

00366



POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Efecto y bioconcentración de mercurio en el gusano de fuego *Eurythoe complanata* (Annelida: Polychaeta) de la zona intermareal de Mazatlán, Sinaloa, México.

T E S I S
para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

Biol. Ramón Vázquez Núñez

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. NURIA MÉNDEZ UBACH
COMITÉ TUTORAL: DR. CARLOS R. GREEN RUÍZ
Y JURADO DR. JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO
DRA. LUZ MARÍA GARCÍA DE LA PARRA
DR. JORGE RUELAS INZUNZA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mazatlán, Sin. 2005

m343897



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

*Lo importante no es vencer a 1000 guerreros
Sino vencerse a si mismo.*

*Sun Tzu
-El Arte de la Guerra-*



Dedicado

A mis Padres

Quienes siempre me han apoyado para que salga adelante y confían en mi para lograr todas mis metas; a quienes no defraudare.

A mi hermana

Por todo su apoyo y por que hemos superado esas barreras que nos atañían.

A mi abuela Guadalupe y Mercedes y a todos mis tíos y tías, a mis primos

..... A todos ustedes, quienes son muy especiales para mi.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT y Becas Nacionales por el apoyo brindado con la beca durante la maestría.

A la Dra. Nuria Méndez por brindarme sus conocimientos, su confianza en la realización de este trabajo y sobre todo por su gran amistad y por su gran sentido del humor, lo cual ha sido muy valioso para lograr hacer este trabajo.

A mis sinodales, el Dr. Carlos Green, Dra. Luz Maria García, Dr. José Luis Carballo, Dr. Jorge Ruelas por todo el apoyo y la orientación que he recibido de ustedes, así como por la amistad que me han brindado.

Al M. en C Sergio Rendón y al Dr. José Salgado por su apoyo durante las salidas al campo para la recolección de muestras.

A Germán Ramírez y Carlos Suárez por su ayuda en el centro de computo y en lo relacionado a asuntos técnicos, así como a Ignacio Palomares por ayudarme a subir la información a la red .

A Clara Ramírez y Pedro Allende por su ayuda y paciencia durante la consulta de literatura en la biblioteca.

Al Quím. Humberto Bojórquez Leyva por su apoyo con la metodología para analizar mercurio.

A Daniel Sarabia y a todos los del taller por su ayuda con lo relacionado a las lanchas para los muestreos y cuando se presentaba algún problema técnico.

A Magali por toda su ayuda con tramites académicos y por aguantarnos a Manuel, Arturo, Jorge y a mi cuando nos reuníamos ahí.

A Rosalba por su ayuda con las fotos que he usado en la tesis, así como por sus consejos que me han sido muy valiosos.

A Natalia por brindarme siempre su ayuda y por su amistad.

A mi amiga Mayra y compañera de todas las pachangas, por todas las cosas que tuvimos que aguantarnos y también por los buenos y malos momentos, pero sin duda fue una buena aventura la que pasamos aquí en Mazatlán y hemos logrado alcanzar las metas planteadas para este reto.

A mi amigo Neptalí y compañero de pachangas y tours, quien me ha brindado su amistad durante este tiempo y también su apoyo en la tesis, por que aun con todo y las desveladas, siempre estábamos puestos a los deberes del laboratorio y a la vez cargando la pila para otro megatour. Y también, aparte de irnos de fiesta, fue alguien con quien poder hablar y en quien poder confiar.

A mis amigos

Al pajuelo de Jhonny por sus buenos consejos y porque ha sido un gran amigo en quien confiar; al maxter Víctor por su apoyo tanto en el laboratorio como fuera de el y por sus enseñanzas con la guitarra; a Manuelix y Arturix (Manuel y Arturo) con quienes he pasado buenos momentos y quienes han sido buenos amigos; a Eloy gameno; a Jorge (conocido en el bajo mundo como el azote del itmar); Hugo ol; Memo; Samuel; Noranuel (conocido también como Manuel). A mi amigo Luis Enrique y a su familia por el apoyo que me han dado... a todos ustedes y a los que no he mencionado o se me escapen, gracias amigos.

A mis amigas

A Karla quien aprecio mucho y quien es una gran chica en quien he podido depositar toda mi confianza; Zaira por toda la carrilla que me ha aguantado y por su gran sentido del humor, así como ha sido alguien que me ha sabido escuchar; Nora; Elenice quien ha sido una persona muy especial y a quien aprecio mucho; Gisela por sus cafés que preparaba en el lab y por ser una gran amiga; Dilian quien siempre esta atenta a ayudar y a escuchar a los demás; Adriana quien es una gran amiga; Roxana; Rebeca por su apoyo en el laboratorio; Sandra a quien aun con lo poco que nos conocimos creo que es una gran persona y una estupenda amiga a quien aprecio mucho; Febe quien es una chica muy especial y con gran animo que contagia; Kissy quien es una gran chica a quien aprecio mucho; Lupita por su amistad y por ser una gran persona; Herlinda por su ayuda en el centro de computo y por su amistad.

Armando y Daniela por su ayuda en el laboratorio con el espectrofotómetro.

A mi tío Carlos por toda la ayuda que me dio desde que inicie la tesis, así como a mi tía Ceci que me apoyo mucho, a mi tío Enrique, a mi tía Lety y mi prima Belén por todo el apoyo que me han dado.

De verdad les agradezco a todos ustedes, por haber hecho de mi estancia en Mazatlán una gran experiencia y a todas aquellas personas que omita, y no por eso sean menos importantes, pero que sepan que aquí las incluyo...

¡¡MUCHAS GRACIAS!!

INDICE

| | |
|---|-----------|
| Resumen..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 2. Antecedentes..... | 7 |
| 2.1. Metales pesados..... | 7 |
| 2.2. Mercurio..... | 8 |
| 2.3. Importancia de los Poliquetos..... | 10 |
| 2.4. Bioconcentración de Metales Pesados en Organismos Marinos..... | 11 |
| 2.5. Efectos de Metales Pesados en Poliquetos..... | 13 |
| 3. Hipótesis..... | 15 |
| 4. Objetivos..... | 16 |
| 5. Área de Estudio..... | 17 |
| 6. Materiales y Métodos | 20 |
| 6.1. Variación estacional de la concentración de Hg en <i>E. complanata</i> y sedimento..... | 20 |
| 6.1.1. Muestreo..... | 20 |
| 6.1.2. Determinación de Hg en <i>E. complanata</i> y en sedimento..... | 20 |
| 6.1.2.1. Evaluación de la técnica..... | 22 |
| 6.2. Bioensayos de Bioacumulación-Recuperación..... | 23 |
| 6.2.1. Manejo de organismos..... | 23 |
| 6.2.2. Pruebas preliminares de exposición a Hg..... | 23 |
| 6.2.3. Bioensayos de Bioacumulación-Recuperación..... | 24 |
| 6.2.4. Preparación de soluciones de mercurio para los bioensayos..... | 25 |
| 6.2.5. Determinación de Hg en <i>E. complanata</i> , sedimentos y soluciones..... | 26 |
| 6.2.6. Balance de Hg..... | 26 |
| 6.2.7. Análisis estadísticos..... | 27 |
| 6.2.8. Determinación de lesiones..... | 27 |
| 7. Resultados..... | 28 |
| 7.1. Variación estacional de la concentración de Hg en <i>E. complanata</i> y sedimento..... | 28 |
| 7.2. Bioensayos de Acumulación-Recuperación..... | 28 |
| 7.2.1. Prueba Preliminar 1. (1-1000 $\mu\text{g/L}$)..... | 28 |
| 7.2.2. Prueba Preliminar 2 (100-900 $\mu\text{g/L}$)..... | 30 |
| 7.2.3. Bioacumulación-Recuperación..... | 30 |
| 7.2.4. Balance de Hg..... | 35 |
| 7.2.5. Lesiones y comportamiento..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.5.1. Pruebas Preliminares..... | 38 |
| 7.2.5.2. Bioacumulación-Recuperación..... | 43 |
| 8. Discusión..... | 45 |
| 8.1. Variación Estacional de la concentración de Hg en <i>E. complanata</i> y sedimento..... | 45 |
| 8.2. Bioensayos de Bioacumulación-Recuperación..... | 48 |
| 8.2.2. Pruebas preliminares (1, 2)..... | 48 |
| 8.2.3. Bioacumulación-Recuperación..... | 49 |
| 8.3. Lesiones y comportamiento..... | 54 |
| 8.4. Impacto Ecológico del Hg..... | 56 |
| 9. Conclusiones..... | 61 |
| 10. Referencias Bibliográficas..... | 63 |
| 11. Apéndice..... | 72 |

INDICE

Figuras.

| | |
|--|----|
| 1. Localidades de muestreo en la bahía de Mazatlán en la costa del Pacífico..... | 19 |
| 2. Variación estacional de las concentraciones de Hg en sedimento y organismos en el periodo de noviembre de 2002 a abril de 2004 en las localidades de la bahía de Mazatlán..... | 29 |
| 3. Mortalidad de <i>E. complanata</i> expuesto a distintas concentraciones nominales de Hg (100-900 $\mu\text{g/L}$) a lo largo del tiempo..... | 31 |
| 4. Bioacumulación de Hg en organismos del bioensayo A (eje y principal) y en soluciones (eje y secundario)..... | 32 |
| 5. Acumulación de Hg en organismos y sedimento del bioensayo B (eje y principal) y en soluciones (eje y secundario)..... | 33 |
| 6. Porcentaje de Hg total por acuario en cada una de las matrices en el bioensayo A de la prueba de Bioacumulación-Recuperación..... | 36 |
| 7. Porcentaje de Hg total por acuario en cada una de las matrices en el bioensayo B de la prueba de Bioacumulación-Recuperación..... | 37 |
| 8. Ejemplar vivo de <i>E. complanata</i> en condiciones normales de no exposición a Hg..... | 39 |
| 9. Coloración gris y piel ligeramente rasgada de <i>E. complanata</i> después de la exposición a 200 $\mu\text{g/L}$ de Hg (prueba preliminar 2)..... | 39 |
| 10. Inflamación severa de la proboscis y piel arrugada de <i>E. complanata</i> después de la exposición a 1000 $\mu\text{g/L}$ de Hg (prueba preliminar 1)..... | 41 |
| 11. <i>E. complanata</i> con ruptura de tegumento (RT), exposición de vísceras (EV) e inflamación de proboscis (IP) después de la exposición a 1000 $\mu\text{g/L}$ de Hg (prueba preliminar 1)..... | 41 |
| 12. Lesiones observadas en <i>E. complanata</i> expuestos a Hg durante la prueba preliminar 2..... | 42 |

INDICE

Tablas.

| | |
|--|----|
| 1. Concentraciones de mercurio en diferentes especies de poliquetos recolectadas en el campo..... | 12 |
| 2. Estudios experimentales realizados con diferentes especies de poliquetos y mercurio..... | 14 |
| 3. Condiciones de operación del Sistema de Digestión de Microondas..... | 22 |
| 4. Número de organismos que presentaron las lesiones observadas durante la exposición a Hg (n=20) durante las pruebas preliminares..... | 40 |
| 5. Disposición de los acuarios de la prueba de Bioacumulación-Recuperación con 3 réplicas (10 organismos en cada una)..... | 44 |
| 6. Concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en sedimento y en distintos organismos de diferentes localidades con relación al presente estudio..... | 58 |

Efecto y bioconcentración de mercurio en el gusano de fuego *Eurythoe complanata* (Annelida: Polychaeta) de la zona intermareal de Mazatlán, Sinaloa, México.

Resumen

Se determinó la concentración de Hg en organismos de poblaciones naturales del gusano de fuego *E. complanata* y en sedimento de 3 localidades ubicadas en distintos puntos con relación al emisor submarino de aguas negras, en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Se recolectaron 10 organismos y sedimento en la UAS, Cerritos e Isla Venados durante noviembre 2002, agosto 2003, noviembre 2003, enero 2004 y abril 2004. Posteriormente el tejido y el sedimento se procesaron en el laboratorio mediante las técnicas de digestión ácida y con el analizador de Hg de vapor frío se obtuvo la concentración de Hg en un intervalo de 0.082-0.263 $\mu\text{g/g}$ peso seco y 0.008-0.020 $\mu\text{g/g}$ peso seco, respectivamente. La distribución de concentraciones de Hg en tejidos fue Isla Venados ($0.186 \pm 0.076 \mu\text{g/g}$) > Cerritos ($0.153 \pm 0.047 \mu\text{g/g}$) > UAS ($0.135 \pm 0.032 \mu\text{g/g}$) y, en sedimento, Cerritos ($0.015 \pm 0.005 \mu\text{g/g}$) > UAS ($0.008 \pm 0.008 \mu\text{g/g}$) > Isla Venados ($0.004 \pm 0.005 \mu\text{g/g}$), influenciada, posiblemente, por las corrientes marinas. Los valores de Hg determinados en la bahía no representan problema de contaminación en comparación con otros estudios.

Se evaluó el efecto de la exposición de Hg en la mortalidad de *E. complanata* mediante dos pruebas preliminares: prueba 1, de 360 hrs (concentraciones nominales: 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$; n=5) y prueba 2, de 170 hrs (concentraciones nominales: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900 $\mu\text{g/L}$; n=10, 2 réplicas), las que permitieron determinar las concentraciones subletales y el tiempo mínimo de exposición en 2 bioensayos subsecuentes de Bioacumulación-Recuperación. En la segunda prueba preliminar se observó un efecto significativo de la concentración de Hg sobre la mortalidad de los organismos (prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis: $H=37.23$, $g_L=9$, $\text{chi cuadrada}=21.67$, $p=0.01$).

Para determinar la acumulación de Hg en los tejidos y sedimentos, se realizaron 2 bioensayos de Bioacumulación-Recuperación, en los cuales los

organismos fueron expuestos a las concentraciones reales de Hg 0, 1.5, 1.7, 3, 7.4, 8.7, 9 y 11 $\mu\text{g/L}$ ($n=10$, 3 réplicas) por 7 días, en ausencia y presencia de sedimento. Durante el periodo de recuperación, se realizó el recambio de soluciones y sedimento para permanecer 7 días en agua de mar sin tóxico. Los organismos del bioensayo sin sedimento (A) acumularon mayor cantidad de Hg que los del bioensayo con sedimento (B) en una proporción 2:1, lo cual fue confirmado con la prueba de Kruskal-Wallis (bioensayo A: $H= 19.43$, $gl= 7$, $\chi^2= 18.475$, $p= 0.01$; bioensayo B: no significativa). Esto demuestra la importancia de la presencia de sedimento en el proceso de acumulación de metales pesados. Durante el periodo de recuperación del bioensayo con sedimento, se estimó que un 3.8% del Hg que había sido acumulado previamente fue eliminado diariamente. Los 7 días de recuperación no fueron suficientes para eliminar todo el Hg acumulado en los tejidos. Para obtener el balance total de Hg en cada acuario, se estableció, como 100%, la cantidad de Hg presente en el día 0 en la solución, el tejido y el sedimento. Durante los días 8 y 16, este porcentaje disminuyó considerablemente. Los organismos acumularon eficientemente el Hg durante la exposición (especialmente los del bioensayo sin sedimento) pero, durante el periodo de recuperación, la eliminación fue muy baja y lenta. El Hg eliminado en ambos bioensayos no se detectó en el agua, por lo tanto pudo haberse evaporado.

Los organismos expuestos a las concentraciones más altas de Hg de las pruebas preliminares presentaron lesiones que consistieron en cambios de coloración y alteraciones de la superficie de la piel, inflamación de la proboscis y ruptura del tegumento y evisceración. Se observaron convulsiones violentas y, ya muertos, estaban enroscados. En las pruebas subletales, se observaron únicamente dos individuos de 480 con la proboscis inflamada.

La integración e interpretación de este tipo de bioensayos, así como el monitoreo en el campo, es una herramienta importante para evaluar y valorar los riesgos potenciales de los metales pesados en la biota y al ambiente en zonas sujetas a actividades de tipo antropogénico.

Efecto y bioconcentración de mercurio en el gusano de fuego *Eurythoe complanata* (Annelida: Polychaeta) de la zona intermareal de Mazatlán, Sinaloa, México.

1. INTRODUCCIÓN

Las zonas costeras, incluyendo bahías, desembocaduras de ríos, estuarios y lagunas, constituyen uno de los principales recursos naturales de las naciones ribereñas (Botello *et al.*, 1996). Tales zonas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo económico y social de las regiones costeras, por su potencial en la producción de alimentos (pesquerías y acuicultura), transporte, construcción y administración de puertos, industria y el crecimiento de polos de expansión urbana y recreativa.

El acelerado aumento de las actividades humanas y su necesidad de utilizar y explotar los recursos de los ecosistemas costeros, han llevado a la alteración de los componentes que mantienen el desempeño natural del ambiente (Albert y Benítez, 1996; Kennish, 1997). Uno de los obstáculos para la administración y ordenamiento ecológico de las zonas costeras es la contaminación antropogénica, que degrada los hábitats y puede afectar la totalidad de los ecosistemas. Esta zona posee hábitats esenciales para la reproducción, el crecimiento y la protección de innumerables recursos vivos, muchos de ellos de importancia comercial y todos de importancia ecológica (Albert y Benítez, 1996), por lo que es prioritario vigilar y normar las actividades humanas que puedan alterarlos (Botello *et al.*, 1996).

El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) ha intentado proponer los criterios que deben regir para considerar si alguna sustancia es peligrosa para el ambiente y/o salud (UNEP, 1984). Algunos de estos criterios son: la forma de liberación al ambiente, su persistencia y transformaciones en compuestos más peligrosos, la bioconcentración, bioacumulación, biomagnificación, la población expuesta, la toxicidad y grado de exposición, así como los efectos en el ambiente físico y químico. La bioconcentración es el proceso por el cual un organismo toma del medio un compuesto químico a través del agua, ya sea por las estructuras respiratorias y/o la piel, y las almacena en sus tejidos con una mayor concentración respecto a la

del medio en función del tiempo, afectando así su fisiología (Albert y Benítez, 1996). Algunas sustancias, mediante el proceso de biomagnificación, aumentan la concentración de un compuesto químico en el organismo de manera progresiva a lo largo de las cadenas tróficas, excediendo la concentración de dicho compuesto químico en la dieta (presa) del organismo (Albert y Benítez, 1996., Ruelas-Inzunza, 2001).

Existen numerosas fuentes de contaminación química del agua de mar que incluyen desperdicios de la producción química industrial, minería, desechos urbanos y escurrimientos de plaguicidas de las tierras agrícolas. Algunos contaminantes específicos incluyen químicos industriales como hidrocarburos clorados y metales pesados, bacterias, particularmente coliformes, y otros desperdicios municipales e industriales (Salazar y Tirado, 1995; Manahan, 2002).

El municipio de Mazatlán es importante en el ámbito comercial y de servicios, en el manufacturero, de la construcción y de la pesca (Ruelas-Inzunza 1998). La ciudad de Mazatlán es una de las áreas más pobladas de la costa noroeste de México, con un importante centro turístico y puerto marítimo. Dependiendo de la estación del año, cuenta con una población de 380 509 habitantes, con una tasa media de crecimiento anual del 1.94% (INEGI, 2001), en un área urbana de 4 362 ha (INEGI, 1995), que generan cerca de 82,000 m³ día⁻¹ de aguas residuales urbanas e industriales no tratadas (Páez-Osuna *et al.*, 1998). Estas aguas son descargadas en la porción sur de la bahía de Mazatlán a través de un emisor submarino de aguas negras. Sólo una planta de tratamiento primaria de aguas negras, localizada en el Puerto de Mazatlán, opera eventualmente en toda la costa del Golfo de California, por lo que prácticamente las aguas del golfo reciben, indirectamente a través de arroyos, ríos, lagunas y estuarios que desembocan en él, las aguas negras de los sitios urbanos costeros de Baja California, Sonora, Sinaloa y Nayarit (Ruelas-Inzunza, 2001). La ausencia y/o marcada deficiencia en el tratamiento de aguas negras urbanas e industriales y su descarga en la región del Golfo de California han contribuido notablemente en el deterioro de la calidad del agua y contaminación de diversos cuerpos de agua costeros (Osuna-López e Izaguirre-Fierro, 2000).

Algunos metales pesados se han catalogado como los contaminantes más dañinos y pueden ser liberados en concentraciones que podrían ser inmediatamente tóxicas para el hombre y los organismos como resultado de la bioacumulación (Villanueva y Páez-Osuna, 1996). Los metales pesados incluyen elementos esenciales como el hierro y cobre y no esenciales como plomo y mercurio.

La importancia de realizar estudios de contaminación por metales pesados, por un lado, es la de conocer los niveles base y la distribución en organismos y en los tejidos procedentes de sitios contaminados y durante eventos de mortandad masiva (PROFEPA, 1995). Asimismo, es necesario considerar los efectos de los metales en los organismos que habitan dichas zonas. El grupo de los anélidos poliquetos es ideal para realizar este tipo de estudios, ya que pueden responder a la presencia de metales pesados en solución, en suspensión y/o en sedimentos, debido a que todos los tipos de alimentación de invertebrados (detritívoros, carnívoros, herbívoros, filtradores y omnívoros) están representados en este grupo (Fauchald y Jumars, 1979), de tal forma que quedaría justificada su utilización en investigaciones de biomonitorio (Rainbow and Philips, 1993).

