

Nota de Investigación/Research Note

Actividades enzimáticas de las fosfatasas ácida y alcalina y la catalasa en *Ruditapes philippinarum* como biomarcadores del estrés generado por tensioactivos aniónicos (C₁₁-LAS) y no iónicos (NPEO_{2,8})

Enzymatic activity of acid and alkaline phosphatase and catalase in *Ruditapes philippinarum* as biomarkers of stress caused by anionic (C₁₁-LAS) and non-ionic (NPEO_{2,8}) surfactants

D Álvarez-Muñoz¹, M Sáez², J Blasco³, A Gómez-Parra¹, E González-Mazo^{1*}

¹ Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Av. República Saharaui s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España. * E-mail: eduardo.gonzalez@uca.es

² Department of Environmental and Toxicological Chemistry, University of Amsterdam, IBED- Kamer B-326, Nieuwe Achtergracht 166, 1018 WV, Amsterdam, The Netherlands.

³ Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Av. República Saharaui s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.

Resumen

Se realizó un estudio de toxicidad subcrónica mediante la exposición de organismos a dos tensioactivos en un sistema en flujo continuo, con un periodo de exposición al tóxico de 120 h, y otro de depuración en ausencia del mismo de 48 h. Los experimentos se realizaron con *Ruditapes philippinarum*, molusco con amplia distribución en zonas intermareales y de gran importancia económica, utilizando sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) como principal tensioactivo aniónico y el nonilfenol etoxilado (NPEO_{2,8}) como no iónico. Los organismos fueron expuestos a tres concentraciones ambientales ($\mu\text{g L}^{-1}$) de LAS y de NPEO_{2,8}, siendo 2.4, 6.7 y 12.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de LAS las concentraciones medidas en el interior de organismos expuestos a la concentración menor, intermedia y mayor, mientras que las concentraciones de NPEO_{2,8} fueron de 13.4 y 14.8 y 31.7 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Las respuestas empleadas como “criterio de efecto” de toxicidad subcelular fueron: las medidas de las actividades enzimáticas de la catalasa (CAT), y las fosfatasas ácida (AcP) y alcalina (ALP). En el caso de CAT, no se han observado diferencias significativas al final de la fase de exposición con ninguno de ambos tensioactivos. Sin embargo, al final de la fase de depuración existió un aumento de la actividad CAT con el C₁₁LAS en los organismos expuestos a la menor concentración ($P < 0.05$) y una disminución significativa con el NPEO_{2,8} en los organismos expuestos a la mayor concentración, la misma que corresponde con la mayor acumulación del compuesto en el interior del organismo. En los organismos expuestos a las concentraciones media y mayor de C₁₁-LAS se observó inhibición de la actividad AcP y activación de la ALP al final del ensayo (día 7) ($P < 0.05$). En los organismos expuestos a la mayor concentración de NPEO_{2,8} existe un aumento de la actividad específica al final de la fase de depuración.

Palabras clave: tensioactivo, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, catalasa, *Ruditapes philippinarum*.

Abstract

A subchronic toxicity study was performed by exposing organisms to two surfactants in a continuous flow-through system for 120 h, followed by a depuration phase of 48 h. The bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*, widely distributed in intertidal zones and of high commercial value, was used. The main anionic and non-ionic surfactants employed were linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and nonylphenol ethoxylate (NPEO_{2,8}), respectively. The organisms were exposed to three environmental levels ($\mu\text{g L}^{-1}$), and the concentrations of C₁₁-LAS measured in the tissues were 2.4, 6.7 and 12.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the low, intermediate and high exposure levels, while those of NPEO_{2,8} were 13.4, 14.8 and 31.7 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The responses used as “end point” of subcellular toxicity were the enzymatic activity of catalase (CAT), acid phosphatase (AcP) and alkaline phosphatase (ALP). No significant differences were observed in CAT activity at the end of the exposure phase; however, at the end of the depuration phase there was an increase in CAT activity in the organisms exposed to the low concentration of C₁₁-LAS ($P < 0.05$) and a significant decrease in the individuals exposed to the high concentration of NPEO_{2,8}, which is related to the largest accumulation of the compound inside the organism. The organisms exposed to the intermediate and high concentrations ($P < 0.05$) of C₁₁-LAS showed inhibition for AcP and activation for ALP at the end of the experiment (day 7). In the organisms exposed to the high concentration of NPEO_{2,8} there was an increase in the specific activity at the end of the depuration stage.

Key words: surfactant, acid phosphatase, alkaline phosphatase, catalase, *Ruditapes philippinarum*.

Introducción

Los tensioactivos son un amplio grupo de compuestos químicos orgánicos con aplicaciones diversas en la metalurgia, agricultura, productos farmacéuticos, pinturas, barnices, fibras y textiles, etc. Sin embargo, su mayor uso se da en la limpieza, siendo muy importante su aplicación en detergentes de uso doméstico. Actúan reduciendo la tensión superficial y tienen una gran tendencia a formar micelas en solventes.

La estructura molecular de estos compuestos consta de dos partes, una parte no polar, hidrófoba, y otra polar, hidrófila, en función de la cual se clasifican en distintos grupos. Tanto por su versatilidad como por su elevado consumo los grupos más importantes son los aniónicos y los no iónicos. Se seleccionó el sulfonato de alquilbenzeno lineal (LAS) como tensioactivo aniónico, cuyo consumo de 270,000 toneladas/año en Europa en 2000 (European Eco-Label 2002) lo hace el más importante. Este compuesto se caracteriza por constar de una cadena alquílica de 11 átomos de carbono (C_{11} -LAS) a la que va unido un anillo aromático sulfonado en posición "para" (fig. 1). El nonilfenol etoxilado (NPEO_{2,8}), uno de los tensioactivos no iónicos más extensamente usados, pertenece al grupo de los alquilfenoles polietoxilados y su estructura molecular consta de una cadena hidrocarbonada con 9 átomos y otra polietoxilada (con una media de 2.8 unidades etoxiladas) unidas a un grupo benceno en posición "para" (fig. 2). En la actualidad este tensioactivo está siendo sustituido por alcoholes polietoxilados (AEOs) debido a su baja biodegradabilidad y carácter estrogénico (Servos *et al.* 1999).

