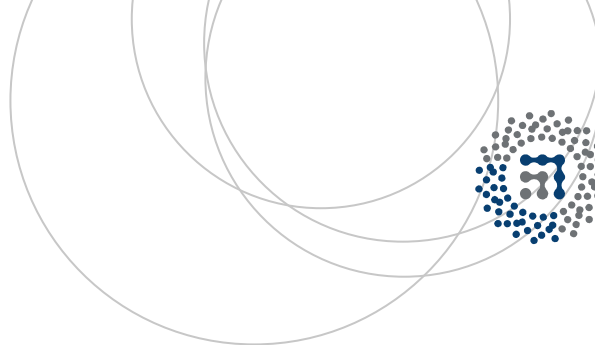




**ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL GLIFOSATO EN
MEJILLÓN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* DENTRO
DE LA ACTUACIÓN DE ELIMINACIÓN DE
BACCHARIS HALIMIFOLIA EN EL MARCO DEL
PROYECTO “LIFE+ Estuarios del País Vasco”**





Manu Soto; Urtzi Izagirre
Zoología & Biología celular
Zoologia eta Biologia Zelularra

ESTUDIOS DE TOXICIDAD DEL GLIFOSATO EN MEJILLÓN *MYTILUS GALLOPROCINCIALIS* DENTRO DE LA ACTUACIÓN DE ELIMINACIÓN DE *BACCHARIS HALIMIFOLIA* EN EL MARCO DEL PROYECTO “LIFE+ Estuarios del País Vasco”

La toxicidad del glifosato está bien estudiada en diferentes organismos terrestres como aves, mamíferos o invertebrados, demostrando una baja toxicidad que, en la mayoría de los casos, se debe a los surfactantes que se emplean en los productos formulados y en menor medida al glifosato de grado técnico. Aunque la toxicidad en organismos acuáticos ha sido menos estudiada, los tests de toxicidad en *Daphnia magna* determinan un LC₅₀ de 780 mg/L para el glifosato de grado técnico que se reduce drásticamente si se utiliza glifosato con formulación que contenga surfactantes. En peces incluso se ha llegado a observar un LC₅₀ de 3mg/L en productos de glifosato formulados (USDA 2003).

En este estudio, se pretenden determinar los posibles efectos del glifosato en la fauna autóctona del estuario de Urdaibai mediante tests de toxicidad en la especie *Mytilus galloprovincialis*. Esta especie es sobradamente conocida por su uso como bioindicador y especie centinela donde se analizan habitualmente diferentes biomarcadores relacionados con estrés a contaminantes metálicos, orgánicos y estrés general (UNEP/RAMOG 1999; ICES 2006).

Este estudio se enmarca en el Proyecto LIFE “Restauración de los hábitats de interés comunitario en estuarios del País Vasco” (código LIFE08NAT/E/0055), por lo que los resultados del mismo podrán servir de referencia para el desarrollo de los trabajos de erradicación de *Baccharis halimifolia*.

Para analizar los posibles efectos tóxicos del glifosato y los aditivos utilizados en estos procesos de erradicación se han realizado dos experimentos de toxicidad. El primero de los experimentos comprende un ensayo de toxicidad aguda para la determinación de la concentración letal del glifosato para el 50% de la población expuesta (LC₅₀). Las concentraciones para la exposición han sido elegidas tras analizar los ensayos de toxicidad en invertebrados acuáticos (USDA, 2003). El primer objetivo es determinar la concentración letal del compuesto de aplicación para el mejillón y establecer la concentración a la cual no se observe ningún efecto tóxico. Con los datos obtenidos de esta primera fase se determinó la concentración subletal, la cual es el umbral superior de concentración para realizar el experimento de la segunda fase. En este segundo experimento se estudiaron los efectos subletales a corto plazo que pudieran ser ocasionados por el glifosato y la mezcla de aplicación (mezcla glifosato-diesel) en la glándula digestiva, branquia y gónada del mejillón.

Material y Métodos

Se recolectaron mejillones *Mytilus galloprovincialis* en aguas de Mundaka cerca de la desembocadura de la ria del estuario de Urdaibai que se contempla como ámbito de actuación con el glifosato. Los especímenes fueron recogidos el 30 de Junio de 2011 a las 9:32 horas coincidiendo con una marea de 1.15 m. Los mejillones seleccionados tenían una longitud máxima de concha comprendida entre 3.5-4.5 cm. Se transportaron a las instalaciones acuarológicas UBEZ, del Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la UPV/EHU para su aclimatación previa a los experimentos. El agua utilizada (Tabla 1) procede de un lugar no contaminado de Getaria (Gipuzkoa). Tras siete días de aclimatación a las condiciones experimentales del acuario se dio comienzo al primero de los experimentos: un ensayo de toxicidad aguda para obtener los datos necesarios para el experimento de toxicidad subletal.

Tabla 1.- Parámetros físico-químicos del agua de mar utilizada en los experimento de toxicidad

pH	7.8-8.0
T °C	18 ±0.5
Conductividad	48 mS
NH₄⁺ mg/L	< 0.5
Salinidad	33-35‰

Experimento 1: ensayo de toxicidad aguda

Los mejillones se repartieron en grupos de 20 individuos en tanques de polipropileno de alta densidad de 20 L de agua en cada uno. Los mejillones se mantuvieron sin aporte alimenticio en las condiciones físico-químicas mencionadas anteriormente (Tabla 1) y con un régimen de aireación constante. Se expusieron a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 ppm) de la mezcla de aplicación (glifosato %50 + diesel %50) utilizada para la erradicación de la *Baccharis halimifolia*. De forma simultánea se mantuvo un grupo control en las mismas condiciones experimentales pero sin aporte de la mezcla de aplicación. Se hizo una única dosificación de las concentraciones seleccionadas al inicio del experimento y se estudió la supervivencia de los mejillones, analizándolos uno a uno, varias veces al día durante 9 días. Los especímenes fallecidos se retiraron inmediatamente para evitar que se produjera la muerte en cadena del resto de mejillones del acuario experimental y se estimara erróneamente la toxicidad de la mezcla de aplicación.