El grupo de los poliquetos presenta diversas ventajas como organismos prueba en experimentos de laboratorio. En primer lugar, son fáciles de manipular, muchas especies se adaptan bien al ambiente de laboratorio, no requieren demasiado espacio y se adaptan a nuevas fuentes de alimento. Un gran número de especies presenta una historia de vida corta, característica que es de utilidad en la medición de los efectos de los tóxicos en la reproducción y en la supervivencia. Debido a su talla en relación al peso corporal, su habilidad para permanecer largos periodos de tiempo sin alimentación y su fácil transportación, son de gran importancia para estudios de investigación a nivel laboratorio en los análisis de toxicidad (Reish, 1980).

En este estudio, se decidió realizar bioensayos con Hg por ser uno de los elementos que causa más preocupación en contaminación por metales pesados debido a su alta toxicidad en bajas concentraciones (Manahan, 2002). Asimismo,

en diversos estudios se representan únicamente las concentraciones totales de Hg, y no las concentraciones biodisponibles, las cuales, en algunos casos, son las fracciones más tóxicas para los organismos (Boening, 2000). Reish *et al.* (1976) y Reish y Carr, (1978), han estudiado el efecto de la mortalidad en poliquetos y lo han catalogado al Hg como el metal más tóxico. Los estudios que miden la disponibilidad de Hg en poliquetos son escasos y, específicamente, en el gusano de fuego *E. complanata*, no existen.

E. complanata es abundante en la bahía de Mazatlán y es importante por contar con amplios registros en mares tropicales, lo cual permitirá, reproducir experimentos con esta especie en distintos lugares. Esto, a la vez, le confiere un carácter de especie candidata para realizar estudios de toxicidad y contaminación. Por otra parte, además de ser fáciles de recolectar y mantener en cultivo (Dilian Anguas, com. pers.), estos organismos son fáciles de manejar y de transportar, se adaptan al ambiente de laboratorio y a nuevas fuentes de alimento, requieren de poco espacio y pueden permanecer hasta 2 semanas sin alimento. Estas características permitirían considerarlo como un biomonitor potencial de contaminación por metales. Por este motivo en este trabajo se pretende utilizar a *E. complanata* para evaluar los efectos producidos por el Hg, así como para cuantificar las concentraciones de este metal en poblaciones naturales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Metales Pesados

Los elementos químicos que son buenos conductores eléctricos, que presentan alta conductividad térmica, alta densidad, maleabilidad y ductilidad son considerados como metales; sin embargo el término metal pesado se utiliza para aquellos elementos cuya densidad excede de 5 g/cm^3 (Förstner y Wittmann, 1979). La mayoría de los metales pesados son ampliamente utilizados en las diversas ramas de la industria en las regiones costeras y, debido a un mal manejo de los desperdicios, pueden ser introducidos al mar. La industria petrolera y las actividades mineras constituyen algunas de las principales fuentes de suministro de metales (Páez-Osuna, 1996). Los sedimentos ricos en petróleo contienen cantidades importantes de mercurio, plomo, cromo, níquel, vanadio y zinc (Rainbow, 1996). Sin embargo, en ciudades con una reducida actividad industrial, los efluentes municipales y domésticos son la principal amenaza para el ambiente acuático por aportar soluciones enriquecidas con Ni, Cr, Cu, Pb, Zn, Cd y Ag hacia los ríos (Páez-Osuna, 1996; Chambers *et al.*, 1997).

Algunos procesos naturales como el intemperismo de las rocas, la degasificación, el vulcanismo terrestre y submarino y los procesos relacionados con los sedimentos marinos aportan también metales al ambiente acuático (Soto-Jiménez, 1998). Las aguas de escurrimiento (incluyendo ríos) conducen a la mayoría de los metales hacia el medio marino, excepto algunos elementos como el mercurio y el plomo, cuya ruta más importante es la atmosférica (Páez-Osuna, 1996). Aún cuando los procesos naturales influyen en la acumulación de metales en ríos y regiones costeras, son los metales originados por la actividad antropogénica los que causan mayores problemas al ambiente. De manera general, se considera que las aguas de desecho doméstico constituyen la fuente más importante de metales en ríos y lagos (Förstner y Wittmann, 1979).

Los metales esenciales, si bien son fundamentales en el metabolismo de un invertebrado, en cantidades excesivas son dañinos; por otro lado, cualquier metal no esencial no cumple ninguna función en los organismos y su sola presencia es perjudicial por lo que debe ser destoxificado. El proceso de destoxificación

involucra la unión del metal con un sustrato evitando que el primero interactúe con el organismo y lo dañe. El lugar de destoxificación final puede ser un órgano diferente al sitio de entrada (Rainbow, 1997). Los metales traza son frecuentemente transportados en la sangre (disueltos o en los hemocitos) a un órgano en particular, como el hepatopáncreas o glándula digestiva u órgano excretor y pueden ser excretados después de cierto tiempo o ser almacenados permanentemente, resultando en concentraciones altas en el tejido. Los iones de cadmio, cobre, plomo y mercurio se unen a las membranas celulares impidiendo los procesos de transporte y también pueden precipitar los biocompuestos fosfatados o catalizar su descomposición (Manahan, 2002).

2.2. Mercurio.

Es un metal líquido que, a temperatura y presión ambiente, forma sales en dos estados iónicos: mercurio I y mercurio II. Las sales mercúricas (mercurio II), son más comunes en el ambiente que las mercuriosas (mercurio I), lo cual las hace biodisponibles y tóxicas. El mercurio elemental es altamente volátil y ligeramente soluble en agua, pero es problemático por su fácil transportación atmosférica (Morel *et al.* 1998; Boening, 2000). El mercurio, por su toxicidad, genera gran preocupación en cuanto a contaminación de metales pesados, por su movilización en formas metiladas por bacterias anaeróbicas y otros factores de polución (Gray *et al.* 2002; Khangarot, 2003). Se encuentra como componente traza de muchos minerales y, en su estado natural, se origina de la degasificación de la corteza terrestre mediante el proceso de vulcanismo. En rocas continentales, en promedio, está alrededor de 80 partes por millón (Manahan, 2002). El combustible carbón fósil y la lignita poseen mercurio, frecuentemente a niveles de 100 partes por billón o mayores, situación que es alarmante con el aumento del uso de estos combustibles para recursos energéticos. Algunos compuestos orgánicos de mercurio suelen ser ampliamente utilizados como plaguicidas, particularmente en los funguicidas en agricultura y poseen una gran variedad de usos en la industria, en aplicaciones militares, medicina y odontología. También se encuentra en desechos químicos de laboratorio, baterías, termómetros rotos y

productos farmacéuticos (Dvonch *et al.*, 1999; Boening, 2000). Los efluentes domésticos poseen hasta 10 veces más el nivel de mercurio encontrado típicamente en aguas naturales (Manahan, 2002).

La toxicidad del mercurio sobre los invertebrados acuáticos depende, en gran medida, de las especies de mercurio y su concentración, el estado de desarrollo del organismo, la temperatura, salinidad y dureza del agua y, en algunos casos, la tasa de flujo de agua. La toxicidad de mercurio aumenta con la temperatura y disminuye con la dureza del agua. La distribución del mercurio orgánico e inorgánico varía entre tejidos después de ser adquirido del agua de mar. El mercurio orgánico está más distribuido en los tejidos que el inorgánico, y se encuentra, predominantemente, en las branquias (Boening, 2000). Se ha encontrado que el metilmercurio es la forma más tóxica en los mamíferos terrestres, ya que ha mostrado ser una potente neurotoxina para muchos vertebrados por carecer de barreras externas o sistemas internos de detoxificación (Klaassen *et al.*, 1986). El hígado es el principal órgano de biotransformación del metilmercurio en los animales, ya que transforma los compuestos de Hg orgánico en metabolitos menos tóxicos que son excretados directamente por la bilis para detoxificación continua mediante las heces fecales (Boening, 2000).

En humanos, entre los efectos toxicológicos del mercurio destacan el daño neurológico, incluyendo irritabilidad, parálisis, ceguera o demencia, ruptura cromosómica y efectos teratogénicos. Los síntomas menos graves del envenenamiento por mercurio, tales como depresión e irritabilidad, tienen un carácter psicopatológico. Debido al parecido de estos síntomas con la conducta humana común, el envenenamiento leve con mercurio no es detectable (Boening, 2000; Manahan, 2002).

Wood (1984) discutió 6 mecanismos protectores en microorganismos y otros organismos de niveles de organización más elevados para aumentar su resistencia al mercurio: 1) bombas de flujo que remueven el ión de Hg de la célula, 2) reducción enzimática del metal en la forma elemental menos tóxica, 3) quelación por polímeros enzimáticos (i.e., metalotioneinas), 4) unión del mercurio

a la superficie celular, 5) precipitación de complejos inorgánicos insolubles en la superficie celular, 6) biometilación con el subsiguiente transporte a través de la membrana celular por difusión. Este mecanismo facilita la disponibilidad de la forma más tóxica de mercurio a los organismos mayores.

2.3. Importancia de los Poliquetos

Los anélidos poliquetos son un grupo muy importante en ecosistemas marinos y estuarinos debido a que son muy abundantes, tanto en fondos duros como fondos blandos. Estos organismos modifican el sustrato por la formación de galerías que cambian las condiciones físicas del sedimento debido a su forma de vida y patrones de alimentación (Salazar-Vallejo *et al.*, 1988).

En aspectos de contaminación son muy importantes por ser el grupo más abundante en algunos medios perturbados. La especie *Capitella capitata* ha sido considerada como indicadora de contaminación debido a que domina en ambientes enriquecidos con materia orgánica. El nereido *Neanthes arenaceodentata*, del Pacífico Oriental templado, es tolerante a la contaminación por hidrocarburos y ha sido propuesto como modelo para toxicología citogenética marina. Los poliquetos presentan considerable importancia en estudios de ecología del bentos por responder rápidamente a cualquier perturbación ambiental. Algunos cirratúlidos (*Tharyx marioni*) son notables por su capacidad de concentrar, en sus palpos, elementos tóxicos, como el arsénico (Salazar-Vallejo *et al.*, 1988).

El gusano de fuego, *Eurythoe complanata*, (Clase Polychaeta; Orden Amphinomida; Familia Amphinomidae; Fauchald, 1977a) se encuentra ampliamente distribuido en mares tropicales, especialmente en ambos lados del continente Americano (Hartman, 1968) y, de acuerdo con Fauchald (1977b), presenta un patrón de dispersión circumtropical en zonas rocosas intermareales y áreas someras submareales y está frecuentemente asociado a arena acumulada debajo de rocas pequeñas y en arrecifes de coral. Es la especie de anfínómidos intermareales más abundante del Golfo de California y es altamente gregario. Es una especie de movimientos lentos que puede alimentarse de organismos de

cuerpo blando (como esponjas, ascidias, corales), incluso ingiere materiales vegetales y sedimentos (Kudenov, 1980., Sergio Salazar-Vallejo, com. pers.). Recientemente, se ha observado que *E. complanata* del canal de San Sebastián, Brasil ingiere grandes cantidades de arena y detritus vegetal y, en menor proporción, macroalgas y diatomeas (Erica Pardo, com. pers.)

2.4. Bioconcentración de Metales Pesados en Organismos Marinos

Se han realizado diversos estudios de áreas costeras templadas concernientes a las concentraciones de metales pesados en los tejidos de poliquetos que habitan ambientes naturales. Sin embargo, en ambientes tropicales y subtropicales la información en este tópico es escasa (Méndez y Páez-Osuna, 1998). Existen pocos estudios sobre acumulación de metales pesados en poliquetos, entre los que destacan el de Cross *et al.*, (1970) con *Diopatra cuprea*, *Chaetopterus variopedatus*, *Amphitrite ornata* y *Glycera americana*, el de Ishii *et al.* (1994), con concentraciones de vanadio en la corona branquial (5500 ± 1800 $\mu\text{g/g}$ peso seco) y el cuerpo (60 ± 25 $\mu\text{g/g}$ peso seco) de *Pseudopotamilla ocellata* y el de Ahn *et al.* (1995) con *Heteromastus filiformis* y *Perinereis aibuhitensis*, en los cuales se registraron niveles elevados de Cu de 450 $\mu\text{g/g}$ y 240 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Pesch (1979) estudió la relación del sedimento con la supervivencia y bioacumulación de Cu en *Neanthes arenaceodentata*, en general, la supervivencia fue mayor en sedimentos ricos en materia orgánica y con tamaño de grano pequeño. En otros estudios con poliquetos los han utilizado como indicadores de contaminación por metales pesados en sedimento, como es el caso de *Nereis diversicolor* (Rainbow y Philips, 1993). En la Bahía de Mazatlán, Méndez y Páez-Osuna (1998) evaluaron las concentraciones de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn, los valores fueron de 4.9, 6.6, 2.1, 8.6, 29.7, 3.9, 21.5 y 262 $\mu\text{g/g}$ de peso seco respectivamente en las poblaciones del gusano de fuego *E. complanata*.

En relación con el mercurio, la información concerniente a la concentración de este metal en poliquetos es escasa. Existen únicamente 3 estudios donde se especifican las concentraciones de Hg en tejidos de 4 especies de poliquetos provenientes de poblaciones naturales (Tabla 1)

Tabla 1. Concentraciones de mercurio en diferentes especies de poliquetos recolectadas en el campo.

| Especie | Concentración | Fuente |
|----------------------------|-------------------------------------|--|
| <i>Nereis diversicolor</i> | 0.03 – 0.08 mg/kg h 0.35 mg/kg s | Zauke, 1977* Leatherland & Burton, 1974 * |
| <i>N. succinea</i> | 0.008 – 0.130 mg/kg h | Luoma, 1977* |
| <i>Arenicola marina</i> | 0.01 – 0.07 mg/kg h | Zauke, 1977* |
| <i>Nephtys hombergii</i> | 0.01 mg/kg h | Zauke, 1977* |

*En Eisler, 1981.

h. Peso húmedo

s. Peso seco

Se han realizado pocos estudios sobre la concentración de mercurio en el tejido de otros organismos en condiciones naturales. Ruelas-Inzunza *et al.* (2000), midieron los niveles y distribución de mercurio total en músculo, hígado y riñón de delfines tornillo *Stenella longirostris* varados en la bahía de la Paz, B. C. S. y encontraron concentraciones de Hg significativamente mayores en el tejido hepático, pero los valores estuvieron por debajo de los niveles registrados en especies similares de sitios contaminados. Por otro lado, Francesconi y Lenanton (1992), midieron los niveles de mercurio en peces provenientes de una bahía al oeste de Australia y explicaron las diferencias de concentraciones de Hg con base en los hábitos alimenticios de los peces. Encontraron que los niveles de Hg, en la mayoría de los peces, sobrepasaron los niveles máximos permisibles de acuerdo con la legislación Australiana. Alonso *et al.* (2000) evaluaron los niveles de Hg en el músculo de 2 especies de peces en la bahía de Cartagena (zona industrializada) y en Ciénega Grande (estuario no contaminado) en Colombia. Observaron diferencias entre las concentraciones de Hg de los 2 cuerpos de agua. Los niveles más elevados de Hg se detectaron en el pez omnívoro *Eugemes plumieri*, mientras que los más bajos correspondieron al pez detritívoro *Mugilis incilis*.

2.5. Efectos de Metales Pesados en Poliquetos

Existen pocos estudios de toxicidad que incorporan bioensayos utilizando metales pesados y poliquetos, de los cuales, únicamente 2 se refieren a *E. complanata*. Reish *et al.* (1989) estudiaron los efectos del Cd y DDT en la supervivencia y regeneración de esta especie y mostraron que son muy sensibles a estos tóxicos. Marcano *et al.* (1996), estudiaron la acumulación y depuración de cobre y zinc en *E. complanata* y proponen la actividad de metalotioneínas como mecanismo bioquímico del control del metabolismo de zinc y cobre.

Por otro lado, Méndez y Baird (2002) realizaron bioensayos con sedimentos contaminados con cadmio y no encontraron efectos significativos de este metal sobre el procesado de sedimento en *Capitella* spp. Selck *et al.* (1998) y Selck *et al.* (1999), realizaron estudios de toxicidad con Cd en *Capitella* sp I sobre la incorporación del metal, efectos de exposición crónica y eficiencia de absorción digestiva, sin encontrar efecto alguno y observaron que el cadmio incorporado a sedimento fue la ruta más importante para la absorción de Cd por *Capitella* sp I.

Reish y Carr (1978), estudiaron los efectos de metales pesados en la supervivencia y reproducción de los poliquetos *Ophryotrocha diadema* y *Ctenodrilus serratus*. Los metales pesados analizados fueron: Cd, Cr, Cu, Pb, Hg y Zn, de los cuales los más tóxicos fueron el Hg y el Cu, lo que coincide con los resultados de Reish *et al.* (1976) con *Neanthes arenaceodentata* y *Capitella capitata*. De acuerdo con estos autores, las concentraciones letales en las que el 50% de la población muere (CL₅₀) a 96 h para todos los metales, excepto Cu, se encontraban entre 1 o 2 órdenes de magnitud mayores que los niveles de metales en los efluentes domésticos.

En relación con Hg, Medeiros *et al.*, (1980) realizaron bioensayos de acumulación utilizando metilmercurio en *Glycera dibranchiata*, donde la acumulación fue rápida, así como su eliminación, con una pérdida del 30% en 8 horas después de una inmersión por 9 días en 0.010 mg metilmercurio/L. La adición de cisteína al medio de depuración acelera la pérdida, con sólo el 14% del metilmercurio remanente después de 8 horas.

La tabla 2 muestra la comparación de los estudios experimentales sobre acumulación (bioconcentración) y letalidad (CL₅₀) de Hg en diferentes especies de poliquetos. La bioconcentración, fue determinada en los tejidos, tanto en los controles como en organismos experimentales, después de la exposición a diferentes concentraciones de Hg durante 20 días (Tabla 2a). La letalidad fue estimada como CL₅₀ a diferentes tiempos de exposición (Tabla 2b).

Tabla 2. Estudios experimentales realizados con diferentes especies de poliquetos y mercurio. a) bioconcentración en controles y en organismos expuestos a diferentes concentraciones de mercurio (Reish & LeMay, 1991); b) Valores de CL₅₀ a diferentes tiempos de exposición.

| a) Bioconcentración de Hg | | |
|---------------------------------|-------------|-------------------------------|
| Especie | Tratamiento | Bioconcentración de Hg (µg/g) |
| <i>Capitella capitata</i> | control | 1.9 |
| | 0.01 µg/g | 18.6 |
| <i>Neanthes arenoceodentata</i> | control | 0.2 |
| | 0.1 µg/g | 62.06± 13.5 |
| <i>Nereis grubei</i> | control | < 0.5 |
| | 1.0 µg/g | 65.5± 21 |

| b) Letalidad | | | |
|---------------------------------|-------------------------|---------|----------------------------|
| Especie | CL ₅₀ (mg/L) | Tiempo | Fuente |
| <i>Capitella capitata</i> | 0.047 | 96 h | Reish & LeMay, 1991 |
| | * < 0.1 | 96 h | Reish <i>et al.</i> , 1976 |
| | * 0.1 | 28 días | |
| <i>Neanthes arenoceodentata</i> | * 0.15 | 96 h | Reish & LeMay, 1991 |
| | * 0.022 | 96 h | Reish <i>et al.</i> , 1976 |
| | * 0.017 | 28 días | |
| <i>Nereis grubei</i> | * 0.09 | 96 h | Reish & LeMay, 1991 |
| <i>Ophryotrocha diadema</i> | *de 0.001 a 1.0 | 96 h | Reish & Carr, 1978 |
| | * 0.16 | 96 h | Reish & LeMay, 1991 |
| <i>Ctenodrilus serratus</i> | *de 0.001 a 0.25 | 96 h | Reish & Carr, 1978 |
| | * 0.042 | 96 h | Reish, 1988 |
| <i>Pectinaria sp</i> | * 0.06 | 96 h | Reish & LeMay, 1991 |

*Concentraciones de las soluciones experimentales

3. HIPÓTESIS

Debido a que el Hg es bioacumulado por ciertas especies de poliquetos y que produce efectos adversos sobre sus procesos biológicos,

-Se espera encontrar, en poblaciones naturales de la bahía de Mazatlán, mayor bioacumulación de Hg en organismos de *E. complanata* procedentes de las localidades más cercanas a aportes de metales pesados (emisor de aguas residuales y Estero de Urias).