A pesar de que los organismos en el medio marino suelen estar sometidos a bajas concentraciones de estos compuestos durante largos periodos de tiempo, son escasos los estudios de toxicidad en especies marinas, y en su mayoría evalúan toxicidad aguda mediante la mortalidad de individuos (Swedmark *et al.* 1971; Bressan *et al.* 1989; Lewis *et al.* 1991, 1992; Hofer *et al.* 1995; Da Ros *et al.* 1995; Servos *et al.* 1999; Barbieri *et al.* 2002).

En el presente trabajo se realizó un estudio de toxicidad subcrónica empleando un dispositivo experimental en flujo continuo desarrollado de acuerdo con la normativa de la OECD (1996), en dos fases: una de exposición al tóxico durante 120 h,

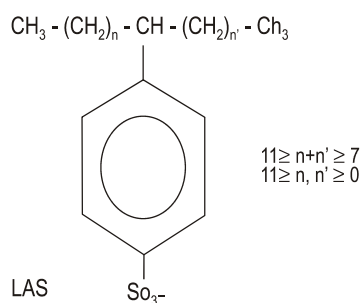


Figura 1. Estructura molecular del sulfonato de alquilbenzeno lineal (LAS).
Figure 1. Molecular structure of linear alkylbenzene sulphonate (LAS).

Introduction

Surfactants are a wide group of organic chemical compounds that have diverse applications in metallurgy, agriculture, pharmaceutical products, paints and varnishes, textiles and fibres, etc., though they are primarily used in cleaning products, in particular domestic detergents. Surfactants act by reducing the surface tension and tend to form micelles in solvents.

The molecular structure of these compounds consists of two parts: a non-polar part, hydrophobic, and a polar part, hydrophilic. Based on this, surfactants are classified into different groups, the anionic and non-ionic being the most important because of their versatility and extensive use. In this study, linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and nonylphenol ethoxylate (NPEO_{2,8}) were selected as anionic and non-ionic surfactants, respectively. The former is the most widely used surfactant in Europe (270,000 tons/year in 2000; European Eco-Label 2002) and has an alkyl chain length of 11 carbon atoms (C_{11} -LAS) to which an aromatic ring sulphonated at the "para" position is attached (fig. 1). The latter is one of the most extensively used non-ionic surfactants and belongs to the group of polyethoxylated alkylphenols. Its molecular structure consists of one hydrocarbonated chain of 9 atoms and one polyethoxylated chain (with a mean of 2.8 ethoxylate units) attached to a benzene group at the "para" position (fig. 2). At present, this non-ionic surfactant is being replaced by alcohol ethoxylates (AEOs) because of its low biodegradability and estrogenic characteristics (Servos *et al.* 1999).

Even though organisms in the marine environment are exposed to low concentrations of these compounds for long periods of time, only a few toxicity studies have been conducted on marine species and they mostly evaluate acute toxicity effects (Swedmark *et al.* 1971; Bressan *et al.* 1989; Lewis *et al.* 1991, 1992; Hofer *et al.* 1995; Da Ros *et al.* 1995; Servos *et al.* 1999; Barbieri *et al.* 2002).

In this paper we present the results of a subchronic toxicity study, using a continuous flow-through system developed according to the OECD (1996) guideline. The test consisted of two phases: a period of exposure to the toxin for 120 h and a depuration period without the toxin for 48 h. The organism

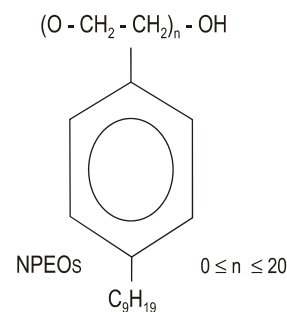


Figura 2. Estructura molecular de nonilfenol etoxilado.
Figure 2. Molecular structure of nonylphenol ethoxylate (NPEO).

y otra de depuración en ausencia del mismo de 48 h. El organismo seleccionado debido a su ubicuidad en sistemas costeros y su elevado valor comercial fue la almeja japonesa *Ruditapes philippinarum*, especie autóctona y bentónica.

Las respuestas empleadas como “criterio de efecto” de toxicidad subcelular fueron las medidas de las actividades enzimáticas de la catalasa (CAT), y las fosfatasa ácida (AcP) y alcalina (ALP).

Un organismo en condiciones fisiológicas normales genera especies reactivas de oxígeno procedentes del metabolismo de compuestos xenobióticos. Estas especies son eliminadas por el sistema de defensa antioxidante, del cual forma parte la CAT, que facilita la eliminación de peróxido de hidrógeno. Una alteración en el sistema de defensas antioxidante puede llevar a la aparición de daño oxidativo, como por ejemplo la peroxidación lipídica. Las enzimas antioxidantes o de estrés oxidativo, como la catalasa, desempeñan un papel fundamental en la homeostasis celular y la inducción de las mismas se refleja como una respuesta específica a contaminantes. En trabajos anteriores (Gupta *et al.* 1989, Da Ros *et al.* 1995) realizados con el molusco *Mytilus edulis* y el teleosteo *Channa punctatus*, no se observaron variaciones significativas en la actividad CAT entre organismos expuestos y no expuestos a LAS. Sin embargo, en un trabajo reciente realizado por Da Silva y Meirelles (2004), con Triton X-100 y Tween 80, dos tensioactivos no iónicos, en el pez *Prochilodus scrofa* si se observaron variaciones significativas en la actividad catalasa, que aumentó en los organismos expuestos al primer tensioactivo y disminuyó en los expuestos al segundo.

