

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE
LA CONTAMINACIÓN DE
SEDIMENTOS DEL RÍO TAJO Y
AFLUENTES**

**BECA DE INVESTIGACIÓN DE LA
DIPUTACIÓN DE TOLEDO**

27 de Marzo de 2007

Carolina Rodríguez Álvarez

03891928-Y

El primer agradecimiento se dirige a la Diputación de Toledo, de forma más especial al Servicio de Medio Ambiente, por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este proyecto.

En segundo lugar, agradecer al Doctor Juan Carlos Sánchez Hernández, profesor en la UCLM, por prestarse a dirigir la investigación y cederme parte de los recursos materiales necesarios, sin los cuales no podría haber realizado este proyecto.

Gracias también a todas esas personas que me han ayudado en alguna de las diferentes etapas de la investigación.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	2
III.	JUSTIFICACIÓN.....	3
IV.	INTRODUCCIÓN.....	4
	- Sistema de estudio	
	- El río Tajo.....	4
	- Ensayos de toxicidad	
	- Que son y para que sirven.....	5
	-Enfoque temporal	6
	- Indicadores de contaminación: Bioindicadores.....	7
	- Biomarcadores.....	8
V	METODOLOGÍA.....	13
	- Muestreo del sedimento.....	13
	- Adquisición y mantenimiento de los cangrejos.....	14
	- Preparación del experimento.....	15
	- Preparación de tejidos a analizar.....	16
	- Parámetros a determinar: Medida de biomarcadores.....	16
	- Determinación de las propiedades físico-químicas del sedimento.....	19
	- Materiales e instrumentos utilizados en el estudio.....	24
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
	- Caracterización del sedimento.....	27
	- Ensayos de toxicidad y medida de biomarcadores.....	31
VII	CONCLUSIONES.....	41
VIII	MODIFICACIONES.....	43
IX	BIBLIOGRAFÍA.....	44

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA CONTAMINACIÓN DE SEDIMENTOS DEL RÍO TAJO Y AFLUENTES

RESUMEN

Los ecosistemas fluviales son considerados uno de los ambientes más sensibles a la contaminación, debido a que son uno de los sistemas más expuestos a la contaminación. La descarga de residuos desde efluentes urbanos e industriales, la escorrentía superficial en terrenos agropecuarios, el almacenamiento de residuos tóxicos y peligrosos en las cuencas hidrográficas constituye una amenaza para el ecosistema acuático (Fig. 1). No debemos olvidar el papel de la agricultura en cuanto a emisión directa o indirecta de plaguicidas y fertilizantes al medio acuático. Todos estos contribuyen a un detrimento de la calidad de las aguas.

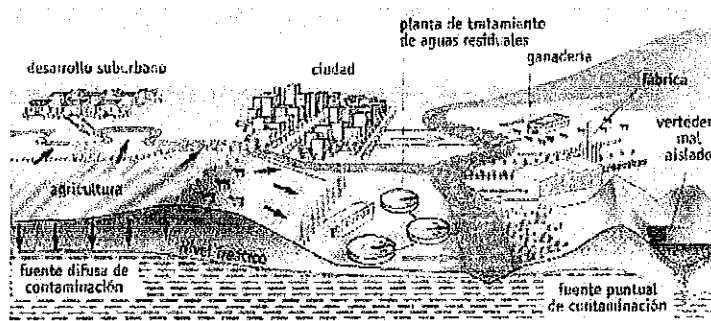


Figura 1. Principales actividades humanas capaces de causar contaminación en el sistema acuático.

No siendo una excepción, los ecosistemas fluviales de la provincia de Toledo se ven afectados, en gran medida, por estas actividades contaminantes. Algunos estudios (Sánchez Hernández et al., 2004) han demostrado la presencia de contaminantes orgánicos como hexaclorobenceno (0,80-2,48 ng/L), lindano (1,30-11,5 ng/L), 4,4'-DDE (6,89-11,6 ng/L), 4,4' DDT (0,61-2,02 ng/L), hidrocarburos poliaromático (812,05-26,75 ng/L) en el río Tajo a su paso por Toledo.

Estas concentraciones encontradas en el agua son similares e incluso superiores a las registradas en sistemas fluviales altamente contaminados del mundo, pudiendo llegar a manifestar efectos adversos sobre algunos organismos acuáticos (Sánchez Hernández, 2002).

A pesar de estos estudios recientes, no existen datos acerca de la calidad del agua del río Tajo y, en especial, sus afluentes en términos de causar un impacto negativo en la biota o en su aprovechamiento en agricultura u otras actividades que requieran de un aporte de agua en condiciones relativamente buenas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos a realizar durante el año de ejecución del proyecto han sido los siguientes:

1. Determinar la existencia de efectos adversos de la contaminación sobre uno de los organismos más representativo del sistema fluvial del río Tajo, *Procambarus clarkii*, a través de ensayos de toxicidad en condiciones de laboratorio.
2. Determinar la respuesta de los biomarcadores moleculares y bioquímicos en los organismos expuestos a los sedimentos mediante ensayos de toxicidad.
3. Caracterización de los sedimentos determinando sus propiedades fisicoquímicas, y así, la movilidad y biodisponibilidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La función de estos ecosistemas para el hombre (pesca, actividades de recreo...) justificaría la ejecución de una evaluación sobre la calidad de las aguas centrándose, principalmente, en los sedimentos ya que en ellos se acumulan la mayoría de los contaminantes químicos en el ecosistema acuático.

La contaminación de las aguas continentales conlleva la contaminación del lecho con el que está en contacto, puesto que los contaminantes se incorporan a los sedimentos por procesos de precipitación y adsorción. Así, los sedimentos pueden actuar como trampa de especies químicas, disminuyendo los niveles de contaminación el agua bajo determinadas condiciones de pH, temperatura, etc. los contaminantes pueden volver a las aguas. Además, los sedimentos pueden ser utilizados para detectar especies que no permanecen solubles después de un vertido de aguas residuales.

Por todo ello, para comprender el efecto de la contaminación de los ríos sobre la fauna acuática, es necesario conocer, no sólo la calidad del agua, sino también es necesario el estudio de los efectos de la contaminación del agua sobre la fauna acuática expuesta a los sedimentos de los ríos.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El sistema en el que se centra el estudio es el río Tajo, especialmente a su paso por la provincia de Toledo.

1. SISTEMA DE ESTUDIO

1.1. El río Tajo.

El río Tajo, con sus 1120 Km. de longitud, de los que 910 Km discurren por el territorio español dirección Este-Oeste, es el río más largo de la Península Ibérica. Desde su nacimiento en la Sierra de Albarracín, hasta su desembocadura en el océano Atlántico, junto a Lisboa en Portugal, el río Tajo discurre por las comunidades autónomas de Aragón, Castilla y León, Madrid, Castilla-La Mancha y Extremadura, siendo Castilla-La Mancha la región que más superficie aporta a su cuenca hidrográfica, con 26,699 Km².

La cuenca del río Tajo está limitada al Norte por el Sistema Central, Al Este por la Cordillera Ibérica y al Sur por los Montes de Toledo. El río Tajo, una vez internado en la provincia de Guadalajara se remansa en los embalses de Entrepeñas, adentrándose posteriormente en tierras madrileñas donde recibe aportes del río Jarama. A partir de aquí se interna en tierras toledanas. Hasta Talavera de la Reina recibe agua de los ríos Guadarrama y Alberche. Tras atravesar esta zona, discurre por valles cerrados, lo que ha favorecido la construcción de una serie de embalses como el de Azután, Valdecañas.... En su último tramo transcurre por tierras portuguesas hacia el Atlántico.

Refiriéndose a la hidrología, el río Tajo es uno de los ríos más caudalosos de España, debido en gran parte a sus afluentes de su margen derecho como son el Jarama, el Guadarrama, el Alberche y el Tiétar. De los afluentes del margen izquierdo cabe destacar el río Guadiela, pues el resto (Algodor, Guadamur, Torcón, etc) permanecen secos gran parte del año.

El régimen hidrológico del Tajo es del tipo pluvio-nival en el tramo alto del río, siendo más pluvial en el curso medio, presentando una variación estacional debido al ritmo de las precipitaciones.

1.2. La industria en la cuenca del tajo

La mayor parte de la industria localizada en la cuenca del río Tajo se abastece a través de sistemas integrados de abastecimiento. No obstante, existe una demanda industrial que no está conectada a las redes urbanas y, por tanto, su abastecimiento se realiza a partir de tomas de agua superficial y de pozos.

2. ENSAYOS DE TOXICIDAD

2.1. Qué son y para qué sirven

Los ensayos de toxicidad constituyen una metodología imprescindible para la determinación de los efectos producidos en un organismo tras su exposición a una o varias sustancias determinadas. En el caso de los ensayos de toxicidad crónica, se estudia las respuestas tóxicas provocadas por la exposición permanente a unas determinadas dosis del agente toxicológico a estudio.

De esta forma se puede realizar una evaluación del riesgo toxicológico de una sustancia en el ambiente, conociendo así, cuál será el impacto/os del agente tóxico en un ecosistema.

En los ensayos de toxicidad clásicos lo que se pretende estudiar son los efectos del contaminante en parámetros como la supervivencia, el crecimiento o la reproducción.

CUALQUIER ENSAYO DE TOXICIDAD

NUESTRO ENSAYO DE TOXICIDAD

Indicador de contaminación

Cangrejo *Procambarus clarkii*.

Respuesta a determinar

Mortalidad, crecimiento, efectos en biomarcadores.

Periodo de exposición

Exposición a 10 días.

Seleccionar una dosis de exposición

En nuestro caso esta concentración no era conocida ya que lo que se determinó no era la relación dosis-respuesta sino conocer los efectos de los contaminantes en el organismo de forma cualitativa.

2.2. Enfoque espacial.

El enfoque espacial nos sirve para comparar distintas zonas con diferente grado de contaminación.

Para el desarrollo del experimento se tomaron suelos potencialmente contaminados de diferentes zonas del río Tajo, además de un sedimento control exento de contaminación. De esta forma se pudo comprobar qué sedimento era el más contaminado y los efectos de los distintos grados de contaminación en los organismos seleccionados para el ensayo de toxicidad.

2.3. Indicadores de contaminación. Bioindicadores.

Para los ensayos de toxicidad es necesario seleccionar un organismo sobre el cual se puedan determinar los efectos tóxicos de una sustancia. Este organismo, es un bioindicador. Así, se define a un organismo cuya presencia o ausencia aporta información a cerca de las condiciones ambientales del hábitat (Van Gestel and Van Brummelen, 1996). El organismo seleccionado debe estar presente en el hábitat en cual aparece la contaminación, no debe ser un animal ajeno a ese ecosistema. En nuestro caso, el bioindicador elegido fue el cangrejo *Procambarus clarkii*.