-Se espera que este metal, a distintas concentraciones, tenga efectos adversos sobre la supervivencia del gusano de fuego *E. complanata* y que el metal se bioconcentre en los organismos al ser expuestos a diferentes concentraciones de Hg,

-Si los individuos tienen la capacidad de regular el tóxico, lo eliminarán después de ser transferidos a un medio sin Hg.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar la concentración natural, la acumulación experimental y los posibles efectos del Hg en el gusano de fuego *E. complanata*.

Particulares

1. Determinar la variación espacial y estacional de las concentraciones de Hg en *E. complanata* y en la fracción biodisponible de los sedimentos de 3 localidades de la bahía de Mazatlán.
2. Determinar las concentraciones subletales del Hg mediante pruebas preliminares de exposición, con el fin de realizar experimentos en el laboratorio de bioacumulación y recuperación.
3. Evaluar la acumulación de Hg en organismos expuestos a concentraciones subletales y la posible eliminación después de un periodo de recuperación en un medio libre de contaminante.
4. Identificar probables daños a nivel morfológico o conductuales

5. ÁREA DE ESTUDIO

El municipio de Mazatlán es el más importante del Sur de Sinaloa. La ciudad de Mazatlán se localiza en el Sureste del Golfo de California, en la costa del Pacífico en México. La bahía de Mazatlán está localizada entre los 23°10' y 23°16' latitud N y 106°25' y 106°29' longitud W, incluye una línea costera de 17 km y presenta un área de 35 km² a lo largo de la plataforma continental. El límite norte de la bahía es la Isla de Pájaros y, en la región sur, el Cerro del Crestón. Las playas arenosas predominan a lo largo de la costa, excepto en Punta Camarón y en la porción sur de la bahía, donde se presenta una orilla rocosa y acantilados.

Esta área es una zona de transición entre el Golfo de California y el Océano Pacífico. Se ha distinguido por una estructura termohalina vertical complicada, caracterizada por fuertes remolinos e intrusiones, lo cual se debe a la mezcla de tres masas de agua distintas en la capa superior. Mediciones de la corriente directa (Emilsson y Alatorre, 1984) indican que en primavera y verano la corriente va hacia el norte sobre el lado continental y hacia el sur por el lado de la península de Baja California en la mitad inferior del Golfo. Estos registros muestran una corriente media de 0.35 m/s hacia el noroeste, cerca de la superficie (García de la Parra, 1992). Los vientos predominantes son del W, NW y WNW, alcanzando una velocidad promedio anual de 3.4 m/s, prevaleciendo en invierno los vientos del NW. Durante el verano, soplan vientos fuertes del S y SE de corta duración (Secretaría de Marina, 1974): El patrón de circulación producido por el viento muestra, como aspecto sobresaliente en el centro de la Bahía, la presencia de un giro ciclónico hacia el S, SE, E y NE, el cual se transforma en anticiclónico hacia las direcciones contrarias a las anteriores (Cabrera, 1988). De acuerdo con la Secretaría de Marina (1974), la corriente en las cercanías de Mazatlán, sigue la dirección hacia el N y es ampliamente modificada por los innumerables accidentes como islas, puntas, islotes, la costa y el fondo, exceptuando el Estero de Urías, que obedece a condiciones de marea. Galindo-Reyes (1986) registró, en el Estero de Urías durante un período de marea, la máxima velocidad en el canal de acceso al puerto con una magnitud de 37 cm/s y que el recambio de masas de agua con

el mar es mínima, lo cual origina que los contaminantes que se vierten en el Estero queden “atrapados” dentro del sistema.

El clima es tropical y subtropical, con lluvias en verano y una temporada de sequía muy marcada (García, 1964). Sobre la planicie costera se manifiesta un clima semi-cálido, semi-seco con temperatura media anual de 25° C. Los registros meteorológicos muestran una precipitación media anual de 148 mm, con máximos anuales de 215.4 mm en 24 horas (durante el mes de octubre) y 94 mm en una hora, frecuentemente acompañadas de huracanes y tormentas tropicales a finales del verano. Para este periodo, el índice medio anual de evaporación es de 2146.8 mm (Dirección de Estadística y Estudios Económicos de la Secretaría de Hacienda Pública y Tesorería del Gobierno del Estado de Sinaloa, 1985).

Se seleccionaron 3 sitios de muestreo en la bahía de Mazatlán: uno localizado frente a la Facultad de Ciencias del Mar de la UAS, a 2.1 km del emisor de aguas residuales de la planta de tratamiento; el segundo sitio correspondiente a la playa de Cerritos, en las afueras de la ciudad, a 16 km del emisor de aguas residuales. El tercer sitio se localiza en la Isla de los Venados, intermedio entre los 2 anteriores, a 7 km del emisor. Estas localidades se caracterizan por presentar áreas rocosas en la zona intermareal y escasa cobertura de sedimento grueso (Figura 1).

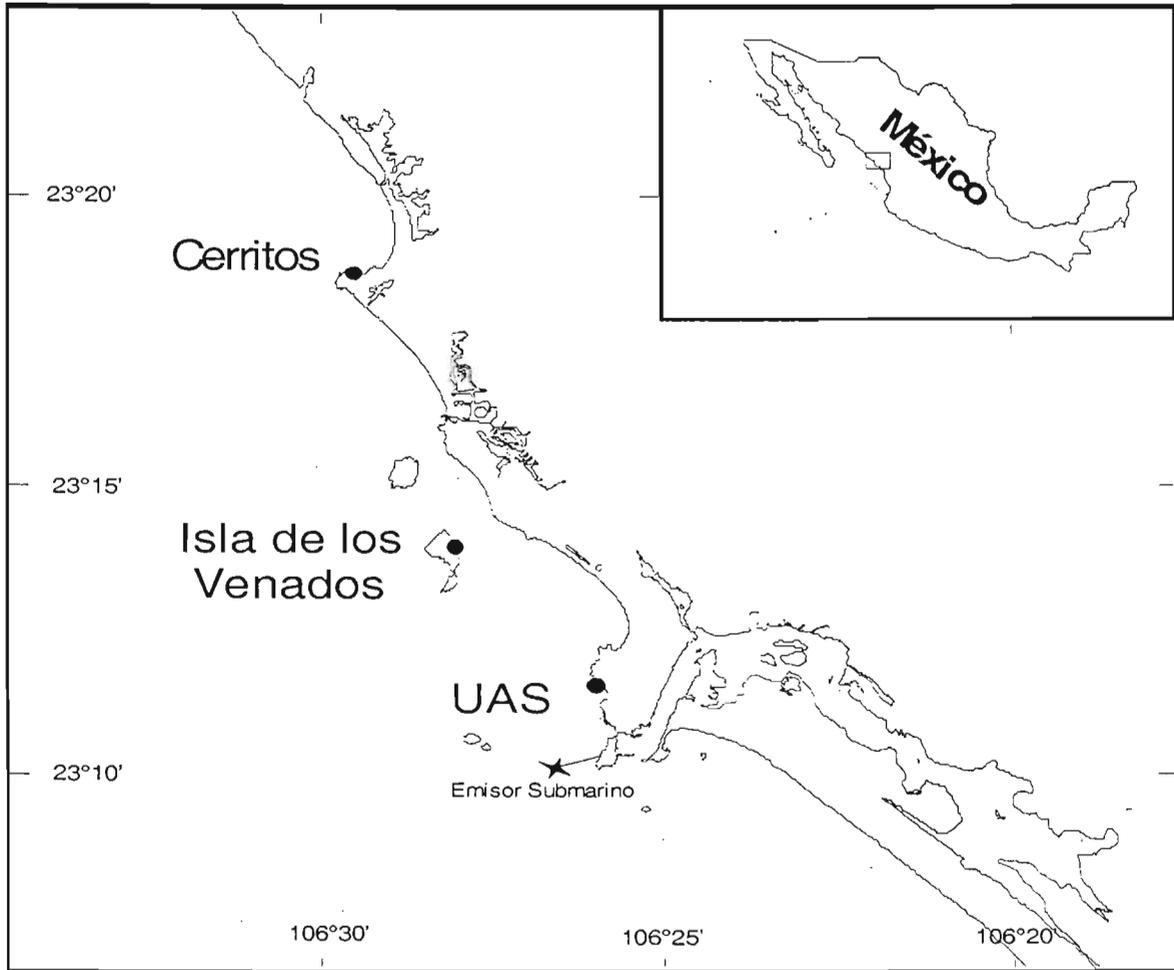


Figura 1. Localidades de muestreo en la bahía de Mazatlán en la costa del Pacífico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Variación estacional de la concentración de Hg en *E. complanata* y sedimentos.

6.1.1. Muestreo

Para determinar la variación estacional de las concentraciones de Hg se obtuvieron 10 individuos de *E. complanata* y muestras de sedimento en las tres localidades seleccionadas durante noviembre del 2002, abril, agosto y noviembre de 2003 y enero y abril de 2004. Los organismos se recolectaron en la zona intermareal, debajo de las rocas, utilizando pinzas de plástico. Se recolectó, de un área de 25 por 25 cm, sedimento superficial asociado a los organismos para obtener la fracción biodisponible de Hg. Se usó una espátula de polietileno y se transportó al laboratorio en charolas de plástico previamente lavadas con baños de ácido clorhídrico y nítrico. En el laboratorio, los organismos se limpiaron con agua de mar para remover partículas del sedimento y, junto con las muestras de sedimento de cada localidad, se eliminó el agua y se congelaron en recipientes de plástico hasta su análisis.

Para los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación, se recolectaron los organismos en la playa de Cerritos, donde *E. complanata* es más abundante. Se recolectaron 230 especímenes adultos (entre 10 y 15 cm de longitud) en abril de 2003, para las pruebas de letalidad (pruebas de exposición a Hg). En agosto de 2003, se recolectaron 480 organismos para la prueba subletal de bioacumulación y recuperación.

6.1.2. Determinación de Hg en *E. complanata* y en sedimento.

En el laboratorio, se analizaron 3 réplicas consistentes, cada una en 3 individuos de *E. complanata* (10 individuos) y alícuotas de sedimento de cada sitio. Tanto los tejidos como los sedimentos se secaron durante 72 hrs en una

liofilizadora LABCONCO (-49 °C y una presión de 133×10^{-3} mbar). El material seco se pulverizó durante 20 minutos en un molino automático (Retsch) equipado con mortero de ágata hasta obtener una muestra fina y homogénea para realizar la digestión ácida.

Se pesaron aproximadamente 0.75 g de sedimento seco (pulverizado) en una balanza analítica OHAUS TP400D (± 0.0001 g) y se registró el peso exacto. De acuerdo con la técnica de digestión ácida débil de Luoma y Bryan (1981) modificada por Szefer *et al.* (1995), se añadieron 15 ml de HCl 1N a cada muestra de sedimento, se agitaron durante 10 minutos en el agitador ultrasónico y se centrifugaron. El sobrenadante se extrajo con una pipeta y se depositó en botes de plástico de 50 ml previamente lavados con HCl y HNO₃.

Para los análisis de organismos, se obtuvo el peso total de cada muestra de tejido pulverizado seco y se utilizaron 0.5 g para la digestión ácida. El material fue predigerido con 10 ml de HNO₃ concentrado durante 18 horas para, posteriormente, iniciar la digestión con el Sistema de Digestión de Microondas MDS-2000 (de la compañía CEM). Las condiciones de operación del microondas se especifican en la tabla 3. Las muestras digeridas se depositaron en botes de plástico de 50 ml.

Las concentraciones de Hg en tejido y en sedimento (fracción biodisponible), se determinaron con un analizador de mercurio de vapor frío (Buck Scientific modelo 400^a) con el método propuesto por Hatch y Ott (1968) y modificado por Loring y Rantala (1995). La solución reductora de Hg utilizada fue cloruro estañoso (SnCl₂).

Tabla 3. Condiciones de operación del Sistema de Digestión de Microondas

| Etapa | 1 | 2 | 3 |
|--|-----|-----|-----|
| Potencia (%) | 90 | 90 | 90 |
| Presión (libras/pulgadas) | 20 | 40 | 90 |
| Tiempo (min) | 10 | 10 | 30 |
| Tiempo mínimo a la presión indicada | 5 | 5 | 15 |
| Abanico | 100 | 100 | 100 |

6.1.2.1. Evaluación de la técnica

Con la intención de conocer la precisión de la técnica de análisis de Hg se realizaron sextuplicados de una misma muestra de tejido y otra de sedimento y se calculó el coeficiente de variación mediante la siguiente fórmula:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desviación estándar} \times 100}{\text{Promedio}}$$

Para la muestra de tejido, el coeficiente de variación obtenido fue de 11.3 % y para la muestra de sedimento fue de 5.0 %.

El límite de detección se determinó obteniendo la desviación estándar más pequeña de las muestras y se multiplicó por 3 ese valor, siendo el límite de detección para tejido de 0.08 $\mu\text{g/g}$ de Hg y para sedimento de 0.004 $\mu\text{g/g}$ de Hg.

Para conocer la exactitud de la técnica, se empleó el material de referencia certificado SRM 2976 (Monzalvo, 2003), que consiste en tejido de mejillón, y el valor de recuperación obtenido fue 98.3 %. Este valor fue tomado en cuenta debido a que no hay disponible material de referencia correspondiente a poliquetos.

6.2. Bioensayos de Bioacumulación-Recuperación.

6.2.1. Manejo de organismos.

Los organismos se mantuvieron en acuarios conectados a una fuente de aire y se colocó sustrato característico del lugar de muestreo (sedimento, rocas y algas), el cual fue reemplazado periódicamente (aproximadamente cada 8 días). El cultivo "stock" se mantuvo a temperatura ambiente (26 a 28° C) con salinidad de 35. Se realizaron 2 recambios de agua semanalmente. Los organismos permanecieron en aclimatación aproximadamente 15 días antes de iniciar cada bioensayo en condiciones de semi-obscuridad. Se complementó la alimentación con hojuelas para peces tropicales (Sera Vipar), sin embargo, el análisis de heces fecales ha demostrado que también ingieren algas adheridas a rocas de la zona intermareal (Dilian Anguas, com. pers.), por lo que éstas se proporcionaron junto con las rocas que se colocaron en los acuarios.

6.2.2. Pruebas preliminares de exposición a Hg.

Se realizaron pruebas preliminares para establecer la concentración mínima o máxima de Hg a la cual mueren los especímenes de *E. complanata* previamente aclimatados en el laboratorio durante 17 días. Para ello, se utilizaron acuarios de 3. 1 L de capacidad y agua de mar filtrada. Se realizaron 2 pruebas preliminares con distintas concentraciones de Hg (ver apartado 6.2.4):

a) En la primera, las concentraciones se seleccionaron de acuerdo con los resultados obtenidos por Reish y Carr (1978), quienes estudiaron los efectos de

Hg en poliquetos. Con el fin de obtener un intervalo de concentraciones subletales, éstas se eligieron de manera logarítmica. Las concentraciones nominales aplicadas fueron: 0, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$. Se analizaron 5 individuos por concentración y la prueba tuvo una duración de 15 días con observaciones diarias. Los resultados de esta prueba permitieron afinar el intervalo de concentraciones nominales durante la segunda prueba preliminar.

b) La segunda prueba preliminar (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900 $\mu\text{g/L}$ de Hg), se realizó con el fin de determinar las concentraciones subletales para el bioensayo de Bioacumulación-Recuperación. Se analizaron 2 réplicas con 10 organismos cada una y se realizaron observaciones diarias durante 7 días. Se tomaron notas del comportamiento (i.e. distribución, movilidad e irritabilidad) y de lesiones.

6.2.3. Bioensayos de Bioacumulación-Recuperación.

Esta prueba consistió de 4 fases: inicio de exposición al tóxico, fin de exposición al tóxico, inicio del periodo de recuperación y fin del periodo de recuperación. Los organismos se expusieron a concentraciones nominales de Hg (2, 3, 6, 13, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$) y un control, de acuerdo con los resultados obtenidos en la segunda prueba preliminar. Se realizaron 2 bioensayos con 3 réplicas cada uno: un grupo de 10 organismos con 1l de solución de HgCl_2 y 1l de agua de mar en el control (bioensayo A) y otro grupo con 1l de solución de HgCl_2 y 1l de agua de mar en el control y aproximadamente 78.15 g peso seco de sedimento por acuario (bioensayo B). Después de 5 días de aclimatación, cada grupo (A y B) se expuso al tóxico durante 7 días y en los siguientes 7 días se les colocó agua de mar libre de Hg. El recambio total de agua y sedimento se realizó durante el día 8 de manera que la fase de recuperación se empezó a analizar entre los días 9 y 15. Se realizaron observaciones diarias para revisar la condición de los gusanos y se consideró la irritabilidad (exhibición de quetas), movilidad o aletargamiento, coloración y condición de la piel (gris, opaca, cuarteada o arrugada).

Se tomaron muestras de organismos, solución y sedimento al inicio (día 0) y fin de la exposición (día 8) y al final del periodo de recuperación (día 16), con la intención de evaluar la concentración total de Hg, la posible destoxificación de los organismos y de identificar en cual de las 3 matrices (organismo, sedimento y agua) se acumula mayor cantidad de Hg. Para ello se analizaron 2 individuos por cada acuario de los bioensayos A y B, del sedimento (0.75 g; bioensayo B) y de las soluciones de Hg (20 ml de cada acuario en ambos bioensayos). Al inicio del período de recuperación, posterior al cambio de la solución de Hg por agua de mar libre de metal, se tomaron 3 réplicas de agua de mar. Las muestras de tejido y sedimento se mantuvieron en congelación, mientras que las de soluciones se mantuvieron a temperatura ambiente para ser procesadas posteriormente.

El sedimento utilizado en este bioensayo fue recogido de la playa de Cerritos, el cual se enjuagó 3 veces con agua corriente, con el fin de eliminar otros organismos y se secó a 60°C hasta eliminar toda la humedad. Se obtuvo el tamaño de grano de dicho sedimento mediante un tamiz de 2 mm y otro de 0.063 mm (Folk, 1968) para obtener el porcentaje de gravas, arenas y lodos. El porcentaje de carbono orgánico se determinó con el método de pérdida de peso por ignición a 550° C (Dean, 1974).

6.2.4. Preparación de soluciones de mercurio para los bioensayos.

Los bioensayos de la prueba preliminar 1 se realizaron empleando soluciones enriquecidas con Hg a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$), además de un control (agua de mar filtrada). Dichas soluciones se prepararon mediante las respectivas diluciones a partir de una solución stock I con una concentración de $10^6 \mu\text{g Hg/L}$. La sal utilizada para preparar la solución stock I fue cloruro de mercurio (HgCl_2). Las soluciones siempre se prepararon con agua de mar filtrada, debido a la naturaleza marina de los organismos utilizados en este estudio. Dicha agua de mar fue purificada con antelación empleando un filtro INSTA PURA de Water Quality, que consiste en un dispositivo mecánico con un filtro de 10 μ , carbón activado y exposición a rayos UV.

Para los experimentos de la prueba preliminar 2, las soluciones de mercurio también se prepararon a partir de la solución stock I ($10^6 \mu\text{g Hg/L}$) mediante diluciones, pero en este caso, se diluyeron de tal forma que se obtuvieron 9 diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y $900 \mu\text{g/L}$).

Finalmente, para los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación se utilizó una solución stock II de mercurio cuya concentración fue de $10^5 \mu\text{g/L}$, la cual fue diluida a las 7 soluciones experimentales correspondientes (2, 3, 6, 13, 25, 50 y $100 \mu\text{g/L}$). Se empleó agua de mar filtrada como control, con las características de calidad antes mencionadas.

Una vez que las soluciones fueron preparadas para cada etapa, se vertió un litro de cada solución separadamente en acuarios de plástico con 3.1 L de capacidad, donde se llevaron a cabo los experimentos.

6.2.5. Determinación de Hg en *E. complanata*, sedimentos y soluciones.

La determinación de Hg total en *E. complanata* y la fracción biodisponible en sedimento se llevó a cabo de la misma manera que en el estudio de la variación estacional (apartado 6.1.2.). Las submuestras de las soluciones se acidificaron con 2.5 ml de HNO_3 65% y se midieron en el analizador de Hg de vapor frío.

6.2.6. Balance de Hg

El Hg total en cada matriz (organismos, sedimento y agua) se calculó al inicio y final del periodo de exposición (día 0 y 8) y al final del periodo de recuperación (día 16). Para ello, se analizó el Hg presente en 0.5 g de peso seco en 2 individuos de cada réplica, y se calculó, por extrapolación, la cantidad de Hg en 10 individuos, con el fin de estimar los μg de metal en los organismos por acuario. La cantidad de Hg inicial en los tejidos fue estimada de la misma manera, utilizando 2 organismos aclimatados del cultivo stock.

Para obtener el Hg total del sedimento en cada acuario, se calculó los μg de Hg en 78.15 g de sedimento a partir de los μg presentes en submuestras de 0.75 g de sedimento de cada réplica, y posteriormente se calculó el promedio.

En las soluciones, se midió, directamente, la concentración en $\mu\text{g/L}$ de Hg de submuestras de 20 ml, ya que el volumen de solución por acuario era de 1 L.