Experimento 2: ensayo de toxicidad subletal

Tras observar el cuadro de mortandad del primer experimento se determinaron tres concentraciones para este segundo experimento donde se analizaron los posibles efectos subletales del glifosato y del diesel. Dado que el glifosato es soluble en agua se decidió añadir una nueva serie, en paralelo a la exposición a la mezcla de aplicación, sólo con glifosato. Este experimento, no previsto en la memoria inicial, permitirá la comparación de los efectos de ambos métodos (glifosato vs. glifosato+diesel). Las concentraciones seleccionadas para este segundo experimento fueron las siguientes:

- 1.- Mezcla de glifosato y diesel (GD): 1 ppm (L), 10 ppm (M), 100 (H) ppm
- 2.- Glifosato (G): 0.5 ppm (L), 5 ppm (M), 50 ppm (H)

Los mejillones, tras ser aclimatados como se ha explicado anteriormente se dispusieron en grupos de 30 individuos en tanques de polipropileno de alta densidad de 15 L (Fig. 1). La dosificación del glifosato y de la mezcla se realizó una vez cada dos días después de la renovación total del agua de los tanques. De forma simultánea se mantuvo un grupo control en las mismas condiciones experimentales pero sin aporte ni de glifosato ni de la mezcla de aplicación. Todos los mejillones se alimentaron, con una dosis de mantenimiento de un compuesto comercial para invertebrados marinos. Se recogieron muestras para su posterior análisis histológico a tiempo 0 (anterior a la exposición), y a los 3 y 21 días del inicio de la exposición, siempre a la misma hora y antes de administrarles comida. En todos los tiempos se disponen también de un grupo control (C).

Los mejillones se diseccionaron inmediatamente tras su retirada de los acuarios y se procesaron como sigue:

1.- Para determinar la estabilidad de la membrana lisosómica, los cambios en la estructura de los lisosomas digestivos y para determinar la acumulación intracelular de lípidos neutros se diseccionaron las glándulas digestivas de cinco especímenes de cada grupo experimental. A continuación se congelaron en crioviales mediante nitrógeno líquido, y se almacenaron en congeladores de -80°C hasta su tinción.

2.- Para la determinación de las alteraciones morfológicas de los túbulos digestivos, la alteración en la composición relativa de tipos celulares (células digestivas vs. células basófilas), y para establecer el desarrollo gametogénico, se diseccionaron la glándula digestiva, branquias y gónada de diez especímenes por grupo experimental. A continuación se fijaron en formaldehído al 4 %, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente hasta su posterior inclusión en parafina. Los bloques histológicos se almacenaron hasta su corte y tinción.



Fig 1. Experimento 2. Exposición subletal durante 21 días a glifosato y mezcla de aplicación (glifosato+diesel).

Estabilidad de la membrana lisosómica (LMS)

El test LMS se realizó de acuerdo con el protocolo estandarizado de la UNEP/RAMOGÉ (1999), con algunas modificaciones. Los cortes seriados de 10 μm de grosor de cada grupo de 5 glándulas digestivas se obtuvieron en un criostato Leica CM 3000 a una temperatura de cámara de $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la temperatura de muestra entre -14 y $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se analizaron mediante un microscopio de luz Leica Laborlux a una magnificación de 40x. Se seleccionaron cuatro zonas de cada sección histológica y se determinó el tiempo de labilización (*labilization period*, LP) como el minuto en que se daba la reacción máxima en cada zona. El valor de LP de cada espécimen corresponde a la media de estas cuatro zonas (Moore 1976; UNEP/RAMOGÉ 1999).

Cambios en la estructura lisosómica (LSC)

Se obtuvieron cortes de 8 μm de grosor de 5 glándulas digestivas por grupo experimental. Estas secciones se tiñeron para la demostración histoquímica de la actividad β -glucuronidasa según Cajaraville et al. (1991). Para medir la estructura de los lisosomas se utilizó una aproximación estereológica aplicando el programa de análisis

de imagen BMS (Biological Measurement System) acoplado a un microscopio de luz Leica Laborlux. La magnificación utilizada para las medidas fue de 100x y se realizaron 5 mediciones por sección (una sección por espécimen). A partir de las áreas medidas se obtienen los siguientes parámetros estereológicos de acuerdo a las fórmulas desarrolladas por Lowe et al. (1981): densidad volumétrica ($VvL = VL/VC$), densidad superficial ($SvL = SL/VC$), relación superficie/volumen ($S/V = SL/VL$) y densidad numérica ($NvL = NL/VC$), donde V = volumen, S = superficie, N = número, L = lisosoma y C = citoplasma de la célula digestiva.

Acumulación intracelular de lípidos neutros

Se obtuvieron cortes de 8 μm de grosor de 5 glándulas digestivas por grupo experimental. Estas secciones se tiñeron utilizando el método de Lillie & Ashburn's Oil Red O (ORO) (Culling 1974). Para medir la acumulación de lípidos neutros intracelulares se utilizó una aproximación del programa de análisis de imagen BMS (Biological Measurement System) acoplado a un microscopio de luz Leica Laborlux. La magnificación utilizada para las medidas fue de 40x y se realizaron 5 mediciones por sección (una sección por animal) para calcular la densidad volumétrica de lípidos neutros intracelulares ($VvNL = VNL/VC$), donde V = volumen, NL = lípidos neutros, C = citoplasma de la célula digestiva.

Análisis planimétrico del epitelio digestivo, composición celular del epitelio digestivo y observación histopatológica

Las secciones de 5 μm se realizaron en un microtomo de parafina Leitz 1512 (Leica Microsistemas) y se tiñeron con hematoxilina/eosina (Pearse 1976). Se aplicó un método estereológico para cuantificar la densidad volumétrica de células basófilas en el epitelio de los alvéolos digestivos (Cajaraville et al. 1990) y las alteraciones planimétricas. Para ello se utilizó una cámara clara acoplada a un microscopio óptico con una magnificación de 40 x. De forma preliminar, se estableció que el número mínimo de campos que se necesitaban para obtener valores significativos y representativos era de tres por animal, y de un mínimo de 6 individuos por grupo experimental. Se cuantificó de forma simultánea la proporción relativa de células digestivas y basófilas en el epitelio digestivo ($VvBAS$), la altura del epitelio digestivo y el radio de la luz de los alveolos (Mean Epithelial Thickness -MET-, Mean Luminal Ratio -MLR-) y la relación entre alvéolos digestivos y tejido conectivo (Connective to diverticula -CTD- ratio), con la ayuda de una grátula Weibel (Multipurpose Test System M-168, Weibel 1979).

Las alteraciones histopatológicas más comunes, son el resultado de cambios producidos a niveles simples de complejidad biológica (molecular y celular), los cuales se pueden reflejar en niveles más altos de complejidad biológica, y por ello, pueden tener graves consecuencias a nivel de individuo o población (Moore & Simpson 1992). Además, las alteraciones histopatológicas pueden prolongarse en el tiempo (Neff et al. 1987). De este modo, el estudio histopatológico de los moluscos bivalvos proporciona información sensible, útil y potencial para evaluar el estado de salud general de los

ecosistemas marinos (Sunila 1988; Kim et al. 1998, 2006; Au 2004). Se analizaron principalmente las respuestas inflamatorias que incluyen infiltraciones hemocíticas, granulocitomas y agregaciones de células pardas y la presencia y prevalencia de los parásitos mas comunes (*Nematopsis* sp, R/CO, metacercaria, *Mytilicola*).