Las fosfatasa pertenecen al grupo de las enzimas hidrolasa e intervienen en la formación de productos metabólicos más fácilmente excretables por el organismo. Participan en procesos de fosforilación y desfosforilación con quinasas (Sparks y Brautigan 1986), y están implicadas en procesos de permeabilidad, crecimiento y diferenciación celular, síntesis de proteínas, absorción y transporte de nutrientes, maduración gonadal y esteroidogénesis (Ram y Sathyanesan 1985). La fosfatasa ácida actúa como enzima marcadora para la detección de lisosomas en fracciones celulares, y la alcalina es una enzima intrínseca a la membrana plasmática encontrada en la mayoría de las células animales. Debido a que los tensioactivos han sido relacionados con la modificación de la actividad lisosomal (Blasco *et al.* 2002), y a su estructura molecular asimétrica por la cual tienden a quedarse retenidos en la interfases, resulta especialmente interesante el estudio de estas enzimas.

Según Blasco *et al.* (1999), en un estudio *in vitro* realizado con *R. philippinarum* donde el organismo fue expuesto a una mezcla de homólogos de LAS (0–100 mg L⁻¹), se observó una fuerte inhibición de AcP tanto en la glándula digestiva como en las branquias, mientras que no se observó ningún efecto en ALP. En los ensayos realizados *in vivo* (500 µg L⁻¹) no se observó ningún efecto en ninguna de ambas enzimas. En peces, una concentración de 100 mg L⁻¹ provocó una inhibición

selected because of its wide distribution in coastal systems and high commercial value was the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*, a benthic species.

The responses employed as “end point” of subcellular toxicity were the enzymatic activity of catalase and of acid and alkaline phosphatase.

An organism under normal physiological conditions generates reactive oxygen species from the metabolism of xenobiotic compounds. These species are eliminated by the antioxidant defense system, which includes catalase (CAT), an enzyme that helps to remove hydrogen peroxide. An alteration in the antioxidant defense system could lead to oxidative damage, such as lipid peroxidation. Oxidative stress or antioxidant enzymes, like CAT, play a fundamental role in cellular homeostasis and their induction is considered a specific response to pollutants. In previous studies on the mollusc *Mytilus edulis* and teleost *Channa punctatus* (Gupta *et al.* 1989, Da Ros *et al.* 1995), no significant variations in CAT activity were found between organisms exposed and not exposed to LAS. However, in a recent study on *Prochilodus scrofa* (Da Silva and Meirelles 2004) using Triton X-100 and Tween 80, two non-ionic surfactants, significant variations in CAT activity were observed, increasing in the organisms exposed to the first surfactant and decreasing in those exposed to the second.

Phosphatases belong to the group of hydrolase enzymes and intervene in the formation of metabolic products that can be more easily excreted by the organism. They participate in phosphorylation and dephosphorylation processes with kinases (Sparks and Brautigan 1986), and are involved in processes of permeability, growth and cellular differentiation, protein synthesis, absorption and transport of nutrients, gonadal maturation and steroidogenesis (Ram and Sathyanesan 1985). Acid phosphatase (AcP) acts as a marker enzyme for the detection of lysosomes in cell fractions, while alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme intrinsic to the plasmatic membrane found in most animal cells. Since surfactants have been associated with the modification of lysosomal activity (Blasco *et al.* 2002) and since they tend to remain in the interphases because of their asymmetric molecular structure, the study of these enzymes proves particularly interesting.

Blasco *et al.* (1999) conducted an *in vitro* study in which *R. philippinarum* was exposed to a mixture of LAS homologues (0–100 mg L⁻¹) and observed a strong inhibition of AcP in both the digestive gland and gills, but no effect on ALP. In the *in vivo* assays (500 µg L⁻¹), there was no effect on either enzyme. On the other hand, a concentration of 100 mg L⁻¹ caused a significant inhibition of ALP in the gills and liver of *Channa punctatus* (Gupta *et al.* 1989) and *Cyprinus carpio* (Misra *et al.* 1991).

This study aims to analyze the effect of two surfactants, C₁₁-LAS (pure homologue) and NPEO_{2,8}, on a benthic marine organism exposed to representative environmental concentrations. The enzymatic activities of CAT, AcP and ALP were also characterized and related to the concentrations of the

significativa de ALP en branquias e hígado de *Channa punctatus* (Gupta *et al.* 1989) y *Cyprinus carpio* (Misra *et al.* 1991).

El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de dos tensioactivos, C₁₁LAS (homólogo puro) y NPEO_{2,8}, sobre un organismo marino bentónico expuesto a concentraciones representativas desde el punto de vista ambiental. También se propuso caracterizar las actividades enzimáticas CAT, AcP y ALP relacionándolas con las concentraciones del compuesto medidas en el interior del organismo para estimar su posible uso como biomarcadores de estrés por tensioactivos.

Material y métodos

Organismos

Se seleccionó la almeja *R. philippinarum*, especie autóctona, destinada al consumo humano y con un elevado interés desde el punto de vista económico. Se utilizaron individuos adultos, con un tamaño de concha entre 30 y 37 mm, que fueron suministrados por una empresa de acuicultura situada en la Bahía de Cádiz, y mantenidos en la Planta de Cultivos Marinos del Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos de la Universidad de Cádiz hasta su utilización. Este centro está registrado por la Junta de Andalucía como establecimiento de cría, suministro y usuario de animales de experimentación (No. de registro: CA/3U y CA/4CS). Previo al comienzo de los experimentos, los organismos fueron colocados en bandejas de aclimatación durante 48 h mantenidos con aireación y el flujo de agua de mar igual al que recibieron durante el experimento. El agua de mar empleada en los experimentos fue caracterizada según establece la normativa de la (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), determinándose un valor de salinidad de 35.94. Los parámetros medidos durante el transcurso de cada experimento fueron, para C₁₁-LAS, 21.6°C ± 0.6 de temperatura, 97.3% ± 1.4 de oxígeno disuelto (OD) y pH de 8.04 ± 0.1, mientras que, para NPEO_{2,8}, fueron 22.3°C ± 0.9 de temperatura, 96.9% ± 1.5 de OD y pH de 8.14 ± 0.1.