El porcentaje de Hg total por acuario correspondió a la suma de los μg de Hg en las 3 matrices y fue calculado para los días 0, 8 y 16. El Hg total de las matrices del día 0 correspondió al 100% y los porcentajes para los días 8 y 16 se calcularon considerando dicho valor.

6.2.7. Análisis estadísticos

El efecto de las concentraciones de Hg sobre la mortalidad de *E. complanata* durante las pruebas preliminares fue probado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparación de medias (programa Toxic MS-DOS versión 1.0, 1990). Durante los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación se aplicó la misma prueba considerando los valores de concentración de Hg en *E. complanata* para cada bioensayo.

6.2.8. Determinación de lesiones

Durante los bioensayos se registraron las lesiones observadas macroscopicamente y se describieron según el tipo de daño y la concentración de Hg en que se presentaron para establecer 3 grupos de lesiones asociadas a la exposición al metal.

7. RESULTADOS

7.1. Variación estacional de la concentración de Hg en *E. complanata* y sedimentos.

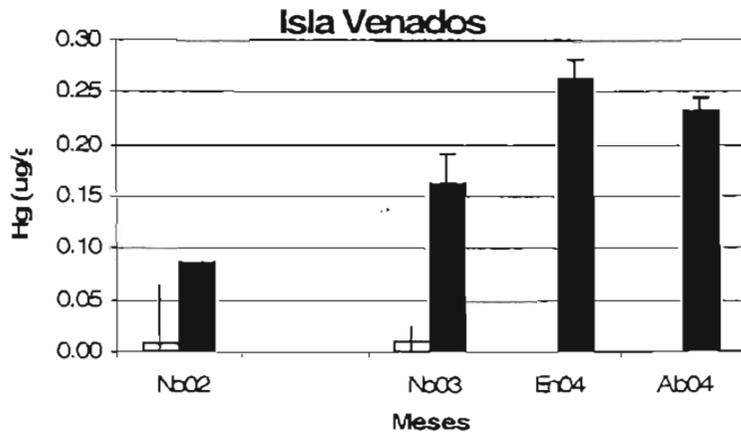
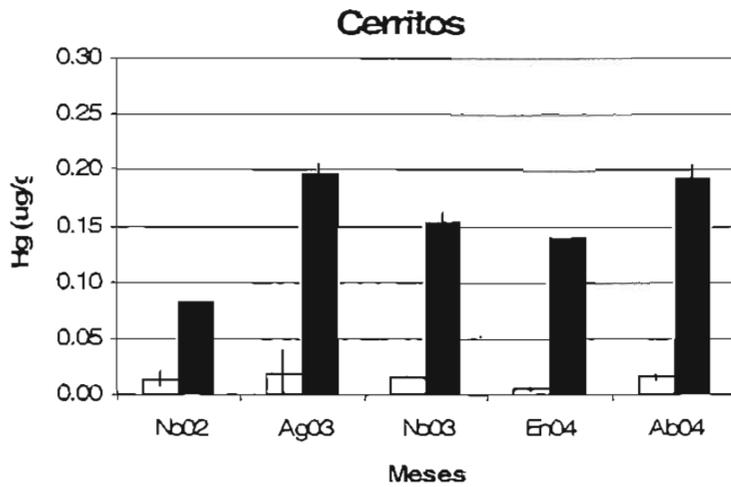
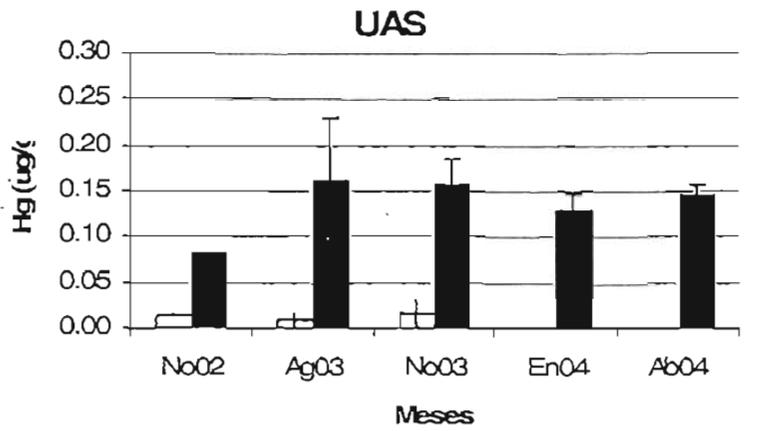
En todas las localidades los organismos presentaron concentraciones más elevadas de Hg en comparación con el sedimento (Figura 2) sin una variación estacional. Los datos muestran niveles de Hg similares en el periodo de noviembre 2002-abril 2004 para las localidades de muestreo UAS y Cerritos. Sin embargo, la localidad con la concentración más alta en el tejido en todos los periodos de muestreo fue la Isla Venados, donde el valor de Hg más alto se presentó en enero 2004 ($0.263 \pm 0.015 \mu\text{g/g}$) y en abril 2004 ($0.233 \pm 0.003 \mu\text{g/g}$). En Cerritos, los valores más elevados se presentaron en agosto 2003 ($0.197 \pm 0.009 \mu\text{g/g}$) y en abril 2004 ($0.193 \pm 0.011 \mu\text{g/g}$) y en la UAS las concentraciones prácticamente fueron constantes. Se puede observar un aparente aumento de Hg en el periodo de agosto 2003 en los organismos de Cerritos, posteriormente una disminución y, en abril 2004 se observó otro aumento en la concentración de Hg. La muestra de agosto 2003 correspondiente a la Isla Venados no se pudo obtener debido a problemas de tipo logístico. Sin embargo, a finales de octubre y principios de noviembre del 2003, se recolectaron muestras adicionales de organismos a 5 m de profundidad y la concentración de Hg resultó ser de $0.279 \pm 0.055 \mu\text{g/g}$ peso seco.

En el sedimento, la concentración de Hg fue muy baja en las 3 localidades y no se observaron patrones estacionales. Cerritos presentó los valores más elevados ($0.020 \pm 0.020 \mu\text{g/g}$ en agosto 2003), ligeramente por encima de las otras dos localidades.

7.2. Bioensayos de Acumulación-Recuperación

7.2.1. Prueba Preliminar 1. (1-1000 $\mu\text{g/L}$).

En este intervalo de concentraciones se expuso a los organismos hasta 15 días. El efecto del mercurio se observó únicamente en la concentración nominal de 1000 $\mu\text{g/L}$, la cual causó mortalidad del 100% durante el primer día.



No02_ noviembre 2002
 Ag03_ agosto 2003
 No03_ noviembre 2003
 En04_ enero 2004
 Ab04_ abril 2004

□ sedimento ■ organismos

Figura 2. Variación estacional de las concentraciones de Hg en sedimento y organismos en el periodo de noviembre de 2002 a abril de 2004 en las localidades de Mazatlán.

En cambio, en el resto de las concentraciones no se presentó mortalidad ni alteración aparente de los individuos durante los 15 días de exposición. De acuerdo con estos resultados, durante la segunda prueba se usaron concentraciones por debajo de 1000 y superiores a 100 $\mu\text{g/L}$.

7.2.2. Prueba Preliminar 2 (100-900 $\mu\text{g/L}$).

Los resultados de esta prueba (Figura 3) mostraron el efecto de las distintas concentraciones de Hg sobre la supervivencia de *E. complanata* en relación al tiempo de exposición. Se observó, en 100 $\mu\text{g/L}$, que los organismos toleraron hasta los 6 días, pero a partir de ese momento comenzaron a morir. Sin embargo, para esta concentración, el 100% de mortalidad fue posterior a los 7 días (no se muestra en la gráfica), a diferencia de las concentraciones más altas ($\geq 200 \mu\text{g/L}$), donde la mortalidad se presentó de forma más rápida.

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (2 colas) mostró que las medias de los valores de mortalidad son significativamente diferentes ($H= 37.23$, $gl= 9$ y $\text{chi cuadrada}= 21.67$, $p= 0.01$), lo que indica que existe un efecto de las diferentes concentraciones de Hg sobre la mortalidad de *E. complanata*.

7.2.3. Bioacumulación-Recuperación

Los resultados de la segunda prueba preliminar, en la cual el 15% de los organismos expuestos a 100 $\mu\text{g/L}$ comenzaron a morir a los 6 días, dieron la pauta para diseñar el experimento de Bioacumulación-Recuperación y con esto se obtuvo la serie de concentraciones y el período de tiempo experimentales. Considerando que la mortalidad en la concentración nominal más baja (100 $\mu\text{g/L}$) ocurrió a los 6 días y que a los 7 días el 20 % de los individuos estaba vivo (Figura 3.), se decidió incluir esta concentración y alargar el experimento hasta 7 días de exposición y 7 días de recuperación, con el fin de asegurar que los organismos y sedimento tuvieran tiempo suficiente de acumular cantidades de Hg detectables por el analizador de Hg de vapor frío.

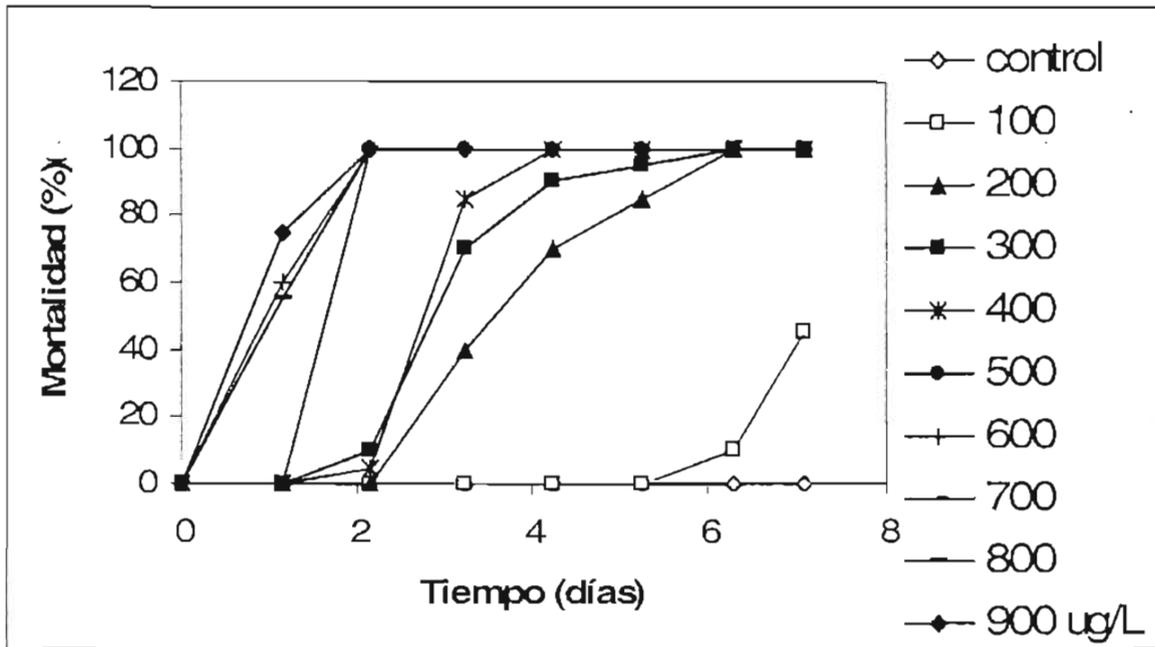


Figura 3. Mortalidad de *E. complanata* expuesto a distintas concentraciones nominales de Hg (100-900 $\mu\text{g/L}$) a lo largo del tiempo.

El sedimento experimental fue predominantemente arenoso, con un 93.95% de arenas, un 6.01% de lodos y un 0.04% de gravas. El contenido de materia orgánica fue de 8.04%.

Las concentraciones nominales de las soluciones aplicadas fueron 2, 3, 6, 13, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$ de Hg, las cuales, después de ser cuantificadas por el analizador de Hg de vapor frío, resultaron ser las siguientes concentraciones reales: 1.5, 1.7, 3, 9, 8.7, 7.4 y 11 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Los tratamientos para los bioensayos A y B se denominaron de acuerdo con estas concentraciones reales.

En las figuras 4 y 5 se muestra la bioacumulación de Hg en *E. complanata* para los bioensayos sin sedimento (A) y con sedimento (B), respectivamente. Esos resultados corresponden al promedio de las 3 réplicas. Los datos originales se presentan en el apéndice I. En ambos bioensayos se observó la misma tendencia en todas las concentraciones. El Hg presente en la solución disminuyó por debajo del límite de detección del aparato de Hg, por lo que se

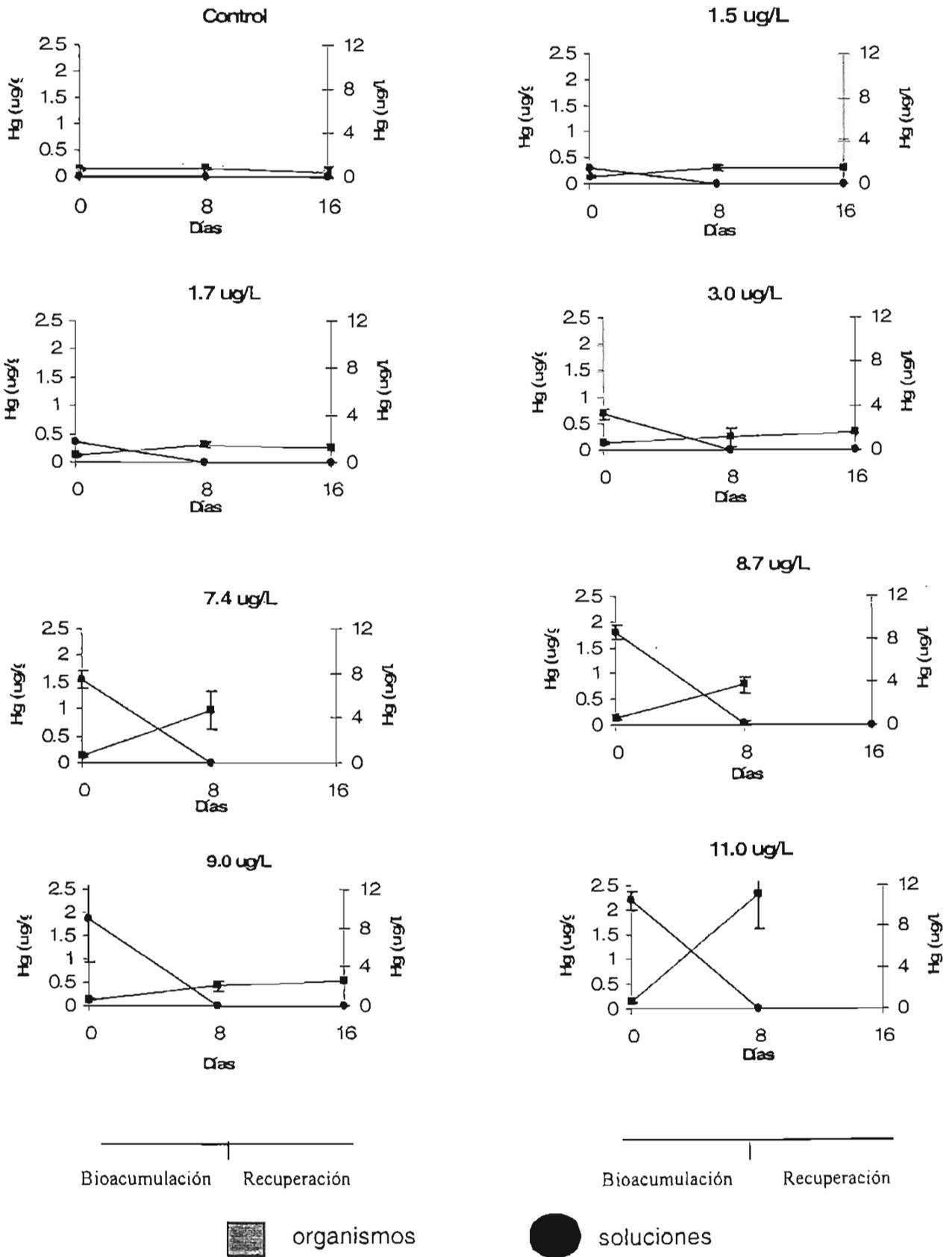


Figura 4. Bioacumulación de Hg en organismos del bioensayo A (eje y principal) y en soluciones (eje y secundario).

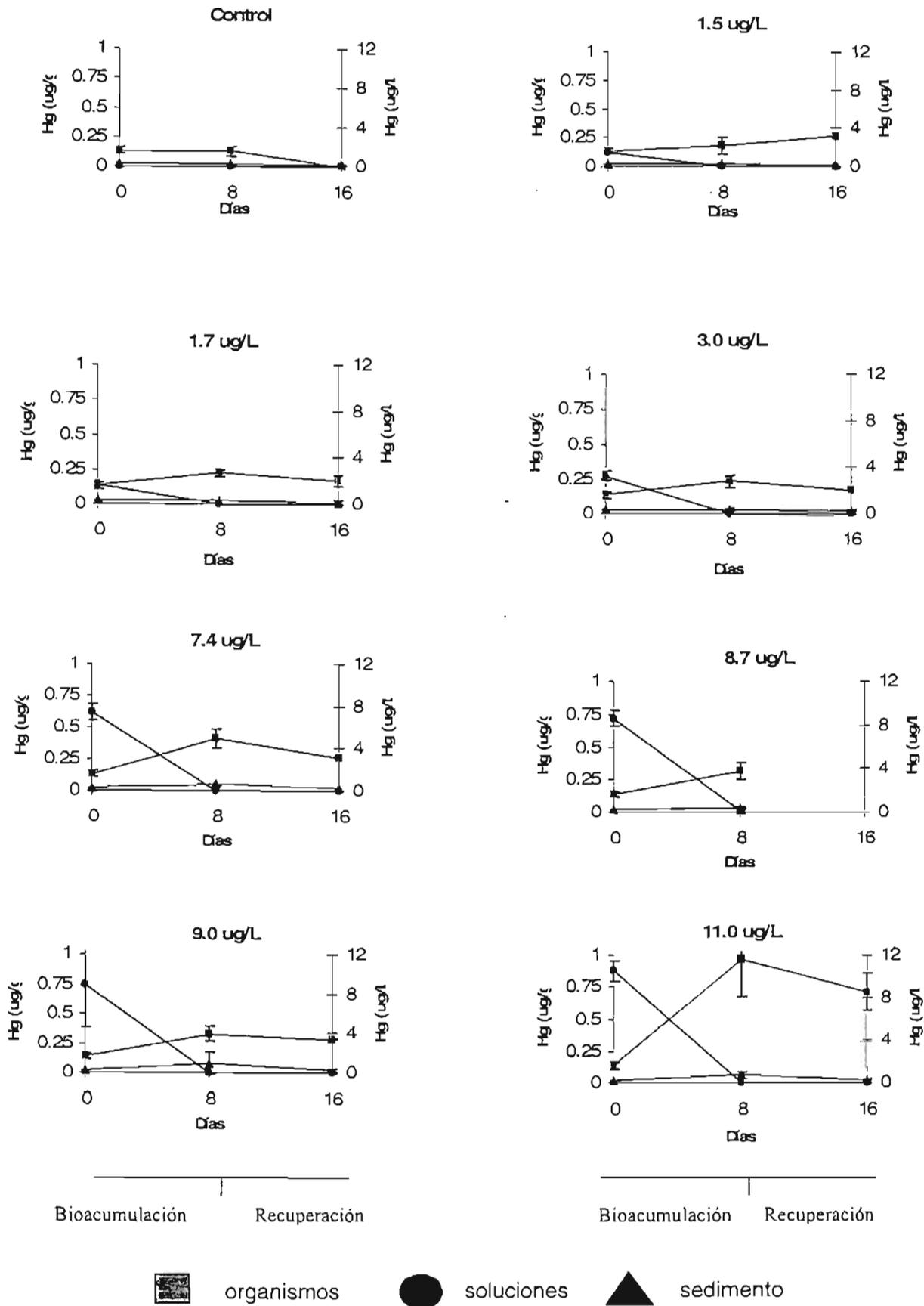


Figura 5. Acumulación de Hg en organismos y sedimento del bioensayo B (eje y principal) y en soluciones (eje y secundario).

registró como 0 µg/L al día 8. Durante el periodo de exposición (día 0 a 8), tanto los organismos como el sedimento acumularon el Hg que estaba en solución; sin embargo, la acumulación en los organismos fue muy elevada en comparación con la del sedimento. Los valores en cada tratamiento sobrepasaron considerablemente los niveles del control. En los tratamientos 1.5, 1.7 y 3.0 µg/L del bioensayo A, los niveles de Hg en el día 8 fueron hasta 3 veces mayores que el control (0.157 ± 0.022 µg/g) pero, a partir de 7.4 µg/L, se dispararon los niveles entre 8 y 9 veces. En el tratamiento de 11.0 µg/L, la concentración en los individuos (2.317 ± 0.714 µg/g) en el día 8 fue aproximadamente 20 veces mayor a la del control. La excepción se observó en el tratamiento 9.0 µg/L, donde la concentración en *E. complanata* (0.424 ± 0.109 µg/g) fue más baja que la esperada (Figura 4).