Desarrollo gametogénico

En las preparaciones histológicas de 10 mejillones teñidas con hematoxilina eosina se analizó el manto (gónada) en un microscopio de luz y se asignó a cada animal un estadio de desarrollo, según Seed (1969).

Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS v14.0. La variabilidad de los factores se estudiaron mediante análisis de la varianza (ANOVA), las diferencias entre pares de medias se estudiaron a posteriori mediante el test para la comparación múltiple de pares de medias de Tukey. Para el periodo de labilización de la membrana lisosómica al ser un dato no paramétrico se aplicó el test de la U de Mann-Whitney como recomienda la UNEP (UNEP/RAMOGGE 1999). En todos los casos se estableció un nivel de significación del 95% ($p < 0.05$). Para el cálculo del LC50 se utilizó la aplicación para el método Spearman-Kärber Trimmed (U.S. EPA statistical computer programs versión 1.5.).

Resultados y Discusión

Experimento 1: ensayo de toxicidad aguda

Los primeros indicios de mortalidad se detectaron en la concentración más alta de la mezcla de aplicación (10.000 ppm) el día 3 de experimento y siguió aumentando hasta alcanzar el 100% de mortalidad en el día 9 (Fig. 2). El inicio de mortalidad en los mejillones correspondientes a la concentración de 1000 ppm se inició el día 5 de experimentación. Ese mismo día se observó un proceso de puesta masiva de gametos (*spawning*) inducida en el grupo expuesto a las concentraciones de 1000 ppm y más adelante en el grupo de 100 ppm (Fig. 3). Esta inducción de la puesta se relaciona con ciertas condiciones de estrés y contaminación (Zorita et al. 2006). En el grupo expuesto a 1000 ppm se observaron acumulaciones de material oleoso en los bisos de los mejillones probablemente procedentes del diesel de la mezcla (Fig. 3). No se observó ni mortalidad, ni puesta inducida ni ningún otro tipo de alteración en los grupos expuestos a concentraciones bajas (0.01, 1 y 10 ppm). Así, se concluye que la concentración a partir de la cual no se observan efectos (NOEC, *no observed effect concentration*) sería de 10 ppm de la mezcla de aplicación.

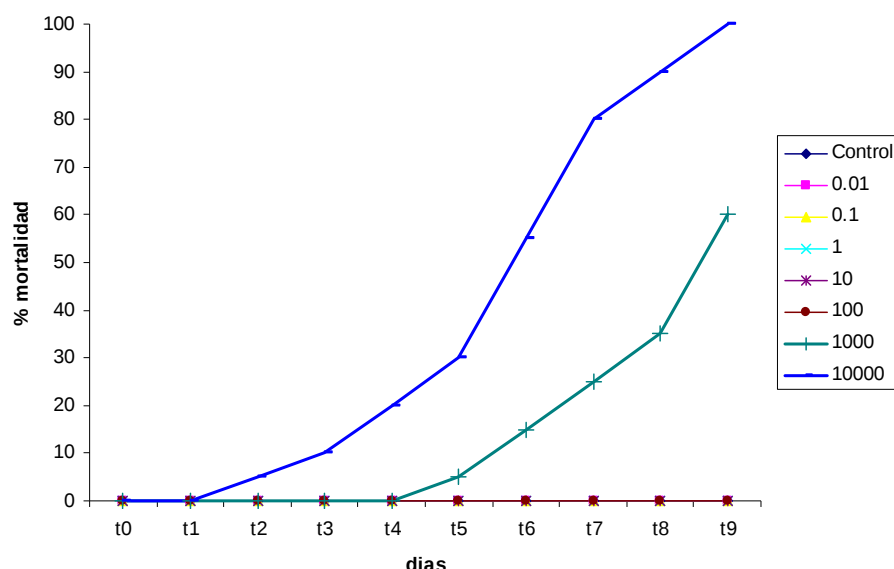


Fig 2. Porcentajes de mortalidad y supervivencia en el experimento de toxicidad aguda para el glifosato%50 + diesel %50.

Tras la finalización del experimento y con los datos de mortalidad obtenidos se realizó el cálculo de la concentración que produce la mortalidad del 50% de la población ó LC50 (*Lethal concentration 50*) según el método Sperman-Karber (Fig. 4). Mediante este test se calculó que para un periodo de 9 días la concentración letal 50 (LC50) es de 794.33 ppm. Estos resultados muestran que la concentración letal es similar a la calculada para otros invertebrados como *Daphnia magna* (LC50: 780 ppm, USDA 2003) aunque en esta ocasión se trataba de glifosato de grado técnico. Por otro lado, cuando se utilizan mezclas con surfactantes las concentraciones letales tienden a ser inferiores (USDA 2003). En nuestro caso también se utiliza el diesel para diluir el glifosato pero por ser el mejillón más resistente o por la menor toxicidad de la mezcla no parece que la concentración letal sea muy baja. Por lo tanto, parece que la mezcla no produce una alta toxicidad.



Fig 3. Posible puesta de gametos inducida en los mejillones expuestos durante 5 días a las concentraciones de 100 ppm (izquierda) y 1000 ppm (derecha) de la mezcla de aplicación. Se pueden observar acumulaciones de sustancias de aspecto oleoso (derecha) en los bisos de los mejillones expuestos a la concentración de 1000 ppm.

DATE:	17/7/11	TEST NUMBER:	1	DURATION:	9 D
TOXICANT :	glifosato+diesel				
SPECIES:	M.galoprovincialis				
RAW DATA:	Concentration	Number	Mortalities		
---	(ppm)	Exposed			
	.00	20	0		
	.01	20	0		
	.10	20	0		
	1.00	20	0		
	10.00	20	0		
	100.00	20	0		
	1000.00	20	12		
	*****	20	20		
SPEARMAN-KARBER TRIM:		.00%			
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	LC50:	794.33			
	95% LOWER CONFIDENCE:	479.64			
	95% UPPER CONFIDENCE:	1315.49			

Fig 4. Calculo de LC50 siguiendo el método Trimmed Spearman-Karber.