Dentro del organismo bioindicador se estudian ciertos parámetros fisiológicos que se ven afectados por el agente contaminante, a los que se les conoce como biomarcadores. Los biomarcadores han sido definidos como "una respuesta biológica que puede estar relacionada con una exposición o con un efecto tóxico de un o más contaminantes del ambiente" (Peakall and Shugart, 1993).

2.3.1. Características de los organismos modelo.

Los organismos seleccionados como indicadores de contaminación han de cumplir las siguientes características:

1. Presentar una cierta sensibilidad al contaminante objeto de estudio.
2. Presentar una amplia distribución geográfica, para de esa forma poder comparar diferentes zonas.
3. Tener un ciclo de vida largo, para garantizar un tiempo de exposición adecuada.
4. El bioindicador debe presentar efectos tóxicos fácilmente reconocibles o cuantificables.
5. Presentar tolerancia a la contaminación.

2.3.2. Nuestro bioindicador: *Procambarus clarkii*

El organismo en el se determinaron los efectos tóxicos de los sedimentos del río Tajo fue el cangrejo rojo, ***Procambarus Clarkii***

Su tamaño alcanza los 10 cm. desde el rostro hasta el telson. Su coloración varía de rojiza a gris azulada. Posee un caparazón cefalotorácico con numerosas espinas en ambos lados de la sutura cervical.

Biología y hábitat

El cangrejo rojo vive en sustratos blandos de ríos, marismas y charcas de agua, excavando túneles para su refugio. Es menos fotóforo que el cangrejo autóctono, por lo que no es difícil verlo a plena luz del día. Permanece entre la vegetación o al descubierto si el agua no está muy clara. Su fisiología es notablemente más resistente, soportando niveles bajos de oxígeno, temperaturas altas y un alto grado de contaminación del agua.

Su alimentación es omnívora, presentando un muy amplio nicho trófico (Correia, 2002). La reproducción comienza en otoño. Tras la fecundación, la hembra se retirara a su agujero donde tendrá lugar la puesta de un centenar de huevos, los cuales permanecerán pegados a los pleópodos de la madre hasta su eclosión en primavera.

Distribución geográfica nativa

P. clarkii es originario del noreste de México Y del sur central de EEUU (Hobbs et al., 1989).

Distribución y establecimiento en la Península Ibérica

P. clarkii, se distribuye por toda la Península Ibérica, siendo muy común y abundante en la mitad sur de la Península (Gutiérrez-Yurrita et al., 1999). Al norte de la Península habita en tramos bajos de los cursos de agua, donde el agua tiene temperaturas más altas.

Mecanismo de introducción

El cangrejo rojo fue introducido en 1974 por los pescadores para fines comerciales. La primera introducción se produjo en las marismas del Bajo Guadalquivir, en la finca denominada "Casablanca" de la provincia de Sevilla (Hadsburgo-Lorena, 1979; Algarin, 1980; Ocete & López, 1983).

Impacto ecológico

En la península Ibérica ya se ha comprobado tanto la alteración de la red trófica (Geiger et al., 2004) como la pérdida de biodiversidad (Rodríguez et al., 2004) de humedales debido a la presencia de *P. clarkii*. Justo después de la introducción, el cangrejo empieza a crecer rápidamente, y tiene un dramático efecto sobre la comunidad acuática debido a su voracidad, provocando cambios en la red trófica, influyendo en la productividad de las zonas donde habita (Correia, 2002). Por otra parte, esta especie es el vector de la afanomicosis enfermedad infecciosa causada por el hongo *Aphanomices astaci* (Diéguez-Urbeondo & Söderhöl, 1993) que es letal para el cangrejo de río autóctono. También se conoce su efecto negativo sobre poblaciones de anfibios (Gamradt & Kats, 1996).

2.4. Biomarcadores.

2.4.1. Uso de biomarcadores

Actualmente el uso de biomarcadores para estimar la exposición o determinar los efectos de contaminantes está recibiendo una atención considerable. (Walker et al., 2001; Huggett et al., 1992; McCarthy and Shugart, 1990). La razón por lo que actualmente ha aumentado el interés en los biomarcadores, son las limitaciones que presentan los métodos clásicos en la toxicología ambiental.

En los métodos clásicos, las concentraciones de contaminantes en el ambiente sólo se relacionan con efectos adversos en los organismos como mortalidad, reproducción o crecimiento. Sin embargo, en los años recientes ha recibido una mayor atención el uso de otras repuestas biológicas (biomarcadores) para estimar cualquier exposición o efecto resultante debido a los contaminantes.

2.4.2. Biomarcadores utilizados en el estudio.

La determinación del efecto producido en los cangrejos tras su exposición a sedimento contaminado se lleva a cabo estudiando la respuesta inducida en distintos biomarcadores por acción del agente tóxico. Para ello, se establecen unos biomarcadores determinados que son sensibles a la contaminación.

En este proyecto se trabaja con tres biomarcadores importantes. Todos ellos son actividades enzimáticas.

Los enzimas son moléculas proteicas, cada tipo de molécula de enzima es una proteína con una composición y una secuencia de aminoácidos específicas. Los aminoácidos son moléculas de bajo peso molecular que forman las subunidades de la

proteína. La unión de cierto número de estos aminoácidos conforma una proteína. Estas enzimas catalizan la mayor parte de las reacciones que se producen en un organismo. Para la realización de su actividad poseen un centro activo, donde se une el sustrato de la reacción.

En el centro activo de las enzimas se encuentra un grupo sulfhidrilolateral (SH^+) aportado por el aminoácido cisteína. Cuando la enzima se encuentra en una solución acuosa, el H^+ se libera de la molécula, por lo que el sitio activo de la enzima queda cargado negativamente (S^-). Este centro activo con carga negativa es un lugar de unión muy afín a sustancias contaminantes con carga positiva, como ocurre con los metales pesados. Éstos, se unen al centro activo de la enzima de tal forma que la inactiva, ya que ningún otro sustrato de reacción podrá unirse al sitio ocupado por el metal. La actividad enzimática, se ve modificada por acción de la sustancia contaminante.

Los biomarcadores enzimáticos estudiados son:

- Acetilcolinesterasa (AChE), del grupo de las colinesterasas (ChEs).
- Glutación S- Transferasa (GST).
- Metalotioneínas (MTs).

I. ACETILCOLINESTERASA (AChE).

La actividad animal requiere del funcionamiento coordinado de muchas células individuales. Las células encargadas de esta coordinación son las neuronas. Éstas se encuentran conectadas unas a otras, por lo que transmiten información por medio de la propagación de señales químicas y eléctricas. Esta transmisión entre neurona se conoce como sinapsis y es llevada a cabo por neurotransmisores. La acetilcolina (ACh) es el transmisor en algunas neuronas de invertebrados, incluyendo el sistema nervioso central de los anélidos. Ésta, transmite el impulso nervioso de unas neuronas a otras.

El mecanismo que interrumpe esa comunicación entre neuronas es el que produce la eliminación del neurotransmisor, en este caso la ACh, del espacio que une las neuronas. Esta eliminación se lleva a cabo por una sustancia específica que hidroliza la molécula transmisora dejándola inactiva. La transmisión de una señal entre neuronas se termina cuando se hidroliza la ACh a colina y acetato debido a la acción de la AChE.

Esta enzima se encuentra en abundancia cerca de la superficie de la membrana postsináptica, es decir, en la neurona que se encuentra al otro lado de la

hendidura sináptica. A la cual, una célula presináptica le ha transmitido el impulso nervioso.

El bloqueo de la actividad de la AChE produce efectos peligrosos, ya que interrumpe la función del sistema nervioso pudiendo producir la muerte. Porque si la AChE quedara totalmente inactiva, por acción de algunas sustancias contaminantes, no se podría eliminar la ACh de la hendidura sináptica por lo que el impulso nervioso no dejaría de transmitirse, evitando la transmisión de otros impulsos nerviosos posteriores necesarios para mantener el funcionamiento del organismo.

Peakall (Peakall et al., 1994) incluyó la inhibición de AChE como una de las mejores biomarcadores estandarizados para diagnosticar un problema de contaminación sin necesidad de realizar análisis químicos.

II. GLUTATION S-TRANSFERASA.

La biotransformación en el organismo de los compuestos extraños, es fundamental para facilitar su excreción y tiene una gran influencia en los efectos tóxicos de estos compuestos. La eliminación de los compuestos extraños, o xenobióticos, que son solubles en las grasas es muy difícil debido a que absorben en distintos tejidos del organismo, por lo que su excreción sería muy lenta. Para que esta eliminación sea más rápida y efectiva, el proceso de biotransformación modifica a la molécula original haciéndola más hidrosoluble. De esta forma se facilita la excreción renal. Las transformaciones de los compuestos xenobióticos se llevan a cabo mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas.

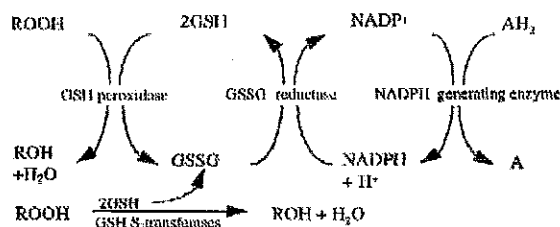
El glutatión (GSH) es un compuesto formado por glicina, cisteína y ácido glutámico. El GSH se conjuga y une con los compuestos xenobióticos, haciéndolos, de esta forma, más hidrosolubles para facilitar su eliminación.

La GST representa una importante familia de enzimas importantes por su papel como catalizadoras en la conjugación de varios compuestos xenobióticos con el tripeptido glutatión (Saint-Denis et al., 1996; Stegeman et al., 1992). Estas enzimas catalizan la reacción de tales compuestos con el grupo -SH del GSH, así los productos presentan más solubilidad en agua.

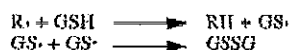
Functions of Glutathione

I. Maintenance of Cellular Sulfhydryl Status

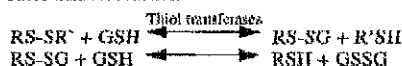
A. Redox cycle



B. Free radical reactions



C. Thiol-transfer reactions



II. CONJUGATION

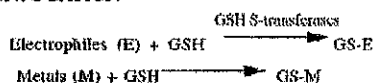


Figura 2. Esquema de las diferentes reacciones en las que se ve implicado el glutatión (GSH) y la GST.

Se propuso que las GSTs habían evolucionado como mecanismo de defensa proporcionando enzimas de detoxificación, para los productos formados por reacción con el oxígeno (Stenersen et al., 1987). Cuando en el medio de la enzima aparecen radicales libres como O_2^- , H_2O_2 , R-HOO , dicha enzima se induce.

Se ha visto que este sistema se ve afectado por varios compuestos químicos, como pueden ser los metales, en algunas especies terrestres y acuáticas (Mayer et al., 1992; Peakall and Walter, 1994).