Tensioactivos

El C₁₁LAS, homólogo mayoritario en la formulación comercial de LAS, fue suministrado por Petroquímica Española SA, con un índice activo del 47% y una pureza del fenil C₁₁ del 94.9%, y 5.1% del fenil C₁₂LAS (mezcla de isómeros posicionales en ambos casos). El nonilfenol etoxilado corresponde a una mezcla de oligómeros entre 1 y 10 unidades etoxiladas, cuyo número medio corresponde a 2.8 (NPEO_{2,8}), con pureza superior al 99%, y fue suministrado por AgBar (Aguas de Barcelona).

Diseño experimental

Tras el periodo de aclimatación los organismos fueron distribuidos en las bandejas de exposición (80 individuos por bandeja). Estas bandejas recibían agua de mar y tensioactivo,

compuesto medido inside the organism in order to estimate their possible use as biomarkers of stress caused by surfactants.

Material and methods

Organisms

Adult individuals (shell size of 30–37 mm) of the clam *R. philippinarum* were used, an autochthonous species destined for human consumption. The specimens were provided by an aquacultural company located in Cádiz Bay and maintained at the marine culture facilities of the Andalusian Centre for Marine Studies (CASEM) of Cádiz University until being used. This centre is registered by the Government of Andalusia as an establishment for breeding, supplying and using experimental animals (registration No. CA/3U and CA/4CS). Prior to initiating the experiments, the organisms were placed in acclimatization trays for 48 h and kept under aeration and the seawater flow subsequently provided. The seawater used in the experiments was characterized according to the US Environmental Protection Agency and a salinity of 35.94 was determined. The following parameters were measured in each bioassay: for C₁₁-LAS, a temperature of 21.6°C ± 0.6, dissolved oxygen of 97.3% ± 1.4 and pH of 8.04 ± 0.1; for NPEO_{2,8}, a temperature of 22.3°C ± 0.9, dissolved oxygen of 96.9% ± 1.5 and pH of 8.14 ± 0.1.

Surfactants

The surfactant C₁₁-LAS, major homologue in the commercial formulation of LAS, was supplied by Petroquímica Española SA, with an active index of 47% and a purity of phenyls C₁₁ and C₁₂ of 94.9% and 5.1%, respectively (mixture of positional isomers in both cases). The nonylphenol ethoxylate, supplied by AgBar (Aguas de Barcelona), with a purity of more than 99%, corresponds to a mixture of oligomers of 1–10 ethoxylate units, the mean number being 2.8 (NPEO_{2,8}).

Experimental design

After the acclimation period, the organisms were placed on exposure trays (80 individuals per tray). These trays received seawater and the surfactant under study, the concentration of the latter being controlled by the input and output flows of each solvent. At the same time, an equal number of organisms were placed on control trays and exposed to the same experimental conditions but without the surfactant.

Throughout the experiment, water and specimen samples were taken daily to determine the real concentration of the compound in the tanks and in the individuals. The concentrations of C₁₁-LAS to which the organisms were exposed were 60 ± 3.4, 190 ± 10.1 and 350 ± 27.2 µg L⁻¹, while those of NPEO_{2,8} were 3 ± 0.3, 4 ± 1.0 and 8 ± 0.5 µg L⁻¹. The concentrations of C₁₁-LAS measured in the whole body (referred to wet weight) of the organisms exposed to the low, intermediate

controlando la concentración de este último por los flujos de entrada y salida de cada solvente. Durante el desarrollo de los bioensayos se colocó un número igual de organismos en bandejas controles, sometidos a las mismas condiciones experimentales pero sin la presencia del tensioactivo a estudiar.

A lo largo de la experimentación se tomaron diariamente muestras de agua y organismos para determinar la concentración real de compuesto en los tanques y su concentración en los individuos. Las concentraciones de C₁₁LAS en el agua a las que fueron expuestos los organismos durante el transcurso del experimento correspondiente fueron 60 ± 3.4 , 190 ± 10.1 y $350 \pm 27.2 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que las de NPEO_{2,8} fueron 3 ± 0.3 , 4 ± 1.0 y $8 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Las concentraciones medidas en el cuerpo entero de organismos y referidas a peso húmedo, en el ensayo con C₁₁LAS fueron 2.4 ± 0.3 , 6.7 ± 0.5 y $12.8 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ en los organismos expuestos a las concentraciones menor, intermedia y mayor, respectivamente, mientras que en el ensayo con NPEO_{2,8} las concentraciones finales en los organismos fueron de 13.4 ± 0.1 , $14.8 \pm 0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ y $31.7 \pm 6.6 \mu\text{g g}^{-1}$ para los organismos expuestos a las concentraciones menor, intermedia y mayor, respectivamente. Para la determinación de LAS se empleó el procedimiento analítico desarrollado por Sáez *et al.* (2000) para el tensioactivo aniónico y el propuesto por Zhao *et al.* (1999) para el no iónico.

La etapa de exposición finalizó a las 120 h por transferencia de los organismos a tanques con agua limpia donde permanecieron durante 48 h en depuración.

Preparación de muestras

Al final de cada fase se muestrearon y diseccionaron los organismos conservando las branquias. Se pesaron alrededor de 3 g de branquias, procedentes de distintos organismos expuestos a la misma concentración, se lavaron con KCl al 1%, se les añadió tampón Tris-HCl en proporción 1:4 (peso-volumen) y se homogeneizaron con un Ultraturrax. El tampón empleado fue Tris-HCl 20 mM pH 7.5 con KCl 150 mM, suplementado a diario con DDT 1 mM, EDTA 1mM y PMSF 0.1 mM. El homogenizado se centrifugó a 500 g durante 10 min a 4°C. Tras la eliminación de la capa lipídica y orgánulos que no eran de interés, se volvió a centrifugar a 10,000 g durante 20 min. El sobrenadante fue recogido y conservado a -80°C hasta su posterior análisis.