Experimento 2: ensayo de toxicidad subletal

En base a los resultados del Experimento 1 se procedió a seleccionar las concentraciones subletales de la mezcla glifosato-diesel para la segunda fase: 0.1 ppm (Baja -L-), 1 ppm (media -M-) y 100 ppm (alta -H-). Adicionalmente, y tal y como se ha mencionado anteriormente, se añadió una nueva serie, en paralelo a la exposición a la mezcla de aplicación, sólo con glifosato. Se eligieron las concentraciones de 0.05 ppm (Baja -L-), 0.5 ppm (media -M-) y 50 ppm (alta -H-) que corresponden a la parte proporcional de glifosato en la mezcla. Este experimento, no previsto en la memoria inicial, permitirá la comparación de los efectos de ambos métodos (glifosato vs. glifosato+diesel). En este segundo experimento no se detectó mortalidad de ninguno los especímenes expuestos a las diferentes concentraciones tras 21 días de exposición, confirmado la selección adecuada de concentraciones subletales.

Estabilidad de la membrana lisosómica

Las respuestas lisosómicas constituyen un biomarcador inespecífico de efecto muy sensible a un amplio rango de contaminantes (Au 2004). El test de estabilidad de la membrana lisosómica aplicado en la glándula digestiva de mejillones es una herramienta utilizada internacionalmente en los programas de seguimiento de la contaminación marina (UNEP/RAMOGÉ 1999). Este parámetro indica el estado de salud general de los organismos. Así, en términos generales, los animales en condiciones saludables presentan un valor alto de tiempo de labilización de la membrana lisosómica ($LP > 20$ min) que indicaría membranas lisosómicas estables. Por el contrario, valores bajos de este parámetro ($LP < 10$ min) indican una situación de estrés general.

En el presente estudio se ha determinado un periodo de labilización de la membrana lisosómica (LP) de más de 20 min para los mejillones del tiempo 0 (Fig. 5), con lo que podemos confirmar una buena situación de salud general de la población de mejillones al inicio del experimento ($t=0$). A pesar de que dichos mejillones control muestran un descenso significativo del parámetro el día 3 del experimento, luego se recuperan los valores iniciales en el día 21 sugiriendo un estado general de salud óptimo. Esto se debe a un posible proceso de aclimatación a las condiciones experimentales del laboratorio, como la alimentación, la cual se ha demostrado que tienen una estrecha relación con los biomarcadores lisosómicos (Izagirre et al. 2009). De todas formas, y a pesar del descenso del día 3, el grupo expuesto a las dosis baja (L) y media (M) de concentración de glifosato muestra un LP cercano a 15 min sugiriendo que no existe un efecto reseñable sobre la salud de los especímenes. Todos los demás grupos muestran un LP cercano a 10 min y los grupos expuestos durante 3 d a la dosis alta de glifosato (t_3 H) y a la dosis baja de la mezcla (t_3 GD L) muestran valores inferiores a 10 min y significativamente inferiores al control. Estos datos se pueden enmarcar en un cuadro toxicidad baja de los compuestos analizados añadido al

proceso de aclimatación. La exposición durante 21 d muestra datos más esclarecedores. Tal y como se ha mencionado con anterioridad, los valores de LP del grupo control se recuperan y superan los 20 min. Del mismo modo (aunque presentan una gran variabilidad interna) los valores obtenidos para mejillones del grupo L son similares a los valores del grupo control no mostrando diferencias significativas con ellos. Los lisosomas de las células digestivas del grupo expuesto a la dosis baja de la mezcla (GD L) aunque muestran valores superiores a los 10 min son diferentes significativamente a los del grupo expuesto a la dosis baja, sugiriendo una mayor toxicidad producida por la exposición al diesel. Los demás grupos, que muestran

