

ÍNDICE ARN/ADN EN POBLACIONES DE LA ALMEJA *Tivela mactroides* (BIVALVIA: VENERIDAE) PROVENIENTES DE LOCALIDADES CON DIFERENTES NIVELES DE CONTAMINACIÓN

RNA/DNA Index in Populations of the Clam *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae) from Localities With Different Pollution Levels

Vanessa Acosta¹ y César Lodeiros²

¹Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, ²Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Cumaná 6101. Tel: (0293) 4302118. E mail: vacosta@sucre.udo.edu.ve

RESUMEN

Se evaluaron tres estados de desarrollo de la almeja *Tivela mactroides*: juveniles (10-20 mm), juveniles con capacidad reproductiva (20-30 mm) y adultos (30-45 mm), con la finalidad de determinar el estado fisiológico de los organismos en relación al grado de contaminación ambiental a la que están expuestas, utilizando el índice de ARN/ADN. Las poblaciones evaluadas fueron obtenidas de Playa Güiria (estado Sucre), ubicada en la zona nororiental de Venezuela, la cual no mostró niveles de contaminación, y las de Río Chico y Boca de Paparo (estado Miranda), en la costa central de Venezuela, caracterizadas por presentar altos niveles de contaminación debido a la influencia del Río Tuy, por descargas urbanas e industriales. Las moléculas de ARN y ADN fueron determinadas en el músculo aductor del bivalvo mediante fluorimetría. Se detectaron diferencias significativas entre las tres poblaciones y las tallas de *Tivela mactroides*, siendo la población de Playa Güiria la que presentó el mayor índice de ARN/ADN, seguida de Río Chico y Boca de Paparo. Este patrón estuvo relacionado con el grado de contaminación de las localidades. El ARN/ADN fue inversamente proporcional a la talla del bivalvo. Los resultados muestran que la relación ARN/ADN puede ser utilizada como un índice para estimar la condición, relativa al estrés ambiental por contaminación, en *Tivela mactroides*.

Palabras clave: Molusco bivalvo, bioindicador, índice fisiológico, contaminación.

ABSTRACT

Three developmental stages in the *Tivela mactroides* clam: juvenile (10-20 mm), juvenile with reproductive capacity (20-30

mm) and adults (30-45 mm) were evaluated to determine the physiological condition of clams related to environmental pollution levels using the RNA/DNA index. The populations evaluated were obtained from Playa Güiria (Sucre state, northeastern coast of Venezuela), which has no sign of pollution, and from Río Chico and Boca de Paparo (Miranda state, central coast of Venezuela), which showed high pollution levels due to urban and industrial waste disposal through the Tuy river. The RNA and DNA concentrations were determined in the adductor muscle by fluorimetric techniques. The three populations showed significant differences in the RNA/DNA index. The clams of Playa Güiria showed the highest RNA/DNA index, followed by Río Chico and Boca de Paparo specimens. This pattern was related to pollution levels in each locality. The RNA/DNA index was inversely proportional to bivalve sizes. The results showed that the RNA/DNA index can be used as a physiological index to estimate conditions of environmental pollution stress on *Tivela mactroides*.

Key word: Bivalve mollusks, bio-indicator, physiological index, pollution.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones ocasionadas en el medio marino por la presencia de contaminantes, como metales pesados e hidrocarburos, pueden ser estimadas en los organismos a través de su condición fisiológica [25]. Uno de los grupos de organismos más utilizados para este tipo de estudio han sido los moluscos bivalvos, debido principalmente a su carácter sésil y filtrador; además de su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de contaminación, que los condicionan como especies modelos para ser empleados en programas de monitoreo ambiental.

Los cambios bioquímicos que acontecen en un organismo proveen una información importante para estimar los efectos de la contaminación en una población, estas alteraciones fisiológicas pueden ser evaluadas mediante moléculas involucradas en el crecimiento como los ácidos nucleicos (ARN y ADN). En este sentido, se considera que el índice ARN/ADN estima adecuadamente el crecimiento instantáneo, particularmente en moluscos bivalvos [8, 17, 26], utilizándose para evaluar respuestas ante estrés ambiental, ya sea por limitación de alimento [5, 24], interacción de los factores ambientales [13] o contaminación antropogénica [3, 10].