En el bioensayo B, las concentraciones del tejido no se dispararon demasiado respecto al control. En los tratamientos 1.7 a 9.0 µg/L, las concentraciones fueron entre 2.5 y 4 veces la del control. Sólo en el tratamiento de 11.0 µg/L la concentración del tejido aumentó aproximadamente 9 veces (0.966 ± 0.293 µg/g) respecto al control (Figura 5).

Durante el periodo de recuperación (día 8 a 16) se observó, en términos generales, una disminución considerable de Hg en el tejido. Sin embargo, en los tratamientos 1.5, 3.0 y 9.0 µg/L del bioensayo A (Figura 4) y 1.5 µg/L del bioensayo B (Figura 5), se observaron ligeros incrementos en la concentración de Hg de los tejidos de *E. complanata*. Estos resultados corresponden a la concentración de una sola réplica, ya que los organismos de las otras dos réplicas habían muerto. La falta de datos durante el período de recuperación de los tratamientos 7.4, 8.7 y 11.0 µg/L (bioensayo A) y 8.7 µg/L (bioensayo B) se debe a que todos los organismos murieron durante el periodo de exposición o de recuperación. En el bioensayo B, la concentración de Hg en sedimento alcanzó los niveles iniciales debido al recambio efectuado en el día 8 (Figura 5).

Entre ambos bioensayos se observó una diferencia muy marcada en las concentraciones de Hg en *E. complanata*. Los individuos del bioensayo A

presentaron elevados niveles de Hg, aproximadamente 2 veces los valores del bioensayo B, los cuales fueron bajos en presencia del sedimento.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en las medias de los valores de concentración de Hg en *E. complanata* en el bioensayo A ($H=19.43$, gl 7, chi cuadrada = 18.475; $p=0.01$), lo que sugiere que la acumulación de Hg en los tejidos depende de la concentración de Hg experimental. Por el contrario, en el bioensayo B, no se observaron diferencias significativas ($H=15.74$, gl 7, chi cuadrada= 18.475; $p=0.01$), lo que sugiere que la presencia del sedimento interfirió con el proceso de bioacumulación.

7.2.4. Balance de Hg

La cantidad inicial de Hg en tejidos fue de $0.688 \mu\text{g}$ en 10 individuos, mientras que en 78.15 g de sedimento, fue de $1.970 \mu\text{g}$.

Las figuras 6 y 7 muestran el balance total de Hg en cada uno de los tratamientos de ambos bioensayos. En cada gráfico, debajo de las leyendas del eje x, se muestra el porcentaje de Hg total (soluciones + organismos + sedimento) para el inicio del experimento (día 0), el final de la exposición (día 8) y para el final de la recuperación (día 16). En ambos bioensayos se observa una disminución considerable en la cantidad total de Hg por acuario al final del periodo de exposición (excepto en el control y en $11.0 \mu\text{g/L}$ del bioensayo A) y durante la recuperación. Los valores de Hg representados en las barras corresponden a la concentración del Hg en los 78.15 g de sedimento en cada acuario, a la correspondiente al peso promedio de 10 organismos y al Hg presente en 1L de solución.

En relación con las soluciones, en ambos bioensayos el porcentaje de Hg en el día 0, correspondió a la concentración inicial de cada tratamiento, el cual

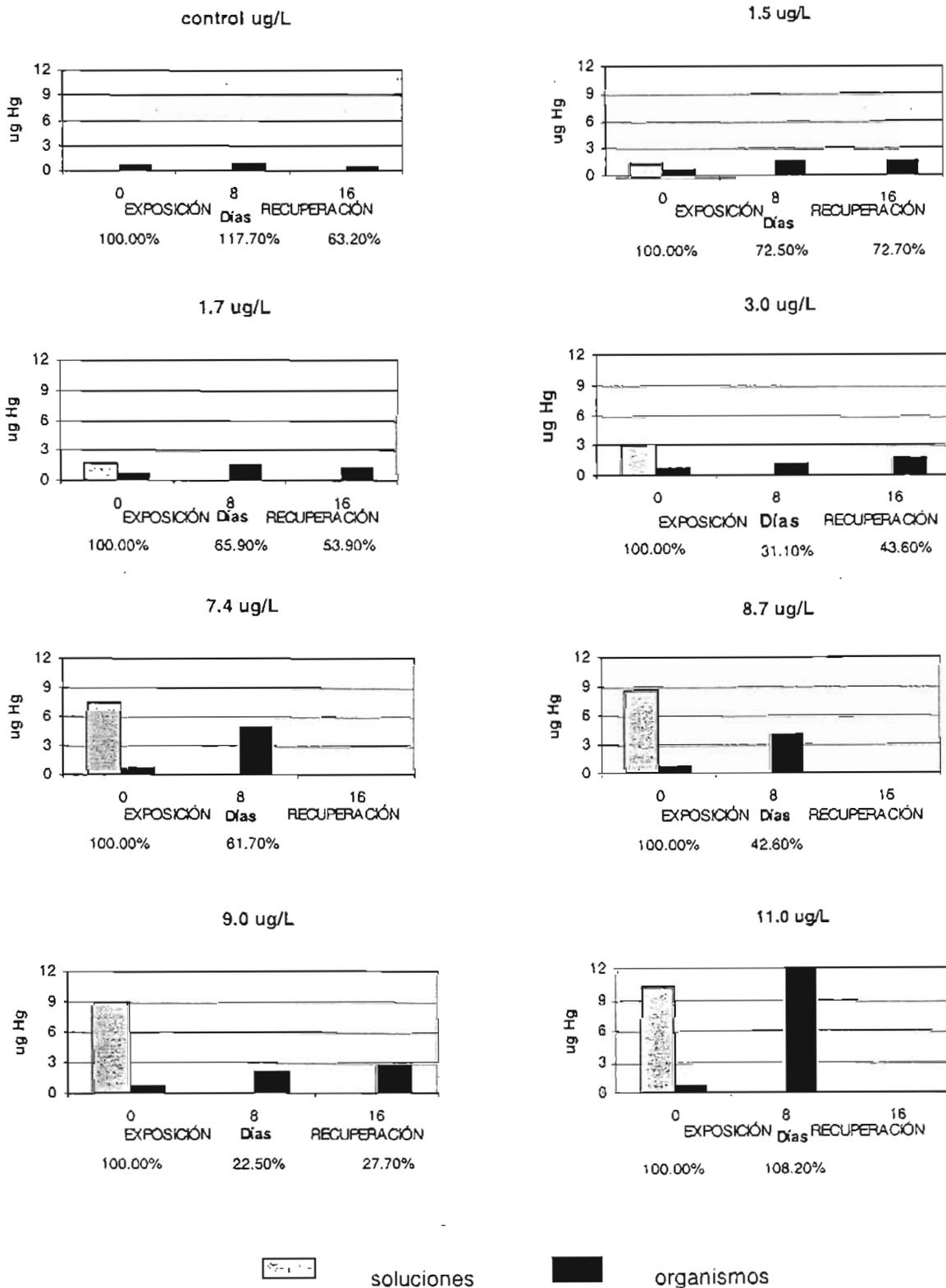


Figura 6. Porcentaje de Hg total por acuario en cada una de las matrices en el bioensayo A de la prueba de Bioacumulación-Recuperación

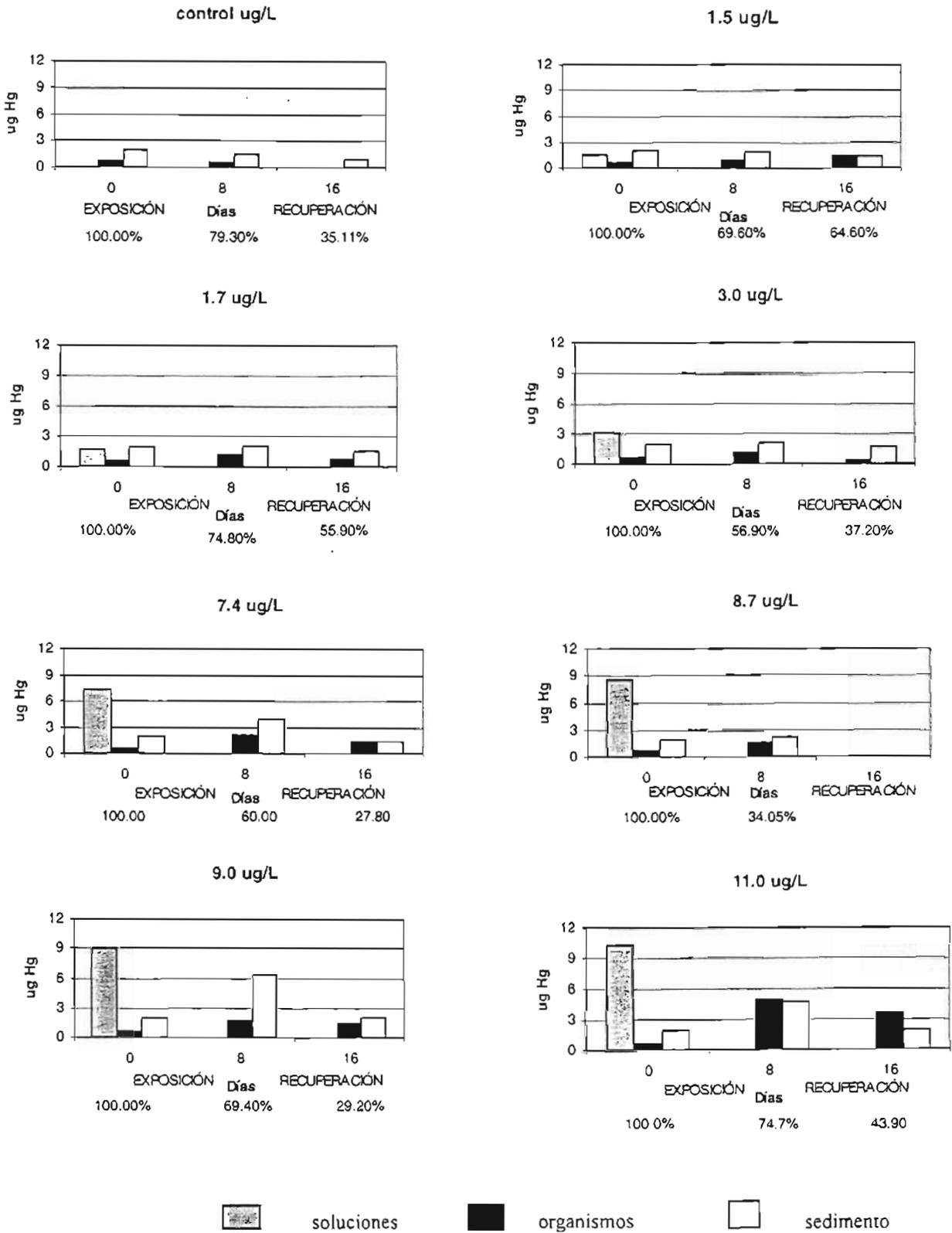


Figura 7. Porcentaje de Hg total por acuario en cada una de las matrices en el bioensayo B de la prueba de Bioacumulación-Recuperación

disminuyó drásticamente, al grado de no ser detectado durante los días 8 y 16. En ambos bioensayos, se observó una tendencia al incremento en la cantidad de Hg en los tejidos durante el periodo de exposición, la cual disminuyó ligeramente durante el periodo de recuperación. Sin embargo, en la mayoría de los tratamientos, la eliminación de Hg no fue total, ya que no se alcanzaron los valores iniciales del día 0. En el bioensayo B, durante el periodo de exposición, la concentración de Hg en sedimento se mantuvo constante en los tratamientos con menor concentración (1.5 a 3.0 $\mu\text{g/L}$). A partir de 7.4 $\mu\text{g/L}$ se observó un incremento en la concentración de Hg. Durante el periodo de recuperación, después del recambio, los niveles de Hg en el sedimento fueron equivalentes a los iniciales, los cuales corresponden a la concentración natural de Hg en el sedimento experimental.

7.2.5. Lesiones y comportamiento.

Durante las pruebas preliminares y los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación, se observaron lesiones y cambios de comportamiento producidos por la exposición a Hg. En la figura 8 se muestra un organismo vivo sin exposición a Hg.

7.2.5.1. Pruebas Preliminares.

Durante la exposición a Hg, los organismos se encontraban generalmente agrupados, pero algunos estaban dispersos y en movimiento dependiendo de la concentración. Al morir, los organismos expuestos a Hg estaban retorcidos y separados entre sí, a diferencia de los controles, los cuales morían extendidos.

Los organismos muertos presentaron diversas lesiones asociadas a la exposición de Hg, desde cambios sutiles de coloración pasando de un gris a gris blanquecino o blanco, hasta cambios en la textura, la cual podía ser arrugada, estar rasgada y "descarapelada" de tal forma que asemejaba a una muda de piel (Figura 9). En la zona oral se observó inflamación de la proboscis a distintos niveles, desde un ligero aumento del volumen a una inflamación intensa de mayor tamaño (Figura 10). En la mayoría de los casos se observaba una coloración rojiza

Lesiones causadas por HgCl_2



Figura 8. Ejemplar vivo de *E. complanata* en condiciones normales de no exposición a Hg.



Figura 9. Coloración gris y piel ligeramente rasgada de *E. complanata* después de la exposición a $200 \mu\text{g/L}$ de Hg (prueba preliminar 2).

en la zona inflamada, así como en otras regiones del cuerpo que podían ser hemorragias. La inflamación de la proboscis no fue característica particular de alguna concentración del tóxico, su presencia era muy frecuente en todas las concentraciones donde hubo daño; sin embargo, fue más intensa en las concentraciones más altas (500 a 900 $\mu\text{g/L}$) y, esporádicamente, en algunas concentraciones más bajas, como 300 $\mu\text{g/L}$. El daño más grave producido por el Hg fue la ruptura del tegumento con exposición de vísceras que se presentaron en uno o más puntos a lo largo del cuerpo, casi siempre acompañado de inflamación intensa de la proboscis (Figura 11).

Las lesiones observadas en cada organismo se agruparon en 4 categorías, en un gradiente de menor a mayor severidad, las cuales, coinciden con los gradientes de las concentraciones de Hg aplicadas (a menor concentración de Hg menor severidad de la lesión y viceversa). Se consideró, como menos severo, la inflamación ligera de la proboscis y la coloración gris de la piel y la textura arrugada y, como muy severa, la inflamación intensa de la proboscis con la ruptura del tegumento con exposición de vísceras (Figura 12).

En la tabla 4 se muestra el número de organismos que presentaron dichas lesiones.

Tabla 4. Número de organismos que presentaron las lesiones observadas durante la exposición a Hg (n=20) durante las pruebas preliminares.

| Concentración $\mu\text{g/L}$ | Sin lesión | lesión 1 | lesión 2 | lesión 3 |
|----------------------------------|------------|----------|----------|----------|
| 0 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 19 | 1 | 0 | 0 |
| 200 | 8 | 2 | 12 | 0 |
| 300 | 7 | 8 | 0 | 14 |
| 400 | 5 | 3 | 15 | 0 |
| 500 | 6 | 4 | 4 | 3 |
| 600 | 1 | 11 | 18 | 0 |
| 700 | 0 | 0 | 3 | 17 |
| 800 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| 900 | 0 | 10 | 12 | 12 |

Sin Lesión: Organismos sin alteraciones con o sin cambios de coloración.

Lesión 1: Organismos con faringe inflamada, con o sin hemorragia.

Lesión 2: Organismos con piel rasgada y cambios de coloración.

Lesión 3: Organismos con faringe inflamada y exposición de vísceras.



Figura 10. Inflamación severa de la proboscis y piel arrugada de *E. complanata* después de la exposición a 1000 $\mu\text{g/L}$ de Hg (prueba preliminar 1).

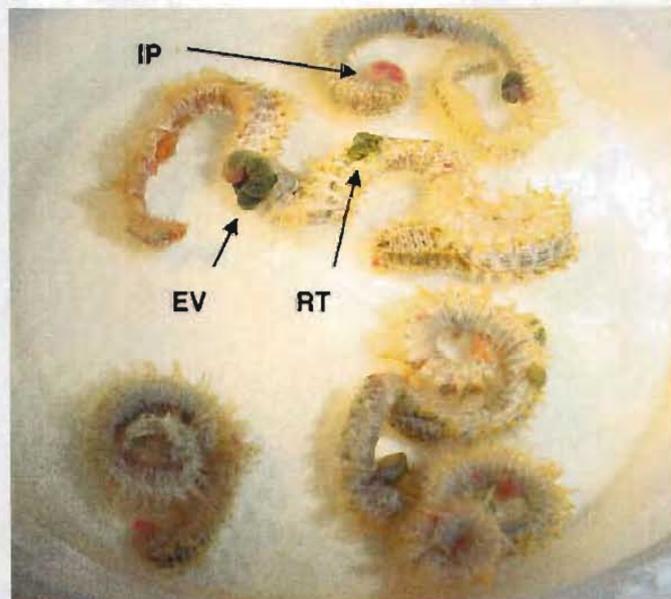


Figura 11. *E. complanata* con ruptura de tegumento (RT), exposición de vísceras (EV) e inflamación de proboscis (IP) después de la exposición a 1000 $\mu\text{g/L}$ de Hg (prueba preliminar 1).

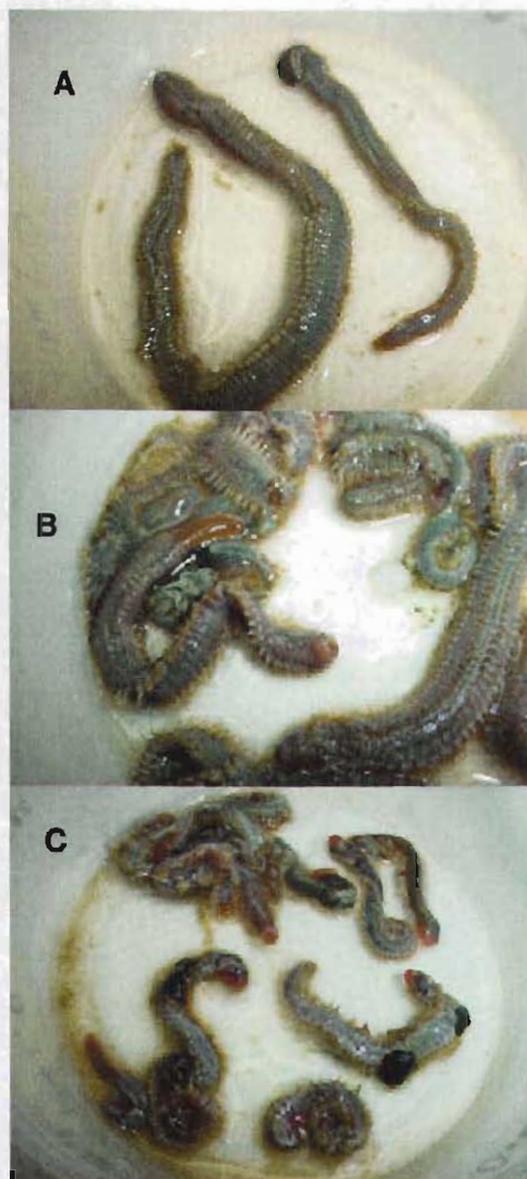


Figura 12. Lesiones observadas en *E. complanata* expuestos a Hg durante la prueba preliminar 2. A) Sin efectos aparentes a 100 $\mu\text{g/L}$ de Hg. B) Cambios de coloración grises e inflamación ligera de proboscis a 500 $\mu\text{g/L}$ de Hg. C) Severa inflamación de proboscis y exposición de vísceras a 700 $\mu\text{g/L}$ de Hg.

7.2.5.2. Bioacumulación-Recuperación

Durante las pruebas de Bioacumulación-Recuperación se observaron algunos patrones conductuales diferentes entre los organismos de cada bioensayo con relación a la presencia o ausencia de sedimento. En general, los organismos del bioensayo A (sin sedimento) estaban separados entre sí en los acuarios, mientras que los organismos del bioensayo B (con sedimento) se presentaron en forma agregada. Algunos organismos, generalmente los de mayor tamaño, mostraban una coloración naranja intensa y expulsaron una sustancia naranja (probablemente sedimento adquirido del medio y la coloración debida a la alimentación con algas rojas) que no se solubilizó en el agua y permaneció en el fondo del acuario. La expulsión de esta sustancia únicamente se observó al transferir los ejemplares a los acuarios con Hg. La presencia de esta sustancia fue muy común en el bioensayo A y, de hecho, no se presentó en 2 acuarios, a diferencia del bioensayo B, donde su presencia fue insignificante (tabla 5). En la mayoría de los casos, la sustancia naranja fue expulsada junto con un líquido blanquecino espeso que enturbió ligeramente el agua y, al paso de horas o días, desapareció la turbidez. Probablemente, la razón por la cual expulsaron esas sustancias fue una reacción al estrés y no necesariamente por la exposición al Hg.

