



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETERMINACION DE LA GENOTOXICIDAD DE
OSTIONES CONTAMINADOS DE LAGUNA DE LA
MANCHA, VER. Y DE TERMINOS, CAMP. EN
Drosophila melanogaster y *Salmonella typhimurium*.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE
SISTEMAS Y RECURSOS ACUATICOS)
P R E S E N T A
BIOL. YOLANDA CITLALI GUERRERO CARBAJAL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. ESTHER DE LA ROSA DUQUE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica que he recibido.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, por permitir que tenga un desarrollo profesional.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque, por su apoyo, confianza, disponibilidad y comentarios en la dirección de esta tesis. Así como a la M. en C. Matilde Beña Valle, por su orientación, dedicación y confianza brindados durante todo el desarrollo de este trabajo, por que sus comentarios corresponden a los de una codirección.

Por la revisión y comentarios para enriquecer esta tesis, al Dr. Antonio García-Cubas, Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque, Dra. Martha Reguero Reza, Dr. Alfonso Vázquez Botello, Dra. Sonia Espina, M. en C. Matilde Breña Valle y M. en C. Emilio Pimentel Peñalosa. Muy especialmente a la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez, por que sus observaciones detalladas definieron el manuscrito final y su interés en mi formación académica.

Al M. en C. Francisco Vera y a todo el personal de la Estación de Ciudad del Carmen, Camp. por el apoyo logístico y facilidades prestadas.

A la Biol. Martha Patricia Cruces Martínez, por su asesoría y comentarios en los experimentos de *Drosophila*. Dr. Gilberto Díaz González por la información que siempre me facilitó, por su desinteresado apoyo y amistad. M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora por toda su disponibilidad y amistad. Dr. Roberto Arregín por sus comentarios.

Por el apoyo técnico del Sr. Juan Antonio Correa Ortiz y Sra. Guadalupe Martínez Cerón.

Al P. de Biol. Carlos Córdova Tellez, por su ayuda en la edición del trabajo.

A la Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque, Lic. Jorge Carbajal Poiré y Sra. Yolanda Carbajal Poiré, por su valiosa aportación y apoyo en la realización de los muestreos.

Y cuando te hayas consolado (siempre se encuentra consuelo) estarás contento de haberme conocido. Serás siempre mi amigo. Tendrás deseos de reír conmigo. Y abriras a veces tu ventana, así... por placer... Y tus amigos se asombrarán al verte reír mirando al cielo, entonces les dirás: "Sí, las estrellas siempre me hacen reír" y ellos te creeran loco.

"El Principito"

Antoine de Saint Exupery.

DEDICATORIA

A mi tío Lic. Jorge Carbajal Poiré, a mi mamá Sra. Yolanda Carbajal Poire, a mi hermano Cuiclahuac Guerrero Carbajal, a mi abuelita Raquel Poiré de Carbajal, porque me enseñaron que hay que vivir con valor y honestidad y su de cariño siempre me han impulsado a continuar.

A mis amigos Ma. Teresa Mendiola Cruz, Ma. Esther Martínez Pardo, Jose Luis González Marroquín, Carlos Cordova Téllez, Samuel Gómez Noguera, Hancel Díaz Soto por sus comentarios y palabras de apoyo en todo momento. Muy especialmente al M. en C. Germán Piña Villalpando.

INDICE

	pag.
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Antecedentes.....	6
Area de Estudio.....	12
1. Laguna de Términos, Camp.....	12
2. Laguna La Mancha, Ver.....	15
Método.....	18
Resultados.....	27
Discusión.....	37
Conclusiones.....	48
Anexo.....	49
Referencias.....	53

INDICE DE TABLAS

Resultados

I Prueba en bacterias con la Fracción Total.....	29
II Prueba en bacterias con la Fracción Polar.....	30
III Prueba en bacterias con la Fracción No Polar.....	31
IV Manchas en las alas de la mosca.....	32
V Viabilidad relativa de larvas contra sacarosa.....	33
VI Viabilidad relativa de larvas contra etanol.....	33
VII Comparación entre los sistemas de SMART y Ames.....	34
VIII Metales Pesados en ostión.....	35
IX Metales Pesados en sedimento.....	36
Contaminantes	
IX Hidrocarburos.....	39
X Plaguicidas Organoclorados y Carbamidas.....	41
XI Plaguicidas Organofosforados.....	42
XII Fungicidas y Fumigantes.....	43
XIII Herbicidas.....	44

RESUMEN

Los ostiones son bivalvos bentónicos que acumulan sustancias diversas cuyo efecto nocivo puede evidenciarse tanto en el ostión mismo como en otros organismos de la cadena alimentaria. Diversas investigaciones indican que los ostiones recolectados en distintos puntos a lo largo del Golfo de México presentan niveles importantes de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, muchos de los cuales son genotóxicos. A pesar de lo anterior es poco lo que se ha investigado en cuanto a la presunta genotoxicidad de estos compuestos bioacumulados en los organismos. En el presente estudio se examinó el efecto mutagénico de fracciones obtenidas de tejidos de ostión colectado de las lagunas de Términos, Camp. y La Mancha, Ver., utilizando los sistemas de prueba de Ames en *Salmonella typhimurium* y el ensayo SMART en *Drosophila melanogaster*. Se efectuaron 3 muestras de ostión, recolectadas a lo largo de un ciclo anual, uno en cada una de las temporadas de secas, lluvias y nortes. Se prepararon 3 fracciones a partir de tejido de ostión liofilizado: total (FT), en etanol y dos fracciones más, polar (FP) y no polar (FNP) que se separaron y concentraron mediante resinas de amberlita (XAD-2). Diferentes diluciones se probaron en *Salmonella typhimurium* en las cepas TA98 y TA100 con y sin activación metabólica. Para el caso de *D. melanogaster* sólo se utilizó la concentración más alta de la fracción total, en larvas *mwh/flr*. Los resultados indican efecto mutagénico en ambos sistemas, especialmente en *Salmonella*, previa activación metabólica en casi todos los casos. Además se observó que las muestras de Laguna de Términos tienen mayor efecto, lo que hasta cierto punto era de esperarse ya que este sitio presenta niveles mayores de contaminación. Se desconoce cuál o cuáles puedan ser los contaminantes genotóxicos, pero en vista de que sólo en las fracciones total y polar con activación metabólica se observó efecto y de que la región aledaña se dedica a actividades agrícolas, se sugiere que los residuos de pesticidas introducidos a la laguna pudieran ser los responsables.

ABSTRACT

Oysters are benthic bivalves prone to concentrate substances, many of them noxious to either the oyster itself or to other organisms along the food chain. Several reports indicate that oysters collected at different points along the Gulf of Mexico coast accumulate organic and inorganic pollutants. Nevertheless, little has been studied concerning the potential genotoxicity of these bioaccumulated compounds. The present work examines the mutagenic effect of different fractions obtained from the tissues of oysters collected at two locations : Laguna de Términos, Campeche and Laguna de La Mancha, Veracruz by means of the Ames test in *Salmonella typhimurium* and the SMART assay in *Drosophila melanogaster*. Three samplings comprising a whole year, were made and include the dry, the rainy and the "nortes" seasons. Three fractions from lyophilized oysters: total (FT) in ethanol, polar (FP) and non polar (FNP). The latter two, separated through amberlite resins (XAD-2) and further concentrated. Several dilutions were tested in strains TA98 and TA100 of *S. typhimurium* with and without metabolic activation. In the case of *D. melanogaster* only the highest concentration from the ethanolic fraction was used. The results show mutagenic effect in both systems, especially in *Salmonella* after metabolic activation by S9 microsomes. Samples from Laguna de Términos were generally more active, a fact not totally unexpected since this place is heavily polluted. The causal agent or mixture is unknown, nevertheless due to the fact that the mutagenic effect was mainly indirect and that the surrounding locations are mostly agricultural, it is suggested that it might be due to pesticide residues carried by river flows into the estuary.

INTRODUCCION

La introducción de diversas sustancias en el ambiente y los organismos, incluyendo al hombre alteran las actividades (pesca, agricultura, etc.) y reducen el valor recreativo y la calidad del agua, suelo y aire (Joint Group of the Scientifics of Marine Pollution, 1977). Genéricamente estas sustancias ajenas a los sistemas son llamadas xenobióticas o contaminantes (Livingston, 1985).

En la zona costera el problema de contaminación es causado por las actividades urbano-industriales. Así las grandes cantidades de sustancias y agentes físicos vertidos al ambiente acuático pueden ser peligrosas para los organismos, ya sea de manera directa, por contacto o en el alimento; o bien al depositarse en el sedimento o al quedarse en la columna de agua, donde pueden permanecer inertes y posteriormente ser activados tomando una forma química biodisponible (Parry *et al.*, 1976). En el ambiente acuático, los organismos asimilan todos los contaminantes, debido a que las células incorporan los elementos aún en contra del gradiente de concentración y sin tomar en cuenta las necesidades (Valkovic, 1980).

Los organismos acuáticos presentan distintos niveles de contaminantes, resultado de la temporalidad, forma de los compuestos, fisiología, entre otros. La temporalidad se refiere a los cambios climáticos que influyen en la aportación de distintas cantidades de xenobióticos, o bien a los ciclos reproductivos asociados (Livingstone, 1985). La especiación química se refiere básicamente a que un contaminante puede estar en forma de complejo, reducida, particulada, disuelta, entre otros, pero la respuesta de un organismo no depende sólo de ello, ya que la "especie química" puede adoptar diversas formas (Nelson y Donkin, 1985), dependiendo de la estructura molecular, solubilidad en el agua, presión de vapor, constante de hidrólisis, fotólisis, degradación biológica y capacidad de eliminación de los organismos (Nelson y Donkin, 1985).

Los organismos presentan distintos tipos de respuestas fisiológicas para la eliminación, detoxificación o transformación de agentes xenobióticos mediante sistemas enzimáticos (Livingston, 1985). Así, los organismos, por diversos mecanismos y pueden regular o almacenar en 10^3 a 10^6 veces por encima de los valores que se encuentran en el agua que les rodea (Rosas *et al.*, 1983); las especies nectónicas pueden desplazarse de zonas altamente

contaminadas a otras relativamente exentas de agentes xenobióticos y eliminar los excesos. En comparación, las especies bentónicas son extremadamente tolerantes a los contaminantes ambientales, ya que en muchas ocasiones se ven forzadas a asimilar grandes cantidades de éstos (Sunila, 1988). A nivel poblacional, los efectos se registran primeramente en la trama trófica, en los sistemas acuáticos ésta es una de las rutas más importantes en la transferencia de contaminantes, en general, tienen la particularidad de ser muy estables, acumularse y ser transferidos entre los distintos grupos de organismos (Aoyama *et al.*, 1978; Kadhim y Parry, 1984; Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). Otra forma de acumulación de los organismos es por exposición directa y asimilación en los organismos, los peces bentónicos y moluscos, que se alimentan por filtración y que tienen digestión intracelular, son capaces de concentrar casi cualquier clase de sustancia xenobiótica dentro de los tejidos corporales, por lo que son considerados excelentes indicadores de contaminación ambiental (Parry *et al.*, 1976; Livingston *et al.*, 1989).

Sin embargo, durante las transformaciones metabólicas, los intermediarios electrofílicos pueden ser más genotóxicos que los compuestos originales (Livingston, 1985). Los compuestos tóxicos son los que pueden producir una respuesta adversa en un sistema biológico, dañando seriamente su estructura o función y en algunos casos provocar la muerte (Rand y Petrocelli, 1985) y el efecto puede variar dependiendo del tipo de contaminante, el tiempo de exposición y la especie del organismo (Rand y Petrocelli, 1985; Kwan *et al.*, 1989).

El agente genotóxico puede ser físico, químico o biológico, actúa alterando la información genética (Brusick, 1987). La genética toxicológica identifica y analiza la actividad tóxica que actúa directamente en los componentes heredables de los sistemas vivos. El daño genotóxico se presenta cuando el organismo se encuentra sometido a concentraciones que al interactuar con los ácidos nucleicos, se producen alteraciones en los elementos genéticos (Brusick, 1987). La exposición a sustancias genotóxicas afecta a los organismos en distintas formas, el daño puede inducir muerte celular en los gametos en división, provocar la muerte de los embriones o anomalías en las generaciones siguientes, causado por mutaciones dominantes y letales recesivas, y finalmente puede presentarse cáncer. Muchas de estas especies expuestas son de importancia comercial y su destino final es el consumo humano, pero se desconoce su potencial genotóxico. Por ello se han desarrollado distintas clases de bioensayos que puedan proporcionar información del agente responsable y/o del efecto genotóxico en dichos organismos (Botello, 1982). Los bioensayos de genotoxicidad ayudan en

la estimación del efecto ecológico de los agentes químicos vertidos a los ecosistemas naturales y utilizan diversos tipos de organismos como bacterias, algas, moluscos y peces (Patrick, 1973; Becking, 1979; Rodríguez-Ariza, 1992).

El empleo de pruebas de genotoxicidad y determinación de agentes xenobióticos deben de complementarse entre sí, para tratar de establecer el comportamiento de las sustancias genotóxicas en las distintas épocas del año. Para la detección del posible efecto genotóxico en los ambientes acuáticos, se pueden utilizar extractos a partir de agua (Langevin *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1993), sedimento (Muller y Anderson, 1991) u organismos (Sparks *et al.*, 1981; Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992) y probarse en los sistemas de SMART, Ames o Cromoensayo, entre otros. El extracto en este caso es el agente genotóxico a probar y es el que refleja hasta cierto punto las condiciones ambientales al momento del muestreo.

OBJETIVOS

1. Determinar si los extractos del liofilizado de ostiones colectados en las lagunas de La Mancha, Ver. y de Términos, Camp., son genotóxicos en dos sistemas biológicos: *Salmonella typhimurium* (prueba de Ames) y en *Drosophila melanogaster* (prueba SMART).
2. Relacionar el presunto efecto genotóxico con el grado de contaminación, a lo largo de un ciclo anual en las Lagunas.

ANTECEDENTES

La respuesta biológica de los organismos expuestos a contaminantes se puede manifestar en diversas formas, una de ellas es el posible daño al ADN (Nacci *et al.*, 1992). Los bivalvos, dadas sus características biológicas, pueden ser utilizados como indicadores indirectos o como inductores de posible daño causado por contaminantes genotóxicos.

Se ha determinado el daño genético en las células de bivalvos al probar compuestos químicos cuyo mecanismo de acción, como sustancia pura, son conocidos. Sin embargo, en esa forma los compuestos no son representativos de la situación en el ambiente (Shugart, 1989; Viarengo y Canesi, 1991), aunque son punto de partida para desarrollar métodos de evaluación de los contaminantes en el ecosistema ya que se pueden hacer inferencias del comportamiento químico, temporalidad y residencia de los mismos (Sparks *et al.*, 1981; Viarengo y Canesi, 1991).

Se ha observado que bajo condiciones de exposición ambiental o de laboratorio los invertebrados acuáticos, ya sea durante el estado larvario o bien de adultos, pueden presentar frecuencias significativas de intercambios de cromátidas hermanas (Pesch y Pesch, 1980; Dixon, 1983; Muller y Anderson, 1991); también pueden desarrollar neoplasmas en distintos tejidos como el epitelio del sistema renal, branquias y gónadas entre otros (Gardner y Yevich, 1991).

En el liofilizado de ostión proveniente del canal del Chijol, Ver., contaminado por hidrocarburos, no se encontró efecto genotóxico con la prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophilla melanogaster* (Olvera *et al.*, 1990). Posteriormente, con la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), el resultado fue inconcluso (Olvera *et al.*, 1992). En experimentos realizados con el ensayo en *Salmonella typhimurium* y el protocolo de preincubación (que consiste en exponer a las bacterias en un medio con pocas sales minerales para que los iones metálicos sean incorporados a la bacteria), el resultado fue negativo. Al emplear la prueba tradicional de Ames con activación metabólica se observó un leve efecto mutagénico, aún cuando no se pudo establecer efecto de dosis-respuesta (Frias *et al.*, 1990). Posteriormente se efectuaron pruebas a partir de microextracciones de hidrocarburos y

metales pesados provenientes de liofilizado de ostión y no se observó efecto genotóxico en ninguna de las pruebas tanto de *Salmonella typhimurium* como de *E. coli*. Es posible suponer que, el tiempo transcurrido entre la fecha de recolecta del ostión y la de experimentación influyó en estos resultados por lo cual se sugirió realizar recolectas sistemáticas de ostión para así poder establecer con mayor seguridad la posible genotoxicidad ambiental. Se sabe que los moluscos filtradores acumulan gran cantidad de contaminantes y pueden ser agentes inductores de genotoxicidad (Santiago-Hernández, 1993).