En Venezuela, la almeja (guacuco) *Tivela mactroides*, constituye un recurso importante desde el punto de vista económico y ecológico [4, 9, 19, 20], así mismo se tiene conocimiento sobre su reproducción [18] y fisiología [21]. Este pelecípodo perteneciente a la Familia Veneridae, presenta amplia distribución en la zona tropical, particularmente en el Caribe [1], encontrándose en ambientes de litorales de alta energía. La especie soporta intervalos amplios de temperatura y salinidad, se reproduce durante todo el año, es fácil de coleccionar y manipular en el laboratorio, por lo cual presenta condiciones adecuadas para ser empleada en estudios ambientales [2]. Debido a estas características y los escasos estudios realizados en el área del Mar Caribe sobre los impactos y efectos que producen los contaminantes sobre poblaciones de organismos en ambientes de alta energía, se consideró evaluar el estado fisiológico mediante el índice ARN/ADN en tres poblaciones de *Tivela mactroides*, provenientes de ambientes con diferentes grados de contaminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La almeja *T. mactroides* fue obtenida en tres localidades: Playa Güiria, ubicada en la costa norte del estado Sucre (10° 45' 55" N y 63° 20' 55" E), en donde presenta importancia económica relevante, soportando una pesquería artesanal significativa [18, 20], Río Chico y Boca de Paparo, ambas playas de la costa central, pertenecientes al estado Miranda (10° 23' N; 65° 58' W y 10° 23' N 65° 56' W, respectivamente). Estas localidades están separadas por unos 5 Km, e influenciadas por el Río Tuy y sostienen una pesquería no organizada y de menor relevancia que la efectuada en Playa Güiria. Esta área de la costa central de Venezuela, se caracteriza por presentar aguas turbulentas, con altas concentraciones de partículas sólidas suspendidas [15]; siendo Boca de Paparo la más cercana a la desembocadura del Río Tuy.

En un estudio preliminar, Acosta [2] encontró niveles altos de metales pesados en el sedimento (Mn, Fe, Cd, Cu, Ni y Pb), tanto en Boca de Paparo como en Río Chico, sobrepasando los valores establecidos para ambientes naturales sin perturbación [22, 23]; en estas zonas, también se detectaron índices bacteriológicos altos en el agua, representados por coliformes fecales y totales (> 900NMP/100ml), los cuales fueron superiores a los máximos (70NMP/100ml) permitidos en zonas

costeras [14]. Contrariamente, Playa Güiria mostró menores niveles de metales pesados, y los índices de coliformes fecales y totales antes mencionados se encontraron dentro de los límites naturales para ambientes no contaminados [22, 23]. En este estudio preliminar, otros factores ambientales fueron determinados: temperatura, oxígeno disuelto, pH, nitratos y fosfatos, los cuales corroboraron el grado de contaminación ambiental de las localidades señaladas. Un resumen de estos resultados se muestran en la TABLA I.

Para evaluar el estado fisiológico de las poblaciones se determinó el índice de ARN/ADN en los organismos, seleccionando tres tallas representativas del desarrollo de la especie, tomando en consideración la talla mínima de reproducción estimada en estudios realizados en las localidades de donde fueron obtenidos los bivalvos [6, 18, 20]. De esta manera se escogieron: juveniles (10-20 mm), juveniles con capacidad reproductiva (20-30 mm, medianos) y adultos (30-40 mm).