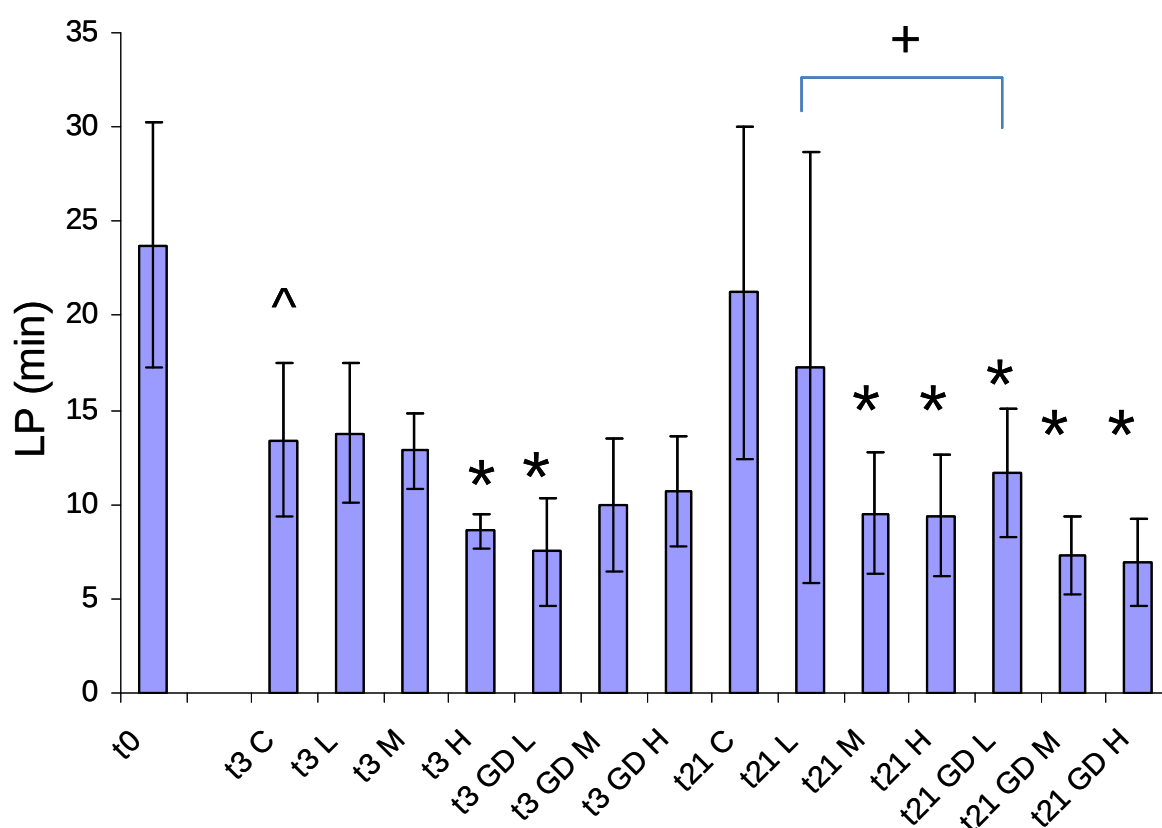


Fig 5. Tiempo de labilización de la membrana lisosómica (LP min) en la glándula digestiva de mejillones. Los segmentos verticales indican la desviación estándar y los * las diferencias significativas con el control de cada tiempo. ^ marca diferencias con el t0. + indica la diferencia entre los grupos marcados. Las diferencias son significativas según el test de U Mann-Whitney ($p < 0.05$). t0: mejillones control diseccionados antes de empezar la exposición; t3: mejillones tras 3 días de experimento; t21: mejillones tras 21 días de experimento; C: grupo control; L: glifosato, 0.5ppm; M: glifosato, 5ppm; H: 50ppm; GDL: glifosato%50+diesel 50%, 1ppm; GDM: glifosato%50+diesel 50%, 10ppm; GDH: glifosato%50+diesel 50%, 100ppm

diferencias significativas respecto al grupo control, presentan valores inferiores a 10 min indicando un posible deterioro en la salud que se acentúa en los grupos expuestos únicamente al diesel. No obstante, ninguno de los grupos presenta un LP inferior o cercano a 5 min lo que indica que no es una situación de toxicidad extrema y que podría ser recuperada (Dagnino et al. 2007; Broeg & Lethonen 2006). En resumen, se observan efectos sobre la estabilidad de la membrana de los lisosomas de las células digestivas de mejillón de los compuestos analizados a concentraciones medias y altas, y también se hace patente una mayor toxicidad en la mezcla de aplicación si la comparamos con la exposición a glifosato disuelto en agua.

Cambios en la estructura lisosómica

En este estudio se han calculado los cuatro parámetros esterológicos que definen la estructura de los lisosomas de la glándula digestiva de los mejillones: la densidad volumétrica, la densidad superficial, la densidad numérica y la relación superficie/volumen (indicador inverso del tamaño de los lisosomas) (Lowe et al. 1981; Cajaraville et al. 1991). A grandes rasgos, un incremento en la densidad volumétrica, tamaño o número de lisosomas podría indicar una respuesta biológica frente a un estrés general, aunque ciertas combinaciones entre respuestas de estos parámetros pueden indicar cuadros de toxicidad diferentes (Izagirre & Marigómez 2010).

Como primera observación se ha de indicar que, de manera similar a lo detectado mediante el test de labilización de la membrana lisosómica, el posible efecto en la aclimatación de los mejillones a las condiciones de laboratorio (detectado a los tres días de experimento en el grupo control), se normaliza antes del día 21 recuperando los valores iniciales para todos los parámetros. El análisis de los cambios estructurales de los lisosomas de las células digestivas, indican una posible alteración en el grupo expuesto a la dosis más alta de la mezcla (Fig. 6). Estas alteraciones están relacionadas con un agrandamiento de los lisosomas que se observan en el parámetro S/V (indicador inverso del tamaño de los lisosomas), y como consecuencia general en un incremento en la densidad volumétrica (Vv). Sin embargo, no se aprecian diferencias en el número de lisosomas (Nv, densidad numérica). Nos encontramos ante un caso típico de respuesta lisosómica frente a un estrés (Moore et al. 1987; Izagirre & Marigómez 2010) que se hace patente sólo en las concentraciones más altas de los compuestos utilizados. En los mejillones expuestos a la mezcla se observa una clara tendencia de incremento de la densidad volumétrica al aumentar la concentración. No obstante, esta tendencia no se observa, al menos tan marcada, en los grupos expuestos sólo a glifosato. Estas diferencias solamente son significativas en el grupo expuesto a la concentración alta de la mezcla en comparación con el grupo control para el día 3 y con todos los grupos para el día 21.