Al probar extractos de organismos estuarinos provenientes de una zona con actividad petrolera de Florida, se detectó actividad mutagénica directa a través del sistema de Ames para *Salmonella typhimurium*, (Sparks *et al.* 1981). Simultáneamente y al analizar distintas fracciones de bivalvos, de las costas del sur de España, se encontraron sustancias genotóxicas de acción directa en la fracción polar y de tipo oxidativo (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). Al usar levaduras como sistema de detección, el extracto de mejillón en dos estudios independientes, uno en la zona de intermarea en el norte de Gran Bretaña y el otro en la laguna de Venecia en Italia, se observó que existe actividad mutagénica directa y relación de dosis-respuesta (Parry *et al.*, 1976; Frezza *et al.*, 1982).

ANTECEDENTES SOBRE CONTAMINACION.

LAGUNA DE TERMINOS, CAMP.

Los estudios de contaminación en la Laguna de Términos, Camp. son muy amplios y variados. Rosales y Alvarez (1979), realizaron un estudio en el que se determinó la concentración de insecticidas organoclorados y bifenilidos policlorados BPC de las lagunas del Golfo de México, incluyendo la Laguna de Términos, Camp., sin embargo no se hace referencia específica sobre los contaminantes en esta laguna. En general, mencionan que los BPC se encontraron en mayor cantidad en las muestras de tejido de ostión de zonas con influencia antropogénica y con ello se demuestra que la distribución es a lo largo de la costa. De los insecticidas, el DDT y el dieldrin están presentes en todas las muestras de ostión de las zonas asociadas a

actividades agrícolas, mientras que los otros compuestos organoclorados se encuentran en menor cantidad.

Después del derrame petrolero del pozo Iztoc-I, se evaluó su magnitud y los efectos posteriores en la biota el mayor impacto fue en la zona costera y no sobre los organismos marinos. Los hidrocarburos totales que se determinaron en el sedimento del área lagunar antes del accidente son menores a los posteriores al derrame. Sin embargo, este aumento se le atribuye a la producción natural de hidrocarburos y no al derrame del pozo Iztoc-I, ya que las mayores concentraciones se localizan en las desembocaduras de los ríos, en las praderas de pastos marinos y en el área de manglar y no en el centro de la laguna, donde los valores son menores, ya que las corrientes intralagunares no permiten la sedimentación de material orgánico (Botello *et al.*, 1981).

En otro estudio el ostión de la Laguna de Términos, Camp. fue empleado como bioindicador, en él se determinó que la contaminación es provocada por las descargas de la industria azucarera y petroquímica, así como por las actividades de explotación y refinación del petróleo. Los niveles de metales como el Cd, Cr, Hg y Pb en agua, se encuentran por debajo de los límites recomendados para la protección de la vida acuática, pero en los bivalvos se observó que se concentran grandes cantidades de metales, principalmente Cd y Pb además de otros elementos que son acumulados en el siguiente orden decreciente: Cd>Zn>Fe>Cr>Ag>Cu>Hg=Ni>Pb>V>Mo (Rosas *et al.*, 1983).

En 1988, Botello y Villanueva determinaron que en este cuerpo de agua interior, el grupo de los contaminantes que varían constantemente son los hidrocarburos, como consecuencia de las actividades petroleras en la Sonda de Campeche. La acumulación es principalmente en el sedimento, agua y pastos marinos. Las determinaciones de plaguicidas están asociadas a las actividades ganaderas y agrícolas, pero los valores de concentración se encontraron menores que los considerados como riesgosos para la biota. Las variaciones de concentración de metales se observaron dentro de los intervalos considerados como naturales en agua, sedimento, ostión y pastos marinos, ya que en esa época no se detectó ningún aporte significativo por rutas antropogénicas. En este informe se señala como el problema más importante de contaminación a la incidencia bacteriana, principalmente en el ostión y en el agua cercana a las zonas pobladas. Las bacterias potencialmente patógenas que se han aislado del ostión en la Laguna de Términos son *Escherichia coli* y *Plesiomonas shigelloides*

(Rosas *et al.*, 1985). En el agua de los centros ostrícolas del Golfo de México, el número de coliformes totales y fecales sobrepasa en varios ordenes de magnitud los límites establecidos para su consumo y está relacionado con las descargas domésticas (Rosas *et al.*, 1985; Pica, 1988).

En 1992, en un análisis de metales, se demostró que los niveles de estos contaminantes van en aumento. Sobrepasan el límite máximo permisible (LMP) para agua costera elementos como el Pb (0.006 mg/l), Cd (0.0009 mg/l) y Cr (0.05 mg/l) (SEDUE, 1990). En el ostión *Crassostrea virginica* el Hg (1.0 ppm), Pb (0.2 ppm), Cd (0.135 ppm) se encuentran por arriba del límite establecido para consumo humano (Food and Drug Administration, 1978; Villanueva y Botello, 1988). La concentración total de cobre, níquel, cobalto, cromo, zinc y cadmio en ostiones se incrementa notablemente en la época de lluvias y el plomo presenta sus valores máximos en la época de nortes (Ponce-Vélez y Botello, 1992). De acuerdo con estos estudios se ha podido establecer la asociación que existe entre las actividades industriales y la utilización de combustible, ya que la distribución de estos metales es por zonas y se encuentra de acuerdo con el tipo de sedimento, corrientes, influencia antropogénica y descarga fluvial (Ponce-Vélez y Botello, 1992; Botello *et al.*, 1992).

LAGUNA DE LA MANCHA, VER.

Los primeros estudios acerca de la contaminación en la Laguna de La Mancha, Ver. indican que este es un embalse en proceso de contaminación por hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) disueltos en el sedimento y en organismos, cuyo origen es petrogénico y pirolítico. Son introducidos por rutas atmosféricas, accidentes, emanaciones de automotores, descargas fluviales y pluviales, entre otros (Botello *et al.*, 1994). Se encontró que en la época de nortes los niveles sobrepasan la norma internacional para aguas costeras no contaminadas (UNESCO, 1976), ya que al parecer los vientos contribuyen al incremento en el transporte atmosférico de estos compuestos. Durante la época de lluvias se registran las concentraciones más altas de HAP (criseno, benzo(a)pireno y pireno) en el sedimento. Lo anterior puede deberse a causas muy variadas, como aumento en los aportes fluviales y atmosféricos, el resultado es la disminución de los hidrocarburos en el agua y aumento en el sedimento superficial (Botello *et al.*, 1994).

Las macrofitas de la laguna tienen los valores más altos de HAP en secas y los menores en nortes. En la primera estación puede ser causa de una tasa de evaporación mayor y un escaso suministro de agua proveniente de los escurrimientos del continente o de los existentes en el sedimento. Los ostiones y mejillones de la laguna presentan concentraciones importantes de criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno y fluoranteno. Los niveles de estos compuestos están en relación con sus hábitos alimenticios por filtración e incorporación de grandes cantidades de agua y partículas suspendidas donde los HAP pueden estar adsorbidos (Botello *et al.*, 1994).

Los hidrocarburos organoclorados en ostiones y mejillones se encuentran en concentraciones que inhiben el crecimiento y el metabolismo reproductivo. Destacan el DDT y sus metabolitos, aldrin, dieldrin, endrin, endosulfan, heptacloro y BHC, los cuales han sido prohibidos por su alta toxicidad y riesgo para la biota. Su principal aporte es el lavado de tierras de cultivo forrajero y de caña de azúcar, además del transporte atmosférico. En el sedimento se registran los niveles más elevados de aldrin, alfa, beta, gamma y delta BHC, pero resaltan por su alta concentración el pp'DDD y el endosulfan sulfato, que son empleados en las campañas sanitarias y para el control de insectos en cultivos de productos básicos e industriales (Díaz-González, 1992).

Los metales tóxicos Pb, Cd y Cr, en agua se encontraron por debajo del límite de detección, lo que hace suponer que no permanecen por mucho tiempo en las fases solubles y suspendidas, ya que por procesos de floculación coloidal, absorción y precipitación se acumulan en los sedimentos. El Pb registra los valores más altos en el sedimento en la época de lluvias, ya que puede estar asociado a los fenómenos de circulación, mezcla, sedimentación, dilución, variaciones estacionales, transporte atmosférico, resuspensión, acarreo de partículas continentales y residuos agroquímicos. En la temporada de secas los valores de Pb son uniformes, lo que indica que en la superficie de la laguna está bien distribuido y su aporte puede ser biogénico o antropogénico, mientras que durante los nortes los vientos modifican la dinámica y las concentraciones varían. El Cr en todas las temporadas mantiene valores constantes. Los valores de mayor biodisponibilidad de Pb se obtienen en secas y de Cd durante la época de nortes (Botello *et al.*, 1994).

Las concentraciones de Fe y Mn son variables de una época a otra, lo que sugiere que existe un importante acarreo de partículas continentales hacia la laguna. El Co, Cu, Ni y Zn deben su presencia en gran parte a los ligandos orgánicos liberados como producto de la descomposición intensiva de la materia orgánica. Las altas concentraciones de Zn en el sedimento podrían deberse principalmente a la depositación de fitoplancton (Presley *et al.*, 1972).

En los bivalvos el Zn y el Cu se registran los niveles de concentración más altos. El Cr, Pb y Cd sobrepasan el límite máximo permitido por el Departamento de Servicios Urbanos de Japón (Nauen, 1983). En los pastos marinos (*Ruppia maritima*) el Ni, Co, Mn y Fe presentan las concentraciones más elevadas, posiblemente por la acumulación en la pared celular de las hojas, las cuales están en contacto directo con el sedimento (Botello *et al.*, 1994).

El análisis microbiológico en agua, sedimento y organismos indican que los límites establecidos por la norma de calidad para aguas de contacto primario y actividad pesquera (APHA, 1985) se rebasaron. Los resultados marcan la relación entre los valores de coliformes totales y coliformes fecales con la época del año. En la temporada de secas se presenta una disminución considerable por la evaporación, cambio de salinidad y aumento de temperatura. En lluvias, la población bacteriana aumenta por el aporte de los ríos y el escurrimiento pluvial, ya que las condiciones ambientales no son tan extremas y los ostiones los incorporan con mayor facilidad (Botello *et al.*, 1994).

ZONA DE ESTUDIO

El Golfo de México es la cuenca semicerrada más importante del Atlántico. En él desembocan dos sistemas deltaicos muy importantes, tanto por el volumen de descarga como por la alta productividad y complejidad ecológica, el Río Mississippi y el Grijalva-Usumacinta. Es una región altamente vulnerable al efecto de la actividad humana, basada principalmente en la extracción, procesamiento y distribución de hidrocarburos, intenso movimiento de complejos portuarios industriales y comerciales, pesquerías, desarrollos agropecuarios y actividades turísticas. En la zona de Reforma-Tabasco y Sonda de Campeche, se encuentran las provincias petroleras más importantes de México (Botello *et al.*, 1992).

Las dos zonas de trabajo en este estudio son la Laguna de Términos, Campeche y la Laguna de La Mancha, Veracruz. La primera se encuentra altamente influida por descargas fluviales y por la Sonda de Campeche; en este sistema estuarino se han realizado diversos estudios para determinar los contaminantes que hay en él. Sin embargo, existen pocos trabajos acerca de un posible efecto genético provocado por dichos contaminantes en los miembros de esta comunidad, muchos de los cuales son recurso alimenticio del hombre. La Laguna de La Mancha, se encuentra en una región aparentemente con poca influencia de aportes masivos de descargas industriales y antropogénicos y los estudios practicados al respecto se iniciaron recientemente, en forma simultánea a este trabajo.

LAGUNA DE TERMINOS, CAMP.

La Laguna de Términos, Camp. es la más importante de la porción sur de la Sonda de Campeche por su tamaño y profundidad (Fig.1). Se localiza en el Estado de Campeche, entre los meridianos 91°15' y 92°00' de longitud oeste y los paralelos 18°25' y 19°00' de latitud norte en el Estado de Campeche (Ponce-Vélez y Botello, 1992).

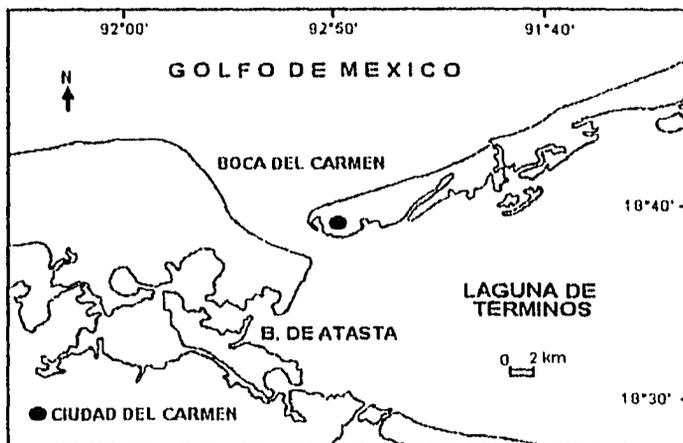


Figura 1. Localización geográfica de la Laguna de Terminos, Camp.

Es un sistema lagunar-estuarino con aporte fluvio-deltaico de tres ríos que forman parte de la red hidrológica del Usumasinta: 1.- El Candelaria-Panlau, cuya cuenca se localiza en la Península de Yucatán y cuyo cauce aporta grandes cantidades de carbonato de calcio; 2.- el Chumapan-Balchacah, se genera en la planicie costera por la unión de los ríos San Joaquín y Salsipuedes; y 3.- el Palizada del Este-Pom-Atasta que forma parte de la red hidrológica de los ríos Mexcalapan y Grijalva. Por el oriente desembocan el río Sabancuy y los arroyos Colax, Lagarteros y Chivojá Grande; por el sur los ríos Mamantel y Candelaria (Botello y Villanueva 1978; Vera-Herrera *et al.*, 1988; Díaz González, 1992).

La laguna está separada del Golfo de México por la Isla del Carmen. Se comunica con el mar a través de dos bocas: al este, Boca de Puerto Real y al oeste, Boca del Carmen. La primera tiene flujo del Golfo y delta bien definido; en la segunda el flujo es hacia el mar. Mide 60 km de longitud y 28 km de ancho, con superficie aproximada de 2,500 km² y profundidad media de 4 m (Mancilla y Vargas, 1980; Conner *et al.*, 1988; Botello y Villanueva, 1988). La región este, limita con la Plataforma de Yucatán, constituida por rocas principalmente calizas, contrastando con la zona oeste donde se presenta deposición de detritus terrígenos aportados por los ríos (Díaz González, 1992).

El sistema se localiza en una zona tropical. El clima es de tipo cálido subhúmedo, isotermal, con lluvias en verano. El promedio anual de temperatura es superior a los 26°C. La precipitación anual promedio es de 1680 mm, fluctúa entre 1,100 y 1,900 mm, el valor máximo es durante los meses de julio a noviembre. La velocidad máxima del viento es de 50-60 km/hr. Los vientos dominantes tienen una dirección noroeste-suroeste, en el invierno se presentan fuertes tormentas tropicales y huracanes en los cuales predominan vientos del cuadrante norte (Botello y Villanueva, 1978).

La salinidad varía dependiendo de la época del año; durante la estación de lluvias desciende hasta 12 o/∞ y en el estiaje aumenta a 38 o/∞. Existe una gradación de la salinidad, ésta es mayor cerca de la Isla del Carmen y disminuye hacia la región continental debido a los aportes fluviales de esta zona (Amezcuca-Linares y Yáñez-Aranzibia, 1980). La mayor descarga de los ríos ocurre durante los meses de septiembre, octubre y noviembre (Conner *et al.*, 1988). Hay tres épocas asociadas a condiciones climatológicas específicas: de febrero a mayo denominada "secas"; de junio a septiembre "lluvias" y de octubre a febrero "nortes" (vientos de invierno) (Vera-Herrera *et al.*, 1988).

Los sedimentos de la laguna están constituidos por arenas, limos y arcillas. El tipo de grano varía en las diferentes zonas de la Laguna de acuerdo con las corrientes y el aporte de los ríos. En la región oeste existe una predominancia de grano fino representado por limos y arcillas, siendo el aporte fluvial el posible causante de este sedimento característico, mientras que en la zona Este se encuentra una dominancia de arenas carbonatadas con más de 70% de carbonato de calcio que proviene de calizas de la Plataforma de Yucatán a través de escurrimientos, oleaje y descarga del Río Candelaria (Phleger y Ayala, 1971).