Enzimas

Las proteínas totales fueron determinadas por el método de Bradford (Bradford 1976).

La actividad catalasa fue determinada por el descenso en la concentración de peróxido de hidrógeno, midiendo la disminución de absorbancia a 240 nm (Aebi 1984) y está expresada en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$.

Las actividades fosfatasa ácida y alcalina fueron determinadas por el método descrito por Blasco *et al.* (1993) y los

and high levels were 2.4 ± 0.3 , 6.7 ± 0.5 and $12.8 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively, while those of NPEO_{2,8} were 13.4 ± 0.1 , 14.8 ± 0.4 and $31.7 \pm 6.6 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The analytical procedure developed by Sáez *et al.* (2000) was used for the anionic surfactant and that proposed by Zhao *et al.* (1999) for the non-ionic.

Organisms were exposed to the surfactants for 120 h and then transferred to clean water where they remained for 48 h for the depuration experiment.

Preparation of samples

At the end of each phase, the organisms were sampled and dissected, conserving the gills. Around 3 g of gills from different organisms exposed to the same concentration were weighed, washed with KCl (1%), buffered with Tris-HCl at a weight:volume ratio of 1:4 and homogenized with Ultraturrax. The tampon used was 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 150 mM KCl, supplemented daily with 1 mM DDT, 1mM EDTA and 0.1 mM PMSF. The homogenate was centrifuged at 500 g for 10 min at 4°C. After eliminating the lipidic layer and unwanted organules, it was centrifuged again at 10,000 g for 20 min. The supernatant was collected and stored at -80°C until further analysis.

Enzymes

Total proteins were determined using the method proposed by Bradford (1976).

The activity of CAT was determined according to the decrease in the concentration of hydrogen peroxide, measuring the reduced absorbency at 240 nm (Aebi 1984), expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$.

The activity of AcP and ALP was determined following the method described by Blasco *et al.* (1993) and the results are expressed in $\text{U mg}^{-1} \text{proteins}$ ($\text{U} = 1 \mu\text{mol p-nitrophenol min}^{-1}$). The measurements were taken with a Versamax multiplate reader at 405 nm and the values were corrected for the wavelength passage in 350- μL microplates.

Statistical analysis

The statistical analysis was done using SPSS 11.5 for Windows. An analysis of variance was performed to compare the results and Tukey's *a posteriori* test was applied to compare the means. The significance level to establish differences was $P < 0.05$.

Results and discussion

Figure 3 shows the total protein content of the organisms used in each assay, measured in the supernatant collected after the second centrifugation of the samples, and does not reflect any alteration in the proteic metabolism. In both cases, the protein levels were very similar and significant differences

resultados están expresados en $U\text{ mg}^{-1}$ proteínas ($U = 1\ \mu\text{mol p-nitrofenol min}^{-1}$). Las medidas se realizaron con un lector multiplaca Versamax a 405 nm y los valores fueron corregidos por el paso de longitud de onda en microplacas de 350 μL .

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando SPSS 11.5 para Windows. Para la comparación de los resultados se empleó el análisis ANOVA, y como test *a posteriori*, el de Tukey, para comparación de medias. El nivel de significancia para establecer diferencias fue $P < 0.05$.

Resultados y discusión

La figura 3 muestra el contenido total de proteínas en los organismos empleados en cada ensayo, medido en el sobrenadante recogido tras la segunda centrifugación de las muestras, el cual no refleja ninguna alteración en el metabolismo proteico. En ambos casos, los niveles protéicos son muy similares y sólo se encuentran diferencias significativas ($P < 0.05$), al quinto día, (fig. 3a) entre los organismos control y los expuestos a una concentración de $190\ \mu\text{g L}^{-1}$ de C_{11}LAS . Se calculó la concentración de proteínas para normalizar los valores de actividad específica obtenidos con los diferentes biomarcadores.

Los efectos de ambos tensioactivos sobre la actividad catalasa específica en branquias de *R. philippinarum* se representan en la figura 4. Al final de la fase de exposición o incorporación de tensioactivo (día 5) no se observan diferencias significativas para ninguno de los tensioactivos utilizados. Sin embargo, al finalizar la etapa de depuración, existen variaciones notables aunque con diferente efecto según el compuesto usado. Para el bioensayo realizado con C_{11}LAS (día 7) (fig. 4a), se observa una mayor actividad enzimática en los extractos de los organismos expuestos a la menor concentración. Existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los organismos control y los expuestos a la concentración menor. Al aumentar la concentración a la que fueron expuestos los organismos se observa un descenso en la actividad, e incluso en los organismos expuestos a la mayor concentración los valores son similares a los obtenidos en el control.

En el pez *Prochilodus scrofa* expuesto *in vitro* a Triton X-100, Da Silva y Meirelles (2004) observaron que la actividad CAT aumentó en presencia del tensioactivo. No obstante, en ese caso la interacción entre el tensioactivo y la proteína se produce de manera directa, mientras que en el experimento con *R. philippinarum* esta interacción es mediada por los procesos metabólicos del organismo. La hipótesis planteada por estos autores es que se forman micelas mixtas, quedando la enzima encapsulada dentro de ellas, por tanto se genera un ambiente hidrofóbico que cambia el equilibrio termodinámico aumentando la velocidad de degradación del H_2O_2 (Da Silva y Meirelles 2004).