En este experimento se esperaban mortalidades asociadas a la exposición de Hg únicamente a 100 $\mu\text{g/L}$, dados los resultados de mortalidad en la prueba preliminar 2. Se observaron 3 casos con proboscis inflamada (tratamientos 8.7 y 11.0 $\mu\text{g/L}$ de Hg, bioensayo A). Sin embargo, en el transcurso del bioensayo, se presentaron mortalidades a concentraciones bajas en ambos tratamientos y en los controles, con mayor número en el bioensayo A (Tabla 5). En algunos acuarios se presentó turbidez del agua y se observó cierto deterioro de la calidad del agua (mal olor, coloración obscura o amarillenta, acumulación de heces fecales, etc). En algunos casos, se observaron puntos blancos en el tegumento de los gusanos y en las heces fecales que se asociaron a crecimiento micótico o bacteriano, sin embargo, esto no fue determinado.

En el bioensayo B se observaron porciones del sedimento con coloración gris y, aunque no ocurrió en todos los casos, este fenómeno se observó en la mayoría de las réplicas en las que hubo mortalidades.

| | Bioensayo A | | | Bioensayo B | | |
|-----------------|-------------|------|------|-------------|---------|------|
| $\mu\text{g/L}$ | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 |
| 0 | 1, 2 | 1 | 1, 2 | 3 | 2 | 2, 6 |
| 1.5 | 1, 2 | 1 | 1, 2 | 1, 2, 6 | 3, 5, 6 | 0 |
| 1.7 | 1, 2 | 1, 2 | 1, 2 | | | 2 |
| 3.0 | 1, 2 | 1, 2 | 1, 2 | | 2 | 2 |
| 7.4 | 1, 2 | 1, 5 | 1, 2 | | 3, 6 | 2, 6 |
| 8.7 | 1, 2 | 3 | 1, 4 | 2 | 2, 6 | 2, 6 |
| 9.0 | 1, 2 | | 1, 2 | 2 | 2, 5, 6 | 2 |
| 11.0 | 1, 2, 3 | 1, 2 | 1, 4 | 1, 6 | | 6 |

Tabla 5. Disposición de los acuarios de la prueba de Bioacumulación-Recuperación con 3 réplicas (10 organismos en cada una). Los cuadros oscuros indican los acuarios donde se presentaron mortalidades de todos los organismos antes de finalizar el experimento. 1. expulsión de sustancia naranja. 2. agua ligeramente turbia por excreción de sustancia blanca. 3. agua muy turbia, a veces espumosa y con mal olor. 4. proboscis con ligera inflamación. 5. presencia de puntos blancos en el tegumento. 6. porciones del sedimento color gris.

8. DISCUSIÓN

8.1. Variación Estacional de la concentración de Hg en *E. complanata* y sedimento.

Mazatlán es importante como centro turístico y por poseer un puerto marítimo con cierta actividad industrial aunque esta no es importante. Sin embargo, los efluentes municipales y domésticos son las principales fuentes de metales pesados (Páez-Osuna, 1996; Chambers *et al.*, 1997), donde el Hg se encuentra hasta 10 veces por encima del nivel encontrado típicamente en aguas naturales (Manahan, 2002).

No hay estudios previos de Hg en la zona de la bahía de Mazatlán y tampoco se sabe de fuentes naturales importantes, excepto el aporte atmosférico (Boening, 2000). Sin embargo, se puede suponer que las fuentes antropogénicas que podrían estar impactando la zona son el emisor submarino de aguas residuales y la acumulación de desechos vertidos en el Estero de Urías.

El Estero de Urías figura como un foco potencial de Hg, ya que ahí se descargan aguas residuales crudas (urbanas e industriales) (Ruelas-Inzunza, 1998), junto con las actividades de tipo antropogénico desarrolladas en las plantas enlatadoras y empacadoras, artillerías, muelles petroleros, rastros, ganadería, acuicultura y, especialmente, en la planta termoeléctrica (Rodríguez, 2004), la cual puede ser la mayor fuente puntual de Hg por la quema de combustible fósil o combustóleo (Klaassen *et al.* 1986; Ecologistas en Acción, 2000).

El Estero de Urías es un sistema semicerrado, por lo que, probablemente, el Hg se acumula más que en la bahía, la cual está abierta y expuesta al continuo oleaje y a las corrientes. En el Estero, el recambio de las masas de agua con el mar es mínima y los contaminantes quedan prácticamente atrapados en el sistema (Galindo-Reyes, 1986). Sin embargo, no debe descartarse como una posible salida de Hg hacia la bahía.

El emisor submarino está localizado a 800 m de la costa, en el Cerro del Crestón, en la porción S de la bahía (Morales, 2001., Alberto Castro, com. pers.). No hay estudios que muestren las concentraciones de Hg en su área de influencia.

Sin embargo, existen estudios en otros países donde las concentraciones de Hg y otros metales pesados son más altos cerca de los emisores que en áreas sin influencia de las descargas (Young *et al.* 1981; Mc Lean *et al.* 1991). Morales (2001), determinó los metales pesados en sedimento y tejido de peces e invertebrados marinos asociados al emisor submarino de Mazatlán pero no registró las concentraciones de Hg y por lo tanto no se pueden comparar con los encontrados en la bahía durante este estudio. Sin embargo, menciona que el Cd y Cr fluctúan dependiendo de la época del año y varían según el organismo y el tejido, sin sobrepasar los límites permisibles. A pesar de la escasez de estudios sobre niveles de Hg en la zona y su procedencia, se puede considerar que los principales aportes provienen, en mayor o menor grado, de los contaminantes acumulados en el Estero de Urías, del emisor y de la atmósfera. Así, la variación natural de Hg en las localidades estudiadas podría ser explicada en términos de corrientes litorales, oleaje y vientos.

Green-Ruíz (2000) menciona que las corrientes litorales es una de las principales vías de transporte de metales hacia la bahía. De acuerdo con Montaño-Ley (1985), las olas más frecuentes provienen del NW, N, W y SW; sin embargo, las de mayor energía son las del SW y W. Estas olas provenientes del SW son las generadas por las tormentas tropicales y son las que causan más daños en la zona costera. Los vientos fuertes del S y SE soplan durante el verano (Secretaría de Marina, 1974), justo en la época de lluvias, cuando se presentan las tormentas tropicales.

Esto sugiere que el Hg proveniente de actividades antropogénicas, el natural y el atmosféricamente depositado que ha sido acumulado, sea probablemente movilizado como resultado del disturbio en el sistema (Boening, 2000). El efecto de la corriente puede transportar el Hg en los sólidos suspendidos, siguiendo la dirección de la costa hacia el N (Secretaría de Marina, 1974). De esta manera, el Hg podría transportarse de la UAS hacia Cerritos y las características de las localidades determinarían su depositación, sugiriendo una variación espacial. Dentro de los factores que pueden estar influyendo en la depositación del Hg en la I. Venados podría ser el patrón de circulación producido

por vientos de SW (olas de mayor energía producidas por tormentas tropicales en verano); este genera pequeños giros anticiclónicos en el interior de la bahía y ciclónicos en las cercanías de la Isla Venados, que invierten su dirección dependiendo de vientos provenientes del NE (Cabrera, 1988). Sin embargo, esto no explica la mayor concentración en la I. Venados.

De acuerdo con la ubicación de las localidades de muestreo en relación con el emisor de aguas residuales, se esperaba encontrar una mayor concentración de Hg en los organismos y sedimento de la UAS, menor concentración en la Isla Venados y menor en la playa de Cerritos; sin embargo no se cumplió esta hipótesis, ya que los resultados muestran otra tendencia (tejidos: Isla Venados>Cerritos>UAS; sedimento: Cerritos>UAS>Isla Venados). No se puede proporcionar una explicación adecuada para estos resultados, en particular, para las concentraciones más altas de Hg en los organismos de la Isla Venados, a 7 km del emisor. Las corrientes marinas no explican, por sí solas, estas tendencias, ya que también influyen otras características propias de la localidad (granulometría, materia orgánica, oleaje), así como de los propios organismos (dieta, metabolismo, talla, sexo). Las características de los sedimentos modifican los procesos de especiación del Hg, por la adhesión a la materia orgánica suspendida o depositada y por la asociación a los granos finos de sedimento. Asimismo, la metilación del Hg, mediado por bacterias, determina la biodisponibilidad a los organismos, la cual es la principal forma en que es adquirido y acumulado en el tejido muscular y lipídico o en su forma inorgánica (HgCl_2) que, por su enlace covalente, es fácilmente liposoluble (Morel *et al.* 1998). La bahía de Mazatlán presenta sedimento altamente enriquecido con materia orgánica frente al Estero de Urias y, en la costa, frente a la Isla Venados (Méndez y Green-Ruiz, 1998). Una probable explicación a la variación espacial de Hg encontrada en la bahía es la mayor acumulación del metal en los sedimentos ricos en materia orgánica, los cuales pudieron haber sido transportados a través de las corrientes hasta las localidades estudiadas. Sin embargo, este supuesto no puede ser comprobado con los resultados aquí obtenidos.

De acuerdo con Power y Chapman (1992), en estudios de contaminación es importante considerar los sedimentos por presentar altas concentraciones de contaminantes y mostrar poca variación espacio-temporal. En este estudio, el sedimento de las 3 localidades muestra valores bajos de Hg probablemente por ser de grano grueso y estar en la zona intermareal expuestos al movimiento del oleaje, de tal forma que no permite la adhesión del metal a las partículas (Green-Ruiz, 2000). Esto sugiere que los análisis de tejidos son muy convenientes porque proveen un patrón integral de tiempo de la fracción biodisponible del contaminante que, además, frecuentemente se encuentra en concentraciones más altas que aquellas presentes en sedimento o agua (Adams, 1995., Rainbow & Phillips, 1993). Desafortunadamente, en este estudio no se midió el Hg en los sólidos suspendidos en la fracción disuelta, la cual podría explicar también la bioconcentración en los organismos, ya que el sedimento suspendido con alta concentración de Hg puede ser transportado por las corrientes y distribuido hasta otros sitios (Siegel *et al*, 2001).

Los resultados obtenidos no mostraron variación estacional en las concentraciones de Hg en las 3 localidades. Las diferencias observadas se atribuyen a una probable variación natural. Para obtener información más concreta al respecto se propone realizar futuros estudios a largo plazo en la bahía de Mazatlán.

8.2. Bioensayos de Bioacumulación-Recuperación

8.2.2. Pruebas preliminares (1, 2)

El efecto del Hg en la supervivencia de *E. complanata* no se ha registrado en estudios de toxicidad ni de contaminación marina. Por este motivo, las concentraciones utilizadas en la prueba preliminar 1 se basaron en el estudio de Reish y Carr (1978), los cuales expusieron a los poliquetos *Ctenodrilus serratus* y *Ophryotrocha diadema* a distintas concentraciones de Hg, entre 1 y 20 000 $\mu\text{g/L}$. Sus resultados coinciden con los de este estudio, donde se muestra que la concentración 1000 $\mu\text{g/L}$ de Hg fue suficiente para acabar con el total de la

población experimental a 31 hrs de exposición. Sin embargo, a diferencia de *C. serratus* y *O. diadema*, no hubo efecto en 100 $\mu\text{g/L}$ para *E. complanata*, lo que sugiere que esta especie muestra mayor tolerancia al Hg. Se debe tener cuidado al comparar estas especies por la variabilidad de los periodos de exposición, las condiciones experimentales, así como a las tolerancias de cada especie. Sin embargo estos datos confirman la alta toxicidad del Hg para poliquetos, como lo han demostrado Reish *et al.* (1976) y Reish y Carr (1978).

Durante la prueba preliminar 2, se presentó una rápida mortalidad hasta la concentración de 200 $\mu\text{g/L}$ (Figura 3); sin embargo, los organismos toleraron la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ hasta los primeros 6 días y, posteriormente, todos murieron a los 10 días. Se esperaba que esta concentración no causara mortalidad según lo observado en la prueba preliminar 1. Probablemente, esta discrepancia se debe a la variabilidad natural de los organismos, a su edad y a sus características inherentes u otra variable no controlada en el laboratorio. Estos resultados fueron similares a los de Reish y Carr (1978), donde 100 $\mu\text{g/L}$ afectaron la supervivencia de *C. serratus* y *O. diadema*, así como de *Capitella capitata* y *Neanthes arenoceodentata* en el estudio de Reish *et al.* (1976).

8.2.3. Bioacumulación-Recuperación

E. complanata mostró una eficiente acumulación de Hg en los 7 tratamientos. Las concentraciones medidas en el tejido indican que estos organismos son buenos acumuladores de metales pasados. Reish y LeMay (1991) midieron la bioconcentración de distintos metales, incluyendo el Hg, en *C. capitata*, *N. arenoceodentata* y *Nereis grubei* y concluyeron que los poliquetos acumulan eficientemente distintos tóxicos. Con estos datos se confirman las hipótesis, del efecto del Hg en la supervivencia y de su acumulación en los individuos.

Los resultados del bioensayo B, indicaron que *E. complanata* es capaz de acumular cantidades considerables de Hg en solución durante al menos 8 días de exposición y, posteriormente, pueden eliminar parte de este tóxico durante 7 días en ausencia del metal, lo que confirma la hipótesis sobre la capacidad de

eliminación del tóxico de esta especie. Sin embargo, el tiempo necesario para eliminar la totalidad del Hg acumulado no pudo ser determinado en los bioensayos debido a su corta duración.

Los organismos del bioensayo A mostraron una ligera eliminación de Hg en el tratamiento 1.7 $\mu\text{g/L}$, pero en el resto de los tratamientos la tendencia fue a mantener la misma concentración o a incrementarla ligeramente, como se observa en los tratamientos 1.5, 3.0 y 9.0 $\mu\text{g/L}$ del bioensayo A (Figura 4) y 1.5 $\mu\text{g/L}$ del bioensayo B (Figura 5); sin embargo, esto se puede atribuir a la variación individual observada en esta especie, así como al error implícito debido a la determinación de la concentración de Hg en una y no en 3 réplicas, dadas las mortalidades registradas. En cambio, la mayoría de los tratamientos del grupo B mostraron eliminación del 25 al 36% del metal. Probablemente, el sedimento actúa favoreciendo la movilización del Hg de los organismos hacia este. Por otro lado, la importancia de la presencia del sedimento durante la exposición se observa en la disponibilidad del Hg a los organismos, ya que los especímenes del grupo B bioacumularon menos Hg, a diferencia de los del grupo A, los cuales mostraron prácticamente el doble de acumulación (proporción 1:2). En la matriz sedimentaria, el Hg se une a la materia orgánica particulada (Triffreau *et al.*, 1995), lo que indica que limita la disponibilidad del metal a los organismos (Boening, 2000).

De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, el Hg estaría actuando de la siguiente forma: se acumula en el tejido de *E. complanata* por su afinidad de incorporarse al músculo, probablemente contenido por lisosomas, unido a metalotioneínas o al tejido graso debido a la liposolubilidad del Hg (Rainbow, 1997; Morel *et al.*, 1998). En la presencia de sedimento, se da una eliminación parcial (bioensayo B), pero no así en la ausencia de sedimento, donde se mantiene la misma concentración. El Hg acumulado en el sedimento probablemente se une a la materia orgánica presente.

Si el sedimento captura una porción del Hg presente en la solución y favorece la eliminación en el periodo de recuperación, esto debería reflejarse entonces en las concentraciones de Hg del sedimento al final del periodo de recuperación. Sin embargo, las concentraciones finales después del recambio de

sedimento no muestran acumulación de Hg, además de que las concentraciones son similares o menores al valor del sedimento inicial sin exponer a Hg. El recambio del sedimento se realizó con el fin de observar si el Hg destoxificado por *E. complanata* era incorporado por el sedimento. Los resultados muestran que no fue así y se concluye que 8 días no fueron suficientes para que el Hg pase de los organismos al sedimento. Probablemente, en el medio natural, los individuos al morir, contribuyen a la incorporación de Hg al sedimento ya que viven sobre él.

La prueba de Kruskal-Wallis, considerando las concentraciones de Hg en los tejidos, mostró que las concentraciones promedio de Hg en los organismos expuestos a las diversas soluciones fueron diferentes significativamente en el bioensayo A, lo que indica que la concentración de las soluciones afectó la bioacumulación. En cambio, en el bioensayo B no se observaron diferencias significativas, lo que sugiere que el sedimento juega un papel muy importante, ya que, al capturar una parte del Hg, no permite la bioacumulación total. Esto se ve reflejado en la bioacumulación en proporción 2:1 entre el bioensayo A y el B, respectivamente.

Aún con la escasa información sobre la destoxificación de *E. complanata*, se sabe que existen procesos o mecanismos que se dan en invertebrados marinos para manipular la presencia de un tóxico (Wood, 1984). Riisgard *et al.* (1985) midieron la depuración de Hg en especímenes del mejillón *Mytilus edulis* después de ser transferidos a agua limpia después de la exposición dentro de un área crónicamente contaminada con Hg durante 3 meses. La forma del Hg que determinaron fue la orgánica (75 % de metilmercurio), que es la especie química que tiene mayor afinidad para acumularse en los tejidos suaves (los comestibles) (Boening, 2000). Por otro lado, Kraus *et al.* (1988) informan que las larvas de los camarones *Palaemonetes pugio*, recolectadas en un sitio contaminado con Hg, sobrevivieron de igual manera que los respectivos controles en un tratamiento de 12.5 $\mu\text{g/L}$ de metilmercurio, indicando así, una marcada tolerancia. También determinaron que estos camarones producían metalotioneínas en respuesta al tratamiento con HgCl_2 , a través de la exposición a Hg inorgánico.

Existen distintos estudios que informan la presencia de metalotioneínas en invertebrados marinos (Viarengo, 1985, 1989; George, 1990; Roesijadi, 1994) y, especialmente en el grupo de los anélidos (Viarengo, 1989; Pavicic *et al.* 1993), presentan lisosomas (involucrados en el transporte y digestión intracelular) que secuestran los metales pesados y mantienen su homeostasis de los metales pesados (Viarengo *et al.* 1987).

Medeiros *et al.* (1980) demostraron que *Glycera dibranchiata*, acumuló rápidamente el metilmercurio así como lo eliminó rápidamente con 30% de pérdida en 8 horas posterior a la inmersión durante 9 días en 10 $\mu\text{g/L}$ de metilmercurio. Esto indica que al menos algunos poliquetos tienen la capacidad de destoxificar el Hg. Se sabe que *E. complanata* presenta metalotioneínas para la depuración de Cu y Zn (Marcano *et al.*, 1996), lo que sugiere que esta especie probablemente posee la capacidad de destoxificación de Hg a través de lisosomas o metalotioneínas, las cuales estarían capturando y eliminando el metal adquirido como protección ante los efectos dañinos durante las exposiciones a bajas concentraciones.

Nusetti *et al.* (1998), en su análisis de exposición de *E. complanata* a concentraciones subletales de Cu (21 días) y recuperación (30 días), encontraron que el contenido de Cu disminuyó en el tejido de 13.7 $\mu\text{g/g}$ a 7.4 $\mu\text{g/g}$ (es decir, un 1.5% del Cu fue eliminado diariamente) y no hubo mortalidades. En el presente estudio, considerando los valores promedio de Hg acumulado en los tejidos después del periodo de exposición y la cantidad de Hg después del periodo de recuperación del bioensayo B, se estimó que un 3.8% del metal acumulado previamente fue eliminado diariamente. Esto sugiere que, en *E. complanata*, la tasa de eliminación del Hg es mayor que la del Cu, el cual ha sido catalogado como uno de los metales más tóxicos para poliquetos (Reish y Carr, 1978).

Al realizar el balance de Hg en los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación, se observó que el 100% inicial (día 0), repartido entre el tejido, la solución y el sedimento (bioensayo B), no se conserva igual en los días 8 y 16 ya que disminuyó el porcentaje en las 3 matrices. Aparentemente, en ambos bioensayos, todo el Hg se movilizó de la solución a los organismos y al sedimento.

En el bioensayo A, el Hg fue acumulado por los organismos, pero una parte se perdió disminuyendo el porcentaje hasta el 50% o menos del 100% original en la mayoría de los casos. Excepto en el control y en el tratamiento 11.0 $\mu\text{g/L}$ se presentó un aumento por encima del 100% en el día 8, el cual no se ha podido explicar (probablemente las muestras fueron contaminadas durante los análisis). El Hg en solución se eliminó completamente del agua y, a pesar de que una gran parte se acumuló en los organismos, el restante fue eliminado por evaporación debido a su alta volatilización (Morel et al., 1998) y, probablemente, una parte quedó adherida a las paredes del acuario. De igual forma, en el bioensayo B, una parte del Hg se movilizó completamente del agua hacia los organismos y el sedimento y el resto probablemente se evaporó, ya que los porcentajes de organismos y sedimento en el día 8 y 16 fueron inferiores a 100%.