La laguna está bordeada, casi en su totalidad por pantanos de mangle y las especies dominantes son *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), *Avicennia germinans* L. (mangle negro) y *Laguncularia racemosa* Gaerth (mangle blanco). Los pastos marinos circundan la zona de la laguna de Isla del Carmen, en el delta de la boca de Puerto Real y en los bajos del este y sureste de la laguna; las especies son: *Thalassia testudinum* Koning, *Halodule* sp. y *Syringodium filiforme* Kutz (Conner *et al.*, 1988). Los bancos de ostión se encuentran en la zona Oeste, en contacto con agua rica en materia orgánica y sedimento fino (Díaz-González, 1992).

La actividad pesquera se concentra en la explotación de ostión (*Crassostrea virginica*), camarón (*Penaeus* sp.), peces diversos, caracol y jaiba (*Callinectes sapidus* y *C. similis*) (Amezcu-Linares y Yañez-Arancibia, 1980). En las zonas que circundan a la laguna, las actividades económicas principales son ganadera, agrícola e industria extractiva del petróleo (Botello y Villanueva, 1988).

LAGUNA DE LA MANCHA, VER.

La Laguna de la Mancha, Ver. está ubicada en el litoral del Golfo de México, entre los paralelos 19°34' y 19°42' de latitud norte y los meridianos 96°22' y 96°24' de longitud oeste (Fig. 2). Se encuentra a 30 km aproximadamente al noroeste de Ciudad José Cardel, sobre la carretera federal 180 y a 10 km de la Central Nucleoeléctrica Laguna Verde, en el municipio de Actopan (Botello *et al.*, 1994).

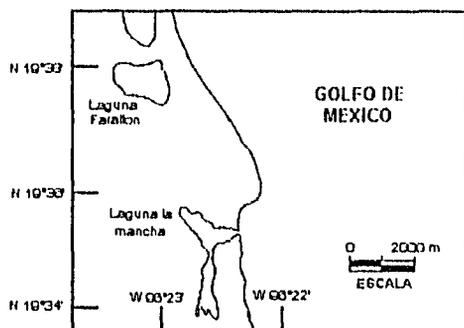


Fig. 2. Localización geográfica de la Laguna de La Mancha, Ver.

Los aportes de agua dulce provienen de varios arroyos temporales y un único arroyo permanente conocido como Caño Grande, que se localiza en la parte suroeste de la laguna (Contreras, 1985). El intercambio de agua marina es a través de una boca temporal única, llamada Barra de La Mancha, que se abre en la época de lluvias por el aumento de la descarga del arroyo mencionado y de algunas otras descargas temporales (Botello *et al.*, 1994).

La Laguna es pequeña y de forma irregular y mide 5 km de longitud con una superficie de 156 hectáreas, formada por dos cuerpos de agua unidos por un canal estrecho. Al norte colinda con la Laguna Salada y el Río Viejón. En el borde occidental de la Laguna se encuentra la vía del ferrocarril que va de Veracruz a Tampico. En la zona de la barra se localiza un gaseoducto y en la orilla este de la laguna, hay un asentamiento de pescadores que explotan los recursos y que contiene una área destinada a corrales para ganado y algunos establecimientos comerciales (Botello *et al.*, 1994).

El sistema se localiza en una zona tropical y el clima es de tipo cálido subhúmedo, isotermal, con lluvias en verano. La temperatura promedio anual es de 25.7°C, la máxima es de 34°C y la mínima de 16°C. La precipitación promedio anual es de entre 1100 mm y 1200 mm, los valores máximos se registran durante los meses de julio a septiembre. Los vientos predominantes son de norte a sur, alcanzan velocidad de 80 a 130 km/hr. La salinidad varía de 0 a 5 ‰ hasta 18 a 30 ‰, por lo somero del área está condicionada a los aportes por escurrimiento continental y por la circulación de agua marina (Flores-Andolais *et al.*, 1988).

Hay tres épocas climatológicas específicas: de febrero a mayo "secas"; de junio a septiembre "lluvias" y de octubre a febrero "nortes" (vientos de invierno). La mayor descarga de los ríos es en los meses de septiembre, octubre y noviembre (Conner *et al.*, 1988).

La vegetación que circunda a la laguna es el manglar constituido por cuatro especies: *Rhizophora mangle*, *Avicenia germinans*, *Laguncularia racemosa* y *Conocarpus erectus*. La distribución de la comunidad vegetal cubre desde unos metros hasta más de un kilómetro, hacia la parte sur del brazo de la laguna en el borde inundable de la porción sur (Botello *et al.*, 1994). La vegetación halófila asociada al mangle está constituida por *Fimbristylis castanea*, *Batis maritima*, *Borrighia frutescens* y *Sesuvium maritimum*. En las zonas más someras se encuentran manchones de una fanerógama sumergida: *Halodule beaudettei* (Novelo, 1978).

Las especies de moluscos con importancia comercial son *Crassostrea virginica*, *Isognomon alatus*, *Melongena melongena*, otros de menor importancia son *Mytilopsis leucophaeata*, *Cerithiidae pliculosa*, *Mulinia lateralis*, *Ocostomia impressa*, *Nassarius vibex* y diversos gasterópodos (Flores-Andolais, 1981; Coutiño, 1982; Botello *et al.*, 1994). La ictiofauna registrada es de 23 familias, 34 géneros y 42 especies. Las especies de mayor densidad son

Anchoa mitchilli, *Poecilia mexicana*, *Gambusia sp.* y *Eucinosomus melanopterus* (Mora y Ramírez, 1980).

METODO

Se estudiaron ostiones de la Laguna de La Mancha, Ver. y de Laguna de Términos, Camp., de la especie *Crassostrea virginica* (Rosas *et al.*, 1983, Villanueva y Botello, 1988). Las recolectas de ostión y sedimento se realizaron durante un ciclo anual abarcando las temporadas de secas, lluvias y nortes. Una recolecta por época del año.

Procesamiento de las Muestras.

Ostión

Los muestreos se efectuaron en el lugar denominado Crucero en la Laguna de La Mancha y en la zona de Atasta de la Laguna de Términos. Los ostiones se obtuvieron directamente del fondo de las lagunas; posteriormente se extrajo la parte blanda con cuchillo de plástico, para evitar raspaduras en la concha y que los pedazos de la misma se adhirieran al cuerpo del organismo. Se lavaron varias veces con agua destilada, se almacenaron en bolsas de plástico previamente etiquetadas y se congelaron a 4°C para su transportación. Ya en el laboratorio se pesaron para tener el dato de peso húmedo, se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 24 horas a una temperatura de -30°C y presión de 20 Pascales, en bomba de vacío. Esto tiene por objeto efectuar una preconcentración de los contaminantes y facilita la conservación, permitiendo el almacenamiento a temperatura ambiente dentro de un desecador. Una vez liofilizado el tejido del bivalvo, se maceró en mortero de porcelana, se tamizó en una malla de 200 μ y se homogeneizó (Pérez-Novara, 1983).

Sedimento

La muestra se tomó directamente en bolsas de plástico. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 36 horas y mediante la técnica de cuarteo se obtuvo una muestra representativa (Pérez- Novara, 1983). Ya en el laboratorio, la muestra se sometió a secado a $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Después se molió en mortero de porcelana y se almacenó hasta la etapa de análisis y cuantificación.

PREPARACION DE FRACCIONES DE OSTION

En la separación de los compuestos químicos se obtienen una fracción total (FT), una fracción polar (FP) y una fracción no polar (FNP). La FT es el concentrado de todos los agentes químicos. La FP contiene las sustancias solubles en agua, las inorgánicas. La FNP contiene las fracciones solubles en sustancias orgánicas.

La preparación de las fracciones de ostión se efectuó modificando la técnica propuesta por Rodríguez-Ariza *et al.* (1992) de acuerdo con el siguiente procedimiento:

El tejido de ostión liofilizado se suspendió en etanol absoluto, a una concentración de 2g peso húmedo/ml, calculando que al liofilizar al ostión, el peso se reduce aproximadamente 20 veces. Se trituró en mortero de porcelana durante 5 minutos, alternando con periodos de incubación a 60°C y agitación constante (140 rpm) durante 30 minutos, hasta cumplir ocho ciclos. Posteriormente se centrifugó el extracto a 20,000 rpm durante 30 minutos, a temperatura ambiente, se tiró el botón y el sobrenadante se guardó a -10°C .

El extracto así obtenido se dividió en dos partes iguales. La primera se utilizó para obtener la fracción total concentrada (FT). Para ello en un rotavapor durante 3 horas a temperatura de entre 40 y 50°C y velocidad de 4-6 rpm se concentró la muestra 10 veces. El remanente se guardó a -10°C hasta su utilización (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). La segunda se pasó por una columna con resina iónica de amberlita XAD-2, cuyas características permiten separar a los contaminantes de acuerdo con su polaridad (Rohm y Hass, 1978 y 1993). Este tipo de resinas es específica para la obtención de compuestos orgánicos de muestras ambientales.

particularmente plaguicidas (Rohm y Hass, 1978 y 1993; Kool *et al.*, 1981). De acuerdo con Yamasaki y Ames (1977), la resina se preparó de la siguiente forma: se lavó 3 veces con 10 volúmenes de acetona cada vez y se colocó en un agitador con plataforma rotatoria (140 rpm) durante 10 minutos. Todo el proceso se repitió primero con etanol y después con agua destilada y finalmente se guardó en refrigeración (5°C) hasta su utilización.

La resina se suspendió en agua destilada y se colocó en una columna de vidrio de 100 x 9 mm a la que se le adaptó una llave de separación. Para separar las fracciones se utilizó un solvente muy polar, etanol y otro no tan polar, dimetil sulfoxido (DMSO). El extracto total suspendido en etanol se agregó a la columna, se mantuvo un flujo de 2-3 ml/min a temperatura ambiente. Primero fluyó la FP, se recolectó y refrigeró, hasta su uso posterior. La FNP, que por las características de la resina se adhirió y para desprenderla se lavó con 5 ml de DMSO, se recolectó y se refrigeró.

De acuerdo con este procedimiento se obtuvieron las tres fracciones mencionadas, la total concentrada (FT), la fracción polar (FP) conteniendo sustancias solubles en agua y la fracción no polar (FNP) que contiene los orgánicos insolubles en agua.

PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD

Prueba de AMES en *Salmonella typhimurium*

La técnica de nominada de Ames se fundamenta en la inducción de reversiones de cepas de *Salmonella typhimurium* deficientes en la síntesis de histidina a bacterias que recuperan la capacidad de síntesis de este aminoácido (Maron y Ames, 1983). Las cepas indicadoras de *S. typhimurium* son portadoras de mutaciones que les impiden fabricar una de las enzimas que se requieren para la síntesis de histidina, por lo que no pueden crecer en medio mineral a menos que se adicione una cantidad suficiente de histidina o que, mediante una reversión recuperen la capacidad de sintetizar este aminoácido (Van der Hoeven *et al.*, 1990). Además, presentan algunas otras modificaciones como la mutación *rfa*, que provoca la pérdida parcial de la barrera de polisacáridos e incrementa la permeabilidad; la mutación *uvrB* que es la pérdida del gen que codifica para el sistema de reparación y aumenta la sensibilidad; por último la mutación del *factor-R* en el plásmido *PKM101*, incrementa la mutación espontánea del sistema de reparación del ADN (Maron y Ames, 1983). Se utilizan dos cepas, TA100 y TA98, que respectivamente indican 2 distintos tipos de mecanismos de mutación, sustitución de bases en el ADN y desplazamiento o corrimiento del mensaje genético por pérdida o adición de algunos nucleótidos (1, 2 o múltiplos de 2). Esta metodología tiene la ventaja de poder simular el metabolismo de cualquier clase de sustancia como ocurre en los organismos con hígado o con el sistema citocromo P-450, al agregarle la mezcla S9 (ver apéndice). Bajo estas condiciones el sistema puede identificar contaminantes cuyos mecanismos de acción pueden ser directos o sea que no requieren de activación metabólica (sin mezcla -S9), o bien mecanismos indirectos, que requieren activación metabólica (mezcla +S9).

El procedimiento consiste en lo siguiente: Se tomó una colonia de la cepa TA98 o TA100, se sembró en un matraz de 250 ml con 10 ml de medio completo oxid y 10 µl de ampicilina (10 µg/ml) que se colocó en un incubador giratorio a 37°C durante 16 horas y para asegurar una buena aireación se agitó a 210 rpm.

En 100 ml de agar blando se diluyó 10 ml de una solución de histidina/biotina 0.5mM y se tomó 2.5 ml que se agregan a tubos estériles con tapa ajustable y se colocó en bloques con temperatura regulable a 48°C, para después agregarles en el orden siguiente: 0.02 ml de la

fracción total, polar o no polar de ostión o del mutágeno de diagnóstico y 0.1 ml del cultivo de 16 horas. En los experimentos con activación metabólica se agregó 2.0 ml de agar blando por tubo y la misma cantidad de extracto de ostión o sustancia testigo. El tubo se agitó y el contenido se vertió sobre cajas de petri con medio mínimo. Una vez solidificado el agar, las cajas de petri se voltearon y se cubrieron para evitar los efectos de la luz sobre sustancias fotosensibles. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas y se cuantificaron las colonias revertantes.

Paralelamente se incluyeron controles negativos de agua bidestilada, etanol y DMSO; y mutágenos de diagnóstico específicos para cada cepa. En las pruebas sin activación metabólica se utilizó azida de sodio para la TA100 y 4-NPD para la TA98, con mezcla enzimática S9, se utilizó 2-AF para ambas cepas.

En la prueba con activación metabólica que indica efecto genotóxico indirecto se utilizó una mezcla de extracto de hígado de rata para activar los promutágenos (mezcla S9) (Ames *et al.*, 1975). La cantidad de mezcla S9 que se agregó en cada tubo es de 0.5 ml (Ver apéndice).

Se analizaron las tres fracciones a concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.02 ml/ml. En total se realizaron tres experimentos por cada extracto con y sin mezcla S9, y en cada experimento hubo tres repeticiones por concentración. Los resultados se evaluaron con el programa estadístico SALANAL desarrollado en conjunto por el Integrated Laboratory Systems (ILS), por el Research Triangle Institute (RTI) bajo la dirección del Dr. Llewellyn Williams del Environmental Monitoring Systems Laboratory U.S. (EMSL, U.S) del Environmental Protection Agency (EPA). Se consideró como resultado positivo cuando la frecuencia de mutación espontánea incrementa dos o más veces el número basal de revertantes y cuando se observó una clara relación de dosis-respuesta (Maron y Ames, 1983).

Prueba de SMART en *Drosophila melanogaster*.

La prueba de Mutación y Recombinación Somática cuyas siglas en inglés son SMART (Somatic Mutation and Recombination Test). Se basa en el uso de células somáticas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, es un sistema eficiente para analizar genotoxicidad., ya que se pueden determinar distintos eventos como mutación, no disyunción, deleción y recombinación. Ofrece otras ventajas como ciclo de vida corto (aproximadamente en 10 días a 25°C y 50% de humedad relativa se completa su desarrollo); es relativamente barato, se obtiene un número grande de individuos por generación, lo que permite obtener tamaños de muestra adecuados en una sola generación y son *in vivo*. El protocolo experimental utiliza las mutaciones recesivas en células somáticas del ala de *D. melanogaster* que detecta recombinación mitótica (Graf *et al.*, 1983). Se utilizaron las mutaciones *mwh* y *flr*³ que se encuentran en el tercer cromosoma, el primero se localiza en posición 0.0 y el segundo con sus tres marcadores en posición 38.8 (García-Bellido y Dapena ,1974). Para la cruce se utilizaron hembras con el marcador *mwh/mwh*: pelos múltiples en el ala, que modifica el carácter silvestre de una cerda por célula a varios pelos por célula (Lindsley y Grell, 1968) (Fig. 3). Los machos que presentan el carácter o pelos *flr*³ en forma de flama en el ala del adulto (Fig. 3). Esta última mutación es letal en condición homocigótica, por lo que es necesaria la presencia de un cromosoma balanceador dominante el *TM*⁶Ser y los individuos, por tanto, presentan el borde discontinuo del ala.