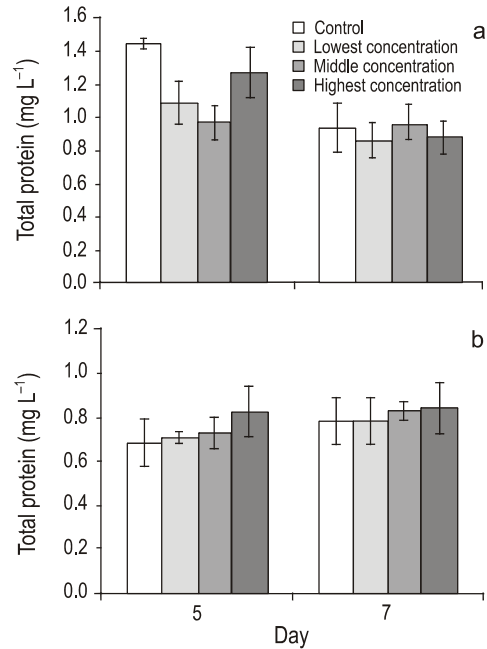


Figura 3. Proteínas totales (mg L^{-1}) en *Ruditapes philippinarum* expuesto a $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ (a) y $\text{NPEO}_{2.8}$ (b).

Figure 3. Total proteins (mg L^{-1}) in *Ruditapes philippinarum* exposed to $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ (a) and $\text{NPEO}_{2.8}$ (b).

($P < 0.05$) were only observed on day 5 between the control organisms and those exposed to a concentration of $190\ \mu\text{g L}^{-1}$ of $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ (fig. 3a). The concentration of proteins was calculated to normalize the specific activity values obtained using the different biomarkers.

The effects of both surfactants on specific CAT activity in the gills of *R. philippinarum* are represented in figure 4. At the end of the exposure phase (day 5), no significant differences were observed for either of the surfactants used; however, at the end of the depuration phase (day 7), significant variations were found though with a different effect depending on the compound used. In the bioassay using $\text{C}_{11}\text{-LAS}$ (fig. 4a), the organisms exposed to the low concentration showed greater enzymatic activity. There was a significant difference ($P < 0.05$) between the control organisms and those exposed to the low concentration. As the concentration increased, the activity decreased and the values obtained for the organisms exposed to the high concentration were similar to those obtained for the controls.

In the fish *Prochilodus scrofa* exposed *in vitro* to Triton X-100, Da Silva and Meirelles (2004) observed that CAT activity increased in the presence of the surfactant; however, in that case the interaction between the surfactant and protein occurred directly, whereas in this study with *R. philippinarum* the interaction was governed by the metabolic processes of the organism. The hypothesis offered by these authors is that mixed micelles are formed, the encapsulated enzyme remaining within them. A hydrophobic environment is thus created

Con el NPEO_{2.8} (fig. 4b) se observó un descenso de la actividad CAT al día 7 ($P < 0.05$) en los extractos de los organismos expuestos a la mayor concentración. Esta inhibición de la CAT sugiere una acumulación de H₂O₂, lo cual puede agravar el estrés oxidativo. Este comportamiento también fue descrito por Da Silva y Meirelles (2004) con el tensioactivo Tween 80.

Respecto a CAT se observa que el efecto del NPEO_{2.8}, el tensioactivo más apolar con una $\log K_{ow} = 4.2$ (Ahel y Giger 1993), es la inhibición. Sin embargo, con C₁₁LAS, cuyo $\log K_{ow} = 3.32$ (HERA 2004), más polar, la enzima se activa. Da Silva y Meirelles (2004) observaron un efecto similar con dos tensioactivos no iónicos ensayados.

La figura 5 muestra la actividad específica de AcP y ALP en branquias de *R. philippinarum* expuestas a los dos tensioactivos ensayados. Los valores de actividad obtenidos para AcP son mayores que para ALP con ambos compuestos, lo que concuerda con la bibliografía (Blasco *et al.* 1993), excepto en el caso de C₁₁LAS al final de la depuración (día 7; fig. 5a, b), cuando se observa un efecto contrario en los organismos expuestos a las dos concentraciones mayores.

Con ninguno de ambos tensioactivos se han observado variaciones significativas en la actividad durante la etapa de exposición al tóxico (día 5). En la fase de eliminación (día 7), existen diferencias significativas en AcP respecto al control ($P < 0.05$) en los organismos en los que se han medido concentraciones intermedia y mayor de C₁₁LAS, produciéndose una fuerte inhibición de la enzima (fig. 5a), efecto también encontrado por Blasco *et al.* (1999). Sin embargo, a estas mismas concentraciones (media y mayor) se produce una fuerte activación de ALP.

that changes the thermodynamic equilibrium, increasing the speed of degradation of hydrogen peroxide (Da Silva and Meirelles 2004).

In the bioassay with NPEO_{2.8} (fig. 4b), a decrease in CAT activity was observed on day 7 ($P < 0.05$) in the extracts of the organisms exposed to the high concentration. This inhibition of CAT suggests an accumulation of hydrogen peroxide, which could aggravate oxidative stress. This behaviour was also described by Da Silva and Meirelles (2004) for the Tween 80 surfactant.

Thus, with respect to CAT, NPEO_{2.8}, the more apolar surfactant with a $\log K_{ow} = 4.2$ (Ahel and Giger 1993), has an inhibitory effect, but in the case of C₁₁-LAS, the more polar surfactant with a $\log K_{ow} = 3.32$ (HERA 2004), the enzyme is activated. Da Silva and Meirelles (2004) observed a similar effect using two non-ionic surfactants.

Figure 5 shows the specific activity of AcP and ALP in gills of *R. philippinarum* exposed to C₁₁-LAS and NPEO_{2.8}. The activity values obtained for AcP were higher than those for ALP in both cases. This agrees with that reported in the literature (Blasco *et al.* 1993), except in regard to C₁₁-LAS at the end of the depuration phase (day 7; fig. 5a, b), when an opposite effect was observed in the organisms exposed to the two higher concentrations.

No significant variations in activity were observed during the exposure phase using either surfactant (day 5), but in the depuration phase (day 7) significant differences ($P < 0.05$) were found relative to the controls. In the organisms exposed to the intermediate and high concentrations of C₁₁-LAS, AcP was strongly inhibited (fig. 5a), an effect that was also observed by Blasco *et al.* (1999); however, at these same concentrations (intermediate and high), ALP was strongly activated.