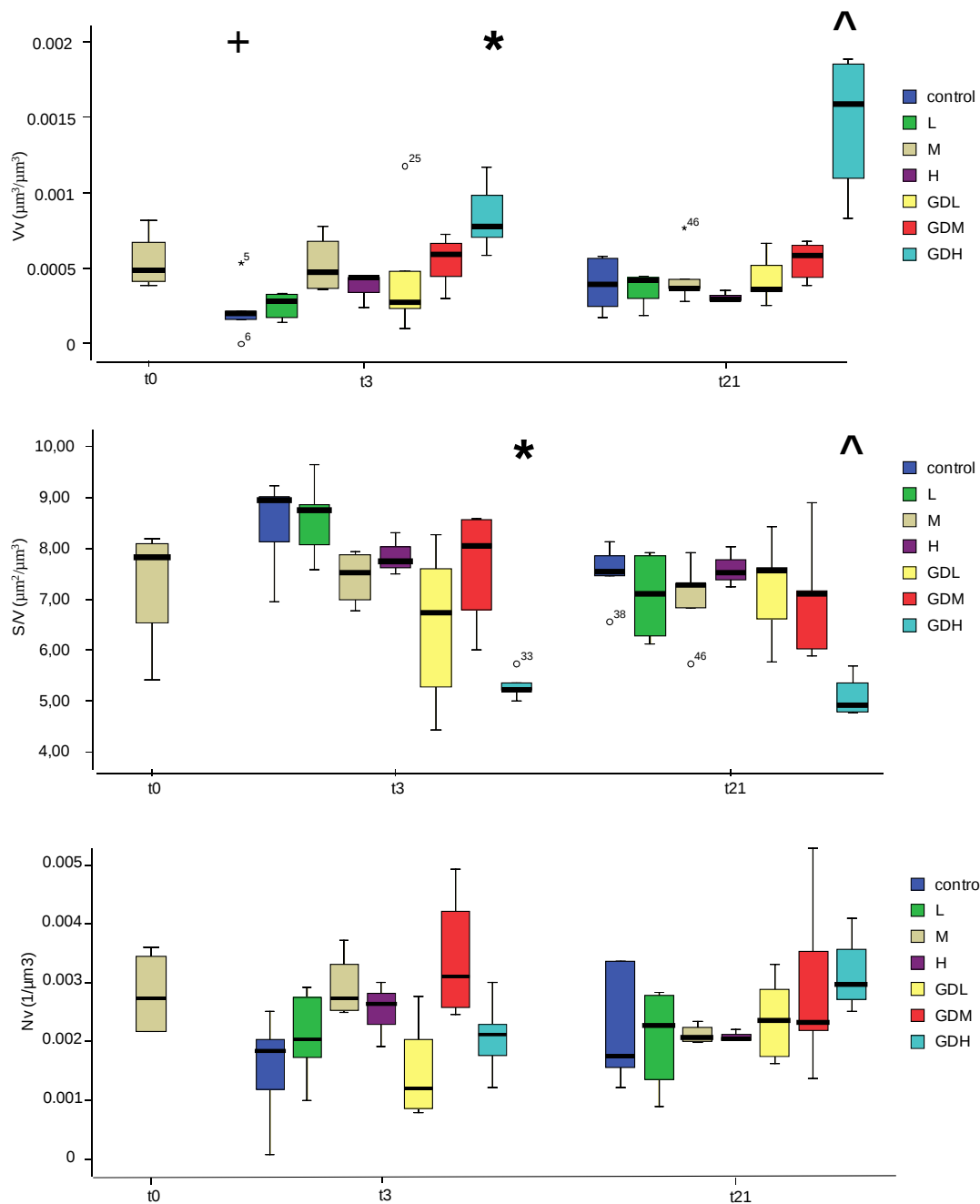


Fig. 6. Densidad volumétrica (Vv), relación superficie/volumen (S/V) y densidad numérica (Nv) de los lisosomas de las células digestivas. Diagrama de cajas, la línea indica la mediana y los segmentos verticales indican el percentil 25 y 75. + indica diferencia significativa respecto al t0; * indica diferencia significativa respecto al control del tiempo correspondiente; ^ indica diferencia significativa respecto todos los demás grupos (ANOVA basada en Tukey, $p < 0.05$). Ver Figura 5 para los códigos de los grupos experimentales.

Acumulación intracelular de lípidos neutros

La acumulación de lípidos neutros intralisosomales se utiliza como biomarcador de exposición a hidrocarburos (Moore et al. 2006; Marigomez & Baybay-Villacorta 2003). Los mejillones muestreados en el tiempo 0 no muestran acumulación de lípidos neutros tal y como se puede observar en la imagen (Fig. 7). No se observa acumulación extrema de lípidos en ningún caso pero existe una relación clara al aumentar la concentración de la mezcla, aunque parece no estar relacionada con el tiempo de exposición. Aunque no se muestran todas las imágenes por simplificar, se ha comprobado que la mayor acumulación de lípidos ocurre en el grupo GDH desde el día 3 de exposición. Aunque los valores no son significativamente diferentes, se observa una tendencia a aumentar la presencia de lípidos neutros en los grupos expuestos a diesel, con la excepción de los especímenes expuestos a la concentración baja (GD L, Fig 7). En los grupos expuestos solo a glifosato no se observa una acumulación relevante de lípidos neutros (Fig 7; t3 H).

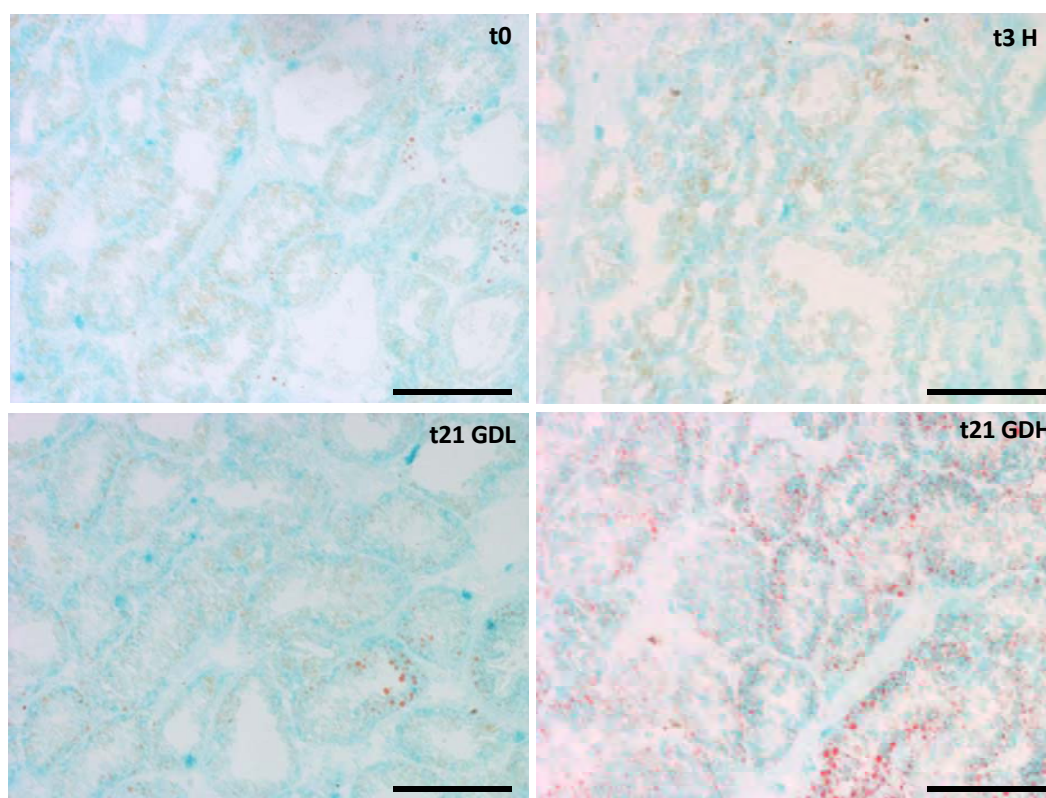


Fig 7. Micrográficas de secciones de tejido de la glándula digestiva teñidas para la demostración histoquímica de lípidos neutros (Oil Red O) en diferentes grupos experimentales. El marcaje específico de color rojo determina la presencia de lípidos. Magnificación x20; barra de escala: 100µm. t0, Control; t3H, exposición de 3 d a la dosis alta de glifosato; t21 GD L, exposición de 21 d a la dosis baja de la mezcla; t21 GD H, exposición de 21 d a la dosis alta de la mezcla.

Análisis planimétrico del epitelio digestivo, composición celular del epitelio digestivo y observación histopatológica

Como primera evaluación del análisis histológico de la glándula digestiva de los mejillones, se puede concluir que ninguno de los parámetros estudiados (Fig. 8) supera los valores considerados como indicativos de situaciones de estrés ambiental cuantificados en otros trabajos de investigación (Marigómez et al. 2006). Por tanto, se puede asumir que el estado de salud de los especímenes puede considerarse como satisfactorio. No obstante, es interesante destacar los valores de la densidad volumétrica de células basófilas de los grupos de mayor concentración de la mezcla. Estos resultados, al contrario de lo esperado, son inusualmente bajos en estos grupos. El incremento en las células basófilas suele ser indicativo de un fuerte estrés o de un estrés de larga duración (Garmendia et al. 2011). Unos valores tan bajos no son comunes ni tan siquiera en muestras control, por lo tanto podrían demostrar una respuesta específica al compuesto empleado.