Otra posibilidad sería que el Hg eliminado por los organismos se diluyó en el agua de mar en cantidades no detectables por el aparato. Aún considerando todas estas opciones, es una cantidad de Hg importante la que se perdió y la explicación más lógica es la evaporación, ya que, debido a su alta presión de vapor, este metal se evapora fácilmente a temperatura ambiente (Whittaker, 1969).

De acuerdo con los resultados de las pruebas preliminares, se esperaba que únicamente los organismos expuestos a las concentraciones más altas (11 $\mu\text{g/L}$) morirían; sin embargo, también hubo mortalidad en las concentraciones más bajas. Esto se puede atribuir a posibles problemas metodológicos, a variables no controladas inherentes a los propios organismos (i.e. edad, metabolismo, sexo, estado físico), es decir, a la variabilidad individual. No existen protocolos para realizar bioensayos con esta especie y el Hg, por lo tanto nos enfrentamos a problemas metodológicos como a lo inapropiado del espacio y las condiciones experimentales, lo cual, probablemente, causó turbidez en el agua, principalmente por no haber recambio constante de las soluciones para no alterar su concentración y afectar la cuantificación de la acumulación y distribución de Hg en las 3 matrices. Esa turbidez provocó deterioro de la calidad de agua (mal olor, coloración oscura o amarillenta, acumulación de heces fecales, etc.) y, al

parecer, hubo contaminación micótica y/o bacteriana como sugiere la presencia de puntos blancos sobre los individuos y las heces. Por otro lado, se desconocían las condiciones de salud de los especímenes al extraerlos del campo, durante y después de la aclimatación y durante el bioensayo de Bioacumulación-Recuperación. Durante la prueba, se decidió no alimentar a los organismos. Esto se decidió al observar, en condiciones de laboratorio sin tóxico, que permanecieron 15 días sin alimento en buen estado de salud. Sin embargo, este hecho pudo influir en la mortalidad de los especímenes experimentales.

Generalmente, todos estos factores se presentaron cuando varios organismos convivían en el mismo espacio. Se presentó mayor mortalidad en el bioensayo A que en el B, lo que pudo provocar que las condiciones desfavorables actuaran sinérgicamente con el Hg, comprometiendo así la supervivencia y minimizando el efecto en el grupo B, mediante la acción protectora del sedimento.

8.3. Lesiones y comportamiento

La mayoría de los estudios toxicológicos y de contaminación marina se enfocan en conocer los valores de los metales en el tejido y en la letalidad y subletalidad de tóxicos. Sin embargo, no han considerado los efectos inmediatos ni los daños físicos que éstos pueden provocar. Es muy probable que los disturbios sutiles a una comunidad ocurran a concentraciones mucho menores por exposiciones crónicas a Hg que aquellas sugeridas en estudios de toxicidad, basadas principalmente en efectos agudos (Boening, 2000). Los resultados de este estudio sugieren que las lesiones pueden ser tan agudas o sutiles según sea la concentración de Hg, pero su importancia radica en que pueden ser indicadores potenciales de estrés ambiental.

Las lesiones observadas en los organismos de este estudio reflejan la toxicidad del Hg. Los organismos expuestos a las concentraciones más altas presentaron las lesiones más graves; sin embargo, todas las lesiones estaban asociadas a mortalidades. En la prueba preliminar 2 no se presentaron lesiones en las concentraciones más bajas (100 y 200 $\mu\text{g/L}$), sólo algunas rasgaduras en la

piel y cambios de coloración en algunos organismos. Se desconoce si las lesiones se presentaron en forma secuencial en cada concentración, es decir, si primero se presentó una inflamación leve de la proboscis y después la exposición de vísceras, o si se dieron simultáneamente, ya que al momento de hacer las observaciones y registrar las lesiones, los organismos ya estaban muertos. Así, al no haber lesiones en la concentración de 100 $\mu\text{g/L}$, las mortalidades pudieron ser causadas por otro factor o, incluso, en acción conjunta con el Hg.

Hasta el momento no hay información sobre daños físicos en esta especie, pero existen datos sobre el daño que producen los metales pesados a nivel inmunológico. Marcano *et al.* (1997) y Nusetti *et al.* (1998), demostraron la acción inmunosupresora de dosis subletales de Cu, de disminución en la fagocitosis y en la formación de rosetas eritrocíticas (para la formación de células de reconocimiento de antígenos) y secretoras (formadoras de celomocitos). Mencionan también que los celomocitos, básicamente células acidófilas y basófilas, en *E. complanata* son consideradas como las principales líneas celulares involucradas en la función inmune, de tal forma que una reducción del fluido celómico puede alterar la inmunocompetencia de los individuos. Asimismo, estos autores señalan que estas respuestas inmunes son análogas u homólogas a otros invertebrados marinos y a mamíferos, lo cual implica que los efectos de estos metales en los mecanismos de defensa son dañinos en el sistema inmune de vertebrados.

Rainbow (1997) informó el efecto de los iones de metales pesados en el metabolismo de invertebrados marinos. En su estudio indicó que el caracol *Helix aspersa* muestra, en el hepatopáncreas, signos de daño histológico, necrosis y pérdida de células y gránulos en el lumen por la liberación en exceso de iones de calcio al ser atrapado el ión del metal en el gránulo, con la consecuente recuperación de los organismos.

En este estudio, es muy probable que muchos de estos daños se presentaron a nivel histológico e inmunológico en las concentraciones más bajas de Hg que no mostraron lesiones evidentes a simple vista. De alguna forma, esto podría explicar la muerte en ausencia de lesiones en 100 $\mu\text{g/L}$; si las defensas

estaban bajas por el estrés al Hg, entonces quedaron vulnerables a los agentes patógenos presentes en el ambiente. Por otra parte, en el bioensayo de Bioacumulación-Recuperación, se observaron 2 casos de proboscis con inflamación leve en concentraciones donde no se esperaban lesiones y solo pocas mortalidades (tratamientos 8.7 y 11 $\mu\text{g/L}$ del bioensayo A). Estos resultados indican que, aún en concentraciones por debajo de las que causan mortalidad, pueden presentarse daños a nivel histológico, sin necesariamente causar la muerte ni daños externos evidentes. Por otro lado, permanece la incógnita de si al presentarse lesiones como las observadas en las pruebas preliminares en fase temprana, los organismos seguían vivos y, de ser así, si pueden recuperarse al ser transferidos a un ambiente limpio o si la aparición de los primeros indicios de estas lesiones implican la muerte irremediable del individuo.

Klaassen *et al.* (1986), mencionan que el Hg produce efectos neurotóxicos. Esto se observó al momento de introducir los organismos en las soluciones de Hg. Los individuos de las soluciones más bajas no mostraron reacción evidente, pero en las concentraciones de Hg más altas se retorcieron violentamente por unos minutos y posteriormente volvieron a su estado normal. Los organismos muertos en las concentraciones altas yacían enroscados individualmente, debido probablemente, a la acción del Hg sobre el sistema nervioso.

8.4. Impacto Ecológico del Hg.

Existen pocos estudios sobre concentraciones naturales de Hg en poliquetos. Eisler (1981., Tabla 1), presenta una recopilación de las concentraciones de este metal en *Nereis diversicolor*, *N. succinea*, *Arenicola marina*, *Nephtys hombergii*, las cuales fluctúan desde 0.008 hasta 0.130 $\mu\text{g/g}$ peso húmedo. Desafortunadamente, al tratarse de peso húmedo, las comparaciones de datos de diferentes especies podrían resultar erróneas, ya que la acumulación de líquidos es variable en las distintas especies. Sin embargo, la concentración de *N. diversicolor* es de 0.350 $\mu\text{g/g}$ peso seco, más alta que los valores determinados en este estudio con *E. complanata*, los cuales están entre 0.082 -0.263 $\mu\text{g/g}$ peso seco, en concentraciones naturales.

En la tabla 6 se observan los niveles de Hg presentes tanto en sedimentos como en organismos de distintas especies y diferentes localidades, así como los niveles registrados en el presente estudio. Fowler (1990) señala que, en sistemas costeros, los sitios no contaminados presentan niveles aproximados o por debajo de $0.1 \mu\text{g/g}$ de Hg en sedimento. Esto se puede observar en zonas con historia de actividad importante con mercurio, como la actividad minera en Teacapan (Rodríguez, 2004) o en la cuenca del Río Sacramento en Sierra Nevada California (Domagalski, 2001), donde las concentraciones están por encima de $0.1 \mu\text{g/g}$ peso seco.

Las concentraciones se elevan en las proximidades de las ciudades (Esquer, 2003), por la contaminación antropogénica, como son las descargas de aguas residuales (Reish *et al.*, 1976) o por actividades industriales relacionadas con el uso del Hg que vierten sus deshechos a ríos o zonas costeras (Fowler, 1990). Las áreas con 1.4 a $2.25 \mu\text{g/g}$ de Hg en el sedimento implican cierto grado de contaminación y, de acuerdo con Fowler (1990), las áreas con 5 a $32 \mu\text{g/g}$ están fuertemente impactadas. Domagalski (2001), señala que las concentraciones cercanas al promedio de la abundancia en la corteza terrestre ($0.067 \mu\text{g/g}$, Cox, 1989) no necesariamente implican contaminación.

Respecto a la tolerancia de los organismos a los metales, Bryan (1974) menciona que es posible encontrar distribución y diversidad normal de especies en un estuario ligeramente contaminado. Sin embargo, los organismos aparentemente normales pueden contener concentraciones de metales de 2 a 3 órdenes de magnitud mayores que los encontrados en estos ecosistemas y estos ser transmitidos al hombre.

Tabla 6. Concentración de Hg ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en sedimento y en distintos organismos de diferentes localidades con relación al presente estudio.

| Organismo | Tejido | Sedimento | Localidad | Referencia |
|---|-----------------------|-----------------------------|--|---------------------------|
| <i>Chione subrugosa</i> | 0.063 | 0.999 | Bahía de Guaymas, Sonora, Mex. | Esquer, 2003. |
| <i>Mugil cephalus</i> | 0.303 | 1.40 a 2.25 | Próximo a la ciudad (Guaymas, Son) | " |
| <i>Opisthonema libertate</i> | 0.437 | | " | " |
| <i>Cathorops fuerthii</i> | 0.705 | | " | " |
| <i>Seriola lalandi</i> | 1.402 | | " | " |
| | | 0.02 | Laguna La Paz, BCS. | Kot <i>et al.</i> , 1999. |
| <i>Cherublemma emmelas</i> | * 0.36 0.031 a 1.0 | | Zona del Talud del Golfo de California. | Monzalvo, 2003. |
| <i>Zalieutes elater</i> | 0.4 0.12 a 0.84 | | " | " |
| <i>Mugil curema</i> | **0.82 | | Teacapan, Sin. | Rodríguez, 2004. |
| <i>Mugil curema</i> | **0.11 | | Urias, Sin. | " |
| <i>Mugil cephalus</i> | 0.13 | | Río Culiacán, Sin. Méx. | Valenzuela, 2003. |
| <i>Lutjanus colorado</i> | 0.89 | | Ensenada del Pabellón, Sin. Méx. | " |
| | | 0.06 | Región Costera Sur de California | Reish <i>et al.</i> 1976. |
| | | 4 | Descarga de las proximidades del condado de Los Angeles | " |
| | | 0.35 Región minera de Hg | Cuenca del Río Sacramento, Cal. Sierra Nevada | Domagalski, 2001 |
| Pescado, (nivel de protección en su consumo. No riesgo) | 0.3 | | | US EPA, 2001. |
| | | 0.067 | Concentración promedio de la abundancia global en la corteza | Cox, 1989. |
| | | 0.008 – 0.6 | Sedimentos profundos del Atlántico N. | Kennish, 1997. |
| | | <0.1 | Sistemas Costeros. Sitios no contaminados | Fowler, 1990. |
| | | 5 - 32 | Sistemas Costeros. Áreas fuertemente impactadas (i.e. Bahía de Minamata, Japón). | " |
| <i>Eurythoe complanata</i> | 0.082-0.263 | 0.008-0.020 | Bahía de Mazatlán, Sinaloa, Méx. | Este Estudio |
| <i>Eurythoe complanata</i> | 0.127-0.966 | 0.012-0.082 | Bioensayos Bioacumulación (B) | " |
| <i>Eurythoe complanata</i> | 0.085-2.317 | | Bioensayo Bioacumulación (A) | " |

*Concentraciones naturales no tóxicas, consideradas como niveles básicos.

**Niveles que no indican riesgo por consumo.

En relación con la acumulación en organismos, US EPA (2001) señala 0.3 $\mu\text{g/g}$ de peso seco en pescado como un nivel de no riesgo para el consumo humano. Sin embargo, Monzalvo (2003) y Rodríguez (2004) señalan que los niveles de Hg de los peces entre 0.36 y 1 $\mu\text{g/g}$ peso seco no son tóxicos y, por lo tanto, no hay riesgo por consumo. En concreto, al confrontar los datos de la literatura con este estudio, se observa que los niveles de Hg en *E. complanata* y en el sedimento de la Bahía de Mazatlán, se encuentran dentro de los niveles naturales normales (menores de 0.3 $\mu\text{g/g}$ de Hg), los cuales no son causa de preocupación por intoxicación y no necesariamente señalan a la actividad antropogénica como la principal fuente de contaminación por este metal (Tabla 6).

Las concentraciones medidas en *E. complanata* y en sedimento durante los bioensayos de este estudio, no solo fueron útiles para determinar el efecto y la acumulación en los organismos, sino que también se han encontrado en otros estudios de campo (Reish *et al.* 1976; Fowler, 1990; Esquer, 2003), ya sea en áreas medianamente o muy contaminadas, en las cuales no se tiene conocimiento de la condición de los organismos que habitan dichas zonas, factor muy importante para establecer la salud y el impacto de los contaminantes en el hábitat.

Por supuesto, estas comparaciones se tienen que hacer con cautela por varias razones:

-Cada localidad cuenta con características físico-químicas diferentes. Las variables ambientales como la temperatura, pH, composición química del agua, geología y tipo de suelo afectan la incorporación y el efecto del Hg sobre los organismos.

-Las especies estudiadas poseen diferencias de hábitos alimenticios, hábitat, locomoción, posición en la cadena trófica y de actividad metabólica, lo cual las hace muy variables para ser comparadas entre sí. Sin embargo, las diferencias de los niveles de Hg pueden reflejar la biomagnificación, según la posición trófica en que se encuentren de acuerdo con sus hábitos alimenticios.

-Es muy importante considerar la especiación química del Hg incorporado a los organismos, sedimento y agua, así como su biodisponibilidad para conocer cómo se comporta en el ambiente.

-Por último, la extrapolación de los resultados de experimentos de laboratorio al ecosistema se deben realizar con mucho cuidado. Con los datos de los bioensayos de este estudio no se pretende extrapolarlos al campo, debido a la falta de los elementos necesarios para hacer una comparación equiparable y veraz de las condiciones naturales con las de laboratorio, pero si es la intención de aproximarse y resaltar la importancia de los efectos que podrían presentarse e impactar negativamente, así como establecer el riesgo potencial hacia los organismos y al hábitat.

Son pocos los estudios que miden el efecto del Hg en poliquetos y, en particular en *E. complanata*, no existe ninguno al respecto, pero por su tamaño, abundancia y distribución circumtropical, es un organismo potencialmente útil como centinela de contaminación bentónica, ya que ha sido utilizado en estudios con metales pesados. Asimismo, dadas las lesiones causadas por Hg, sería importante ampliar la información concerniente a este tema, ya que brindaría más elementos para evaluar el efecto adverso de los contaminantes ambientales en la salud del ecosistema.

9. CONCLUSIONES

a) El estudio sobre la variación estacional del Hg en *E. complanata* y sedimentos de las 3 localidades de Mazatlán indicaron lo siguiente:

- Las concentraciones promedio de Hg determinadas en *E. complanata* de las localidades estudiadas ($0.18 \mu\text{g/g}$ peso seco) están dentro de los niveles considerados como no tóxicos en tejidos de organismos marinos, los cuales han sido considerados como menores a $1 \mu\text{g/g}$.

- Las concentraciones promedio de Hg en sedimento estimadas para las diferentes localidades ($0.007 \mu\text{g/g}$ peso seco) están dentro de los niveles naturales o de sitios no contaminados, cuyos valores han sido considerados como cercanos o menores a $0.1 \mu\text{g/g}$, aproximadamente.

- Las concentraciones de Hg en sedimentos y en organismos no mostraron variación estacional y las diferencias encontradas durante las distintas épocas se atribuyen a variación natural.

- La variación espacial observada en las concentraciones de Hg en organismos (Isla Venados>Cerritos>UAS). y en sedimentos (Cerritos>UAS>Isla Venados) sugieren que la principal fuente de Hg no necesariamente proviene de las actividades antropogénicas desarrolladas en el estero de Urias y en la bahía de Mazatlán.

b) Los bioensayos realizados en el laboratorio permitieron concluir lo siguiente:

- Las dos pruebas preliminares (concentraciones nominales de 1 a $100 \mu\text{g/L}$ y 100 a $900 \mu\text{g/L}$, respectivamente) indicaron que la concentración nominal mínima a la cual se presentó mortalidad de *E. complanata* fue $100 \mu\text{g/L}$.

- Los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación (concentraciones reales de 1.5 a $11 \mu\text{g/L}$) indicaron que *E. complanata* posee gran capacidad para acumular Hg. La bioacumulación es menor en presencia de sedimento. *E. complanata* elimina el Hg con mayor eficiencia en presencia de sedimento.

- La cantidad de Hg eliminada por *E. complanata* durante los 7 días de recuperación es menor que la cantidad acumulada durante los 7 días de exposición. La depuración es lenta y requiere de un periodo de tiempo superior a 7 días para eliminar el Hg hasta llegar a la concentración inicial
- El balance total de Hg indicó que una parte del tóxico de las soluciones se acumuló en los organismos y en el sedimento y una porción considerable se evaporó durante el bioensayo, debido a la gran volatilización de este metal.
- Los organismos expuestos a las altas concentraciones de Hg de las pruebas preliminares mostraron lesiones tales como inflamación de la proboscis, exposición de vísceras, piel rasgada y cambios de coloración. Se desconocen los posibles efectos deletéreos del Hg en otras funciones biológicas.
- La capacidad de acumulación y eliminación de Hg en *E. complanata* puede tener implicaciones importantes en las poblaciones naturales debido al riesgo potencial que este metal representa en los ecosistemas.

c) Se recomienda:

- Realizar estudios a largo plazo de las poblaciones naturales con el fin de observar la posible variación estacional del mercurio acumulado en *E. complanata*, sedimentos y agua.
- Afinar los métodos con repeticiones de los experimentos con el fin de desarrollar un buen protocolo reproducible en el futuro.
- Utilizar a *E. complanata* como centinela ambiental para metales pesados por ser abundante en la zona circumtropical, por su capacidad de acumulación de Hg y por presentar lesiones asociadas al tóxico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams WJ. 1995. Aquatic toxicology testing methods. *In*: DJ Hoffman., BA Rattner., GA Burton Jr., J Cairns Jr. (Eds.), Handbook of ecotoxicology. Boca Raton: CRC Press. 25-46 pp.
- Ahn IY., YC Kang., JW Choi. 1995. The influence of industrial effluents on intertidal benthic communities in Panweol, Kyeonggi Bay (Yellow Sea) on the West Coast of Korea. *Marine Pollution Bulletin*. 30, 200-206.
- Albert LA., JA Benítez. 1996. Impacto ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros. *In*: AV Botello, JL Rojas-Galaviz, JA Benítez, D Zárate-Lomelí (Eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnósis y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 107-123 pp.
- Alonso D., P Pineda., J Olivero., H Gonzáles., N Campos. 2000. Mercury levels in muscle of two fishes species and sediments from the Cartagena Bay and the Ciénega Grande de Santa Marta, Colombia. *Environmental Pollution*. 109: 157-163.
- Boening DW. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*. 40: 1335-1351.
- Botello AV., G Ponce V., SA Macko. 1996. Niveles de concentración de Hidrocarburos en el Golfo de México. *In*: AV Botello, JL Rojas-Galaviz, JA Benítez, D Zárate-Lomelí (Eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnósis y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 225-253 p.
- Bryan GW. 1974. Adaptation of an estuarine polychaete to sediments containing high concentrations of heavy metals. *In*: Vernberg FJ., Vernberg WB (eds). *Pollution and physiology of marine organism*. Academic Press. USA. 123-135 p.
- Cabrera DH. 1988. Modelación hidrodinámica numérica del Puerto de Mazatlán y sus proximidades. Tesis de Licenciatura. ESCM, Universidad de Colima. 26 pp.
- Chambers PA., M Allard., SL Walker., J Marsalek., J Lawrence., M Servos., J Busnarda., KS Munger., C Jefferson., RA Kent., MP Wong., K Adare. 1997. Impacts of municipal wastewater effluents on Canadian waters: a review. *Water Quality Research Journal of Canada* 32: 659-713.
- Cox PA. 1989. *The elements: Their origin, abundance, and distribution*. Oxford University Press, Oxford. 207 pp.