El índice ARN/ADN fue determinado siguiendo la metodología de Canino y Calderone [7]. De esta manera, se seleccionaron 20 organismos por cada grupo de talla, a los cuales se les extrajo el músculo aductor (10 y 20 mg), para ser macerado en viales eppendorf de 1,5 ml de capacidad, hasta formar un homogeneizado. A cada vial se le añadió 100 µl de solución de sarcosina (1%), y se procedió a mezclar en un agitador eléctrico durante 30 min, se dejó reposar, volviéndose a mezclar otros 30 min. A cada vial se le colocó 900 µl de buffer (TRIS-EDTA), se mezcló y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. De cada muestra y por duplicado, 10 µl del sobrenadante se colocaron en tubos de borosilicato (12x75 mm), añadiéndoles 400 µl del buffer. Para la determinación del ARN se le añadió 500 µl de la solución de Bromuro de Etidium y para el ADN, 500 µl del reactivo de Hoechst. Las lecturas, tanto para el ARN como para el ADN, se realizaron en un flúorímetro a longitudes de onda de 490 nm.

Para estimar las concentraciones de los ácidos nucleicos, por extrapolación se establecieron curvas patrones tanto para el ARN y ADN. Para ello 200 µl de la solución estándar de ADN y de ARN, por separado, se colocaron en tubos de borosilicato, los cuales contenían previamente 300 µl de solución buffer (TRIS-EDTA), a partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas para cada uno de los ácidos nucleicos.

Para evaluar las diferencias del índice de condición entre las poblaciones, se aplicó un ANOVA de dos vías, considerando como factores la zona de muestreo y la talla de los individuos. En los casos donde existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) se aplicó la prueba de Scheffé ($P < 0,05$). Previo al análisis, la data se transformó en arcoseno, en función de normalizarla, siguiendo las recomendaciones en Zar [27].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los organismos de Playa Güiria presentaron los mayores niveles de ARN/ADN, en contraste con los de Río Chico y

TABLA I
NIVELES DE METALES PESADOS EN EL SEDIMENTO, ÍNDICES BACTERIOLÓGICOS Y PARÁMETROS
AMBIENTALES EN EL AGUA DE PLAYA GUIRIA, RÍO CHICO Y BOCA DE PAPARO

	Boca de Paparo	Río Chico	Playa Güiria
<i>Metales pesados ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)</i>			
Mn	78,20 $\pm$ 25,44	75,28 $\pm$ 17,86	18,95 $\pm$ 1,18
Fe	1317,50 $\pm$ 78,85	396,00 $\pm$ 8,13	200,00 $\pm$ 9,35
Zn	158,10 $\pm$ 34,57	200,00 $\pm$ 40,63	161,25 $\pm$ 27,88
Cu	92,30 $\pm$ 13,12	19,98 $\pm$ 0,24	0,080 $\pm$ 0,49
Cd	4,48 $\pm$ 4,08	0,40 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,001
Cr	47,50 $\pm$ 2,42	5,23 $\pm$ 0,04	ND
Pb	7,98 $\pm$ 2,41	0,38 $\pm$ 0,05	ND
Ni	46,09 $\pm$ 2,58	10,97 $\pm$ 1,03	ND
<i>Índices bacteriológicos (NMP/100ml)</i>			
Coliformes Totales	36	930	1120
Coliformes Fecales	73	930	1163
<i>Parámetros ambientales</i>			
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	24,08 $\pm$ 0,051	28,11 $\pm$ 0,031	29,33 $\pm$ 0,05
Clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,63 $\pm$ 0,137	2,26 $\pm$ 0,212	3,66 $\pm$ 0,191
Salinidad (p.s.u.)	36,51 $\pm$ 0,051	35,23 $\pm$ 0,047	33,67 $\pm$ 0,039
Oxígeno disuelto ($\mu\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	7,76 $\pm$ 0,052	5,69 $\pm$ 0,031	4,98 $\pm$ 0,043
Potencial Hidrógeno	8,02 $\pm$ 0,005	7,96 $\pm$ 0,004	7,04 $\pm$ 0,003
Nitrógeno total ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	18,99 $\pm$ 1,089	59,95 $\pm$ 1,175	93,75 $\pm$ 1,095
Fósforo total ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	8,87 $\pm$ 1,895	18,75 $\pm$ 2,578	51,69 $\pm$ 3,878

Boca de Paparo, estableciéndose diferencias altamente significativas (ANOVA, $P < 0,0001$; FIG. 1). Estas respuestas estuvieron relacionadas con el grado de contaminación ambiental de las localidades antes señaladas (TABLA I), mostrando una disminución de la condición fisiológica de población de *T. mactroides* con el nivel de perturbación ambiental.