La GST se encuentra en la mayoría de los tejidos, especialmente en el hígado, hepatopáncreas, intestino, riñón, los testículos y el pulmón. Dentro de las células podemos encontrarlo en una elevada concentración dentro del retículo endoplasmático liso. Éste, es un orgánulo con membrana. Por ello para la medida de esta enzima primero se deben aislar las diferentes fracciones celulares, hasta conseguir aislar el orgánulo que nos interesa. Actualmente se ha estudiado la actividad de la GST en el hepatopáncreas en el cangrejo rojo *Procambarus clarkii* (Almar et al., 1987).

III. METALOTIONEÍNAS.

Un gran número de estudios han determinado la capacidad de algunos organismos de acumular ciertos metales (Hopkin, 1989). Los metales que se introducen en el organismo de las lombrices pueden aparecer de formas distintas. Una de las maneras por la que se produce la detoxificación de metales pesados en los tejidos es la que se lleva a cabo por la unión de estos metales a metalotioneínas.

Las MTs son proteínas de bajo peso molecular que presentan grupos sulfhidrilos dados por el aminoácido cisteína. Cuando un agente tóxico, como un metal, se une a las MTs debido a la gran afinidad de los metales por los grupos -SH de las enzimas, se produce un cambio en el estado de oxidación del metal. De esta forma, puede pasar a disminuir su toxicidad dentro del organismo. Esas MTs han sido encontradas tanto en vertebrados como invertebrados, moluscos y crustáceos (Roesijadi, 1992; Engel and Brouwer, 1993; Barka, 2000)

Las MTs se concentran especialmente en el hígado, hepatopáncreas, riñón, intestino delgado y branquias.

Se sabe que ciertos metales y algunos compuestos orgánicos producen una inducción de las MTs (Dallinger, 1996; Roesijadi, 1993).

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

3.1. Muestreo del sedimento.

3.1.1. Estaciones de muestreo.

Las muestras de sedimentos problema se recogieron en diferentes puntos ubicados a lo largo del curso del río Tajo su paso por la provincia de Toledo. Se tomaron dos puntos de muestreo:

1. En el primer punto de muestreo los sedimentos se tomaron en río Tajo a su paso por la **Puebla de Montalbán**, más concretamente en una zona ubicada aguas abajo del matadero de esta localidad. De esta forma podemos comprobar el efecto de las aguas procedentes de dicho matadero.

2. **Aceca**. Los sedimentos se tomaron aguas abajo de la central térmica de Aceca. Como en el caso anterior, comprobaremos el efecto de los vertidos de agua de dicha central sobre el Tajo.

3. El sedimento control, tomado como referencia, se tomó en una zona exenta de contaminación y en la que está presente el organismo bioindicador utilizado. Así estos sedimentos se recogieron en las márgenes de las lagunas de **Villafranca de los Caballeros**, más concretamente en la "laguna grande" cuyas aguas provienen el río Cigüela.

3.1.2. Recogida de las muestras.

Las muestras de sedimento se recogieron en una zona cerca de las márgenes del río, pues en esas zonas se encuentra la mayor parte del sedimento. Se tomó la primera capa de material limoso, pues los organismos se encuentran en contacto directo con ella. Evitamos tomar el sedimento más enterrado pues actúa como sumidero y en él se pueden encontrar una mayor concentración de contaminantes. Lo que no sería realmente representativo de lo que ocurre en el sedimento con el que están en contacto los diferentes organismos acuáticos.

3.1.3 Transporte y conservación de las muestras

Las muestras se recogieron en bolsas de plástico con auto cierre y fueron debidamente etiquetadas con el lugar de muestreo, día y hora quedando así perfectamente identificadas. Durante el transporte, se conservaron en neveras con hielo para mantenerlos fríos, de esta forma se reduce la degradación de dicho material

por los microorganismos manteniéndose las propiedades físico químicas del sedimento. Una vez en el laboratorio, las muestras se conservaron en frío, a una temperatura entorno a 4°C para seguir manteniendo inalteradas las características del sedimento. Durante el periodo de conservación, debemos vigilar que el sedimento no se congele. El tiempo máximo de conservación de las muestras de sedimento es de 2 meses.

3.3. Adquisición y mantenimiento de los cangrejos

Los cangrejos se adquirieron en un mercado para mayoristas (Mercamadrid) previo encargo. Se compraron en torno a 90 individuos de la especie *Procambarus clarkii*. No se recogieron del medio natural (control) debido a que el periodo en el que se comenzaron los experimentos no era el adecuado para la pesca de los mismos.

Una vez en el laboratorio los cangrejos tienen que aclimatarsen a las nuevas condiciones de temperatura, diferente composición del agua, etc.

Los cangrejos se repartieron en cuatro peceras de 70 litros de volumen para su mantenimiento y aclimatación. Asegurando de esta forma que las variaciones en los diferentes parámetros biológicos a determinar, se debían

exclusivamente al tipo de sedimento al que eran expuestos (los dos objeto de estudio y el sedimento control) y no debido al estrés generado por las nuevas condiciones del ambiente.

En la base de la pecera se creó un sustrato con guijarros y piedras de mayor tamaño. Se añadió agua hasta obtener una profundidad de 15-20 cm, renovándola todos los días al comenzar el periodo de adaptación y cada dos días transcurrida dos semanas. Así, el periodo tuvo una duración aproximada de un mes.

Se comprobó que los cangrejos se adaptaron totalmente al nuevo ambiente pues mudaron su exoesqueleto. Se aparearon y pusieron huevos que eclosionaron, de los cuales surgió una nueva generación de cangrejos.

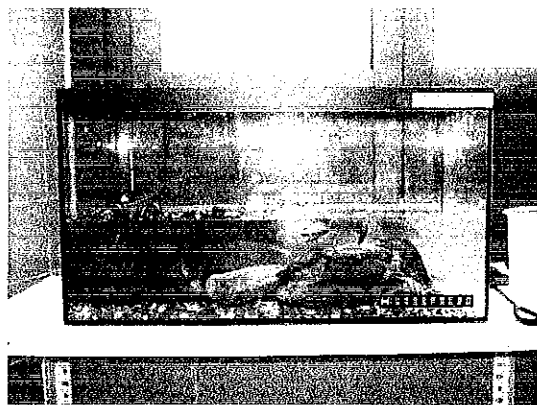


Figura 3. Acuario de mantenimiento de cangrejos.

El agua utilizada para el llenado de las diferentes peceras que posteriormente fue el agua utilizada durante el experimento, era agua corriente en la se burbujeaba oxígeno durante 48 horas para disminuir la cantidad de cloro.

3.2. Preparación del experimento.

Una vez finalizado el periodo de aclimatación, se comenzó la fase experimental propiamente dicha.

3.2.1. Diseño experimental: exposición a los sedimentos.

La exposición de los cangrejos a los diferentes sedimentos se realizó en recipientes de plástico (dimensiones 8x12x22cm). Se prepararon 3 réplicas para cada uno de los 3 sedimentos (Puebla de Montalbán, Aceca, Villafranca de los Caballeros) y para cada réplica se utilizaron 3 cangrejos (recipientes separados). Eso hace un total de 27 muestras. Cada uno de los recipientes se identificó adecuadamente con la fecha, el sedimento que contenía, el número de réplica y el número de cangrejo.

En cada réplica se añadió una cantidad de sedimento y agua en proporción $\frac{1}{4}$, por cada parte de sedimento 4 partes de agua. Así, se pesaron 250g de sedimento en cada recipiente, añadiéndose posteriormente 1 litro de agua. Colocándose piedras para simular, en cierta medida, las condiciones de su ambiente natural. Una vez preparadas las diferentes réplicas se dejaron reposar durante 24 horas para que sedimentase todo el sedimento levantado y disminuyera la turbidez del agua.

Una vez transcurridas las 24 horas, se introdujeron los cangrejos, uno en cada réplica, permaneciendo en los diferentes sedimentos durante un periodo de exposición de 10 días. Durante ese tiempo se anotarán todos aquellos datos considerados de interés, como la muda del exoesqueleto.

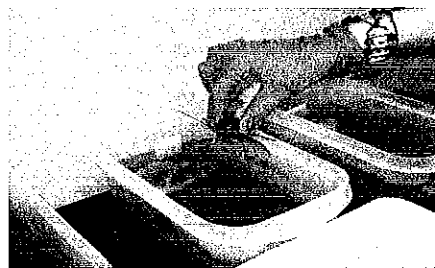


Figura 4. Exposición de los cangrejos a los diferentes sedimentos.

3.2.2. Condiciones del experimento. Factores a controlar

Todos los días se tomaron datos de pH, conductividad y temperatura tanto en el agua de las diferentes peceras de aclimatación como en diferentes recipientes donde los cangrejos se expusieron a los sedimentos (Tablas 4 y 5).

Se les suministraba un suplemento de alimento compuesto por lechuga, pequeños camarones (gammarus) y carne de pescado.

3.3. Preparación de los diferentes tejidos a analizar.

Transcurrido el periodo de exposición de los cangrejos a los diferentes sedimentos, se retiraron de los mismos y se procedió a la

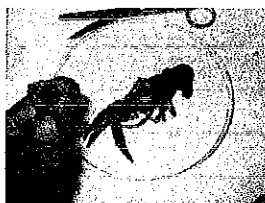


Figura 5. Disección y extracción de los tejidos a analizar.

extracción de los tejidos de interés. La disección se realizó

con tijeras y pinzas de acero inoxidable. Las fracciones extraídas se introdujeron en eppendorfs, convenientemente etiquetados, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C hasta el momento de su análisis. De esta forma se pudo detener las diferentes actividades fisiológicas celulares y la actividad enzimática. Las fracciones extraídas fueron:

- Hepatopáncreas
- Branquias
- Glándulas verdes
- Músculo (cuerpo)

En cada uno de los tejidos se determinó una actividad enzimática diferente.

3.4. Parámetros a determinar. Medida de biomarcadores.

Los parámetros toxicológicos medidos durante el experimento fueron el crecimiento, medido como peso, y la mortalidad. Con estas medidas se cubrirían los objetivos de los test estandarizados de toxicidad crónica o aguda.

Se controló la supervivencia de los cangrejos expuestos a los diferentes sedimentos.

Para comprobar los efectos de los sedimentos en el crecimiento, los cangrejos fueron pesados antes y después de exponerlos a los diferentes sedimentos. Así, se pudo comparar los distintos pesos pudiendo determinar si el crecimiento se veía o no afectado a la exposición del organismo a los sedimentos problema (Tabla 7).

Sin embargo, durante el estudio no sólo se midieron estos dos parámetros, también se determinaron los efectos subletales en los cangrejos debido a los diferentes contaminantes de los sedimentos problema. Estos efectos se midieron mediante el análisis de biomarcadores moleculares en los organismos test.

Así, en este proyecto se pudo estudiar la respuesta biológica de estos organismos frente a la contaminación del sedimento, mediante distintos test en el laboratorio usando el cangrejo *Procambarus clarkii*, en condiciones controladas (pH, temperatura...) en el laboratorio, relacionando la respuesta de los biomarcadores con los contaminantes biodisponibles en el sedimento.

