (Eds) Contribuciones al conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México. Vol 2.* En prensa. IPN-IMTA
- Davidson J, Good C, Welsh C, Summerfelt ST** (2014) Comparing the effects of high vs low nitrate on the health, performance and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 59: 30-40.
- Organization for Economic Co-operation and Development [OECD]** (2010) Detailed review paper (DR) on mollusks life-cycle toxicity testing. *ENV/JM/MONO(2019)9*. 182 pp. On-line available at: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282010%299&doclanguage=en>
- Soucek DJ, Dickinson A** (2012) Acute toxicity of nitrate and nitrite to sensitive freshwater insects, mollusks, and a crustacean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 233-242.
- Tidepool** (2001-2015) *CETIS –Comprehensive Environmental Toxicity Information System*. CETIS Users Guide v1.8.8.2 Tidepool Scientific Software, MacKinleyville, Ca.: 241.