In the NPEO_{2.8} bioassay, both enzymes showed a similar tendency. At the end of the depuration phase (day 7) there was an increase in activity relative to the controls in the organisms exposed to the high concentration, though this difference was only significant ($P < 0.05$) for AcP (fig. 5c, d).

No significant variations were observed in the activity of any of the three enzymes assayed during the exposure phase. All the alterations occurred in the depuration phase. The percentages of depuration obtained after 48 h were 99.9% for C₁₁-LAS and 94% for NPEO_{2.8}. Given these high percentages of depuration, during the biotransformation and elimination of the surfactant by the organism, the intermediate degradation products that are formed, i.e. sulphophenyl carboxylates (SPCs) in the case of LAS and polyethyleneglycols (PEGs) in the case of NPEO, may have a greater effect on the enzymatic activity (inhibition or activation depending on the case) than the original compounds. Greater effects are produced at higher concentrations of the original compounds measured in the organisms, thus resulting in higher concentrations of the intermediate degradation products.

The most notable differences were therefore observed in the depuration phase, indicating that the effect is produced with

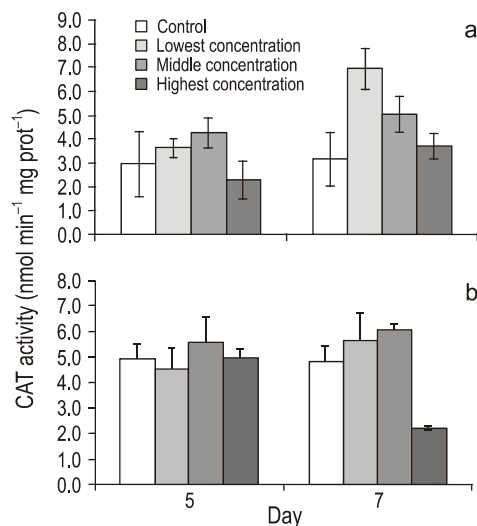


Figura 4. Actividad catalasa específica (nmol min⁻¹ mg prot⁻¹) medida en branquias de *Ruditapes philippinarum* expuesto a C₁₁-LAS (a) y NPEO_{2.8} (b).

Figure 4. Specific catalase activity (nmol min⁻¹ mg prot⁻¹) measured in gills of *Ruditapes philippinarum* exposed to C₁₁-LAS (a) and NPEO_{2.8} (b).

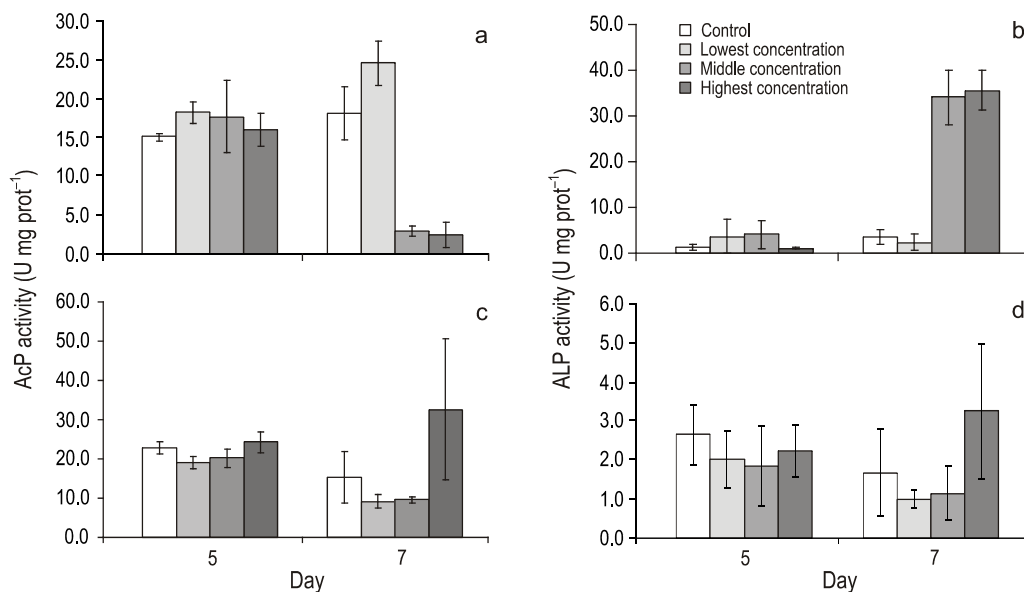


Figura 5. Fosfatasa ácida en *Ruditapes philippinarum* expuesto a C₁₁-LAS (a) y a NPEO_{2.8} (c). Fosfatasa alcalina en organismos expuestos a C₁₁-LAS (b) y a NPEO_{2.8} (d). Ambas medidas fueron realizadas en branquias y expresadas en U mg⁻¹ proteínas.

Figure 5. Acid phosphatase (AcP) in *Ruditapes philippinarum* exposed to C₁₁-LAS (a) and NPEO_{2.8} (c). Alkaline phosphatase (ALP) in *R. philippinarum* exposed to C₁₁-LAS (b) and NPEO_{2.8} (d). Both enzymes were measured in gills and the values are given in U mg⁻¹ proteins.

Los resultados obtenidos con NPEO_{2.8} muestran una tendencia similar en ambas enzimas. Al final de la fase de depuración (día 7) existe un aumento de la actividad con respecto al control en los organismos expuestos a la mayor concentración, siendo esta diferencia significativa ($P < 0.05$) sólo para AcP (fig. 5c, d).