En nuestro ensayo de toxicidad se analizó la actividad de los biomarcadores AChE, GST y concentración de MTs. También se realizaron cuantificaciones de proteínas totales, debido a que para determinar la actividad de algunos biomarcadores se precisa ponderar por la concentración de proteínas totales de la muestra, para de esta forma, homogeneizar los resultados.

I. Acetilcolinesterasa (AChE)

La AChE fue medida en el músculo extraído del cangrejo atendiendo al método de Ellman (Ellman et al., 1961).

El primer paso, fue homogeneizar el músculo con ayuda de una disolución tampón. Por homogeneizar se entiende, triturar y hacer una solución del músculo en el tampón, de esta forma se liberan los componentes o moléculas celulares a estudiar. El homogenado se centrifuga, aislandose así, una fracción citosólica donde se encuentra la AChE.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo mediante la adición de acetilcolina como sustrato de reacción y el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) que forma un complejo coloreado al unirse a la enzima, que posteriormente se midió espectrofotométricamente la cinética de la reacción utilizando un espectrofotómetro de absorción molecular.

II. Cuantificación de proteínas totales.

La determinación de proteínas totales se realizó siguiendo el método Bradford (Bradford, 1976). El reactivo Bradford contiene azul de Coumassie que aportan una coloración al unirse a las proteínas. Se determinó las concentraciones de proteínas mediante colorimetría. Para determinar la concentración de proteínas totales de las

muestras se realizó una curva de calibrado utilizando albúmina sérica bovina. A partir de la cual se extrapolaron los valores de concentración de las proteínas de cada muestra.

El valor de concentración de la muestra se multiplicó por el factor de dilución para obtener μg de proteína/ml cangrejo.

III. Glutation S-Transferasa (GST)

Determinación en el hepatopáncreas de la lombriz. Siguiendo el método de Lukkari (Lukkari et al., 2004).

Primeramente, se homogeneizó los 2/3 del hepatopáncreas del cangrejo en una solución tampón. Una vez centrifugado el homogenado se recuperó una fracción citosólica o **S9**. Ésta se ultracentrifugó y se obtiene así una fracción citosólica donde estaba aislado el retículo endoplasmático liso de las células donde se encuentra el GST.

Posteriormente, se llevo a cabo la lectura de la cinética de la reacción de la enzima incorporando como sustrato de reacción GSH y DTNB. Al producirse la reacción tenía lugar un cambio en la coloración de la muestra lo que era detectado por el espectrofotómetro.

Las reacciones producidas en la cubeta de reacción, que hacen posible la medida de la enzima son:

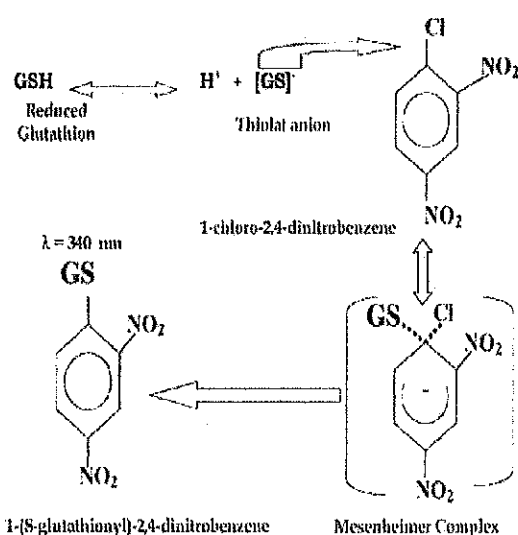


Figura 6. Mecanismo de conjugación del glutatión reducido con el DTNB. M. Haddous et al / Clínica Chimica Acta 326 (2002) 131-142.

IV. Metalotioneínas (Mt)

La concentración de esta enzima se mide en el hepatopáncreas (tomamos 1/3 del mismo) siguiendo el método espectrofotométrico de Viarengo (Viarengo et al., 1997) donde primero, se preparó el tejido mediante homogeneización en una solución tamponada. El homogeneizado se centrifugó obteniéndose una fracción citosólica donde se encontraron las metalotioneínas. A esta fracción se le añadió etanol frío y triclorometano, se centrifugó. Después, se aísla la fracción citosólica obtenida y se trató con diferentes reactivos para centrifugarse de nuevo. En el pellet aislado (precipitado) se encuentran las metalotioneínas, por lo que éste se resuspendió con una solución salina. Posteriormente, se midió la absorbancia de la muestra en espectrofotómetro de absorción molecular.

Para extrapolar los valores de absorbancia obtenidos y expresarlos como concentración de metalotioneínas, se realizó una curva de calibrado con (GSH).

3.5. Determinación de las propiedades físico-químicas del sedimento.

3.5.1. Medida del % de humedad

i) Fundamento

Se define como la cantidad de agua que las diferentes matrices pueden contener en su estructura.

ii) Materiales empleados

- Vidrios de reloj
- Estufa P- Selecta

iii) Procedimiento

Una pequeñas parte del sedimento recogido se reparte en vidrios de reloj y se introduce en la estufa a 105°C durante cuatro días. El tanto por ciento de humedad se determina por pesada constante, esto es, tomaremos el peso de los diferentes sedimentos a diferentes tiempos de permanencia en la estufa, hasta que las medidas de los pesos no

varíen con el tiempo, lo que nos indica que todo el agua del sedimento se ha evaporado. Así por diferencia en el peso antes y después del secado se determina el % de humedad.

3.5.2. Medida del pH

i) Fundamento

La medida de pH determina el potencial eléctrico que se crea en la membrana de vidrio de un electrodo, que es función de la actividad de los iones hidrógeno a ambos lados de la membrana. A la hora de hablar de disoluciones, el pH se define como el valor negativo del logaritmo de la concentración de protones:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Sin embargo, el concepto de pH en el sedimento no es tan preciso ya que la acidez o basicidad de un sedimento puede provenir de distintas vías: sales que se encuentran en suelos carbonatados y salinos, ácidos orgánicos liberados por fermentaciones, hidrólisis de aluminio o protones intercambiables. Así, se pueden distinguir varios tipos de acidez (Soil Survey Staff, 2001):

- Acidez libre: corresponde a los protones presentes en equilibrio con la solución del suelo, y se evalúa mediante la medida del pH de una suspensión de suelo en agua destilada.
- Acidez potencial: es un índice de la acidez edáfica. Se mide mediante una suspensión del suelo en una disolución no tamponada de una sal neutra como el KCl. Su valor es inferior a la acidez libre en 0.5-1.0 unidades de pH y depende del porcentaje de saturación de bases del suelo (se produce el desplazamiento de H^+ intercambiables en las posiciones de cambio).

ii) Reactivos y materiales empleados

- pH-metro CRISON Basic 20
- Balanza digital SARTORIUS BL 6100.
- Solución de KCl 0,1 M. Disolver 7,456 g en 100 ml de agua destilada y diluir hasta 1 litro.

iii) Procedimiento

En primer lugar se procede a la calibración del pH-metro; hecho esto, se preparan las diferentes muestras a determinar:

- pH en agua (EPA method 9045c): se pesan 10 g de sedimento y se añaden 10 ml de agua destilada. Se agita cinco minutos, dejando reposar la mezcla durante 1 hora. A continuación se toma la medida de pH.
- pH en KCl: se procede de la misma forma que en el apartado de pH en agua, pero utilizando una disolución de KCl 0,1 M en vez de agua destilada.

(Tabla 2)

3.5.3. Medida de la conductividad.

La conductividad eléctrica es proporcional a la concentración de sales en la solución y es función de la temperatura. Si ponemos una solución entre dos electrodos, al aplicar un potencial eléctrico, la cantidad de corriente que circula depende directamente de la concentración de las sales disueltas.

Reactivos y materiales empleados

- pH-metro conductivímetro CRISON Basic 20
- Balanza digital SARTORIUS BL 6100.

Procedimiento.

En primer lugar se procedió a la calibración del conductivímetro. Posteriormente se pesaron 10 g de suelo y se añadieron 50 ml de agua destilada. Se agitó treinta minutos y se tomó la medida de la conductividad eléctrica.

3.5.4. Determinación de la materia orgánica.

Para la determinación del contenido de la materia orgánica se siguió el Método de Walkley-Black (MAPA, 1994).

i) Fundamento.

Este método se basa en la determinación del carbono orgánico del sedimento mediante su oxidación con dicromato potásico en presencia de ácido sulfúrico. La reacción que se produce es la siguiente:



El exceso de oxidante se valora con sulfato ferroso amónico (sal de Mohr) y la cantidad de carbono orgánico oxidado se calcula a partir de la cantidad de dicromato reducido.

ii) Reactivos empleados.

- Dicromato potásico, pureza PA (para análisis), PANREAC
- Difenilamina, , pureza PA (para análisis), PANREAC
- Sulfato ferroso amónico, pureza PA (para análisis), PANREAC
- Ácido sulfúrico concentrado, pureza PA (para análisis), PANREAC
- Ácido fosfórico concentrado, pureza PA (para análisis), PANREAC

iii) Preparación de reactivos.

- Dicromato potásico 1N: se toman 60 g de dicromato potásico y se secan en una estufa a 105°C durante 2 horas. Se pesan 40,035 g del producto seco y se disuelven en agua desionizada enrasando a 1 litro.
- Difenilamina: se echan 16,7 ml de agua desionizada en un matraz aforado de 100 ml enrasando con ácido sulfúrico concentrado. Se pesan 0,5 g de difenilamina y se mezclan con la disolución de ácido sulfúrico (una vez que se ha enfriado), agitándose con una varilla hasta que se disuelva completamente.
- Sulfato ferroso amónico (Sal de Mohr 0.5N): se disuelven 196,1 g de la sal en una mezcla formada por unos 600 ml de agua desionizada y 200 ml de ácido sulfúrico concentrado; posteriormente, se enrasa con agua hasta 1 l.

iv) Procedimiento.

Se pesa 1 g de sedimento y se echa en un matraz erlenmeyer de 500 mL. Se añaden 10 mL de disolución de dicromato potásico 1N. Se agita y se añade 20 mL de

ácido sulfúrico concentrado. Se agita suavemente y se deja reposar durante 30 minutos. Después se añaden 200 ml de agua desionizada, 10 ml de ácido fosfórico y 1 ml de disolución de difenilamina; al añadir este último reactivo, las muestras se vuelven de color negro. De la misma manera se prepara un blanco en el que se utilizan todos los reactivos anteriores, a excepción de la masa de suelo.

Una vez añadidos todos los reactivos, se procede a la valoración de las muestras con la sal de Mohr. En primer lugar se valora el blanco, y a continuación las diferentes muestras de suelo. Una vez que el color del contenido del matraz pasa a tonos verdes se detiene la valoración y se anota el volumen de sal de Mohr gastada.

v) Cálculos.