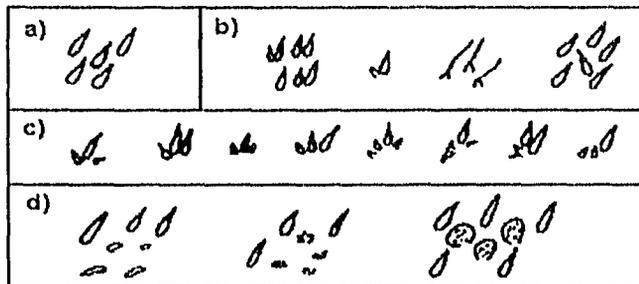


Figura 3. Tricomos en el ala. a)Normal, b) Derivados que no se consideran como *mwh* o *flr*³, c) *mwh*, d) *flr*³ (Graf *et al.*, 1983).

De la cepa *mwh* se aislaron hembras vírgenes y se cruzaron con machos *flr³/TM³*; Ser. Dichas hembras ovipositaron durante 3 horas, los huevos se dejaron madurar 72 horas, a 25 + 1°C y 60% de humedad relativa. Las larvas de segundo estadio se separaron por gradiente de densidad con una solución de sacarosa al 20% (Magnusson y Rameí, 1990). En el microscopio estereoscópico se contaron 500 larvas de 2o. estadio, se colocaron en tubos homeopáticos conteniendo un círculo de papel filtro, donde se agregó 0.8 ml de cada sustancia, en grupos de 100 individuos y se incubaron durante 24 horas en cuarto de cultivo a 25°C. Los testigos se prepararon de la siguiente forma: para el testigo negativo se pesaron 5 gr de sacarosa y se disolvieron en 100 ml de agua para obtener una solución 5% (p/v); para el testigo positivo se mezclaron 20 ml de etanol en 80 ml de la solución de sacarosa 5% para una solución 20% (v/v). La fracción total se preparó mezclando 20 ml del extracto concentrado de ostión (FT) en 80 ml de la solución de sacarosa 5%.

Después del tratamiento agudo durante 24 horas, las larvas se transfirieron a tubos homeopáticos con medio de cultivo, hasta que emergieron los adultos, los cuales se contaron y se fijaron en frascos de vidrio con alcohol al 70% durante 48 horas (Graf *et al.*, 1983). Se disecaron las alas empleando pinzas de relojero del No. 5 y una aguja de disección. Se colocaron sobre un portaobjetos en una gota de solución de Fauré donde se extendieron perfectamente con la ayuda de las pinzas. La preparación se dejó secar durante 24 horas en atmósfera exenta de polvo. Una vez secas, las alas se colocaron en un cubre objetos con una gota de solución de Fauré. Posteriormente, se analizaron las preparaciones en el microscopio óptico a 400X. Para facilitar la observación, se considero las divisiones naturales del ala en la que a cada región se le asignó una letra del alfabeto (Graf *et al.*, 1983) (Fig. 4).

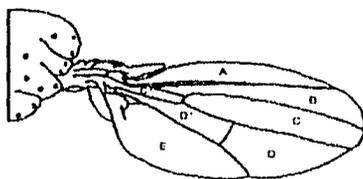


Figura 4. Regiones A-E en el ala (Graf *et al.*, 1983).

El criterio establecido para la identificación de las manchas en las alas es el siguiente: 1 a 2 células dañadas con el fenotipo *mwh* o *flr³*, se consideró como mancha chica. Cuando el

número de células dañadas es de 3 o más, es una macha grande. En ambos casos, se puede considerar que es un efecto de recombinación, mutación o delección. El tercer tipo que puede ser identificado es el de las manchas gemelas que presentan células con el fenotipo *mwh* y *ltr*³, en este caso el tipo de evento puede ser debido a la recombinación de material genético (Graf *et al.*, 1983).

DETERMINACION DE METALES POR ABSORCION ATOMICA.

El método de absorción atómica se basa en la absorción de radiación de los átomos en estado gaseoso. El "estado base" de los electrones se puede determinar porque se les puede encontrar en los orbitales de manera ordenada y predecible. Al aplicarle a un átomo una cantidad de energía de magnitud apropiada ésta será absorbida y un electrón exterior será promovido a una configuración menos estable o "estado excitado". En este estado inestable el átomo regresará inmediatamente al estado base produciendo energía radiante equivalente a la energía absorbida inicialmente en el proceso de excitación. Puesto que cada elemento tiene una estructura electrónica única, la longitud de onda de la luz emitida es particular de cada elemento; al interponer los átomos con el haz de luz, la cantidad de luz absorbida aumenta y puede ser cuantificada proporcionando el valor de concentración específica de cada elemento (Varma, 1984; Ximenez, 1980).

Para las determinaciones de metales en ostión y sedimento se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer Modelo 5000. La preparación de las muestras se realizó por calcinación, de esta forma se eliminó el riesgo de pérdida de material por volatilización. Para la obtención de cenizas más blancas se adiciona 1.8 ml de nitrato de magnesio 40% por cada 60 g de muestra. La muestra se sometió a una precalcinación, primero en lámpara para evitar la proyección de líquidos, después en parrilla eléctrica y al final en mechero a flama moderada, hasta la desaparición de humos blancos. Se pasó a la mufla aumentando la temperatura gradualmente hasta los 500°C durante 8 horas. Al mismo tiempo que se evaluaron las muestras se prepararon blancos de cada elemento con tritrisoles grado analítico. La curva patrón se elaboró leyendo varias veces el blanco y ajustando a cero, se hizo un promedio; se elaboró el gráfico de concentración vs. absorbancia y se ajustó la recta por regresión lineal. La absorbancia de cada muestra se interpoló en la recta y se obtuvo directamente la concentración (Beaty, 1979).

RESULTADOS

Prueba de Ames en *Salmonella typhimurium*.

Sin Activación Metabólica (-S9).

Las Fracciones Totales (FT -S9) y Polares (FP -S9) del ostión de la Laguna de Términos, Camp. durante la temporada de nortes, indicaron efecto positivo en la cepa que registra pérdida de mensaje del material genético (TA98). La respuesta genotóxica al utilizar la FT -S9 se registró solo a la concentración 1.00 ml/ml, mientras que la FP -S9 fue en las tres concentraciones (0.02, 0.1 y 1.0 ml/ml) (Tablas I y II). En el caso de las Fracciones No Polares (FNP -S9) del ostión no indicaron efecto mutagénico, los valores son equiparables a la basal, que en este caso se comparó contra el testigo dimetil sulfoxido (DMSO₄) (Tabla III). La Fracción Total (FT -S9) del ostión de la Laguna de La Mancha, Ver., presentó respuesta genotóxica a la concentración de 0.10 ml/ml mientras que las Fracciones Polar (FP -S9) y No Polar (FNP -S9) muestran valores negativos en todos los casos (Tablas I, II y III).

Activación Metabólica +S9.

Las Fracciones Totales (FT +S9) del ostión de la Laguna de Términos, Camp. fueron genotóxicas en la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, la correspondiente a la época de secas la respuesta se presento a la concentración de 1.00 ml/ml, en lluvias a en las tres concentraciones y en nortes en la concentración 1.00 ml/ml. Esta misma fracción en las temporadas de secas y nortes se registraron como genotóxicas en la cepa TA100, en ambos casos al utilizar la concentraciones de 1.00 ml/ml (Tabla I). Las Fracciones Polares (FP +S9) del ostión de la Laguna de Términos, Camp. correspondientes a las tres estaciones del año analizadas, indicaron respuesta positiva en la cepa TA98, en secas cuando se utilizaron las concentraciones 0.10 y 1.00 ml/ml, en lluvias la respuesta fue con las tres concentraciones (0.02, 0.10 y 1.00 ml/ml), en este caso particular parece ser efecto de letalidad, más que de genotoxicidad, finalmente en nortes con 1.00 ml/ml (Tabla II). La FP +S9 de la Laguna de

Términos, Camp. en nortes fue el único caso que registró daño genético por sustitución de mensaje (cepa TA100) (Tabla II). Las Fracciones No Polares (FNP) del ostión de la Laguna, de Términos, Camp. se mantuvieron sin efecto genotóxico, en este caso se comparo contra DMSO (Tabla III).

Las Fracciones Total (FT +S9) del ostión de la Laguna de La Mancha, Ver. de las temporadas de lluvias y nortes fueron genotóxicas en la cepa TA98; en ambos casos el efecto se registro en la dilución 1.00 ml/ml. La misma muestra al probarse en la cepa TA100 fue positiva a la concentración de 1.00 ml/ml (Tabla I). Las Fracciones Polares (FP +S9) de esta Laguna correspondientes a la temporada de lluvias fueron genotóxicas en la cepa TA98 a la concentración de 1.00 ml/ml y en la cepa TA100 a 1.00 ml/ml (Tabla II). Los valores de las Fracciones No Polares (FNP +S9) se mantuvieron en la basal (Tabla III).

Tabla I. Efecto de la fracción total (FT) de ostión con y sin activación metabólica en dos cepas de *S. typhimurium*.

		<i>S. typhimurium</i> TA98								<i>S. typhimurium</i> TA100							
		La Mancha				Términos				La Mancha				Términos			
MUESTREO	CONCENTRACION v/v	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
		x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
SECAS	000	47	7	35	3	56	7	35	6	200	69	163	10	178	21	200	51
	0.02	42	11	40	12	32	9	34	8	223	57	160	24	217	55	191	26
	0.10	49	8	34	1	42	14	43	21	155	25	164	7	216	30	195	31
	1.00	48	10	44	6	33	1	397•	95	257	21	166	14	221	58	415*	28
LLUVIAS	000	26	3	35	3	27	3	27	3	201	25	164	12	201	25	298	31
	0.02	39	18	49	12	33	7	45*	4	212	17	134	15	231	36	201	86
	0.10	35	2	39	5	23	5	43*	2	202	25	133	15	199	81	230	18
	1.00	44	15	59*	10	27	3	47*	7	218	7	155	9	209	37	189	66
NORTES	000	42	3	35	2	39	7	32	6	295	11	156	14	294	18	158	15
	0.02	46	2	45	7	41	10	41	6	255	88	238•	8	258	39	203	24
	0.10	42	10	41	3	31	3	42	3	253	80	216	27	253	53	276	104
	1.00	51	4	50•	12	288*	90	205•	45	296	76	418•	68	340	75	366•	41

CLAVE

-S9 Sin activación metabólica

+S9 Con activación metabólica

Nivel de significancia * 5%: • 1%

Solvente Etanol.

Tabla II. Efecto de las fracciones polares (FP) de ostión con y sin activación metabólica en dos cepas de *S. typhimurium*.

		<i>S. typhimurium</i> TA98								<i>S. typhimurium</i> TA100							
		La Mancha				Términos				La Mancha				Términos			
MUESTREO	CONCENTRACION v/v	-S9		+S9		- S9		+S9		- S9		+S9		- S9		+S9	
		x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
SECAS	000	40	11	34	2	38	8	45	8	239	35	1834	38	219	46	194	40
	0.02	34	13	42	11	40	2	58	11	230	37	190	65	354	207	200	41
	0.10	34	9	41	12	30	5	66*	4	233	42	202	67	307	175	243	55
	1.00	39	14	45	11	34	3	75•	19	251	25	194	79	251	105	252	20
LLUVIAS	000	40	7	30	10	31	5	45	8	226	34	169	10	236	32	254	4
	0.02	32	6	45	11	36	10	272*	8	251	82	214	77	207	47	232	11
	0.10	37	14	46	1	34	3	247•	22	234	47	271	41	207	21	240	50
	1.00	41	9	56*	15	37	7	100*	15	241	55	271	40	224	13	254	36
NORTES	000	29	1	39	8	28	2	34	2	267	43	163	14	268	78	148	4
	0.02	38	6	42	11	39*	5	49	14	276	11	205	66	274	89	226•	2
	0.10	34	6	40	9	41*	1	55	13	180	21	184	60	246	101	215*	24
	1.00	44	11	47	19	42*	6	82*	16	346	33	207	81	272	75	226•	9

CLAVE

-S9 Sin activación metabólica

+S9 Con activación metabólica

Nivel de significancia * 5%; • 1%

Solvente H₂O Destilada

Tabla III. Efecto de la fracción no polar (FNP) de ostión con y sin activación metabólica en dos cepas de *S.typhimurium*.

		<i>S. typhimurium</i> TA98								<i>S. typhimurium</i> TA100							
		La Mancha				Términos				La Mancha				Términos			
MUESTREO	CONCENTRACION v/v	-S9		+S9		- S9		+S9		- S9		+S9		- S9		+S9	
		x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
SECAS	000	34	9	41	8	34	9	52	9	202	19	235	36	201	19	261	35
	0.02	40	5	38	15	39	7	73	1	208	65	232	31	242	88	310	1
	0.10	35	4	35	5	42	7	52	1	217	76	194	25	207	60	276	30
	1.00	37	6	31	6	40	7	56	14	189	64	209	28	226	51	280	80
LLUVIAS	000	34	9	40	9	34	9	38	6	202	18	184	40	202	18	230	25
	0.02	36	6	36	2	38	9	28	2	185	65	150	34	244	85	245	40
	0.10	41	14	29	7	38	10	35	1	209	42	184	8	223	71	274	66
	1.00	41	11	29	7	38	10	45	18	209	55	198	10	187	66	280	62
NORTES	000	41	9	40	7	41	9	44	9	262	48	181	41	262	48	228	28
	0.02	37	2	38	3	42	3	31	2	265	57	226	10	277	97	200	18
	0.10	39	4	45	6	40	7	35	11	262	70	201	17	289	123	282	81
	1.00	42	2	42	8	37	5	38	2	279	65	217	34	261	73	237	38

CLAVE

-S9 Sin activación metabólica

+S9 Con activación metabólica

Nivel de significancia * 5%; • 1%

Solvente DMSO

Prueba de SMART en *Drosophila melanogaster*.

Los resultados preliminares con la fracción total (FT) de ostión de la Laguna de La Mancha, Ver. indican efecto genotóxico en el sistema de manchas en el ala de *D. melanogaster*. Durante la temporada de secas fue significativo al comparar contra el testigo de alcohol. Las frecuencias de las machas chicas y grandes en lluvias con respecto a las basales, se obtuvo el doble de manchas grandes y en nortes el efecto fue positivo en las manchas grandes al comparar contra el testigo de sacarosa (Tabla IV). Las muestras de la Laguna de Términos, Camp. en la época de secas resultaron ser significativos para las manchas chicas y dobles; en lluvias el incremento fue significativo al comparar contra ambos testigos en las manchas chicas y grandes, finalmente en nortes no se presentó ningún efecto significativo en los distintos tipos de manchas (Tabla IV).

Tabla IV. Manchas registradas en las alas de la mosca *Drosophila melanogaster* después del tratamiento de 24 hrs. con extracto concentrado (FT) de ostión *Crassostrea virginica*.

MUESTREO	TRATAMIENTO	No. de Alas	TAMAÑO DE LA MANCHA							
			Chicas		Grandes		Gemelas		Totales	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
SECAS	Sacarosa 5%	40	14	0.35	4	0.100	0	0.000	18	0.450
	EtaOH	40	6	0.15	1	0.250	1	0.025	8	0.200
	La Mancha, Ver.	40	24	0.60	2	0.050	1	0.025	27	0.675
	Términos, Camp.	40	12	0.30	1	0.025	2	0.050	15	0.375
LLUVIAS	Sacarosa 5%	40	8	0.20	3	0.750	3	0.028	14	0.350
	EtaOH	40	10	0.25	1	0.025	0	0.000	11	0.275
	La Mancha, Ver.	40	16	0.40	6	0.150	1	0.025	23	0.575
	Términos, Camp.	40	29	0.50	7	0.175	1	0.025	28	0.700
NORTES	Sacarosa 5%	40	11	0.28	3	0.075	0	0.000	14	0.350
	EtaOH	40	15	0.38	5	0.125	1	0.025	21	0.500
	La Mancha, Ver.	40	23	0.58	9	0.225	1	0.025	33	0.825
	Términos, Camp.	40	19	0.48	3	0.075	1	0.025	23	0.570

No. - Número de manchas por ala

% - Frecuencia de manchas

La viabilidad de las larvas al usar FT del ostión proveniente de la Laguna de Términos, Camp. en las épocas de secas y lluvias disminuyó 30% y 18% respectivamente (Tabla V y VI). El

número de sobrevivientes al usar el extracto de ostión de la Laguna de La Mancha, Ver. es comparable con los valores de los testigos de sacarosa y alcohol (Tabla V y VI).