No se observaron variaciones significativas en la actividad de ninguna de las tres enzimas ensayadas durante la fase de exposición al tóxico, todas las alteraciones se han visto reflejadas en la fase de depuración. El porcentaje de depuración alcanzado tras 48 h en el caso del tensioactivo aniónico fue de 99.9% y de 94% en el del no iónico. Dado el elevado porcentaje de depuración en ambos casos, lo que puede suceder es que en la etapa de biotransformación y eliminación del tensioactivo por el organismo, los productos intermedios de degradación que se forman, ácidos sulfonilcarboxílicos (SPCs) en el caso del LAS y polietilenglicoles (PEGs) en el de NPEO, produzcan un mayor efecto sobre las actividades enzimáticas (inhibición o activación según sea el caso) que los compuestos originales, observándose mayores efectos a mayores concentraciones de los compuestos originales medidas en los organismos, las cuales darán lugar, por consiguiente, a mayores concentraciones de los productos intermedios de degradación.

Por tanto, las diferencias más notables se observaron en la fase de depuración, lo que implica que el efecto se produce con un desfase de tiempo. Es posible que el proceso de biotransformación de los compuestos en otros más polares, y la consiguiente liberación de radicales que modifican la actividad enzimática, se de con mayor intensidad en este periodo de la

a time shift. It is possible that the biotransformation of compounds into more polar products and the subsequent freeing of radicals that modify the enzymatic activity occurs with greater intensity in this experimental period and produces the differences observed. Further research is necessary to establish the relationship between degradation products and enzymatic activities.

Acknowledgements

The authors thank PETRESA SA for financial support (OT 143/02), the staff at the marine culture facilities of CASEM for their assistance during the experiments, and F. Ventura (AgBar) for providing the NPEO standards.

English translation by Christine Harris.

experimentación y sea la causa de las diferencias observadas. En este sentido es necesario llevar a cabo investigaciones que permitan establecer la relación entre los productos de degradación y las actividades enzimáticas.

Agradecimientos

Los autores agraden a PETRESA SA por la financiación de este trabajo (OT 143/02), al personal de la Planta de Cultivos Marinos del CASEM, donde se ha desarrollado la parte experimental, por la ayuda prestada, y a F Ventura (AgBar) por facilitar los patrones de NPEO.

Referencias

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121–126.
- Ahel M, Giger W. 1993. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26: 1471–1478.
- Barbieri E, Oliveira IR, Serralheiro PCS. 2002. The use of metabolism to evaluate the toxicity of dodecyl benzene sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (mullet) according to the temperature and salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 277: 109–127.
- Blasco J, Puppo J, Sarasquete MC. 1993. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Biol.* 115: 113–118.
- Blasco J, González-Mazo E, Sarasquete C. 1999. Linear alkylbenzene sulphonates (LAS) and bioaccumulation of heavy metals (Cu and Pb) in *Ruditapes philippinarum*. *Toxicol. Environ. Chem.* 71: 447–456.
- Blasco J, Hampel M, Moreno-Garrido I. 2002. Toxicity of Surfactants for Aquatic Life. Ed. Knepper.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Bressan M, Brunetti R, Casellato S, Fava GC, Giro P, Marin M, Negrisolo P, Tallandini L, Thomann S, Tosani L, Turchetto M. 1989. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on benthic organisms. *Tens. Surfact. Det.* 26: 148–157.
- Da Ros L, Nasci C, Campesan P, Sartorello G, Stocco G, Menetto A. 1995. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and cadmium on the digestive gland of mussel, *Mytilus* sp. *Mar. Environ. Res.* 39: 321–324.
- Da Silva MEF, Meirelles NC. 2004. Interaction of non-ionic surfactants with hepatic CYP in *Prochilodus scrofa*. *Toxicol. In Vitro* 18: 859–867.
- European Eco-Label. 2002. Revision of Eco-label Criteria for Laundry Detergents, DHI Water & Environment dk Teknik, Energy & Environment.
- Gupta BN, Mathur AK, Argawal C, Singh A. 1989. *In vitro* effect of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on some enzymes in liver and gills of the teleost *Channa punctatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 375–381.
- HERA. 2004. Human and Environmental Risk Assessment: Linear Alkylbenzene Sulphonate, LAS (CAS No. 68411-30-3).
- Hofer R, Jeney Z, Bucher F. 1995. Chronic effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry at water criteria limits. *Wat. Res.* 29: 2725–2729.
- Lewis MA. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: A review and risk assessment. *Wat. Res.* 25: 101–113.
- Lewis MA. 1992. The effects of mixtures and other environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to fresh water and marine life. Review paper. *Wat. Res.* 26(8): 1013–1023.
- Misra V, Kumar V, Pandey SD, Viswanathan PN. 1991. Biochemical alterations in fish fingerlings (*Cyprinus carpio*) exposed to sublethal concentrations of linear alkyl benzene sulphonate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 514–517.
- OECD. 1996. Bioconcentration flow-through fish test. OECD, guideline 305.
- Ram RN, Sathyanesan AG. 1985. Mercuric chloride, cythion and ammonium sulphate induced changes in the brain, liver and ovarian alkaline phosphatase content in the fish *Channa punctatus*. *Environ. Ecol.* 3: 263–268.
- Sáez M, León VM, Gómez-Parra A, González-Mazo E. 2000. Extraction and isolation of linear alkylbenzene sulfonates and their intermediate metabolites from various marine organisms. *J. Chromatogr. A* 889: 99–104.
- Servos MR. 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Wat. Qual. Res. J. Canada* 34: 123–177.
- Sparks JW, Brautigan DL. 1986. Molecular basis for substrate specificity of protein kinases and phosphatases. *Int. J. Biochem.* 18: 497–504.
- Swedmark M, Braaten B, Emanuelson E, Granmo A. 1971. Biological effects of surface active agents on marine animals. *Mar. Biol.* 9: 183–201.
- Zhao M, Van der Wielen F, De Voogt P. 1999. Optimization of a matrix-solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylate in biological tissues. *J. Chromatogr. A.* 837: 129–138.

*Recibido en abril de 2005;
aceptado en marzo de 2006.*