En primer lugar, se calcula el factor de la sal de Mohr, ya que su concentración de Fe^{2+} disminuye con el tiempo, al tratarse de un ión que se oxida fácilmente por acción del aire. Este factor se deduce del volumen (V) consumido para reducir el dicromato en el ensayo del blanco.

$$M = 10 / V_{\text{gastado}}$$

A continuación se determina el carbono orgánico fácilmente oxidable:

$$\% \text{ C}_{\text{orgánico fácilmente oxidable}} (\text{p/p}) = [V_{\text{blanco}} - V_{\text{problema}}] * 0,3 * M / M_{\text{suelo}}$$

donde:

V_{blanco} = Volumen de sal de Mohr gastado en la valoración del blanco

V_{problema} = Volumen de sal de Mohr gastado en la valoración de la muestra

M = Factor de la sal de Mohr.

M_{suelo} = Masa de suelo utilizada (1 gramo).

$0,3 = 3 \cdot 10^{-3} \cdot 100$; dónde 3 es el peso equivalente del C

Seguidamente se calcula el carbono orgánico total:

$$\% \text{ C}_{\text{orgánico total}} (\text{p/p}) = 1,334 * \% \text{ C}_{\text{orgánico oxidado}}$$

Por último se calcula el porcentaje de materia orgánica contenido en el suelo:

$$\% \text{ m.o} (\text{p/p}) = 1,724 * \% \text{ C}_{\text{orgánico total}}$$

(Tabla3).

3.6. Materiales e instrumentos utilizados en el estudio.

Durante el desarrollo del proyecto se utilizaron una gran variedad de de materiales e instrumentos que nos permitieron alcanzar los objetivos planteados.

Así, en la fase de recogida se utilizaron diferentes materiales para la toma adecuada de los distintos tipos de suelos, como palas, tamices, neveras de conservación...

Para la realización de la fase experimental se recurrió a un gran numero de instrumental de laboratorio como probetas, tubos de ensayos, placas petri, eppendorfs, vasos de precipitados, pinzas...todos ellos para desarrollar adecuadamente la fase experimental.

Durante la fase de experimentación, además del instrumental básico de cualquier laboratorio de bioquímica, también se utilizó un variado número de instrumentos para la conservación, preparación de las muestras, medida de diferentes parámetros a estudiar y análisis de las distinta actividades enzimáticas. Así, entre otros instrumentos se requirieron balanzas analíticas, pHmetro-conductivímetro, homogeneizadores, centrifugas y un espectrofotómetro de absorción molecular.

- Homogeneizador Ultra-Turrax® T25.

En la homogeneización de los tejidos de las diferentes partes de las muestras de cangrejo se utilizó un instrumento conocido como homogeneizador. Éste consta de una punta y un cuerpo donde se encuentra un rotor que hace girar la punta del homogeneizador. Estas puntas son como un émbolo rotatorio que se ajusta a las paredes del tubo o recipiente que contiene la muestra. Las puntas del aparato son intercambiables por lo que según la parte de la muestra a homogeneizar así se utilizará una u otra.

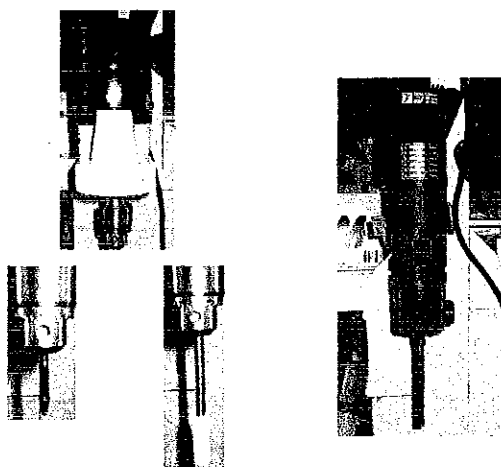


Figura 7. Distintos homogeneizadores y puntas utilizadas.

- Centrifuga refrigerada BECKMAN COULTER™ MICROFUGA® 22R.

La centrifugación es el procedimiento más utilizado para separar el homogenado en las distintas fracciones que lo componen. Cada una de las fracciones celulares tiene una densidad o peso característico, por ello cuando se les somete a una determinada fuerza centrífuga, los orgánulos celulares de mayor tamaño serán los primeros en precipitar y los menos pesados se mantienen en la disolución.

- Ultracentrífuga Beckman con un rotor de titanio del tipo 50.4 Ti.

La característica de esta Ultracentrífuga es que al alcanzar tan altas velocidades, se consigue el aislamiento de fracciones celulares de muy baja densidad, que de otra forma no se podrían obtener. Esta ultracentrífuga se utiliza con el fin de aislar la fracción microsomal de la parte media de la lombriz, para de esta forma analizar la actividad GST. En la Ultracentrífuga se pueden acoplar diferentes rotores. En nuestro caso se utiliza un rotor del tipo 50.4 Ti de titanio.

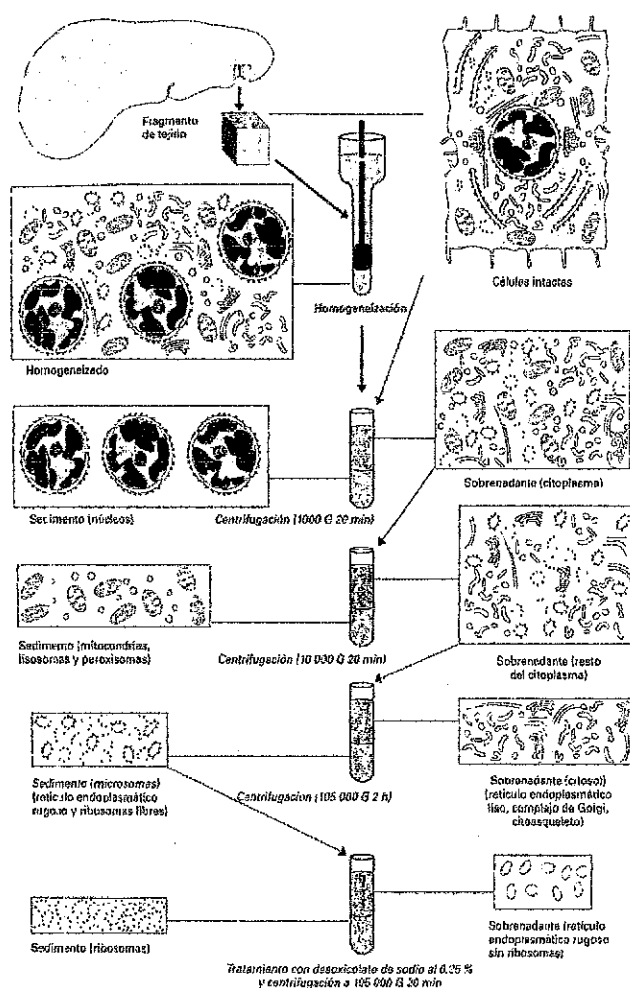


Figura 8. Fraccionamiento celular mediante centrifugación a diferentes velocidades.

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis JENWAY 6400.

Un espectrofotómetro es un dispositivo que hace pasar un haz de luz visible o UV a través de una cubeta llena de líquido y mide la intensidad de las longitudes de onda que salen.

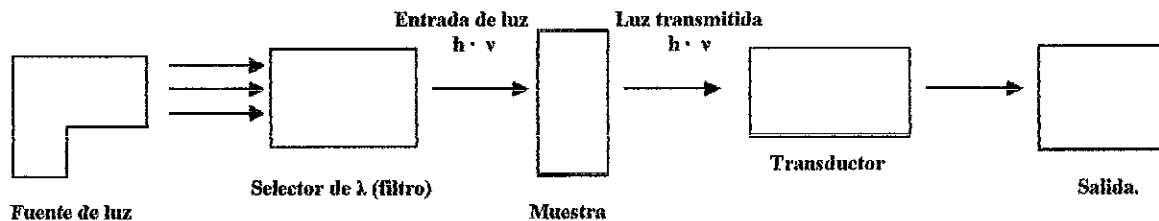


Figura XY . Diseño de un equipo experimental para medir absorción o transmitancia a una única λ . La energía del fotón = $h \cdot \nu$.



Figura 9. Espectrofotómetro utilizado para la medida de las distintas actividades enzimáticas analizadas.

La absorbancia de una muestra es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la luz incidente. Experimental se muestra que:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

La **absorbancia (A)** es directamente proporcional a:

a: es una constante que depende de la sustancia y la λ de medida.

b: longitud del paso óptico a través del cual la luz viaja hacia la muestra.

c: concentración de la sustancia que absorbe luz.

Ley de Lambert-Beer.

$$A \text{ (adimensional)} = \epsilon \text{ (l/mol-cm)} \cdot b \text{ (cm)} \cdot c \text{ (mol/l)}$$

ϵ = coeficiente de extinción molar o de absorptividad molar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DEL SEDIMENTO

Tabla 1. Porcentaje de humedad de los diferentes sedimentos.

	Peso sedimento húmedo(g)	Peso sedimento seco(g)	Pérdida de peso	% Humedad
Control	69,32	48,78	20,53	29,50
Puebla de Montalbán	68,90	50,46	18,44	26,77
Aceca	32,99	28,73	4,25	12,91

El sedimento que contiene una mayor cantidad de agua tras su recogida en los diferentes puntos de muestreo es el sedimento control, obtenido de la laguna Grande, de Villafranca de los Caballeros. Le sigue el sedimento recogido en la Puebla de Montalbán y por último, aquel que presenta un menor porcentaje de agua en su estructura es el sedimento de Aceca.

Es un factor a tener en cuenta a la hora de realizar los diferentes análisis del sedimento. Para corregir esta diferencia de humedad, antes de comenzar la caracterización, se secan todos los sedimentos en una estufa. De esta forma nos aseguramos que la menor o mayor cantidad de agua de las distintas muestras, es un factor que no interfiere en los resultados obtenidos en el análisis físico-químico del sedimentos.

Tabla 2. pH y conductividad de los diferentes sedimentos

	pH	Conductividad (μ S)
Control	8,9	840
Puebla de Montalbán	7,9	1189
Aceca	7,3	618

El sedimento que presenta un mayor valor de pH es el sedimento control, seguido de el de la Puebla y por último el de Aceca. Aunque la diferencia entre los valores no es elevada, pues todos los sedimentos presentan un pH básico, Así todas las muestras son de naturaleza alcalina, en especial el sedimento control.

El pH es una de las medidas más indicativas de las propiedades químicas del sedimento, se ve afectado por muchos factores como la naturaleza de la materia orgánica, cantidad de cationes y aniones intercambiables...etc.

A la vez el pH influye en la solubilidad de los iones del medio (como es el caso de los metales) , de tal forma que los iones se encuentran en una forma menos soluble en medios alcalinos, como ocurre con el sedimento control, que en medios ácidos.