La sobrevivencia contra sacarosa y alcohol para descartar el efecto de los solventes está por debajo del 50% en la laguna de Términos, Camp. en las épocas de secas y lluvias. Mientras que para la Laguna de La Mancha, Ver. en todo el ciclo de muestre el promedio es comparable con los testigos (Tabla V y VI).

Tabla V. Viabilidad relativa de larvas de *D. melanogaster* contra el testigo de sacarosa.

MUESTREO	TRATAMIENTO	LA MANCHA	TERMINOS
		%	%
	Sacarosa	100	100
SECAS	EtaOH	66.7	108.2
	FT	77.9	40.7
LLUVIAS	EtaOH	74.8	89.6
	FT	80.7	30.1
NORTES	EtaOH	60.4	74.9
	FT	88.2	81.2

Tabla VI. Viabilidad relativa en larvas de *D. melanogaster* contra el testigo de etanol.

MUESTREO	TRATAMIENTO	LA MANCHA	TERMINOS
		%	%
	EtaOH	100	100
SECAS	Sacarosa	150	92.4
	FT	116.8	37.6
LLUVIAS	Sacarosa	133.5	111.6
	FT	107.8	33.6
NORTES	Sacarosa	165.5	133.5
	FT	129.5	108.4

Comparación entre las pruebas SMART y de Ames.

Los sistemas de mutación somática (SMART) y de reversión en *S. typhimurium* (Ames), se compararon tomando solamente el efecto positivo en cada uno y para cada laguna. En La Mancha, el ensayo con *S. typhimurium* presentó efecto en lluvias y nortes mientras que el SMART en las tres recolectas. En cambio, en Términos, la prueba de Ames indicó mutagenesis en las tres estaciones, pero el SMART, sólo en secas y lluvias. El método estadístico de X^2 confirma que existen ciertas diferencias, particularmente en la Laguna de La Mancha, durante la recolecta de secas y en la Laguna de Términos, en nortes, por lo que el grado de coincidencia entre ambos ensayos es de 90% (Tabla VI).

Tabla VI. Comparación de la fracción total (FT) entre el sistema SMART y de Ames.

LA MANCHA, VER.	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Secas	0	3
Lluvias	1	3
Nortes	3	2
TERMINOS, CAMP.	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Secas	2	0
Lluvias	3	3
Nortes	3	0

$$X^2_{.900} = 15.72$$

Contenido de metales en liofilizado de ostión y en sedimento.

Los resultados de las determinaciones de metales por absorción atómica se muestran en las Tablas VIII y IX. Las determinaciones de elementos químicos se pueden ubicar en dos grupos:

1. Traza esenciales: Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn.
2. No esenciales: Ti, Cd y Pb.

Los análisis de elementos químicos corresponden a las temporadas de lluvias y nortes. En el ostión de la Laguna de La Mancha, Ver. de la época de lluvias, las concentraciones de Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn y Cd se encuentran más elevadas. En esta misma temporada del año en la Laguna de Términos, Camp., los niveles de Fe, Co, Ni, Cd y Pb se presentan más altos (Tabla VIII). Los niveles que se presentaron más altos en nortes en la Laguna de Términos, Camp. fueron de Cr, Mn y Zn (Tabla VIII).

Tabla VIII. Concentración de metales pesados cuantificados por absorción atómica en el liofilizado de ostión.

ELEMENTO [ppm]	LA MANCHA LLUVIAS	LA MANCHA NORTES	TERMINOS LLUVIAS	TERMINOS NORTES
Cr	7.00	3.40	5.50	7.30
Mn	103.50	70.50	37.80	51.20
Fe	1418.00	715.00	682.00	637.00
Co	0.54	0.25	0.75	0.27
Cu	1010.00	424.00	201.00	166.00
Zn	2308.00	1017.00	593.00	649.00
Ti				
Ni	2.60	1.30	3.20	2.20
Cd	5.10	1.90	5.00	3.70
Pb	0.56	0.69	0.80	0.63

En el sedimento la Laguna de La Mancha, Ver. se hicieron determinaciones de algunos metales (Tabla IX). En la temporada de lluvias el aumento de las concentraciones corresponden al Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, y Ti. En nortes el Cd presentó mayor elevación de la concentración (Tabla IX). En el sedimento de la Laguna de Términos, Camp. de la temporada de lluvias las determinaciones químicas muestran más altas concentraciones para Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ti y Pb (Tabla IX).

Tabla IX. Concentración de metales cuantificados por absorción atómica en el sedimento de las lagunas La Mancha, Ver. y de Términos, Camp.

ELEMENTO (ppm)	LA MANCHA LLUVIAS	LA MANCHA NORTES	TERMINOS LLUVIAS	TERMINOS NORTES
Cr	72.30	29.30	168.00	138.00
Mn	1119.50	466.70	891.00	529.60
Fe	42.00	12.00	30.40	26.60
Co	11.00	9.40	11.50	12.00
Cu	51.40	22.70	30.00	20.60
Zn	73.70	34.50	61.00	67.00
Ti	4.10	2.15	3.88	3.06
Ni	47.50	13.20	151.70	144.50
Cd	0.40	0.70	0.46	0.50
Pb	21.50	28.40	27.80	26.40

DISCUSION

Los estudios realizados para evaluar el potencial genotóxico de distintos contaminantes utilizando sistemas biológicos desde procariontes como bacterias hasta diversas especies de eucariontes, levaduras e insectos hasta mamíferos, así como cultivos de tejidos de distintas especies, son muy variados. Sin embargo, los trabajos para determinar el efecto mutagénico de los contaminantes ambientales incorporados en los tejidos de los organismos son relativamente escasos (Shugart, 1989; Viarengo y Canesi, 1991).

Diversos investigadores han definido el efecto mutagénico de una gran cantidad de contaminantes que se han probado en forma individual. Dicha información se ha integrado en largas listas que llegan a ser poco prácticas e innecesarias, ya que el efecto sobre la biota no es causado por un agente xenobiótico, si no por mezclas complejas (Rainbow *et al.*, 1990). No obstante, estos resultados han permitido validar diversos sistemas biológicos para detectar genotoxicidad, en los cuales se han determinado los mecanismos de acción de los agentes genotóxicos puros y han permitido inferir las posibles consecuencias de la contaminación en el ambiente acuático (Shugart, 1989; Shugart y Theodorakis, 1994). A su vez los organismos expuestos pueden actuar como indicadores ya que incorporan casi cualquier clase de contaminante y permiten estimar la severidad del daño, ya que existe una relación entre la dosis recibida, el metabolismo y los efectos biológicos (Kohn, 1983; Shugart y Theodorakis, 1994).

La acción de agentes xenobióticos en los organismos, principalmente los lipofílicos ocurre al ser acumulados en forma inactiva o bien al ser metabolizados (Alink *et al.*, 1983; Buhler y Williams, 1988). El análisis de contaminantes de muestras ambientales puede identificar a las sustancias aisladas, pero no indica nada acerca de las posibles interacciones entre las diversas mezclas de xenobióticos ambientales, ya que pasa por alto a los intermediarios de acción lenta o a la inducción de enzimas específicas (Couch y Harshbarger, 1985). En este trabajo, el extracto de ostión representa una mezcla compleja de agentes contaminantes diversos, inicialmente vertidos en los sistemas costeros y que han experimentado a su vez, diversos procesos de biotransformación (Buhler y Williams, 1988).

Resumiendo los resultados de este trabajo se infiere que se trata de: 1. agentes mutagénicos solubles en agua. 2. Que en general son de efecto indirecto ya que se requiere activación por microsomas hepáticos. 3. Que el mecanismo de mutación es según lo que indican las cepas de tipo corrimiento de mensaje. 4. Y que en general el efecto es mayor en la Laguna de Términos, Camp. (Tablas I y II).

De acuerdo a la información que de manera sistemática se ha colectado acerca de la contaminación en la Laguna de Términos, Camp. y en menor grado de la Laguna de La Mancha, Ver., se observa que hay tres grandes grupos de agentes xenobióticos: hidrocarburos fósiles residuales, pesticidas y metales (Botello y Villanueva, 1988).

La genotoxicidad de los hidrocarburos fósiles residuales depende del número de anillos y pueden provocar pérdida de información del material genético como sustitución y corrimiento del mensaje (McGeorge *et al.*, 1983; Kadhim y Parry, 1984; Canadá 1986; Shugart *et al.*, 1989; Petrilli *et al.*, 1980;). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los más dañinos (Botello y Mandelli, 1979; Harvey, 1982; Stephenson, 1992) pero su efecto mutagénico en *S. typhimurium* requiere de previa activación por los microsomas hepáticos (Tabla X) (McCann *et al.*, 1975; Nylander *et al.*, 1978; Baker, 1980; Toledo, 1982; Stegman, 1985; Bianchi *et al.*, 1989; Viarengo y Canesi, 1991; Mersh-Sunderman *et al.*, 1994). Es difícil que haya HAP en el ostión, ya que Wade *et al.* (1988) demostraron que hay una relación entre el peso molecular del contaminante y su distribución, así los más pesados se sedimentan y quedan atrapados donde son degradados por la flora microbiana (Lee *et al.*, 1978; Fedorak y Westlake, 1981; Toledo, 1982; Wade *et al.*, 1988), mientras que los ligeros permanecen en la columna de agua. Esto a su vez facilita su incorporación en el ostión, sin embargo son poco (Wade *et al.*, 1988). Además se ha observado que solamente a raíz de accidentes petroleros es cuando se ha detectado efecto genotóxico, ya que al parecer solo en estas circunstancias se registran niveles altos de hidrocarburos (Kadhim y Parry, 1984). También hay que considerar que tanto la dinámica de las masas de agua como el acarreo de los ríos tienden a diluir las concentraciones de hidrocarburos fósiles (Botello *et al.*, 1981). Todo lo anterior concuerda con este estudio, en donde no se observó efecto genotóxico en ninguna de las fracciones no polares (FNP) y por lo cual se excluye a los hidrocarburos fósiles como los posibles causantes de la mutagenicidad observada (Tabla III).

Tabla X. Mutagenicidad de hidrocarburos en los sistemas de SMART y Ames.

COMPUESTO	<i>Salmonella typhimurium</i>				<i>Drosophilla melanogaster</i>
	TA98		TA100		
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	
Benceno	-	-	-	-(7)	
Tolueno	-	-	-	-(5)	
Xileno	-	-	-	-(5)	
Cresol	-	-	-	-(5)	
Perileno		+(7)			
Criseno				+(7)	N (3,7)
Pireno	+(3)	+(3)	-(1)	-(1)	
	-(1)	-(1)			
Naftaleno				-	
Fenantreno	w(7)	-(1)	-(1)	+(5,7)	
Antranteno		+(2,7)			
Antraceno	-(2)	-(2)	-(2)	+(7)	
Benzo [a] Antraceno	+	+	+	+(7)	+(1,3,7)
Dibenzo [a,c] Antraceno	+	+	+	+(7)	
Dibenzo [a,h] Antraceno	+	+	+	+(6,7)	+(1,3,7)
Benzo [c] Fenantreno		+(7)			
Benzo [a] Pireno	+	+	+	+(2,7)	
Benzo [e] Pireno		+(7)	+(6)	+(6)	N(1,3)
Dibenzo [c,i] Pireno	+	+	+	+(1,3,7)	N(1,3)

CLAVE

+ Efecto genotóxico positivo. - Efecto genotóxico negativo. w Débil efecto genotóxico. N Efecto no detectado.

REFERENCIAS.

1. McCann *et al.*, 1975; 2. Harworth *et al.*, 1983; 3. Upton *et al.*, 1984; 4. Mortelmans *et al.*, 1986; 5. Zeiger *et al.*, 1988; 6. Zeiger *et al.*, 1992; 7. Marsh-Sunderman *et al.*, 1994.

Los pesticidas provocan alteraciones en el material genético (Randaleff, 1970; Aldridge, 1971; Cerey *et al.*, 1973; Fest y Schimidt, 1973; De la Jara y De la Parra, 1977; Siddiqui *et al.*, 1981; Upton *et al.*, 1984), al reaccionar con los átomos de nitrógeno y oxígeno de las bases purinas y de la citosina, o con los grupos fosfato del ADN (Verly y Brakier, 1970). Dentro del organismo los pesticidas sufren diversos procesos de transformación biológica, liberando metabolitos, muchos de los cuales han sido identificados como responsables de daño genotóxico (Dybing *et al.*, 1989). Las rutas primarias del metabolismo son oxidaciones o hidroxilaciones. En organismos inferiores esta metabolización es efectuada por la fracción del citocromo P-450, mientras que en los superiores ocurre en el hígado (Fest y Smith, 1973; Stegman, 1985; Buhler y Williams, 1988). Los compuestos que individualmente son genotóxicos, al pasar por el metabolismo sufren transformaciones que alteran su estructura química (Tablas XI, XII, XIII y

XVI). En las bacterias se está simulando el metabolismo de mamíferos con microsomas hepáticos, por lo que la producción de metabolitos secundarios aunado a los fenómenos sinérgicos o antagónicos (Alink *et al.*, 1983) actúan de manera indirecta produciendo daño genético (Majumdar *et al.*, 1977; Planche *et al.*, 1979; Harworth *et al.*, 1983; Upton *et al.*, 1984; Mortelmans *et al.*, 1986; Zeiger *et al.*, 1987; Zeiger *et al.*, 1988; Zeiger *et al.*, 1992; Cortes-Eslava, 1993). El efecto genotóxico se presenta de acuerdo a ciertas condiciones específicas, ya que solo ocurre en la fracción soluble, es indirecta y el mecanismo de mutación es en general por corrimiento de mensaje (Tablas I, II y III). De todos los posibles candidatos listados en las tablas XI, XII, XIII y XIV, solamente el dimetilan, el dibromoetano y el sulfato parecen reunir estas especificaciones. Sin embargo, estos compuestos presentan tanto el mecanismo de mutación por corrimiento como por sustitución de mensaje.

Los plaguicidas identificados en la Laguna de Términos, Camp. y Laguna de La Mancha, Ver., incluyen a algunos organoclorados y organofosforados, de ellos solo algunos son genotóxicos (Tablas XI y XII) (Botello y Villanueva, 1988; Díaz-González, 1992; Botello *et al.*, 1994). La identificación de pesticidas en los distintos sustratos de las lagunas (agua, sedimento y organismos) en muchos casos presenta limitaciones técnicas, para establecer su presencia en las Lagunas se recurre a información indirecta, tal como los datos que proporcionan los agricultores y ganaderos o por inferencia de los cultivos y actividades agrícola/ganaderas de la zona. Por lo que el hecho de que no se tengan identificados químicamente no quiere decir que no se utilicen o no se encuentren depositados en los sistemas estuarinos.

Tabla XI. Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* y *Drosophila melanogaster* de plaguicidas organoclorados y carbamidas utilizados en la región de las Lagunas de La Mancha, Ver. y de Términos, Camp.

COMPUESTO	Solubilidad en Agua	<i>Salmonella</i>	<i>Drosophila</i>	La Mancha	Terminos
t-Lindano	Insoluble (7 ppm agua)	-(2,3) °	N	13	14
Heptacloro	Insoluble (4.5 kg/l etanol)	-(2,5,9,12) °	N	13	14
Clordano	Insoluble (0.1ppm agua)	+ (7) °°	N	13	15
Dieldrin (HEOD)	Insoluble	+ (2,8) ♥ -(3,9,12) °	N	13	14, 15
Aldrin	Insoluble	-(2,7,9) °	N	13	14
Diclorvos	Soluble (10000ppm agua)	+(2,6) V	? (2)		
Endrin	Insoluble (17 g/100ml acetona)	-(5,2) ° +(9) ♥	N	13	14
Metooxiclor	Insoluble (2 g/100 ml etanol)	-(2)	-(2)		
DDT	Insoluble (2 g/100 ml etanol)	-(1,2,7) °	? (2)	13	14, 15
pp'DDD	Insoluble (2 g/100 ml etanol)	+(1) ♦ -(2,7) °	? (2)	13	14
pp'DDE	Insoluble (2 g/100 ml etanol)	-(1,2,4,9) °	? (2) +(10,11)	13	14
Dimetilan	Soluble (25% agua)	+(2) ♥	N		
Nemagon	Insoluble (89 ppm agua)	+(2,6) ♦	+(11,16,17)		

CLAVE

N Sin dato. ? Datos inconcluyentes. ° +S9 y -S9. °° TA100 +S9. ♥ TA100 +S9 y -S9 y TA98 +S9. V TA100 +S9 -S9 y TA98 -S9 letal. ♦ TA98 +S9. ♦ TA100 +S9 y TA98 +S9

REFERENCIAS

1. Planche *et al.*, 1987.
2. Upton *et al.*, 1984.
3. Harworth *et al.*, 1983.
4. Mortelmans *et al.*, 1986.
5. Zeiger *et al.*, 1987.
6. Zeiger *et al.*, 1988.
7. Zeiger *et al.*, 1992.
8. Majumdar *et al.*, 1977.
9. Mersh *et al.*, 1994.
10. Valencia *et al.*, 1983.
11. Yoon *et al.*, 1985.
12. Marshall *et al.*, 1976.
13. Botello *et al.*, 1994.
14. Díaz González, 1992.
15. Botello y Villanueva, 1988.
16. Murnik, 1976.
17. Sandhu *et al.*, 1984.