Además del efecto de la contaminación por los metales pesados e índices bacteriológicos, los bajos niveles de ARN/ADN obtenidos en los organismos Boca de Paparo y Río Chico, pudieron estar afectados por las condiciones ambientales extremas, como altas temperaturas, bajas salinidades, bajos niveles de pH y de oxígeno disuelto (TABLA I), factores que juegan un papel importante en el comportamiento y establecimiento de una población, ya que influyen y regulan el metabolismo de un organismo [11].

El índice ARN/ADN fue inversamente proporcional a la talla (ANOVA, $P < 0,05$; FIG. 1), obteniéndose siempre los valores mayores en la población de Playa Güiria (juveniles: $5,51 \pm 0,244$; medianos: $4,47 \pm 0,340$ y adultos: $0,10 \pm 0,083$), segui-

do por la población de Río Chico (juveniles: $3,58 \pm 0,188$; medianos: $3,06 \pm 0,333$ y adultos: $0,10 \pm 0,083$) y la de Boca de Paparo (juveniles: $2,33 \pm 0,305$; medianos: $1,46 \pm 0,095$ y adultos: $0,77 \pm 0,113$). La variabilidad del nivel de ARN/ADN en los diferentes grupos de tallas, pudieron estar relacionados con la producción de energía que los organismos destinan para su desarrollo. En este sentido, los juveniles canalizan la mayor parte de la energía producida para el proceso de crecimiento somático, dando origen a mayor síntesis de proteínas (aumento del ARN); en contraste con los juveniles con capacidad reproductiva, que canalizan la energía tanto para el crecimiento reproductivo (gametogénesis) como para el somático, y finalmente los adultos, los cuales representan una condición de crecimiento somático nulo, dirigen la energía producida, principalmente para la reproducción. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nusetti y Morales [16] quienes determinaron un incremento progresivo del ADN/ARN según la talla en el mejillón marrón *Perna perna*. Kenchington [12] también reportó un decrecimiento del ADN/ARN con el incremento de la altura de la concha en *Placopecten magellanicus*. Por

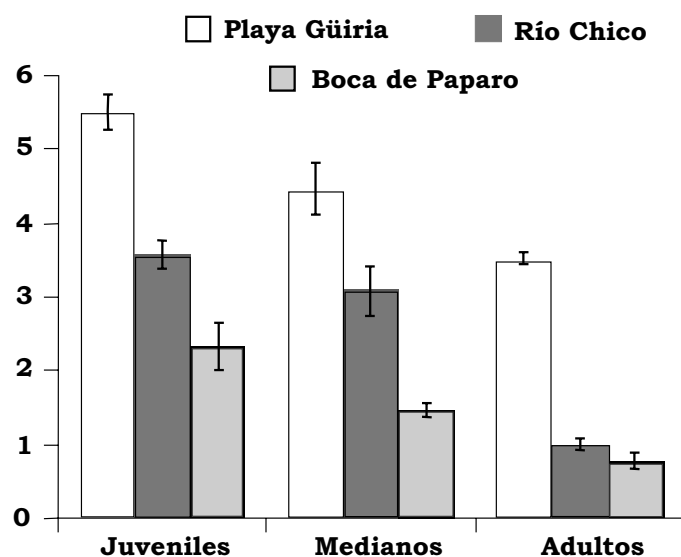


FIGURA 1. RELACIÓN DE ARN/ADN EN EL MÚSCULO DE JUVENILES, JUVENILES CON CAPACIDAD REPRODUCTIVA (MEDIANOS) Y ADULTOS DE *TIVELA MACTROIDES* DE LAS POBLACIONES DE PLAYA GÜIRIA (EDO. SUCRE) EN LA COSTA NORORIENTAL DE VENEZUELA Y DE RIO CHICO Y BOCA DE PAPARO (EDO. MIRANDA), EN LA COSTA CENTRAL DE VENEZUELA.