De esta forma podemos decir, que el sedimento que presenta una mayor acidez es el sedimento de Aceca, por ello la solubilidad y por tanto la cantidad de iones (como son lo metales) presentes es mayor en el sedimento de Aceca.

La conductividad eléctrica es proporcional a la concentración de sales en la solución y es función de la temperatura. En este caso, el sedimento que presenta una mayor conductividad es la Puebla de Montalbán, seguido por el control y por último el sedimento de Aceca.

Tabla 3. Determinación de cantidad de materia orgánica (Carbono) en los sedimentos problema.

	Volumen de valorante (ml)	%C org fácilmente oxidable	%C org total	% materia orgánica
Puebla de Montalbán	20,0	0,50	0,66	1,14
Aceca	19,8	0,53	0,71	1,22
Contol	17	0,35	0,47	0,81

El sedimento que presenta una mayor proporción de materia orgánica es Aceca, seguido de la Puebla y por último el control. Esta materia orgánica es una fracción a tener en cuenta en el suelo, pues a ella se asocian un gran número de sustancias, como contaminantes, metales que se encuentran en el sedimento, debido a que los compuestos orgánicos del sedimento tienen una alta afinidad por los metales pesados debido a la presencia de ligandos o grupos funcionales (carboxilo, fenólicos, alcoholes, carbonilos,...) que pueden formar quelatos con aquellos, formando *complejos organo-metálicos* de gran importancia ambiental. La capacidad de adsorción e intercambio de los metales pesados por parte de la materia orgánica se debe a su carga negativa.

Si comparamos los valores de pH y conductividad de la tabla anterior, con los valores de % de materia orgánica observamos como cuanto más básico es el pH de un suelo, menor es la cantidad de materia orgánica en el mismo.

Tabla 4. Medidas de pH, conductividad (C) y temperatura durante el periodo de aclimatación.

	ACUARIO 1			ACUARIO 2			ACUARIO 3			ACUARIO 4		
	pH	C (μ S)	T (°C)	pH	C (μ S)	T (°C)	pH	C (μ S)	T (°C)	pH	C (μ S)	T (°C)
Semana 1	7,6	299,6	24	8	304,9	25	7,4	187,7	22	7,3	258,3	21
Semana 2	7,2	242	22	7,2	231,1	22	7,4	235,9	21	7,2	227,7	21
Semana 3	7,1	291,5	24	7,1	254,1	24	7,1	252,8	23	7,1	254,9	23
Semana 4	7,3	290,6	24	7,3	280,2	24	7,3	223,9	23	7,3	236,7	23

Durante el periodo de adaptación de los cangrejos en los diferentes acuarios, el pH se mantuvo entorno a un valor de 7, la conductividad entre 200-300 (μ S) y la temperatura del agua entre 21-24°C.

Tabla 5. Medidas de pH, conductividad (C) y temperatura durante el periodo de exposición de los cangrejos a los diferentes sedimentos

	Sedimento Control			Puebla de Montalbán			Aceca		
	pH	C (μ S)	T (°C)	pH	C (μ S)	T (°C)	pH	C (μ S)	T (°C)
Réplica 1	7,8	3481	23	7,4	549,4	22	7,4	354,6	22
Réplica 2	7,7	3496	23	7,4	539,4	22	7,3	344	23
Réplica 3	7,8	3395	23	7,6	627,9	23	7,6	408,9	23

Durante el periodo de exposición de los cangrejos a los diferentes sedimentos se observa que el pH del agua se mantiene en un valor entre 7-8, este valor es más elevado en el caso del sedimento control. Para la conductividad, los valores más altos se registran en el agua del sedimento control.

ENSAYOS DE TOXICIDAD Y MEDIDA DE BIOMARCADORES

Los datos se ordenaron utilizando la hoja de cálculo Microsoft Excel, para posteriormente analizar los datos mediante el programa estadístico Statsoft Inc. (2003) Statistica versión 6.

El análisis estadístico de los datos comenzó con las siguientes comprobaciones:

1. Las variables estudiadas responden a una distribución normal.
2. Análisis de la hipótesis:
 - H0-1: La respuesta de las diferentes variables es dependiente de la exposición a sedimento contaminado.

Las pruebas estadísticas empleadas para la verificación de la hipótesis se realizaron atendiendo a un nivel de probabilidad de 0,05. Aquellas variables cuyo grado de significación esté por debajo o sea igual al valor 0,05 se tomarán como significativas, es decir, se admite alguna de las hipótesis enunciadas.

1. Comprobación de la distribución normal de las variables (peso, AChE, GST y MTs) mediante la aplicación del test Shapiro-Wilk's.

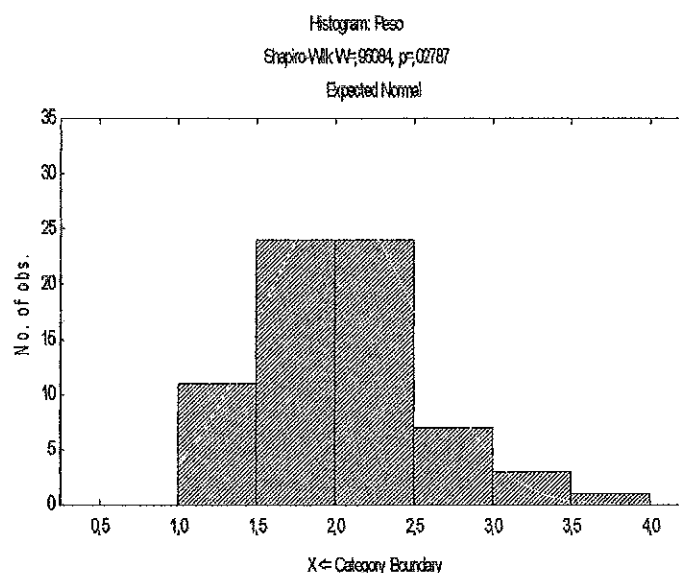


Figura 10. Ejemplo de un gráfico del programa Statistica que muestra si la variable analizada (en este caso el peso) se ajusta a una distribución normalmente.

Cuando aplicamos este test estadístico a todas las variables, se observa que ninguna se distribuye normalmente. Por ello, se transforman las variables a

valores logarítmicos y se aplica de nuevo el test Shapiro-Wilks para determinar si después de la transformación se ajustan a una distribución normal.

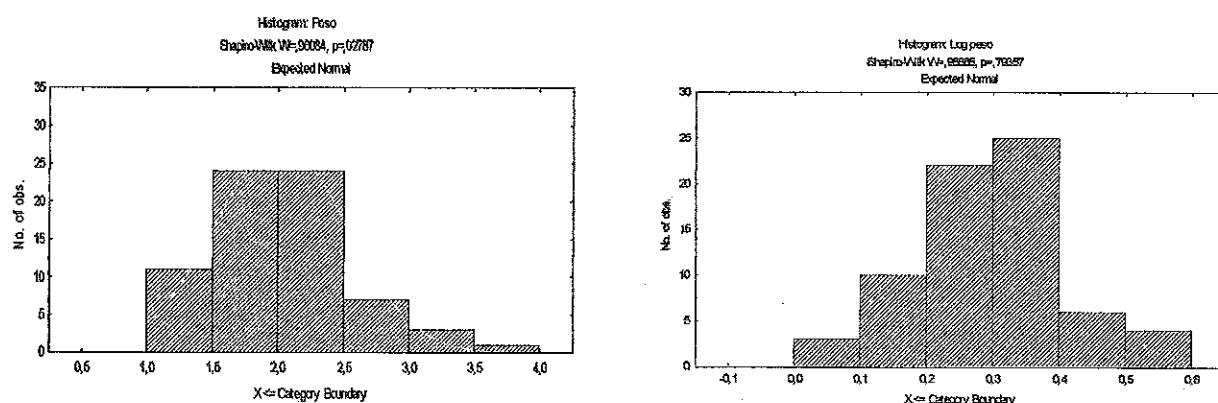


Figura 11. Representaciones gráficas en las que en el primer caso, se observa una distribución normal de la variable peso, mientras que en el segundo caso, tras la transformación, sí muestra una distribución normal.

Mediante el análisis y la interpretación de los resultados obtenidos después de aplicar el estadístico ANOVA se obtiene un valor de significación para cada variable. Así podremos aceptar o rechazar la hipótesis inicial.

Se realizó el test **ANOVA** para determinar si el sedimento al cual se expusieron los cangrejos a los sedimentos constituye un factor que afecta a la variabilidad de las diferentes variables (peso, AChE, GST, MTs).

Los niveles de significación (P) obtenidos para la variación, de cada parámetro analizado, debido a la exposición a diferente muestra de sedimento son:

Tabla 6. Valor de significación de la variación de los parámetros analizados.

PARÁMETRO	P
Peso	$P > 0,05$
AChE	$P > 0,05$
GST	$P > 0,05$
MTs	$P < 0,05$

- Si $P > 0,05$; variación no significativa del parámetro analizado.

- Si $P < 0,05$; variación significativa del parámetro analizado.

ENSAYOS DE TOXICIDAD Y MEDIDA DE BIOMARCADORES

Tabla 7. Mortalidad y crecimiento de los cangrejos (peso).

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia (g)	Media (g)	Mortalidad
Control R1	26,57	24,67	1,90	1,53	0
Control R2	24,50	23,17	1,33		0
Control R3	24,17	22,80	1,37		0
Puebla R1	26,47	25,37	1,10	1,22	0
Puebla R2	20,57	18,93	1,63		0
Pueba R3	24,87	23,95	0,92		0
Aceca R1	22,87	21,33	1,53	1,34	0
Aceca R2	21,97	21,13	0,83		0
Aceca R3	23,13	21,49	1,64		0

El número de cangrejos que sobreviven en el periodo de exposición a los sedimentos es el mismo tanto si el tenemos un sedimento problema o si el sedimento se trata del control. Esto es, sobreviven el 100% de los cangrejos expuestos. La mortalidad de los cangrejos no se ve comprometida tras la exposición a los diferentes sedimentos del Tajo.

El peso de los cangrejos ha modificado durante el periodo de exposición, observándose una mayor disminución en el peso en los cangrejos sometidos al sedimento control. Para cada sedimento obtenemos una variación en el peso diferente pero con valores muy próximos.

Cuando realizamos el test estadístico ANOVA para comprobar si la variación en el peso es significativa con respecto al tipo del sedimento al cual se expongan los cangrejos, obtenemos un grado de significación $P > 0,05$. (Tabla 6) lo que nos indica que las variaciones en los pesos de los organismos no son significativos con respecto al tipo de sedimento.

Así, el tipo de sedimento al que se exponen los cangrejos no genera efectos significativos en el peso.

A) ACTIVIDAD AChE

Tabla 8. Actividad AChE en los cangrejos expuestos a diferentes sedimentos.