Tabla XII. Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* y *Drosophila melanogaster* de plaguicidas organofosforados utilizados en la región de las Lagunas de La Mancha, Ver. y de Términos, Camp.

COMPUESTO	Solubilidad en Agua	<i>Salmonella</i>	<i>Drosophilla</i>	La Mancha	Términos
Fention	Insoluble (55 ppm en agua)	+ (3) ^o - (1)	- (1)		
Paration	Insoluble (145 ppm agua)	+ (2) †	N		8
EtilParation	Insoluble	- (1)	- (1)		8
Coumapos	Insoluble (1.5 ppm agua)	- (1)	? (1)		
Metil Azinfos	Insoluble (28 ppm agua)	- (1) + (4,9) Δ	- (1)		8
Malation	Insoluble (21 ppm agua)	- (1,2)	- (1)		8
Metil Paration	Insoluble (55 ppm agua)	+ (2) † - (1)	N		8
Diazinon	Soluble (290 ppn/100 ml agua)	- (1,5,7)	N		
Dimetoato	Soluble 3%	+ (2) † - (1)	- (1)		

CLAVE

+ Efecto positivo. - Efecto negativo. N Sin dato. ? Datos inconcluyentes. ° TA100 +S9. † TA100 -S9. ‡ TA100 +S9 y -S9. Δ TA 98 activación vegetal.

REFERENCIAS

1. Upton *et al.*, 1984. 2. Harworth *et al.*, 1983. 3. Mortelmans *et al.*, 1986. 4. Zeiger *et al.*, 1987. 5. Zeiger *et al.*, 1988. 6. Zeiger *et al.*, 1992. 7. Marshal *et al.*, 1976. 8. Díaz González, 1992. 9. Cortes-Eslava, 1993.

Tabla XIII. Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* y *Drosophila melanogaster* de herbicidas utilizados en la región de las Lagunas de La Mancha, Ver. y de Términos, Camp.

COMPUESTO	Solubilidad en Agua	<i>Salmonella</i>	<i>Drosophila</i>	La Mancha	Términos
Sulfalato	Poco soluble (100 ppm agua)	+ (1,2) *	N		7
Monuron	?	- (1,2)	- (1)		7
Trifluralin	Soluble (1400ppm agua)	+ (3) Δ	- (1)		7
Cotoran	Insoluble (80 ppm agua)	- (1)	N		7
Dialato	Poco Soluble (400 ppm agua)	- (1,4,6) Δ	N(5)		7

CLAVE

+ Efecto positivo. - Efecto negativo. N Sin dato. * TA100 +S9 y TA98 +S9. Δ TA100 +S9.

REFERENCIAS

1. Upton *et al.*, 1984. 2. Harworth *et al.*, 1983. 3. Mortelmans *et al.*, 1986. 4. De Lorenzo *et al.*, 1978. 5. Murnik *et al.*, 1976. 6. Sikka y Florczyk, 1978. 7. Diaz González, 1992.

Los metales constituyen un gran problema en el ambiente acuático por la capacidad que tienen para formar complejos con la materia orgánica y por la tendencia a fijarse en los tejidos de los organismos expuestos (Livingston, 1985; Viarengo, 1985; Villanueva y Botello, 1988, Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). La biodisposición de los metales está sujeta a factores de concentración, temperatura, salinidad, presencia de agentes quelantes u otros metales, impermeabilidad de la superficie, estado nutricional, etapa reproductiva, flujo osmótico, entre otros. (Rainbow, 1990). Se adquieren a partir del alimento o por adsorción de formas biolábiles en el tubo digestivo (Aoyama *et al.*, 1978). El Cd se encuentran por arriba del límite máximo permitido (LMP) es de 0.135 ppm (Food and Drug Administration, 1978; Villanueva y Botello, 1992). El (Tabla VIII). En *S. typhimurium* el Mn, Co, Zn y Cd son mutagénicos, ya que provocan desplazamiento del mensaje y no requieren de activación metabólica. Solo en un caso Laguna de Términos, Camp. y otro en Laguna de La Mancha, Ver. se encontró efecto atribuible a los metales. Sin embargo, para detectar la genotoxicidad de los metales en *S. typhimurium*, es necesario aplicar un protocolo experimental específico (Pagano y Zeiger, 1992), y los experimentos así efectuados para confirmar lo anterior dieron todos resultados (Datos no incluidos), por lo que se tiende a descartar el efecto provocado por este grupo de contaminantes. Aunque existe al posibilidad de que los metales se encuentre interaccionando

algún otro tipo de agentes xenobióticos y por lo tanto no disponibles a las bacterias (Pagano y Zeiger, 1992).

Tabla XIV. Mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* y *Drosophila melanogaster* de fungicidas y fumigantes utilizados en la región de las laguna de La Mancha, Ver. y de Términos, Camp.

COMPUESTO	Solubilidad en Agua	<i>Salmonella</i>	<i>Drosophila</i>	La Mancha	Términos
Fenolovo	Insoluble	-(1,4)	N		8
Oxido de propileno	Soluble	+(1,3) ^o	+(1)		8
	(40% en agua)				
Solan	Insoluble	-(1,2)	-(1)		8
Nitrofe	Insoluble	+(1) ▲	N		8
	(1ppm agua)	-(3)			
Dibromoetano	Soluble	+(1,4) ▲	N		8
	250 partes**				
Griseoulvin	Insoluble	-(1,4)	N		8
	(13 g/ml DMF)				
Captan	Insoluble	+(4,5) ▲	-(1)		8
	(290 mg/ml etanol)				
NBT	Insoluble*	+(5,6,7) ▲	N		8
Folpet	Insoluble	+(1) ▲	N		8
	(290 mg/100ml etanol)				
Dexon	Insoluble*	+(4) ▲ ^o	N		8

CLAVE

+ Efecto positivo. - Efecto negativo. N Sin dato. * TA1535 +S9. ▲TA100 +S9 y -S9 y TA98 +S9 y -S9.

REFERENCIAS

1. Upton *et al.*, 1984. 2. Harwhorth *et al.*, 1983. 3. Zeiger *et al.*, 1988. 4. Zeiger *et al.*, 1992. 5. Kada *et al.*, 1974. 6. Shirasu *et al.*, 1976. 7. Kier *et al.*, 1986. 8. Diaz González, 1992

Aunque no se puede atribuir a los metales incorporados por el ostión el leve daño genético registrado en el ensayo de *Salmonella* sin activación metabólica, el riesgo de cáncer para los bivalvos es evidente. En estudios histopatológicos practicados en ostión *Crassostrea virginica* de las costas de Black Rock Harbor, expuestos a sedimentos contaminados se detectó que concentraciones de Ni $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$, Pb $2.6 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$, Cd $1.9 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ y Cr $2.2 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ son evidencia suficiente para atribuirles la incidencia de cáncer en diversos tejidos como el renal, el gastrointestinal, el sistema respiratorio, cardíaco, gonadal y del sistema nervioso

(Gardner *et al.*, 1988). Las concentraciones determinadas en este estudio para Ni, Cr y Cd para la Laguna de Términos, Camp. y Laguna de La Mancha, Ver., se encuentran en todos los casos por arriba de los valores determinados como causales de cáncer (Gardner y Yevich, 1991).

Las determinaciones efectuadas por absorción atómica ostión y sedimento corresponden a las temporadas de lluvias y nortes (Tablas VIII y IX), mientras que las muestras de la temporada de secas fueron analizadas por la técnica de rayos X de fluorescencia. En este último caso el equipo presentó fallas, por lo que es probable que algunos resultados no correspondan a valores reales (Datos no incluidos).

El Cr, Mn, Fe y Co, se encuentran agrupados como elementos mutagénicos (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). Los elementos químicos que tradicionalmente se han asociado con hidrocarburos, son el V y Ni. El vanadio no fue determinado en las muestras de ostión y de sedimento. El níquel esta considerado como elemento esencial, pero en ninguno de los casos se le encontró por arriba del valor establecido de tolerancia para crustáceos (5ppm).

En el ostión de la Laguna de La Mancha, Ver. se encuentra en concentración elevada mientras que en el ostión de la Laguna de Términos, Camp. ocurre lo contrario (Tabla VIII). Se ha reportado que la concentración de Cu en los bivalvos es un reflejo de mecanismos fisiológicos y no existe influencia de las variaciones estacionales (Viarengo, 1985; Lauenstein *et al.*, 1990), aunque es un elemento químico que refleja contaminación (López-Artíguez *et al.*, 1989). También se ha observado que bivalvos de zonas relativamente libres de contaminantes, acumulan mayor cantidad de sustancias potencialmente genotóxicas, tal parece que los organismos sometidos a condiciones extremas de contaminación aceleran los mecanismos de metabolización y/o excreción (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992).

El Zn, es importante en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria e interviene como promotor de la movilidad de los espermatozoides. Los ostiones tienden a acumularlo pero también presentan estrategias metabólicas para eliminarlo (Rainbow, 1990). Tanto el Mn, el Zn y el Cd son de poca genotoxicidad en el sistema de Ames, lo cual puede a su vez ser un reflejo de las propiedades químicas en comparación a otros metales de transición (Rodríguez-Ariza *et al.*, 1992). El Pb y el Cr en cambio, se han caracterizado por ser un elemento típicamente tóxico pero no genotóxico (Forstner y Wittmann, 1979). El número de

muestreos realizados y las concentraciones determinadas en el ostión y en el sedimento de la época de lluvias y nortes no presenta variaciones que puedan vincularse con flujos estacionales. Por último el Ti solo se encontro en el sedimento, lo cual puede indicar que la forma química en el agua de las Lagunas no está biodisponible y todo queda atrapado en el sedimento.

Los resultados indican que se pueden establecer ciertas diferencias entre ambas Lagunas, debido principalmente a los contaminantes introducidos. La bibliografía menciona que la Laguna de Términos, Camp. es una zona con alto grado de desarrollo industrial, vinculado con la extracción del petróleo y con la actividad agrícola, por lo que también es alto el aporte de contaminantes (Díaz-González, 1994; Botello y Villanueva, 1988; Botello, *et al.*, 1992). En cambio en la Laguna de La Mancha, Ver., considerada como testigo en este estudio, las actividades se enfocan principalmente a la agricultura y a la gandería; por lo cual se le considera en proceso de contaminación (Botello *et al.*, 1994). Las rutas de incorporación a las lagunas costeras de pesticidas y otros compuestos provenientes de las zonas de desarrollo, ocurre por escurrimiento y acarreo de los ríos, donde pueden quedar atrapados en las partículas en suspensión y posteriormente en la zona de mezcla agua dulce/agua salada, sedimentarse. Los factores físicos como el viento y el movimiento de las masas de agua vuelven a resuspenderlos dejando a los genotóxicos biodisponibles, cuando el nivel y los aportes de agua disminuyen, la debido a la evaporación. De esta forma una gran cantidad de contaminantes permanecen en el sedimento para ser degradados o bien para que los organismos los asimilen directamente (Toledo, 1982; Stephenson, 1992). Los resultados de los tres muestreos realizados mantienen en general relación entre el daño al ADN y el grado de contaminación, así la genotoxicidad más elevada se registra con los ostiones que por estar en la Laguna más contaminada, tienen la posibilidad de acumular mayor cantidad y tipo de xenobioticos.

La prueba SMART no indica si el mecanismo de mutación es directo o indirecto, pero si permite pueden observar mutaciones génicas y eventos recombinogénicos. Los resultados preliminares muestran un leve efecto mutagénico, que se presenta en ambas Lagunas (Tabla IV). El análisis de viabilidad de larvas tratadas con la Fracción Total (FT) (Tablas V y VI), se observa una disminución en el número de individuos que alcanzan la etapa de adulto. La sobrevivencia en los muestreos de secas y lluvias en Laguna de Términos, Camp. indican cierto efecto letal, aún después de descartar al testigo de etanol (Tabla V), lo cual se puede

atribuir al grupo de los pesticidas, particularmente insecticidas aplicados en los cultivos de las zonas aledañas. Este efecto no se observó en la Laguna de La Mancha, Ver. En el caso de tratarse de algún insecticida, éste provocaría un efecto de letalidad y bajo estas circunstancias el posible daño genético pasa a ser secundario.

Hay similitud entre las pruebas de Ames y SMART en el efecto genotóxico de la Fracción Total (FT). En el caso de la Laguna de Términos, Camp. la comparación entre los resultados de *S. typhimurium* (Tabla I) y los de manchas en el ala de *D. melanogaster* (Tabla IV), indicaron que el grado de coincidencia entre ambos sistemas es del 90% (Tabla VII). De acuerdo a este valor estadístico, se puede establecer que en el extracto de ostión hay compuestos químicos que provocan daño en el material genético en ambos sistemas, aunque el efecto es menor en *D. melanogaster* que en *S. typhimurium*. Lo anterior se podría atribuir a una mayor sensibilidad en una de los dos sistemas, pero como sólo hay un experimento en *D. melanogaster*, no se puede considerar a estos resultados como concluyentes, por lo que sería necesario efectuar más experimentos, ya que el método ha sido ampliamente validado (Würgler y Vogel, 1986).

Otros estudios similares a éste analizan las diferencias en genotoxicidad de contaminantes incorporados en el ostión y en otras dos especies de organismos recolectados todos dentro de un sistema estuarino (Sparks *et al.*, 1982). En Italia se realizó la determinación de genotoxicidad de moluscos de la Laguna de Venecia y se comparó contra organismos de la misma especie adquiridos en el mercado, para después tratar de definir la capacidad de respuesta de los mejillones transportados de zonas con menor cantidad de contaminantes a otras altamente contaminadas (Frezza *et al.*, 1982). En 1992, Rodríguez-Ariza *et al.*, realizaron un estudio con tres especies de bivalvos recolectadas en distintos puntos de la costa del Atlántico Sur y se clasificaron desde altamente contaminados hasta poca contaminados.

Durante el desarrollo del presente estudio, se consideró la posibilidad de tener un testigo de ostiones lavados en el laboratorio, sin embargo la infraestructura y recursos no lo permitieron. Sin embargo se trató de establecer la posible relación entre el grado de contaminación de cada laguna y la genotoxicidad provocada por los contaminantes acumulados por los ostiones. Los extractos de los ostiones provenientes de la Laguna de La Mancha, Ver., considerada como testigo en general ocasionaron menor daño al material genético de *Salmonella typhimurium* que los provenientes de la Laguna de Términos, Camp., con mayor contaminación. Aunque puede tratarse de una coincidencia, la magnitud del daño genotóxico, el tipo de mecanismos y

las fechas de recolecta, pueden mostrar que el efecto es causado por las sustancias xenobióticas detectados por otros estudios, indican que las diferencias se deben a contaminación y no a respuestas metabólicas o antibacteriales del ostión. Sin embargo, para una mayor certeza sería conveniente continuar con los muestreos, en ambas lagunas o ampliarse a otras también del Golfo de México, para así establecer la relación entre el grado de contaminación en los estuarios y la genotoxicidad provocada por agentes xenobióticos incorporados al ostión. Para definir a los contaminantes sería conveniente realizar análisis por cromatografía de gases de las distintas fracciones de ostión en busca de plaguicidas solubles o de otros contaminantes.

CONCLUSIONES

Los resultados indicaron que ambos sistema de prueba detectaron genotoxicidad, pero el de *Salmonella typhimurium* mostró mayor sensibilidad.

No obstante lo anterior, se considera que los de *Drosophila melanogaster* son todavía datos preliminares.