otra parte, Lodeiros y col. [13] evaluaron el efecto ambiental sobre diferentes tallas de *Euvola (Pecten) ziczac*, demostrando una correlatividad del índice de ARN/ADN con el crecimiento y la condición fisiológica. La variabilidad de los niveles del índice ARN/ADN encontrada en el presente trabajo y en los estudios antes mencionados, debido a la diferente canalización de la energía producida, relativa a la reproducción, sugiere la utilización de organismos juveniles sin capacidad reproductiva, como condición del desarrollo del bivalvo más adecuada para analizar el índice ARN/ADN. En tal sentido, se sugiere la utilización de tallas menores de 20 mm para evaluación de la condición fisiológica de *Tivela mactroides* a través de la relación ARN/ADN.

En el presente estudio, los niveles de ARN/ADN obtenidos en el músculo aductor de las poblaciones de *Tivela mactroides* estuvieron relacionados con las condiciones de contaminación de su origen, lo cual sugiere que la relación ARN/ADN puede ser utilizada, como un índice adecuado para determinar estrés fisiológico dado por contaminación ambiental.

AGRADECIMIENTO

La presente investigación fue parcialmente financiada por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (CI-UDO) y el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Venezuela (FONACIT).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABBOTT, R. **American Seashells**. 2da. Edition. D. Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York. 663 pp. 1974.
- [2] ACOSTA, V. **Estado fisiológico de poblaciones del guacuco *Tivela mactroides* Born, 1778 (Bivalvia: Veneridae) en ambientes con diferentes grados de contaminación**. Universidad de Oriente. Instituto Oceanográfico de Venezuela. (Tesis). 70 pp. 2001.
- [3] ACOSTA, V.; LODEIROS, C. Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles del mejillón verde *Perna viridis* mediante la concentración de ADN y la relación ARN/ADN en el músculo abductor. **Revista Científica, FCV-LUZ**. IX(6): 485-490. 2001.
- [4] ALMEIDA, P. Distribución de los moluscos de la Costa Centro Occidental (Patanemo-Punta Tucacas) de Venezuela. Composición de hábitat litorales. **Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle**. 97: 23-51. 1974.
- [5] BRACHO, M.; SEGNIINI, M.; VIÑOLES, I.; CHUNG, K. Efecto de la alimentación sobre la condición fisiológica del mejillón verde *Perna viridis* (L. 1758) (Mollusca: Mytilidae), medido por la relación ARN/ADN. **Reunión 29 de la Asociación Laboratorios Marinos del Caribe**. Cumaná, Venezuela 18-24 julio. Venezuela. 83 pp. 1999.
- [6] BRITO, P. **Algunos aspectos de la dinámica poblacional del guacuco *Tivela mactroides* (Born, 1778) en dos localidades de Barlovento**. Universidad Simón Bolívar. (Trabajo Especial de Grado). 60 pp. 1984.
- [7] CANINO, M.; CALDERONE, E. Modifications and comparison of two fluometric techniques for determining nucleic and contents of fish larvae. **Fish. Bull.** 93:15-165. 1995.
- [8] FRANTZIS, A.; GRÈMARE, A.; VETION, G. Taux de croissance et rapports ARN-ADN chez le bivalve dépositore *Abra ovata* nourri á partir de différents détritres. **Oceanologica Acta**. 16(3): 303-313. 1993.
- [9] GODOY, A.; SEVEREYN, H.; DELGADO, J. Estudio comparativo de la densidad y biomasa de la almeja *Tivela mactroides* en tres playas arenosas de alta energía del Estado Zulia, Venezuela. **Act. Cient. Venez.** 48: 58. 1997.
- [10] GÓMEZ, J.; SEGNIINI, M.; FUENTES, M. Efecto del cobre sobre la condición fisiológica de *Lima scabra*, medida por la razón ARN/ADN. **Scientia (Panamá)**. 13 (1): 27-34. 1998.
- [11] GRIFFITHS, C.; GRIFFITHS, R. Bivalvia. In: Pandian, J.H., Vernberg F.J. (Eds). **Animal Energetics**, Vol. 2. Academic Press, 1-88 pp. 1987
- [12] KENCHINGTON, E. Spatial and temporal variation in abductor muscle RNA/DNA ratio in sea scallops (*Placopect-*