Sedimento	Réplica	Actividad AChE (nmol/min/mg proteína)	
		Media	SD
Control	R1	10,2	1,85
	R2	26,4	4,70
	R3	21,6	8,48
Puebla de Montalbán	R1	17,0	8,20
	R2	6,6	8,85
	R3	30,3	15,9
Aceca	R1	14,8	2,5
	R2	17,2	6,5
	R3	18,2	2,4

Tabla 9. Valores medios de actividad AChE de los cangrejos para cada tipo de sedimento.

MUESTRA	ACTIVIDAD MEDIA AChE	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Control	19,4	8,72
Puebla	24,6	8,7
Aceca	16,9	4,1

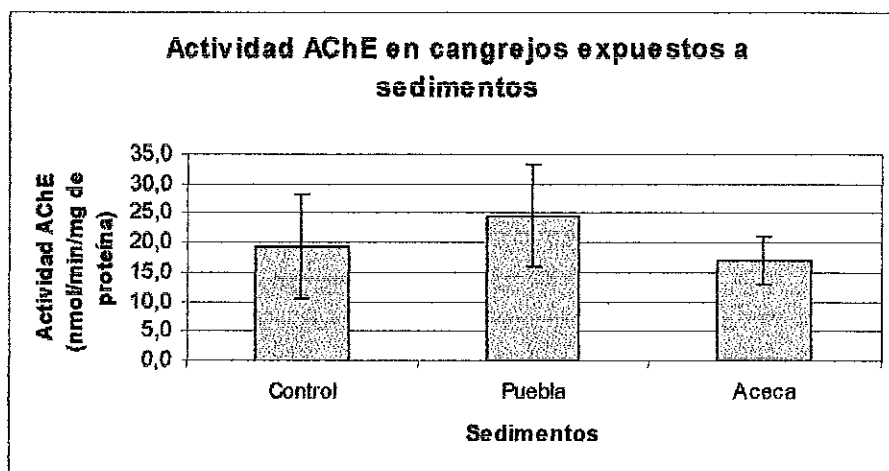


Figura 12. Representación gráfica de valores medios de actividad AChE en los cangrejos sometidos a los sedimentos.

En la tabla 9 donde aparecen los valores medios de actividad de AChE, se ve cómo la actividad de esta enzima es mayor en los cangrejos expuestos al sedimento de la Puebla de Montalbán que en los expuestos al resto de sedimentos, superando, incluso, la actividad en el control.

Comparando los dos sedimentos contaminados, se observa una inhibición de la actividad enzimática en los cangrejos sometido al sedimento de Aceca, lo que puede deberse, a que la concentración de contaminantes en este punto sea mayor que en la Puebla, lo que disminuya la actividad enzimática de AChE.

Aunque gráficamente se observe una variación en la actividad AChE de los cangrejos expuestos a los diferentes sedimentos, esta variación es no significativa (Tabla 6; $P > 0,05$). Esto es, la exposición de los cangrejos a diferentes sedimentos no

genera variaciones importantes en el peso de las lombrices, de esta forma la variación en la actividad AChE de los cangrejos no se explica por la exposición a diferentes sedimentos que presentan un mayor o menor grado de contaminación.

Existen estudios en los que se analizan cómo otros factores como la estación, la temperatura, el estado nutricional, y el escenario de la reproducción o la actividad pueden influenciar la actividad AChE (Jiménez et al. 1988; McDonald et al. 1990; Rattner and Fairbrother 1991).

Aunque podemos encontrar investigaciones en la que se ha observado una fuerte inhibición de las AChE por la exposición de los organismos a pesticidas y metales pesados (Martínez- Tabche et al., 2001; Diamantino et al., 2003)

Así, en general, las colinesterasas son sensibles a la contaminación presentando baja actividad de la enzima en presencia de metales pesados. Sin embargo en otros estudios se ha observado que no existe correlación entre las diferentes concentraciones de pesticidas y la inhibición de la colinesterasa.

Aunque, como hemos mencionado antes , en nuestro estudio, la variación a la actividad de AChE no se explica por la exposición a los diferentes sedimentos, contaminados y control.

B) ACTIVIDAD GST

Tabla 10. Actividad GST en los cangrejos expuestos a diferentes sedimentos

Sedimento	Réplica	Actividad GST (nmol/min/mg proteína)	
		Media	SD
Control	R1	1,30	4,18
	R2	0,20	2,07
	R3	-1,90	7,45
Puebla de Montalbán	R1	-1,59	1,24
	R2	8,29	14,83
	R3	4,43	7,69
Aceca	R1	-2,58	1,61
	R2	-0,57	5,07
	R3	-1,96	6,21

Tabla 11. Valores medios de actividad GST de los cangrejos para cada tipo de sedimento.

MUESTRA	ACTIVIDAD MEDIA GST	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Control	-0,14	4,6
Puebla	3,77	9,4
Aceca	-1,7	4,2

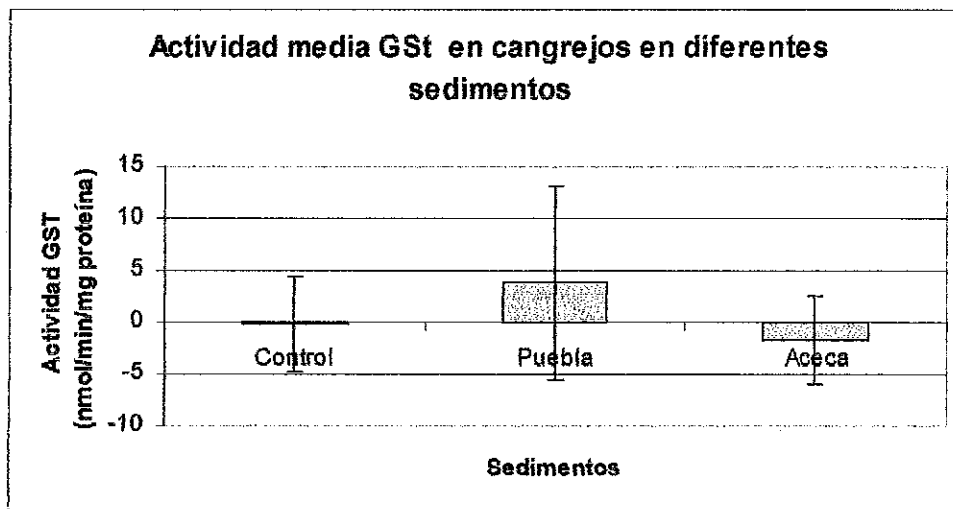


Figura 13. Representación gráfica de valores medios de actividad GST en los cangrejos sometidos a los sedimentos.

No se observan (Figura 13) aumentos ni disminuciones significativas (Tabla 6, $P > 0,05$) en la actividad GST de los cangrejos expuestos a los diferentes sedimentos del río Tajo ni en el caso del sedimento control.

Así, se puede decir, que el tipo de sedimento (con su mayor o menor grado de contaminación) por sí mismo no es un factor que tenga un efecto significativo en la variación de la actividad GST de los cangrejos sometidos a los distintos sedimentos.

Aunque en la teoría, la actividad enzimática GST se ve reducida en organismos expuestos a medios contaminados, sin embargo esto a veces no ocurre. Hay que tener en cuenta la respuesta de diferentes organismos acuáticos a la contaminación, como la producida por metales, depende de parámetros biológicos como el pH, la temperatura... y parámetros bióticos como la talla, el sexo o la madurez del animal (O'Hara, 1973; Ray 1984) Es decir, existen variaciones en la actividad GST que no tienen porqué deberse a la exposición de los cangrejos a sedimentos contaminados.

C) CONCENTRACIÓN DE MTs

Tabla 12. Concentración de MTs en los cangrejos expuestos a diferentes sedimentos

Sedimento	Réplica	Concentración MTs ($\mu\text{g/g}$ peso húmedo)	
		Media	SD
Control	R1	10,69	2,46
	R2	5,96	1,07
	R3	6,22	1,71
Puebla de Montalbán	R1	99,50	19,69
	R2	90,54	25,80
	R3	96,64	19,23
Aceca	R1	18,73	27,31
	R2	140,42	40,69
	R3	189,19	40,37

Tabla 13. Valores medios de la concentración de MTs de los cangrejos para cada tipo de sedimento.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN MEDIA GST	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Control	7,62	2,8
Puebla	95,23	19,26
Aceca	142,78	50,45

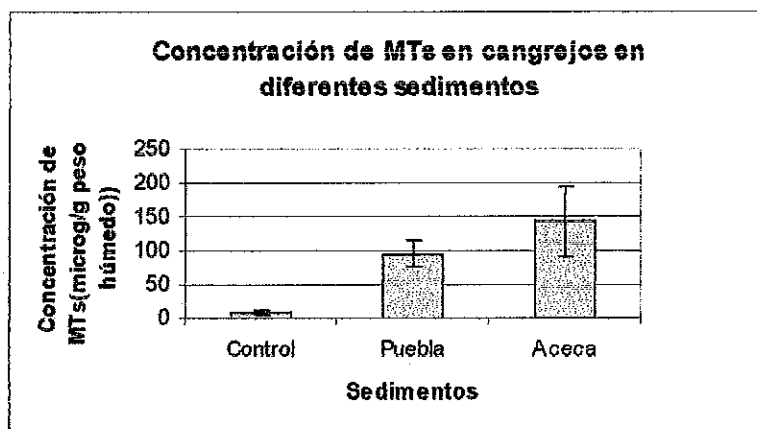


Figura 14. Representación gráfica de valores medios de la concentración de MTS en los cangrejos sometidos a los sedimentos.

Se detecta un aumento significativo (Tabla 6; $P < 0,05$) en la concentración de metalotioneínas en los cangrejos expuestos a los sedimentos procedentes del río Tajo, con respecto a las concentraciones medidas en el sedimento control.

De esta forma, podemos decir que el tipo del sedimento al cual es tan expuestos los cangrejos juega un papel importante en la concentración de MTs que presentan dichos organismos.

Las MTs son proteínas que son sintetizadas por el organismo cuando se encuentra en un ambiente donde existe contaminación, especialmente cuando existen metales pesados en el medio. El organismo hace frente a ese exceso de contaminantes mediante la síntesis de MTs que se unen al contaminante y disminuyen su toxicidad en el interior del organismo.

Así, en lagunas especies se ha demostrado la inducción en la síntesis de MTs debido a los contaminantes metálicos, sugiriendo el uso potencial de la concentración de MTs en el organismo, como biomarcadores de exposición a metales.