De acuerdo a las diferencias entre ambas lagunas se puede establecer relación entre el grado de contaminación del embalse y la respuesta genotóxica: a mayor contaminación, mayor daño genético. La genotoxicidad mayor en la Laguna de Términos, Camp. puede ser consecuencia del mayor desarrollo agrícola e industrial de la región.

Los muestreos anuales indican diferencias estacionales en la genotoxicidad provocada por los contaminantes acumulados por el ostión. De lo anterior se infiere que si se mantiene periodicidad en los muestreos, es posible establecer un programa de biomonitoreo acerca de la genotoxicidad de contaminantes en tejidos de ostión.

El estudio sugiere que el ostión puede ser un buen indicador de genotoxicidad, ya que acumula contaminantes que según se observó pueden provocar daño genético que a su vez podría reflejarse en la cadena alimentaria.

Se tiende a descartar la posibilidad de que los hidrocarburos sean responsables del daño genético observado, ya que no se encontró efecto en la fracción inorgánica.

Los posibles responsables del daño son de efecto indirecto, solubles en agua y en la mayoría de los casos provocan corrimiento del mensaje genético. Es probable que se trate de algún plaguicida, ya que algunos de los utilizados en la región reúnen las características antes marcadas.

Es poco probable que se trate de metales, también presentes en ambas lagunas, ya que la mutagenicidad conocida es de efecto directo, es decir no requieren de activación metabólica y al aplicar el protocolo específico para metales en *S. typhimurium* el resultado fue negativo en todos los casos.

ANEXO

REACTIVOS

De J.T Baker fueron: sulfato de magnesio ($Mg SO_4 \cdot 7H_2O$), ácido cítrico monohidratado, fosfato de potasio dibásico trihidratado (K_2HPO_4), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), fosfato de sodio dihidrogenado (Na_2HPO_4), fosfato disodio hidrogenado (Na_2HPO_4), dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona.

De Sigma fueron: fosfato de sodio y amonio ($NaH_2N_2PO_4 \cdot 4H_2O$), Nicotin adenin dinucleótido fosfato (NAPD), Glucosa-6-Fosfato, D-biotina, L-histidina, 2-aminofluoreno (2-AF) y azida de sodio (Na_3N).

De Bioxon: agar bacteriológico, glucosa y extracto de levadura.

De Mol. Tox. Co.: extracto hepático liofilizado de rata.

PREPARACION DE REACTIVOS.

SALES DE VOGEL-BONNER (50X).

INGREDIENTES	PARA 100 ml
Agua destilada caliente	67.0 ml
Sulfato de Magnesio ($Mg SO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 g
Acido cítrico monohidratado	10.0 g
Fosfato de Potasio Dibásico Anhidrido (K_2HPO_4)	50.0 g
Fosfato de Sodio y Amonio (K_2HPO_4)	17.5 g

Colocar el agua en un vaso de vidrio sobre un agitador magnético y verter las sales en el orden indicado, a medida que se vaya disolviendo la anterior. Ajustar el volumen y esterilizar a $121^\circ C$ durante 20 min.

SOLUCION DE SALES (KCl 1.65 M, MgCl₂ 0.4M).

INGREDIENTES	PARA 500 ml
Cloruro de Potasio (KCl)	61.5 g
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ • 6H ₂ O)	40.7 g
Agua destilada	Ajustar 500.0 ml

Disolver los ingredientes en el agua. Esterilizar a 121°C durante 20 min. Almacenar en frascos de vidrio con tapon de rosca y refrigerar.

BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.2M, pH 7.4.

INGREDIENTES	PARA 500 ml
Fosfato de Sodio Monobásico 0.2M (NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O, 13.8 g/500ml)	60 ml
Fosfato de Sodio Dibásico 0.2M(NaH ₂ PO ₄ , 14.2 g/500ml)	440 ml

Ajustar el pH con las mismas soluciones. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

SOLUCION DE NADP 0.1M.

INGREDIENTES	PARA 5 ml
NADP	383 g
Agua Destilada Estéril	5 ml

Colocar la cantidad de NADP en tubos de ensaye con tapa de rosca y cubralo con papel metálico. Almacenar en un desecador a -20°C. Agregar el agua solo cuando se vaya a utilizar y mantener en un baño de hielo. No es necesario esterilizar, pero se puede filtrar (tamaño de poro 0.22 µm). Una vez preparado se guarda en el congelador. Permanece estable por 6 meses.

GLUCOSA 6-FOSFATO 1M.

INGREDIENTES	PARA 10 ml
Glucosa 6-Fosfato	2.82 g
Agua Destilada Estéril	10 .00 ml

Colocar las cantidades indicadas de glucosa 6-fosfato en tubos de ensaye cubiertos con papel aluminio. Almacenar en desecadores y solo cuando se vayan a utilizar agregar el agua. La solución puede ser esterilizada por medio de filtros de 0.22 µm.

MEZCLA ENZIMATICA S9 (4%)

INGREDIENTES	PARA 50 ml
Fracción hepática de rata	2.0 ml
MgCl ₂ 0.4M, KCl 1.65M	1.0 ml
Glucosa 6-Fosfato	0.25 ml
NADP 0.1M	2.0 ml
Buffer de Fosfatos 0.2M pH7.4	25.0 ml
Agua Destilada Estéril	19.75 ml

Los ingredientes se agregan en el orden inverso. La mezcla se prepara inmediatamente que se va a utilizar y se mantiene en baño de hielo. Nunca se debe recongelar la fracción sobrante.

MEDIO MINIMO

INGREDIENTES	PARA 1 l
Agar	15 g
Agua Destilada	930 ml
Glucosa al 40 %	50 ml
Sales de Vogler-Bonner (50X)	20 ml

Agregar el agar al agua y esterilizar a 121°C durante 20 min. Cuando la solución se haya enfriado ligeramente, adicionar las sales y la glucosa previamente esterilizadas.

SOLUCION DE HISTIDINA-BIOTINA 0.5mM.

INGREDIENTES	PARA 250 ml
D-Biotina	30.9 mg
L-Histidina.HCl	24.0 mg
Agua Destilada	250.0 ml

Disolver la biotina en agua caliente. Esterilizar por filtración (tamaño de poro 0.22 µm) o a 121°C durante 20 min. Almacenar en recipientes de vidrio a 4°C.

AGAR BLANDO

INGREDIENTES	PARA 500 ml
Agar	3.0 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	2.5 g
Agua Destilada	500.0 ml

El agar se puede disolver en agua caliente o en una parrilla con agitador magnetico. Una vez disuelto, prepare alicuotas de 100 ml y esterilizar a 121°C durante 20 min.

REFERENCIAS

- ALDRIDGE, W.N. 1971. The nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases. *Bull. WHO.* **44**: 25.
- ALINK, G.M., H.A. Smith, J.J. van Houdt, J.R. Kolkman y J.S.M. Boleij. 1983. Mutagenic activity of airborne particles at non-industrial locations. *Mutat. Res.* **116**: 21-34.
- AMES, B.N., J. McCann y E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**: 347-363.
- AMEZCUA-LINARES, F. y A. Yañez-Arancibia. 1980. Ecología de los sistemas fluvio-lagunares asociados a la Laguna de Términos. El habitat y estructura de las comunidades de peces. *An. Centro Cienc. del Mar y Limno. Univ. Nat. Auton. México.* **7**(1):69-117.
- APHA - American Public Health Association. 1985. Standard methods for examination of water and wastewater. 16 Ed. Washington, D.C. 1268 pp.
- AOYAMA, I., Y. Inoue y Y. Inoue. 1978. Experimental study on the concentration process of trace element through a food chain from the viewpoint of nutrition ecology. *Water Res.* **12**: 831-836.
- BAKER, J.M. 1980. Impact of oil pollution on living resources, IUNCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). *Commission of Ecology Papers.* Núm. 4.
- BEATY, R. 1979. *Instrumentation and techniques in Atomic Absorption spectrometry.* Perkin Elmer Co. USA.
- BECKING, C.A. 1979. *Report of the workshop on biological screening tests.* EPA-600/9-004 U.S. Environmental Protection Agency, Las Vegas, Neu.
- BIANCHI, A.P., C.A. Bianchi y M.S. Varney. 1989. Marina development as sources of hydrocarbons inputs to Estuaries. *Oil Chem. Pollut.* **5**:477-488.
- BOTELLO, A.V. y S. Villanueva. 1978. Variaciones de los parámetros hidrológicos en las épocas de sequías y lluvias (mayo y septiembre, (1974) en la Laguna de Términos. *An. Centro Cienc. del Mar y Limno. Univ. Nat. Auton. México.* **5**(1):159-178.
- BOTELLO, A.V. y E.F. Mandelli. 1979. Organic carbon isotope ratios of recent sediments from coastal lagoons of the Gulf of Mexico, Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* **44**: 557-559.
- BOTELLO, A.V., C. Alvarez, L. Cells, J. Mejía, R. Salas y F. Ponce de León. 1981. Cuantificación de hidrocarburos fósiles y metales pesados en sedimentos y organismos marinos (camarón, moluscos y peces) de la Sonda de Campeche. *Segundo Informe Parcial del Programa Coordinado de Estudios Ecológicos en la Sonda de Campeche.* UNAM-ICMyL. 32pp.
- BOTELLO, A.V. 1982. La contaminación en el mar. *Ciencia y Desarrollo.* **43**: 91-101.
- BOTELLO, A.V. y S. Villanueva. 1988. La contaminación y procesos geoquímicos en la Laguna de Términos, Campeche; México. *Ecología y Conservación del Delta Usumacinta y Grijalva. Memorias.* 493-516.
- BOTELLO, A.V., G. Ponce Vélez, A. Toledo, G. Díaz González y S. Villanueva. 1992. Ecología, Recursos Costeros y Contaminación e Golfo de México. *Ciencia y Desarrollo.* **18**(102): 28-48.

- BOTELLO, A.V., A. González-Fierro, G. Ponce-Velez, G. Díaz-González, L. Rueda-Quintana, S. Villanueva-Fregoso, P. Rodríguez-Castañeda, N. Becerra-Tapia, S. Espina, C. Vanégas-Pérez. 1994. **Estudio Geoquímico y diagnóstico ambiental de las lagunas de los alrededores de la Central Nucleoeléctrica Laguna Verde, Veracruz.** Convenio de Colaboración UNAM-ICMyL y CFE-Central Nucleoeléctrica de Laguna Verde-Laboratorio de Monitoreo y Dosimetría Ambiental. 128 pp.
- BUHLER, D.R. y D.E. Williams. 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxicol.* 11: 19-28.
- BRUSICK, D. 1987. **Principles of Genetic Toxicology.** Plenum Press. New York. 284 pp.
- CANADA. 1986. Minister of National Health and Welfare and Minister of the Environment. Advisory Committee on Mutagenesis. **Guidelines on the use of Mutagenicity Test in the Toxicological Evaluation of Chemical,** Ottawa. 84 pp.
- CEREY, K., V. Izakovic y J. Rutkay-Nedeka. 1973. Effect of heplaclor on dominant lethality and bone marrow in rats. *Mutat. Res.* 21, 26.
- CONNER, W. H., F.X. Flores Verdugo, J. Day Jr., F. Vera Herrera y V. H. Rivera. 1988. Estructura y productividad de los manglares de la Costa Mexicana del Pacífico. **Ecología y Conservación del Delta Usumacinta y Grijalva. Memorias.** 549- 472.
- CONTRERAS, F. 1985. **Las lagunas costeras mexicanas.** Centro de Ecodesarrollo. Secretaría de Pesca, México, D. F. 115pp.
- CORTEZ-ESLAVA, J. 1993. Evaluación del daño mutagénico provocado por los insecticidas organofosforados foxim y metil azinfos en *Salmonella typhimurium* a través del metabolismo vegetal. **Tesis de Maestría en Ciencias (Biología).** Facultad de Ciencias U.N.A.M. 70 pp.
- COUCH, J.A. y J.C. Harshbarger. 1985. Effects of carcinogenic agents on aquatic animals: An environmental and experimental overview. *Environ. Carcinogenesis Revs.* 3(1): 63-105.
- COUTIÑO, R.R. 1982. Contribución al conocimiento de la fauna acompañante de la población ostrícola de la Laguna de La Mancha, Ver. **Tesis Profesional.** Universidad Veracruzana. Xalapa Ver. 85pp.
- DE LA JARA, F. y C.A. De La Parra. 1977. **Manual de toxicología y tratamiento de las intoxicaciones con plaguicidas.** Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, A.C. 39-51.
- DE LONRENZO, F., N. Slaiano, L. Silengo and R. Cortese. 1978. *Cancer Res.* 38: 13-15
- DÍAZ-GONZALEZ, G. 1992. Determinación de hidrocarburos organoclorados en sedimento y organismos de la plataforma continental y zonas costeras del Golfo de México. **Tesis Doctoral.** Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, U.N.A.M. 169pp.
- DIXON, D.R. 1983. Sister chromatid exchange and mutagens in the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.* 14(8): 282-284.
- DYBING, E., J.G. Omichinski, E.J. Soderlund, G. Brunborg, M. Lag y J.A. Holme. 1989. Mutagenicity and organ damage of 1,2-Dibromo-3-chloropropane (DBCP) and Tris (2,3-Dibromopropyl)Phosphate (Tris-BP): Role of metabolic activation. En: *Reviews in Biochemical Toxicology.* Eds. E. Hodgson, J. R. Bend and R. M. Philpot. Elsevier Science Publishing Co., Inc. 139-186.

- FEDORAK, P.M. y D.W.S. Westlake. 1981. Microbial degradation of aromatic and saturates in Prodhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography. *Can. J. Microbiol.* 27: 432-443.
- FEST, C. y K.J. Schmidt. 1973. *The chemistry of organophosphorus pesticides*. Springer, Berlin.
- FLORES-ANDOLAIS, F. 1981. Aspectos ecológicos y comunidades de moluscos en la Laguna de La Mancha, Ver., México. VII Simposio Latinoamericano Oceanográfico. Resúmenes. 123pp.
- FLORES-ANDOLAIS, F., A. García-Cubas y A. Toledano-Granados. 1988. Sistemática y algunos aspectos ecológicos de los moluscos de la Laguna de La Mancha, Ver., México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nat. Auton. México.* 15(2): 235-358.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1978. Fed. Reg. Ref. CPG 7108.07.
- FORSTNER, V y G.T.W. Wiltmann, 1979. *Metal pollution in the aquatic environment*. Foreword by Edward D. Goldberg. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 486 pp.
- FREZZA, D., B. Pegoraro y S. Presciuttini. 1982. A marine host-mediated assay for the detection of mutagenic compounds in polluted sea waters. *Mutat. Res.* 104: 215-223.
- FRIAS, H., M. Breña y O. Olvera. 1990. Posible efecto mutagénico de ostión colectado en el Canal del Chijol, Ver. I. Congreso Nacional de Genética, Sociedad Mexicana de Genética. Tlaxcala. 13.
- GARCIA-BELLIDO, A. y J. Dapena. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 128: 117-130.
- GARDNER, G.R., P.P. Yevich, J.C. Harshbarger y A.R. Malcolm. 1988. Comparative Histopathological effects of chemically contaminated sediment on marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 24: 311-316.
- GARDNER, G.R. y P.P. Yevich, J.C. Harshbarger y A.R. Malcolm. 1991. Carcinogenicity of Black Rock Harbor sediment to the eastern oyster and trophic transfer of Black Rock Harbor carcinogens from the blue mussel to the winter flounder. *Environ. Health Perspectives.* 90: 53-66.
- GRAF, U., H. Juon, A.J. Kats, H.J. Frei y F.E. Würzler. 1983. A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120: 233-239.
- HARVEY, R.G. 1982. Polycyclic hydrocarbons and cancer. *American Scientist.* 70: 366-393.
- HAWORTH, S., T. Lawlor, K. Morteimans, W. Speck y E. Zeiger. 1983. *Salmonella* mutagenicity test results from 250 chemicals. *Environ. Mutagen.* 5 (Suppl. 1): 3-142.
- JOINT GROUP OF THE EXPERTS ON THE SCIENTIFICS OF MARINE POLLUTION. Impact Oil on the Marine Environment. 1977. *Reports and Studies.* 6: 255pp-
- KADA, T., M. Moriya y Y. Shirasu. 1974. Screening of pesticides for DNA interactions by rec-assay and mutagenesis testing and frameshift mutagens detected. *Mutat. Res.* 26: 243-248.
- KADHIM, M. y J.M. Parry. 1984. The detection of mutagenic chemicals in the tissues of shellfish exposed to oil pollution. *Mutat. Res.* 136: 93-105.