- ten magellanicus*) in the Bay of Fundy, Canada. **J. Shellfish Res.** 13: 19-24. 1994.
- [13] LODEIROS, C.; FERNÁNDEZ, R.; BONMATI, A.; HIMMELMAN, J.; CHUNG, K. Relation of RNA/DNA ratios to grow for the scallop *Euvola (Pecten) ziczac* (L.) in suspended culture. **Mar. Biol.** 126: 245-251. 1996.
- [14] MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES (MARNR). Estudio de la influencia del Río Tuy en el Litoral Barloventeño. **Serie de Informes Técnicos. DGSIIA/IT/** 159 pp. 1985.
- [15] MOGOLLÓN, J.; RAMÍREZ, A.; BIFANO, C. Determinación de los niveles de contaminación en sedimentos del Estado Anzoátegui. **Memorias del VII Congreso Geológico Venezolano**. Barquisimeto, estado Lara. Venezuela. 1121-1230 pp. 1989.
- [16] NUSETTI, O.; MORALES, D. Crecimiento de algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L. 1758): Composición de ARN, relación ARN/ADN y reservas energéticas. **Act. Cient. Venez.** 39: 289-293. 1988.
- [17] PEASE, A. Studies of relationship of RNA/DNA ratios and the protein synthesis to growth in the oyster *Crassostrea virginica*. **Fisheries and Marine Service. Technical Report N° 622** 78 pp. 1976.
- [18] PRIETO, A. **Contribución a la ecología de *Tivela mactroides* Born, 1778 (Mollusca: Bivalvia). Aspectos reproductivos y distribución de tallas**. Universidad de Oriente. (Trabajo Especial de Grado). 50 pp. 1977.
- [19] PRIETO, A. **Ecología de *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Mollusca, Bivalvia). Crecimiento, mortalidad numérica, eliminación y rendimiento en la localidad de Playa Güiría (Estado-Sucre, Venezuela)**. Universidad de Oriente. (Tesis). 209 pp. 1987.
- [20] RAMÍREZ, T. **Dinámica poblacional y explotación del guacuco *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia: Veneridae) en la Bahía de Güiría, Estado Sucre**. Universidad de Oriente. (Tesis de Maestría). 140 pp. 1993.
- [21] RUIZ, C. **Procesos fisiológicos asociados a fluctuaciones en el hábitat de *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae)**. Universidad Simón Bolívar. (Trabajo Especial de Grado). 163 pp. 1983.
- [22] SADIQ, M. **Toxic metal chemistry in marine environments**. Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 390 pp. 1992.
- [23] SENIOR, W.; CASTAÑEDA, J.; MARTÍNEZ, G. Diagnóstico ambiental de la zona costera del Nororiente de Venezuela. **Informe Final. Proyecto DAO-PALMAVEN**. 525 pp. 1999.
- [24] VIÑOLES, I.; SEGNINI, M.; BRACHO, M.; CHUNG, K. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo del mejillón verde, *Perna viridis* (L., 1758) (Mollusca: Mytilidae), medido por la relación ARN/ADN. **Reunión 29 de la Asociación Laboratorios Marinos del Caribe**. Cumaná, 18-24 julio. Venezuela. 82 pp. 1999.
- [25] WIDDOWS, J.; BURNS, K.; MENON, N.; PAGE, D.; SORIA, R. Measurement of physiological energetic (scope for growth) and chemical contaminants in mussels (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 138: 99-117. 1990.
- [26] WRIGHT, D.; HETZEL, E. Use of RNA/DNA ratio as indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 25: 199-206. 1985.
- [27] ZAR, J. **Biostatistical Analysis**. 2nd edition. Pentice-Hall, Inc., New Jersey. 120 pp. 1984.