Por ello, si en la concentración de MTs de los cangrejos expuestos a los sedimentos del Tajo, es mayor que la observada en el sedimento control, podemos deducir que los sedimentos de la Puebla y de Aceca presentan una mayor concentración de contaminantes, pues provocan la inducción de las MTs, como mecanismo de defensa. Dentro de estos sedimentos, aquél que induce más la síntesis de la proteína en los cangrejos es el sedimento de Aceca, por lo que presentaría una mayor cantidad de contaminantes que la muestra recogida en la Puebla de Montalbán.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Ensayos de toxicidad clásicos: peso y mortalidad

La disminución en el peso de los cangrejos tras el periodo de exposición no es un buen indicador de contaminación de los diferentes sedimentos, porque como ya se vio anteriormente, las variaciones en el peso de los cangrejos no se deben a la exposición a diferentes sedimentos.

El cangrejo *P. clarkii* es un bioindicador de contaminación adecuado debido a la sensibilidad que muestran después de ser expuestos a sedimentos contaminados. Además, su respuesta a la contaminación es bastante rápida por lo que muestra efectos a cortos periodos de exposición. Así mismo, su tiempo de vida es apropiado para realizar ensayos de toxicidad.

El cangrejo muestra tolerancia al contaminante, por ello el índice de mortalidad que presenta después de la exposición a sedimentos contaminados es cero.

- Análisis de biomarcadores

De los tres biomarcadores analizados, el único cuya variación es debida, de forma significativa, a la exposición a distintos sedimentos es el parámetro concentración de MTS.

Por el contrario, las variaciones registradas en la actividad GST y AChE de los cangrejos no están causadas por el tipo de sedimento al que han estado expuestos.

Durante el experimento, los cangrejos han pasado de un agua de mantenimiento (acuarios) que presentaba unas condiciones óptimas para el desarrollo del organismo, a unos sedimentos (Tajo) con unas características fisicoquímicas diferentes. Estos cambios en el medio externo provocan un estrés en el organismo, lo que se manifiesta como una variación de la actividad enzimática del animal. El organismo del cangrejo intenta aclimatarse a estas nuevas condiciones externas variando su actividad enzimática en un intento de mantener sus funciones biológicas dentro de un rango normal.

Independientemente de las variaciones obtenidas después de analizar las actividades enzimáticas, cabe resaltar la sensibilidad en la respuesta que muestran estos biomarcadores a la alteración de las condiciones fisicoquímicas del medio externo, como la exposición de los cangrejos a sedimentos contaminados.

- Importancia de los biomarcadores

En este estudio se ha comprobado la importancia de los biomarcadores enzimáticos en la evaluación de la exposición de diferentes organismos, en nuestro caso el cangrejo *P.clarkii*, a sedimentos contaminados. Nos ofrecen datos acerca de los efectos subletales causados en los organismos por ciertas sustancias. Así, son una herramienta complementaria en la evaluación de la exposición de ciertos bioindicadores a medios contaminados.

El único efecto significativo detectado tras la realización del experimento es que la concentración de MTs varía de forma importante en el organismo tras su exposición a un sedimento contaminado. El resto de parámetros como la actividad de AChE o GST en los organismos analizados no dan una respuesta clara de qué le ocurre al organismo después de la exposición a los diferentes sedimentos.

Independiente de la afección producida sobre los biomarcadores enzimáticos debido a la exposición a estos sedimentos, parece claro, que la supervivencia del organismo no se ve comprometida, al menos a corto plazo tras la exposición a los sedimentos que actualmente se encuentran en el Tajo.

MODIFICACIONES

MODIFICACIONES CON RESPECTO AL PROYECTO INICIAL

Durante la realización del proyecto, nos encontramos con una serie de dificultades que nos hizo ir modificando en parte el proyecto que en un principio se planeó. Así las modificaciones más importantes se centran en los diferentes organismos bioindicadores a analizar.

Así, en un principio, se planteó abarcar no sólo cangrejos, sino también dafnias (pulgas de agua) y peces. Pero debido a la dificultad que nos suponía su mantenimiento en el laboratorio, tuvimos que desistir en trabajar con estos organismos. Como ejemplo, tenemos el problema de las gambusias. Cuando en los diferentes acuarios se añadían más organismos capturados, se producía un aumento de las en número de muertes de las gambusias. De esta forma era muy difícil trabajar con el número suficiente de organismos.

Surgieron dificultades a la hora de mantener las condiciones óptimas para la supervivencia de los diferentes organismos, pues algunos de ellos son muy sensibles por ello hay que controlar adecuadamente todos los factores que les afectan y que podrían falsear los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos no marcan el final de la investigación, sino el inicio de muchas otras que lleguen a aportar más datos a cerca de las complejas relaciones hombre, contaminación y medio natural. Dejando así la puerta abierta queda para futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcorn, P., Otero, M. (2006) The use of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiana (SW, Spain). *Science of the Total Environment*. 366
- Algarin, S. 1980. Problemática y perspectiva de la introducción del cangrejo. Páginas: 25-31. En: *Actas de las Jornadas de estudio del Cangrejo Rojo de la Marisma*, Sevilla. 80 ps.
- Almar M. M., Diaz-Mayans J. and Romero F.J. (1987) Glutathione content and GSH *S-transferase* activity in midgut gland of *P. clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C, 433-435.
- Amirad, J.C. (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76, 160-202.
- Barka, S., 2000. Processus de détoxification et localisation tissulaire des métaux traces (cuivre, zinc, nickel, cadmium, argent et mercure) chez un crustacé marin *Tigriopus brevicornis* (Müller). Etude du biomarqueur "protéines type métallothionéines", de la bioaccumulation des métaux et des conséquences sur les transferts trophiques. Thèse de doctorat, Université de Paris6, 19 septembre 2000, 204p.
- Correia, A.M. 2002 Niche breadth and trophic diversity: feeding behaviour of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal). *Acta Oecologica*, 23: 421-429.
- Dallinger R (1996) Metallothionein research in terrestrial invertebrates: synopsis and perspectives. *Comp Biochem Physiol C* 113:125-133.
- Dieguez-Urbeondo J. & Söderhöl, K. 1993. *Procambarus clarkii* as a vector for the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24: 761-765.

BIBLIOGRAFÍA

- Engel, D.W., Brouwer, M., 1993. Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein. *Mar. Environ. Res.* 35, 1-5.

- Gamradt, S.C. & Kats, L.B. 1996. Effect of Introduced Crayfish and Mosquitofish on California Newts. *Conservation Biology*, 10 (4): 1155-1162.

- Geiger, W., Alcorlo, P., Baltanás, A. & Montes, C. 2004. Impact of an introduced Crustacean on the trophic webs of Mediterranean wetlands. *Biological invasions* (en prensa).

- Gutiérrez-Yurrita, P.J., Sancho, G., Bravo, M.A., Baltanás, A. & Montes, C. 1998. Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Doñana National Park temporary fresh-water marsh (Spain). *Journal of Crustacean Biology*, 18(1): 120-127.

- Gutiérrez-Yurrita, P.J., Martínez, J.M., Ilheu, M., Bravo-Utrera, M.A., Brenardo, J.M. & Montes, C. 1999. The status of crayfish populations in Spain and Portugal. Páginas: 161-192. En: GHERARDI, F., HOLDICH, D. (eds.). *Crayfish in Europe as Alien Species: How to Make the Best of a Bad Situation? Crustacean Issues*, 11.

- Hadsburgo-Lorena, A.S. 1979. Present situation of exotic species of crayfish introduced into Spanish continental waters. *Freshwater Crayfish*, 4: 175-184.

- Hobbs III, H.H., Jass, J.P. & Huner, J.V. 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana*, 5: 299-316.

- Hopkin SP (1989) *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier, London.

- Huggett R.J., Kirmle R.A., Mehrle O.M., Bergman H.L. (1992) *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton

- Laurent, P.J. 1990. Point sur les risques engendrés par l'introduction intempestive de l'écrevisse rouge des marais de Louisiane (*Procambarus clarkii*). *Courrier de la cellule Environnement*, 11: 7-9.

- Lukkari, T, Taavitsainen, M, Soimasuo, M, Oikari, A, Haimi, J (2004) Biomarker response of the earthworm *Aporrectodea Tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environ Pollut* 129:377-386.
- Mayer FL, Versteeg DJ, McKee MJ, Folmar LC, Graney RL, McCune DC, Rattner BA (1992) Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett RJ, Kimerle RA, Merle PM, Bergman HL (eds) *Biomarkers Biochemical, Physiological, and histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, pp 5-86.
- McCarthy JF, Shugart LR (1990) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis, Boca Raton.
- O'Hara J. (1973) The influence of temperature and salinity on the toxicity of cadmium to the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Fish. Bull* 71, 149-153.
- Ocete, M. e. & Lopez, s. 1983. Problemática de la introducción de *Procambarus Clarkii* (Girard) (Crustacea : Decapoda) en las marismas de I Guadalquivir. Páginas: 515-523. En: *Actas del I Congreso Ibérico de Entomología*, León. 90 ps.
- Peakall DB, Walker CH (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. *Vertebrates. Ecotoxicology* 3: 173-179.
- Peakall, D., 1994. Biomarkers-the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 55-60.
- Peakall DB, Shugart LR (1993) *Biomarkers: Research and Application in Assessment of Environmental Health*. Springer- Verlag, Berlin.
- Peakall DB, Walker CH (1994) The role of biomarkers in environmental assessment. *Vertebrates. Ecotoxicology* 3: 173-179.
- Ray S. (1984) Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experimentia* 40, 14-22.

- Rodríguez, C.F., Bécares, E., Fernández-Aláez, M. & . Fernández-Aláez, c. 2004. Loss of biodiversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological invasions* (en prensa).

- Roesjadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22,81-114.

- Roesjadi G (1993) Response of invertebrate metallothioneins and MT genes to metals and implications of environmental toxicology. IN: Suzuki KT, Imunra N, Kimura M (eds) Metallothionein, Vol. III. Biological Roles and Medicals implications. Birkhauser, Basel, pp 141-158

- Sánchez Hernandez J.C.,2002. Informe técnico" Evaluación ecotoxicológica de la calidad de l agua del Río Tajo a través del uso de biomarcadores bioquímicos y membranas semipermeables". Dirección General de Aguas, Consejería de Obras Públicas, JCCM.

- Sánchez Hernandez J.C., Borghini F., Grimalt J.O.,2004. Field accumulation of hydrophobic organic contaminant by semipermeable membrana devices: environmental monitoring implications. *J. Environ. Monit.*, 6:1-9.

- Saint-Denis M, Labrot F, Narbone JF, Ribera D (1996) Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:602-614.

- Stegeman JJ, Brouwer M, Di giulio RT, Forlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA (1992) Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemicals exposure and effect. IN: Hugget RJ, Klmerle RA, Merle PM, Bergman HL (eds) Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis, Boca Raton, pp 235-336.

- Stenerse J, Kobro S, Bjerke M, Arend U (1987) Glutathione S- Transferases in aquatic and terrestrial animals from nine phyla. *Comp Biochem Physiol C* 86: 73-82.

- van Gestel, CAM, van Brummelen, TC (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5:217-225.

- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB (2001) Principles of ecotoxicology, 2nd edition, Taylor & Francis, London, UK.