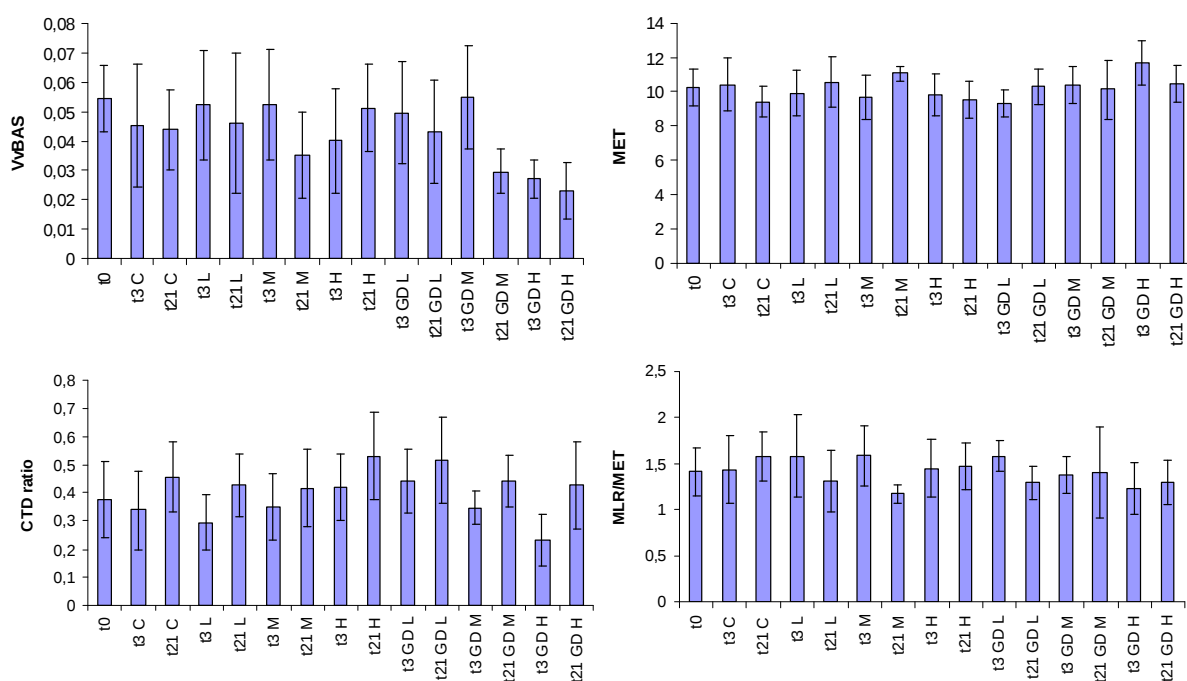


Fig 8. Alteraciones histológicas en glándula digestiva de mejillón. Densidad volumétrica de células basófilas (Vv_{BAS}); grosor medio del epitelio digestivo (*Mean Epithelial thickness* -MET-); Relación entre el tejido digestivo y el tejido conectivo de la glándula digestiva (*Connective to diverticula* -CTD- ratio); Relación entre el radio medio de la luz del alveolo digestivo y del grosor medio del epitelio digestivo (MLR/MET). Los segmentos verticales indican la desviación estándar para cada grupo experimental. Ver Figura 5 para los códigos de los grupos experimentales.

Tras el estudio histopatológico de la glándula digestiva de los mejillones expuestos a *glifosato* y a la mezcla de *glifosato* y *diesel*, se observaron diferentes tipos de respuestas inflamatorias que incluyen infiltraciones hemocíticas, granulocitomas y agregaciones de células pardas. En general, la presencia de infiltraciones hemocíticas, granulocitomas y agregaciones de células pardas son bajas en todos los grupos de exposición, excepto la presencia de infiltraciones hemocíticas en los mejillones expuestos a las concentraciones más altas de la mezcla tanto para el día 3 como para día 21 de exposición. Los únicos parásitos que se han observado son *Nematopsis* sp, *R/CO*, metacercaria y *Mytilicola intestinalis* en la glándula digestiva y *Nematopsis* sp y *Protoecus maculatus* *Nematopsis* sp en el manto. En general, las prevalencia e intensidades son relativamente bajas en ambos tejidos y en todos los grupos de exposición.

Desarrollo gametogénico

Tras analizar el desarrollo gametogénico en el manto de los mejillones expuestos a glifosato y a la mezcla de glifosato y diesel, se observa que la mayoría de los grupos no muestran diferencias para este parámetro (Fig. 9). Solo se observa una clara diferencia que concuerda con lo observado en el experimento de toxicidad aguda realizado. Los mejillones expuestos a las concentraciones más altas de la mezcla tanto el día 3 como de forma más marcada el día 21 sufren un proceso de puesta inducida. Tras 3 días de exposición la mayoría de los mejillones de este grupo experimental se encuentran en puesta o en post-puesta y al día 21 el 80% de los mejillones están en post-puesta y el 20% en puesta, cuando en el grupo control la mayoría de los mejillones se encuentran en estado de madurez gametogénico. Estas puestas inducidas por exposición a contaminantes han sido observadas en trabajos anteriores (Zorita et al. 2006) y pueden ser síntoma de una alteración severa del ciclo de reproducción de los mejillones. No obstante, estas concentraciones no son susceptibles de encontrarse en el ambiente dado que son extremadamente altas considerando la cantidad de producto que se lleva al campo para las aplicaciones.