- KIER, L.D., D.J. Brusick, A.E. Auletta, E.S. Von Halle, M.M. Brown, V.F. Simmon, V. Dunkel, J. McCann, K. Mortelmans, M. Prival, T.K. Rao y V. Ray. 1986. The *Salmonella typhimurium* microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 168: 69-240.
- KOHN, K. W. 1983. The significance of DNA-Damage assays in toxicity and carcinogenicity assessment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 407: 106-118.
- KOOL, H.J., C.P. van Kreijl, H.J. van Krane y e. de Greef. 1981. The use of XAD-Resins for the detection of mutagenic activity in water. *Chemosphere.* 10: 85-98.
- KWAN, K.K., B.J. Dutka, S.S. Rao. y D. Liu. 1989. Mutatox Test: A new environmental impact assessment procedure for water and sediment. *NWRI Contribution.* 89(156): 1-15pp.
- LANGVIN, R., J.B. Rasmussen, H. Stoterdijk y C. Blaise. 1992. Genotoxicity in water and sediment extracts from the St.Lawrence River System, using SOS Chromotest. *Wat. Res.* 26(4): 419-429.
- LAUENSTEIN, G. G., A. Robertson y T.P. O'Connor. 1990. Comparison of trace metal data in mussel and oyster from a 1980's programme. *Mar. Pollut. Bull.* 5(1): 440-447.
- LEE, R.F., W.S. Gardner, J. W. Anderson, J.W. Blaylock y J.Barwell-Clarke. 1978. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in controlled ecosystem enclosures. *Environ. Sci. Technol.* 12: 832-838.
- LINDSLEY, D.L. y E.H. Grell. 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution, Publ. no. 627, Washington D.C.
- LINDSLEY, D.L. y G. Zimm. 1985. The genome of *Drosophila melanogaster*. Part I: Genes A-K. D.I.S. 62: 1-277.
- LIVINGSTONE, D.R. 1985. Responses of the detoxication/toxication enzyme systems of molluscs to organic pollutants and xenobiotics. *Mar. Pollut. Bull.* 16(4): 158-164.
- LOPEZ-ARTIGUEZ, M., M.L. Soria y M. Repetto. 1989. Heavy metals in bivalve molluscs in the Hueiva Estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 634-642.
- MAGNUSON, J. y C. Ramei. 1990. Inhibitor of poly(ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis.* 5: 511-514.
- MAJUMDAR, S.K., I.G. Maharan y G.A. Vigliati. 1977. Mutagenicity of dieldrin in *Salmonella* microsome test. *J. Herd.* 68: 184-185.
- MANCILLA, P.M. y F.M. Vargas. 1980. Los primeros estudios sobre la circulación y el flujo neto de agua através de la Laguna de Términos, Campeche. *An. Cento del Mar y Limnol. Univ. Nat. Auton. de México.* 7:1-12.
- MARON, D.M. y B.N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- MARSHAL, T.C., H.W. Dorough y H.E. Swin. 1976. Screening of pesticides for mutagenicity potential using *Salmonella*. *Agric. Food. Chem.* 24: 560-563.

- MARTNEZ-JERONIMO, F. 1991. La importancia de los bioensayos en la evaluación de la toxicidad acuática. *Universidad: Ciencia y Tecnología*. 1(4): 37-44.
- McCANN, J., E. Choi, E. Yamasaki y B.N. Ames. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72(12): 5135-5139.
- McGEORGE, L.J., J.B. Louis, T.B. Atherholt y G.J. McGarril. 1983. Mutagenicity analyses of industrial effluents: Background, results to date. *Report of the New Jersey Department of Environmental Protection*, Trenton, N.J.
- MERSH-SUNDERMAN, V., U. Schneider, G. Klopman y H.S. Rosenkrans. 1994. SOS induction in *Escherichia coli* and *Salmonella* mutagenicity: A comparison using 330 compounds. *Mutagenesis*. 9(2): 205-224.
- MORA, P.C. y M.F. Ramírez. 1980. Los componentes de la ictiofauna y su variación estacional en la Laguna de La Mancha, Ver., México. *IV Congreso Nal. Zool. Resúmenes*. 47pp.
- MORTELMANS, K., S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer y E. Zeiger. 1986. *Salmonella* mutagenicity test: II. Results from the testing of 225 chemicals. *Environ. Mutagen*. 8(Suppl. 7): 1-119.
- MULLER C. y S. Anderson. 1991. Genotoxic effects of complex marine sediment extracts on V79 chinese hamster lung fibroblast. *Environ. Toxicol. Chem*. 10: 1149-1153.
- MURNIK, M.R. 1976. Mutagenicity of widely-used herbicides. *Genetics*. 83: S54 (abstract).
- NACCI, D., S. Nelson, W. Nelson y E. Jackinm. 1992. Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Mar. Environ. Res*. 33: 83-100.
- NAUEN, C.E. 1983. *Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Fisheries Circular No. FIR/C764. Roma Octubre 1983. 42 pp.
- NELSON, A. y P. Donkin. 1995. Processes of bioaccumulation: the importance of chemical speciation. *Mar. Pollut. Bull*. 16(4): 164-169.
- NOVELO, R.A. 1978. La vegetación de la estación biológica El Morro de La Mancha, Ver. *Botánica*. 3(1): 9-23.
- NYLANDER, P., H. Olofsson B. Rasmuson y H. Svalin. 1978. Mutagenic effects of petrol in *Drosophila melanogaster*. I. Effects of Benzene and 1,2-Dicloroetano. *Mutat. Res*. 57: 163-167.
- OLVERA, O., E. Pimentel, M.P. Cruces, M.E. de la Rosa y J. Guzmán. 1990. Determinación del efecto genotóxico del ostión *Crassostrea virginica* del Canal del Chijol, Ver. *Informe Técnico Redbiología-ININ*. 11pp.
- OLVERA, O., M.P. Cruces, E. Pimentel, C. Arceo, J. Guzmán, M.E. de la Rosa y P. Avila. 1992. Evaluation of the mutagenic effect of oysters by means of the SMART Technique. *1st. International Conference on Environmental Mutagenesis In Human Populations at Risk. Calro, Egypt*. Abstract.
- PAGANO, D.A. y E. Zeiger. 1992. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen*. 19: 139-146

- PARRY, J.M., D.J. Tweats y M.A.J. Al-Mossawi. 1976. Monitoring the marine environment for mutagens. *Nature*. **264**: 538-540pp.
- PATRICK, R. 1973. Use of algae specially diatoms in the assessment of water quality. In *Biological methods for assessment of water quality* ASTM. Philadelphia. STP-528.
- PEREZ-NOVARA, A.M. 1983. Cuantificación de contaminantes metálicos por Rayos X de Fluorescencia. *Informe Técnico GSTN-002-85*. ININ-México.
- PESCH, G.G. y C. E. Pesch. 1980. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **37**: 1225-1228.
- PETRILLI, F.L., G.P. De Renzi y S. De Flora. 1980. Interaction between polycyclic aromatic hydrocarbons, crude oil and oil dispersants in the Salmonella mutagenesis assay. *Carcinogenesis*. **1**: 51-56.
- PHLEGER, B.F. y A. Ayala C. 1971. Process and history of Terminos Lagoon, México. *Amer. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* **55**(2): 2130-2140.
- PICA, G.Y. 1985. Determinación de los niveles de contaminación fecal de la Laguna de Términos, Campeche, mediante la cuantificación de bacterias coliformes y coprostanol (dos métodos comparativos). Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 70 pp.
- PLANCHE, G., A. Croisy, C. Malavelli, L. Tomatis y H. Bartsch. 1979. Metabolic and mutagenicity studies on DDT. *Chem. Biol. Interact.* **25**: 157-175.
- PONCE-VELEZ, G. y A.V. Botello. 1992. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiología*. **1**(2): 1-10.
- PRESLEY, B.J., Y. Kolodny, A. Nissenbaum e I. R. Kaplan. 1972. Early diagenesis in a reducin fjord, Saanich Inlet, British Columbia - 11. Trace element distribution in interstitial water and sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **36**: 1073-1090.
- RAINBOW, P., D.J.H. Phillips y M.H. Depledge. 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for Laboratory Investigation of Accumulation Strategies. *Mar. Pollut. Bull.* **21**(7): 321-324.
- RAND, G.M. y S.R. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation. New York.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A. N. Abril, J.I. Navas, G. Dorado, J. López Barea y C. Pueyo. 1992. Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coast. *Environ. Mol. Mutagen.* **19**: 112-124.
- ROHM y Hass Company. 1978. Summary Bulletin. Amberlite Polymeric Adsorbents. 11pp.
- ROHM y Hass Company. 1993. Amberlite XAD-2. Product Description. 3pp.
- ROSALES, M.T.L. y L.R. Alvarez. 1979. Niveles actuales de hidrocarburos organoclorados en sedimentos de lagunas costeras del Golfo de México. *An. Centro Cienc. del Mar y Limno. Univ. Nal. Auton. México.* **6**(2): 1-6.
- ROSAS, I., A. Báez y R. Belmont. 1983. Oyster (*Crassostrea virginica*) as indicator of heavy metal pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico. *Wat. Air and Soil Poll.* **20**: 127-135.
- ROSAS, I., A. Yela y A. Baez. 1985. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en ostión (*Crassostrea virginica*) durante su desarrollo y procesamiento en el mercado. *Rev. Contam. Ambient.* **1**: 51-64.

- SAMONELLA ASSAY ANALYSIS (SALANAL). Integrated Laboratory Systems. U.S. Environmental Protection Agency. 6pp.
- SANDHU, S.S., M.D. Waters, K.E. Mortelmans, E. L. Evans, M.M. Jotz, A.D. Mitchell y V. Kasica. 1984. Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of *in vitro* and shorte term *in vivo* tests. *Mutat. Res.* **136**: 173-183.
- SANTIAGO-HERNANDEZ, J.A. 1993. Determinación de genotoxicidad de ostones contaminados con petroleo y sus derivados en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. *Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Zaragoza".U.N.A.M.* 77pp.
- SECRETARIA DE DESARROLLO URBANO Y ECOLOGIA. 1990. *Gaceta Ecológica*. II(6): 64 pp.
- SHIRASU, Y. M. Moriya, K. Kato, A. Furuhashi y T. Kada. 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* **40**: 19-30.
- SHUGART, L.R. 1989. DNA. Damage as an Indicator of pollutant-induced genotoxicity. *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. Ed. W.G. Landis and H. van der Schalie, American Society for Testing and Materials. Philadelphia. Vol. 13. ASTM STP1096. 348-355.
- SHUGART, L.R., J. Bickham, G. Jackim, G. McMahon, W. Ridley, J. Stein y S. Steiner. 1989. DNA Alterations. En *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Marker of Antroprogenic Stress*. Edited by R.J. Huggett, R.A.Kimerle, R.M. Mehrle Jr., H.L.Bergman. Lewis Publishers Colorado. 125-153.
- SHUGART, L.R. y C. Theodorakis. 1994. Environmental genotoxicity: Probing the underlying mechanisms. *Environ. Health Perspect.* **102**(12): 13-17.
- SIDDIQI, M.K.J., C.S. Mukesh, K.B. Ajeet, R.K.M. Coimbatore and D. Kully. 1981. Human chlorinated hydrocarbon pesticides in blood of newborn babies in India. *PEMJAD.* **15**: 77-79.
- SIKKA, H.C. y P. Florczyk. 1978. Mutagenic activity of thiocarbamate herbicides in *Salmonella typhimurium*. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 146-148.
- SNYDER, R.D. 1990. Modulation of DNA repair by metals. En *Biological effects of heavy metals*. Vol. II. Metal Carcinogenesis. De. E.C. Foulkes. 77'93.
- SPARKS, T.H., J.R. Baylis y C.W.J. Chang. 1981. Comparison of mutagen accumulation in 3 estuarine species using the *Salmonella*/microsome activation system. *Mutat. Res.* **85**: 133-139.
- STEGMAN, J.J. 1985. B[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species. *Mar. Biol.* **89**: 21-30
- STEPHENSON, M.T. 1992. Components of produced water: A compilation of industry studies. *J. Petrol. Technol.* **44**(5): 548-550.
- SUNILA, I. 1988. Acute hitological responses of the gill of the mussel *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *J. Invertebrate Path.* **52**: 137-141.
- TOLEDO, A. 1982. *Petroleo y ecodesarrollo en el sureste de México*. Centro de Ecodesarrollo. 253pp.
- UNESCO,1976. Guide to operational procedures for the IGOSS pilot proyect on marine pollution (petroleum). Monitoring Manual and Guides No. 7.

- UPTON, A.C., D.B. Clayson, J.D. Jansen, H.S. Rosenkranz y G.M. Williams. 1984. Report of ICPEMC Task group 5 on the differentiation between genotoxic and non genotoxic carcinogens. *Mutat. Res.* **133**: 1-49.
- VALENCIA, R., S. Abrahamson, W. R. Lee, E. S. van Halle, R. C. Woodruff, F.E. Wurgler y S. Zimmering. 1983. Chromosome mutation test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **134**: 61-88.
- VALKOVIC, V. 1980. *Analysis of biological materials for trace elements using X-Ray spectroscopy*. Ed. Vlado Valkovic. Boca Ralón, Fla. CRC. Press. 242 pp.
- VAN DER HOEVEN, N., S.A.L.M. Koolijman y W.K. de Raat. 1990. Salmonella test: Relation between mutagenicity and number of revertant colonies. *Mutat. Res.* **234**: 289-302.
- VARGAS, V.M.F., V.E.P. Motta y J.A.P. Henriques. 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* **319**: 31-45.
- VARMA, A. 1985. *Handbook of atomic absorption analysis*. Vol. 1. C.R.C. Press. USA.
- VERA HERRERA, F., J. L. Rojas Galaviz y A. Yañez Arancibia. 1988. Pantanos Dulceacuícolas influenciados por la marea en la región de la Laguna de Términos: estructura ecológica del sistema fluvio-deltaico del Río Palizada. *Ecología y Conservación del Delta Usumacinta y Grijalva. Memorias.* 383-402.
- VERLY, W.G. AND L. Brakier. 1970. Mecanisme moleculaire de l'action toxique des agents alkylals. *Rev. Europ. Etudes Clin. Et. Biol.* **15**: 483-488.
- VIARENGO, A. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* **16**(4): 153-158.
- VIARENGO, A. y L. Canesi. 1991. Mussels as biological indicator of pollution. *Aquaculture.* **94**: 225-243.
- VILLANUEVA, F. S. y A.V. Botello. 1988. Evaluación de algunos metales pesados en organismos del Río Coatzacoalcos y de la Laguna del Ostión, Ver., México. *Rev. Contam. Ambient.* **4**: 19-31.
- WADE, T.L., E.L. Atlas, J.M. Brooks, M.C. Kennicutt II, R.G. Fox, J. Sericano, B. Garcia-Romero y D. Defreitas. 1988. NOAA. Gulf of Mexico status and trends program: Trace organic contaminant distribution in sediments and oysters. *Estuaries.* **11**(3): 171-179.
- WÜRGLER, F.E. y E.W. Vogel. 1986. *In vivo mutagenicity testing using somatic cells of Drosophila melanogaster*. Chemical mutagens. Principles and Methods for their detection. Plenum Press, Nueva York. 10: 1-72.
- XIMENEZ, H.L. 1980. *Espectroscopia de Absorción Atómica*. Vol. 1. Introducción. Publicaciones Análíticas. España.
- YAMASAKI, E. y B.N. Ames. 1977. Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resins XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**.
- YOON, J., J. Mason, R. Valencia, R. Woodruff y S. Zimmering. 1985. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IV. Results of 45 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.* **7**: 349-367.
- ZEIGER, E., B. Anderson, S. Harworth, T. Lawlor, K. Mortelmans y E. Speck. 1987. *Salmonella* mutagenicity test: III. Results from testing of 255 chemicals. *Environ. Mutagen.* **9**(Suppl.9): 1-110.

ZEIGER, E., B. Anderson, S. Harworth, T. Lawlor y K. Mortelmans. 1988. *Salmonella* mutagenicity test: IV. Results from testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **11**(Suppl. 12):1-110.

ZEIGER, E., B. Anderson, S. Harworth, T. Lawlor y K. Mortelmans. 1992. *Salmonella* mutagenicity test: V. Results from testing of 311 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **19**(Suppl. 21): 2-141.