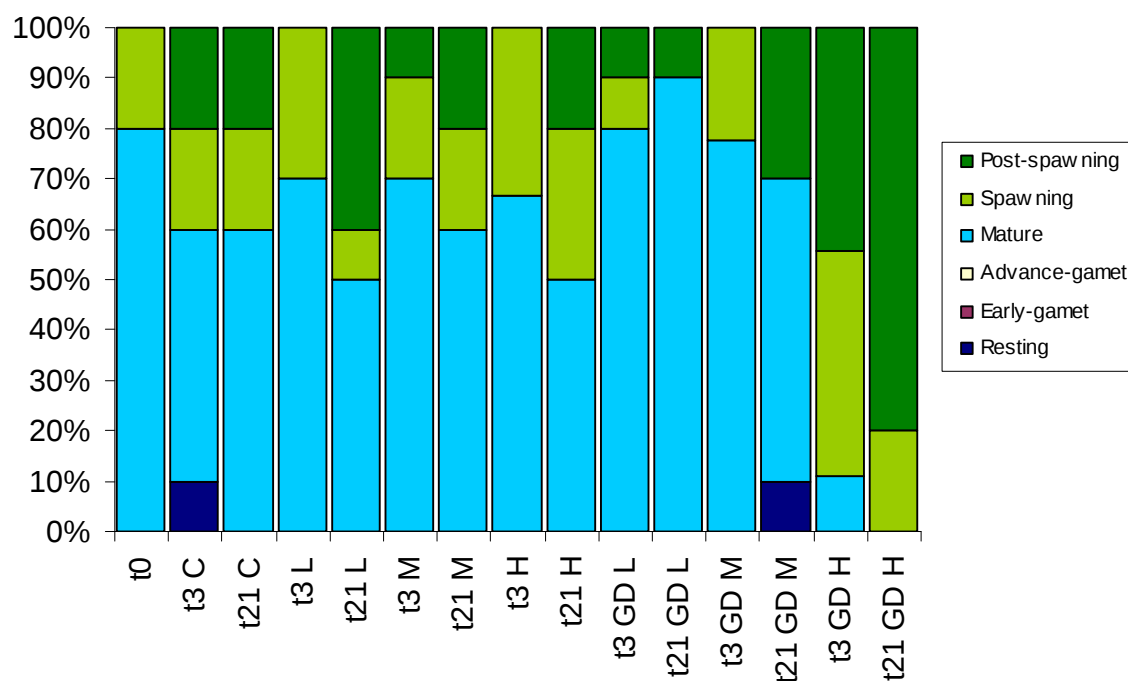


Fig 9. Desarrollo gametogénico observado en muestras histológicas de manto de mejillón correspondientes a los grupos experimentales (leyenda en Figura 5). Escala según Seed (1969). Ver Figura 5 para los códigos de los grupos experimentales.

Conclusiones

- 1.- La toxicidad del glifosato disuelto en agua es baja y siempre menor que la producida al ser suministrado con diesel. Sin embargo, la toxicidad de la mezcla de trabajo es así mismo baja y tan sólo detectable a dosis altas.
- 2.- Se recomienda la utilización del producto sin mezclarlo con diesel ya que es miscible en agua y así se reducen los posibles efectos tóxicos que podrían ocurrir en caso de vertido accidental de la mezcla en el momento de su aplicación en campo.
- 3.- Al tratarse de una aplicación directa al tocón de la planta y al ser los volúmenes que se transportan al campo bajos, el riesgo para la salud del ecosistema puede ser considerado de bajo o muy bajo.
- 4.- Sería deseable la realización de un estudio en profundidad para determinar los efectos producidos por exposiciones subletales de larga duración.

Bibliografía

Au DWT (2004) The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar Poll Bull* 48: 817-834

Cajaraville MP, Díez G, Marigómez IA, Angulo E (1990) Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Dis Aquat Org*, 9: 221-228

Cajaraville MP, Marigómez JA, Angulo E (1991) Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 21: 395-400

Culling CFA (1974) *Handbook of histopathological and histochemical techniques*, 3rd edn. Butterworths, London

Broeg K, Lehtonen KK (2006) Indices for the assessment of environmental pollution of the 1058 Baltic Sea coasts: integrated assessment of the multi-biomarker approach. *Mar Pollut Bull* 2006; 53:508-522.

Dagnimo A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A (2007) Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, 12: 155-172.

Garmendia L, Soto M, Vicario U, Kim Y, Cajaraville MP, Marigómez I (2011) Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: Tissue-level biomarkers and histopathology. *J Environ Monit* 13, 915. DOI: 10.1039/c0em00410c

ICES (2006) Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC), 27-31 March 2006, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2006/MHC: 04. 79 pp

Izagirre U, Ruiz P, Marigómez I (2010) Time-course study of the early lysosomal responses to pollutants in mussel digestive cells using acid phosphatase as lysosomal enzyme marker, *Comp. Biochem. Physiol.*, 2009, 149C, 587–597

Izagirre U & Marigómez M (2009) Lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilisation in mussel digestive cells measured by an integrative index, *Environ. Pollut*, 157, 1544–1553.

Kim Y, Powell EN, Wade TL, Presley BJ, Sericano J. (1998) Parasites of sentinel bivalves in the NOAA Status and Trend Program: distribution and relationship to contaminant body burden. *Mar. Poll. Bull.* 37, 45-55.

Kim Y, Ashton-Alcox A, Powell EN (2006) Histological techniques for marine bivalve molluscs: update NOAA technical memorandum NOS NCCOS 27, 76 pp.

Lowe DM, Moore MN, Clarke KR (1981) Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat Toxicol*, 1: 213-226

Marigómez I, Baybay-Villacorta L (2003) Pollutant specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquat Toxicol*, 64: 235-257.

Marigómez I, Soto M, Cancio I, Orbea A, Garmendia L, Cajaraville MP (2006) Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Mar Pollut Bull* 53:287–304

Moore MN (1976) Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussels, (*Mytilus edulis*), and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res*, 175: 279-287

Moore MN, Pipe RK, Farrar SV, Thompson S, Donkin P (1987) Lysosomal and microsomal responses to oil-derived hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo JM, Kester DR, (Eds.) *Oceanic processes in marine pollution*, Vol I. Robert E Krieger publishing company, Malabar, Florida, 89-96.

Moore, M.N., Simpson, M.G. (1992) Molecular and cellular pathology in Environmental impact assessment. *Aquatic Toxicol.* 22 (4), 313-322.

Neff, J.M., Hillman, R.E., Carr, R.S., Buhl, R.L., Lahey, J.I. (1987). Histopathological and biochemical responses in arctic marine bivalve molluscs exposed to experimentally spilled oil. *Arctic*. 40, 220-229.

Pearse AGE (1976) *Histochemistry, theoretical and applied*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 759 pp

Seed R (1969) The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia* 3:277-316

Sunila I. (1988) Pollution-related histopathological changes in the mussel *Mytilus edulis* L. in the Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.* 24, 277-280.

UNEP/RAMOGÉ (1999) *Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme*. UNEP, Athens. 39 pp.

USDA, Forest Service Forest Health Protection (2003). Patrick R. Durkin Syracuse Environmental Research Associates, Inc. Glyphosate – Human Health and Ecological Risk assessment Final Report. pp281

Weibel ER (1979) *Stereological methods*. Vol. I. Academic Press, London

Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP (2006) Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquatic Toxicology, Volume 78, Supplement, Pages S109-S116