Cross FA., TW Duke., JN Willis. 1970. Biogeochemistry of trace metals in a coastal plain estuary: distribution of manganese, iron and zinc in sediments, waters and polychaetous worms. *Chesapeake Science*. 11, 221-234.

Dean WE. 1974. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss of ignition: comparison with other methods. *Journal of Sedimentary Petrology*. 44 (1): 242-248.

Dirección de Estadística y Estudios Económicos de la Secretaría de Hacienda Pública y Tesorería del Gobierno del Estado de Sinaloa. 1985. Síntesis monográfica del municipio de Mazatlán. 92 pp.

Domagalski J. 2001. Mercury and methylmercury in water and sediment of Sacramento River Basin, California. *Applied Geochemistry*. 16: 1677-1691.

Dvonch JT., JR Graney., GJ Keeler., RK Stevens. 1999. Use of elemental tracers to source apportion Hg in South Florida precipitation. *Environmental Science and Technology*. 33 (24). 4522-4527.

Ecologistas en Acción. 2000. Las centrales térmicas de carbón son la mayor fuente puntual de contaminación por mercurio.
<http://www.ainfos.ca/00/jan/ainfos00348.html>

Eisler R. 1981. Trace metal concentrations in marine organisms. Pergamon Press. New York. 685 pp.

Emilsson I., MA Alatorre. 1984. Investigaciones recientes sobre la circulación en la parte exterior del Golfo de California. *In: Ayala-Castañares., AFB Phleger., RC Schwartzlose y J Vargas (Eds.). The Gulf of California. UNAM. México.*

Esquer HHVP. 2003. Concentración de mercurio en el sedimento superficial, flora y fauna representativos de la Bahía de Guaymas, Sonora. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del MAR. 93 pp.

Fauchald K. 1977 a. The Polychaete worms. Definitions and keys to the Orders, Families and Genera. Natural History Museum. California. Sci. Ser. 28. 188 pp.

Fauchald K. 1977 b. Polychaetes from intertidal areas in Panama with a review of previous shallow-water records. *Smithsonian Contributions to Zoology*. 221: 1-81.

Fauchald K., PA Jumars. 1979. The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanography Marine Biology Annual Review*. 17: 193-284.

Folk R. 1968. Petrology of sedimentary rocks Hemphills, Austin, Texas. 170 pp.

Förstner, V., GTW Wittmann. 1979. Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer Verlag. Berlin. 485 pp.

Fowler SW. 1990. Critical review of selected heavy metal and chlorinated hydrocarbon concentrations in the marine environment. *Marine Environmental Research*. 29, 1-64.

Francesconi KA., RCJ Lenanton. 1992. Mercury contamination in a semi-enclosed marine embayment: organic and inorganic mercury content of biota, and factors influencing mercury levels in fish. *Marine Environmental Research*. 33: 189-212.

Galindo-Reyes JG. 1986. Estudio de la contaminación por plaguicidas en el Estero de Urias. Escuela de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa. México, DF.

García AE. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Offset Larios. México. 71 pp.

García de la Parra LM. 1992. Estimación de tasas de fijación de nitrógeno atmosférico en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 89 pp.

George SG. 1990. Biochemical and cytological assessment of metal toxicity in marine animals. *In: Heavy metals in the marine environment* (RW Furnes and PS Rainbow), Boca Raton, Florida: CRC Press. 123-142 pp.

Gray JE., JG Crock., DL Fey. 2002. Environmental geochemistry of abandoned mercury mines in west-central Nevada, USA. *Applied Geochemistry*. 17: 1069-1079.

Green-Ruiz C. 2000. Geoquímica de metales pesados y mineralogía de la fracción arcillosa de los sedimentos de cuatro puertos del Golfo de California. Tesis de Doctorado. UNAM. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. 329 pp.

Hartman O. 1968. Atlas of the Errantiate Polychaetous Annelids from California. Allan Hancock Foundation, University of Southern California. Los Angeles. 828 pp.

Hatch WR., Ott WL. 1968. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*. 40: 2085-2087.

INEGI. 1995. Censo de población y vivienda: resultados preliminares. Estados Unidos Mexicanos. 301 pp.

INEGI. 2001. Tabulados básicos nacionales y por entidad federativa. Base de datos y tabulados de la muestra censal. XII Censo General de Población y Vivienda, 2000. Aguascalientes, Ags., México.
<http://www.inegi.gob.mx/est/default.asp?c=703>

Ishii T., T Otake., K Okoshi., M Nakahara., R Nakamura. 1994. Intracellular localization of vanadium in the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*. *Marine Biology*. 12: 143-151.

Kennish MJ. 1997. *Practical Handbook of estuarine and marine pollution*. CRC Press. Florida. 524 pp.

Khangarot BS. 2003. Mercury-induced morphological changes in the respiratory surface of an asian freshwater catfish, *Saccobranchus fossilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 70: 705-712.

Klaassen CD., MO Amdur., J Doull (editors). 1986. *Casarett and Doull's toxicology. The Basic Science of Poisons*. 3rd edition. MacMillan, New York. 974 p.

Kot FS., C Green-Ruiz., F Páez-Osuna., EN Shumilin., D Rodríguez-Meza. 1999. Distribution of mercury in sediments from La Paz Lagoon, Peninsula of Baja California, México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63: 45-51.

Kraus ML., JS Weis., P Weis. 1988. Effects of mercury on larval and adult grass shrimp. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 17: 355-363.

Kudenov JD. 1980. Annelida: Polychaeta. *In*: RC Brusca (Ed.), *Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California*. The University of California Press. Tucson. 77-123 pp.

Leatherland TM., JD Burton. 1974. The occurrence of some trace metals in coastal organisms with particular reference to the Solent region. *Journal of Marine Biology Association*. UK. 54: 457-468.

Loring OH., RTT Rantala. 1995. *Manual for the geochemical analysis of marine sediments and suspended particulated matter*. Reference Methods of Marine Pollution Studies. No 63.

Luoma SN. 1977. Physiological characteristics of mercury uptake by two estuarine species. *Marine Biology*. 41: 269-273.

Luoma SN., GW Bryan. 1981. A statistical assessment of the form of trace metals in oxidized estuarine sediments employing chemical extractants. *The Science of the Total Environment*. 17: 165-196.

Manahan SE. 2002. *Introducción a la Química Ambiental*. Curso de Posgrado Intensivo. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM. 751 pp.

Marcano L., O Nusetti., J Rodríguez-Grau., J Vilas. 1996. Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polychaete *Eurythoe complanata*. Comparative biochemistry and physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 114(3): 179-184.

Marcano L., O Nusetti., J Rodríguez-Grau., J Briceño., J Vilas. 1997. Coelomic fluid lysozym activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 59: 22-28.

Mc Lean C., A Miskiewicz., EA Roberts. 1991. Effect of three primary treatment sewage outfalls on metals concentrations in the fish *Cheilodactylus fuscus* collected along the coast of Sydney, Australia. Marine Pollution Bulletin. 22(3): 134-140.

Medeiros DM; LL Cadwell; RL Preston. 1980. A possible physiological uptake mechanism of methylmercury by the marine blood worm (*Glycera dibranchiata*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 24: 97 101.

Méndez N., DJ Baird. 2002. Effects of cadmium on sediment processing on members of the *Capitella* species-complex. Environmental Pollution 120: 299-305.

Méndez N., M Green-Ruiz. 1998. Superficial sediments and their relation to polychaete families in a subtropical embayment, México. Revista de Biología Tropical. 46(2): 237-248.

Méndez N., F Páez-Osuna. 1998. Trace metals in two populations of the fireworm *Eurythoe complanata* from Mazatlán Bay: effect of body size on concentrations. Environmental Pollution. 102: 279-285.

Montaño-Ley Y. 1985. Estudio del transporte litoral de arenas en la Isla de la Piedra, Mazatlán, Sin., usando trazadores fluorescentes. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional. Autónoma de México. 12: 15-32.

Monzalvo SK. 2003. Determinación de mercurio en dos especies de peces bentónicos (*Cherublemma emmelas* y *Zalieutes elater*) de la zona del talud del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. 84 pp.

Morales HF. 2001. Concentración y distribución de metales pesados en los sedimentos y tejidos de fauna asociada al emisor de aguas municipales del puerto de Mazatlán. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 85 pp.

Morel FMM., AML Kraepiel., M Amyot. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1998. 29: 543-66.

Nusetti O., R Salazar-Lugo., J Rodríguez-Grau., J. Vilas. 1998. Immune and biochemical responses of the Polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119C (2): 177-183.

Osuna-López JI., G Izaguirre Fierro. 2000. El golfo de California: Hidrología y Contaminación. *In: Bermejo Mar de Cortés*. UABC/Universidad Autónoma de Sinaloa. México. 181 pp.

Páez-Osuna F. 1996. Fuentes de metales pesados en la zona costera marina, *In: AV Botello, JL Rojas-Galaviz, JA Benítez, D Zárate-Lomelí (Eds.)*. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 297-308 p.

Páez-Osuna F., SR Guerrero-Galván., AC Ruiz-Fernández. 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 36: 65-75.

Pavicic J., B Raspor., D Martineic. 1993. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels: methodological approach and field evaluation. *Marine Biology*. 115 (3): 435-444.

Pesch CE. 1979. Influence of three sediment types on copper toxicity to the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Marine Biology*. 52: 237- 245.

Power EA., PM Chapman. 1992. Assessing sediment quality. In G. A. Burton Jr. (Ed.), *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers. Boca Raton. 1-18 pp.

PROFEPA. 1995. Mortalidad de mamíferos y aves marinas en el alto golfo de California. Informe Final. 40 pp.

Rainbow PS. 1996. Heavy metals in aquatic invertebrates. *In: WN Beyer., GH Heinz., AW Redmond-Norwood. (Eds)* Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations. Lewis Publishers, Boca Raton, FLorida. 405-425 pp.

Rainbow PS. 1997. Trace metal accumulation in marine invertebrates: marine biology or marine chemistry?. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 77: 195-210.

Rainbow PS., DJH Phillips. 1993. Review: cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*. 26: 593-601.

Reish DJ., JM Martin., FM Plitz., JQ Word. 1976. The effect of heavy metals on laboratory populations of two polychaetes with comparison to the water quality conditions and standards in Southern California marine waters. *Water Research*. 10: 299-302.

Reish DJ., R S. Carr. 1978. The Effect of heavy metals on the survival, reproduction, development and life cycles for two species of polychaetous annelids. *Marine Pollution Bulletin*. 9(1): 24-27.

Reish DJ. 1980. Use of Polychaetous Annelids as test organisms for marine bioassay experiments. *Aquatic invertebrate bioassays*. ASTM STP 715, *In* : A. L. Buikema, Jr., J Cairns, Jr., (Eds.). American Society for Testing and Materials. 140-154 pp.

Reish DJ. 1988. The use of toxicity testing in marine environmental research. *In*: DF Soule., GS Kleppel. *Marine organisms as indicators*. Springer-Verlag, New York. 231-245 pp.

Reish DJ., SL Asato., JA LeMay. 1989. The effect of cadmium and DDT on the survival and regeneration in the amphinomid polychaete *Eurythoe complanata*. VII Simposio. Internacional de Biología Marina. La Paz, México. 107-111.

Reish DJ., JA LeMay. 1991. Toxicity and bioconcentration of metals and organic compounds by polychaeta. *Ophelia Supplement*. 5: 653-660.

Riisgard HU., T Kjørboe., F Mohlenberg., I Drabek., PM Pheiffer. 1985. Accumulation, elimination and chemical speciation of mercury in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica*. *Marine Biology*. 86: 55-62.

Rodríguez PA. 2004. Análisis comparativo de la concentración de mercurio en el tejido muscular de la lisa *Mugil curema*, (Valenciennes, 1836) de los esteros Urías y Teacapán, Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera. Universidad Autónoma de Nayarit. 50 pp.

Roesijadi G. 1994. Behavior of metallotionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Marine Environmental Research*. 38, 147.

Ruelas-Inzunza JR. 1998. Balanos (*Balanus eburneus*, *Fistulobalanus dentivarians* y *Megabalanus coccopoma*) como biomonitores de la contaminación por metales pesados en las aguas del Puerto de Mazatlán, Sinaloa. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 121 pp.

Ruelas-Inzunza JR., F Páez-Osuna., H Pérez-Cortés. 2000. Distribution of mercury in muscle, liver and kidney of the spinner dolphin (*Stenella longirostris*) stranded in the Southern Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. 40(11): 1063-1066.

Ruelas-Inzunza JR. 2001. Concentración y distribución de metales pesados en tejidos de organismos representativos del bajo golfo de California y áreas adyacentes: fauna y flora. Tesis Doctoral. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 130 pp.

Salazar-Vallejo SI., J Angel de León-González., H Salaices-Polanco. 1988. Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México. Libros Universitarios. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 212 pp.

Salazar RR; AJM Tirado. 1995. Influencia bacteriológica-sanitaria de las descargas de aguas residuales, vertidas a través del emisor submarino en la bahía de Mazatlán, Sin. México. Tesis de Licenciatura. ECM. Universidad Autónoma de Sinaloa. 49 pp.

Secretaría de Marina. 1974. Estudio geográfico de la región de Mazatlán, Sinaloa. Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. México, DF. 353 p.

Selck H., VE Forbes., TL Forbes. 1998. Toxicity and toxicokinetics of cadmium in *Capitella* sp. I: relative importance of water and sediment as routes of cadmium uptake. Marine Ecology Progress Series. 164: 167-178.

Selck H., AW Decho., VE Forbes. 1999. Effects of chronic metal exposure and sediment organic matter on digestive absorption efficiency of cadmium by the deposit-feeding polychaete *Capitella* species I. Environmental Toxicology and Chemistry 18: 1289-1297.

Siegel FR., JH Kravitz., JJ Galasso. 2001. Arsenic and mercury contamination in 31 cores taken in 1965, st. Anna Trough, Kara Sea, Arctic Ocean. Environmental Geology. 40 (4-5): 528-542.

Soto-Jiménez JM. 1998. Distribución y concentración de metales pesados en los sedimentos del Puerto de Mazatlán y áreas adyacentes: su normalización y fraccionamiento geoquímico. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 245 pp.

Szefer P., GP Glasby., J Pempkowiak., R Kaliszan. 1995. Extraction studies of heavy-metals pollutants in surficial sediments from the Southern Baltic Sea off Poland. Chemical Geology. 120: 111-126.

Triffreau C., J Lutzenkirchen., P Behra. 1995. Modeling the adsorption of mercury (II) on (hydro)oxides: I. Amorphous iron oxide and α -quartz. Journal of Colloid and Interface Science. 172: 82-93.

UNEP. 1984. List of environmentally dangerous chemical substances and processes of global significance. Report of the executive director of the Twelfth session of its governing council, Ginebra. United Nations Environment Programme. Report N 22:47.

US EPA. 2001. Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury, Office of Water. EPA-823-R-01-001.

Valenzuela AE. 2003. Concentración de mercurio en 4 especies de peces (*Galechthys peruvianus*, *Cynoscion xanthulus*, *Lutjanus colorado* y *Mugil cephalus*) y 2 especies de tiburones (*Carcharhinus leucas* y *Sphyrna lewini*) del sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón, Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del MAR. Mazatlán. 55 p.

Viarengo A. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*. 16: 153-158.

Viarengo A., MN Moore., G Mancinelli., A Mazzucotelli., RK Pipe., SV Farrar. 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology*. 94, 251.

Viarengo A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Reviews in Aquatic Science*. 1: 295-317.

Villanueva FS., F Páez-Osuna. 1996. Niveles de metales en el Golfo de México: agua, sedimentos y organismos, *In*: AV Botello, JL Rojas-Galaviz, JA Benítez, D. Zárate-Lomelí (Eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnósis y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 309-347 pp.

Whittaker RM. 1969. Química general. 1ª ed. Compañía Editorial Continental. México. 740 pp.

Wood JM. 1984. Alkylation of metals and the activity of metal-alkyls. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 7, 229-240.

Young DR., MD Moore., TK Jan., RP Eganhouse. 1981. Metals in seafood organisms near a large California municipal outfall. *Marine Pollution Bulletin*. 12: 134-138.

Zauke GP. 1977. Mercury in benthic invertebrates of the Elbe estuary. *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*. 29: 358-374.

11. APÉNDICE

Apéndice I. Concentraciones de Hg en sedimento, soluciones y tejido durante los bioensayos de Bioacumulación-Recuperación (la ausencia de datos indica la muerte de los organismos durante los bioensayos).

Bioensayo A

| Tratamientos | Día | Réplica | soluciones | organismos |
|--------------|-----|---------|------------|------------|
| control | 0 | 1 | 0 | 0.158 |
| | | 2 | 0 | 0.110 |
| | | 3 | 0 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.288 |
| | | 2 | 0 | 0.142 |
| | | 3 | 0 | 0.173 |
| | 16 | 1 | | |
| | | 2 | 0 | 0.169 |
| | | 3 | 0 | 0.000 |
| 1.5 | 0 | 1 | 1.5 | 0.158 |
| | | 2 | 1.5 | 0.110 |
| | | 3 | 1.5 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.235 |
| | | 2 | 0 | 0.370 |
| | | 3 | 0 | 0.320 |
| | 16 | 1 | | |
| | | 2 | 0 | 0.309 |
| | | 3 | | |
| 1.7 | 0 | 1 | 1.72 | 0.158 |
| | | 2 | 1.72 | 0.110 |
| | | 3 | 1.72 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.271 |
| | | 2 | 0 | 0.292 |
| | | 3 | 0 | 0.355 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.250 |
| | | 2 | | |
| | | 3 | | |
| 3 | 0 | 1 | 2.75 | 0.158 |
| | | 2 | 3.4 | 0.110 |
| | | 3 | 3.55 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.030 |
| | | 2 | 0 | 0.396 |
| | | 3 | 0 | 0.280 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.330 |
| | | 2 | 0 | |
| | | 3 | | |
| 7.4 | 0 | 1 | 6.5 | 0.158 |
| | | 2 | 8 | 0.110 |
| | | 3 | 7.8 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.900 |
| | | 2 | 0 | 1.360 |
| | | 3 | 0 | 0.660 |
| | 16 | 1 | | |
| | | 2 | | |
| | | 3 | | |
| 8.7 | 0 | 1 | 9.35 | 0.158 |
| | | 2 | 8 | 0.110 |
| | | 3 | 8.6 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0.45 | 0.604 |
| | | 2 | 0 | 0.840 |
| | | 3 | 0 | 0.880 |
| | 16 | 1 | | |
| | | 2 | | |
| | | 3 | 0 | |
| 9 | 0 | 1 | 8 | 0.158 |
| | | 2 | | 0.110 |
| | | 3 | 10 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.348 |
| | | 2 | 0 | 0.549 |
| | | 3 | 0 | 0.375 |
| | 16 | 1 | | |
| | | 2 | 0 | 0.522 |
| | | 3 | | |

| Tratamientos | Día | Réplica | soluciones | organismos |
|--------------|-----|---------|------------|------------|
| 11 | 0 | 1 | 10 | 0.158 |
| | | 2 | 11.6 | 0.110 |
| | | 3 | 10 | 0.138 |
| | 8 | 1 | 0 | 1.800 |
| | | 2 | 0 | 3.132 |
| | | 3 | 0 | 2.020 |
| | 16 | 1 | | |
| | | 2 | | |
| | | 3 | | |

Bioensayo B

| Tratamientos | Día | Réplica | soluciones | organismos | sedimentos |
|--------------|-----|---------|------------|------------|------------|
| control | 0 | 1 | 0 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 0 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 0 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.140 | 0.016 |
| | | 2 | 0 | 0.082 | 0.025 |
| | | 3 | 0 | 0.160 | 0.015 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.000 | 0.013 |
| | | 2 | 0 | | 0.011 |
| | | 3 | | | |
| 1.5 | 0 | 1 | 1.5 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 1.5 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 1.5 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.250 | 0.021 |
| | | 2 | 0 | 0.200 | 0.027 |
| | | 3 | 0 | 0.108 | 0.027 |
| | 16 | 1 | 0 | | 0.020 |
| | | 2 | 0 | | 0 |
| | | 3 | 0 | 0.260 | 0.015 |
| 1.7 | 0 | 1 | 1.72 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 1.72 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 1.72 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.198 | 0.029 |
| | | 2 | 0 | 0.242 | 0.026 |
| | | 3 | 0 | 0.235 | 0.025 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.132 | 0.017 |
| | | 2 | 0 | 0.192 | 0.024 |
| | | 3 | | | 0 |
| 3 | 0 | 1 | 2.75 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 3.4 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 3.55 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.220 | 0.020 |
| | | 2 | 0 | 0.287 | 0.036 |
| | | 3 | 0 | 0.204 | 0.025 |
| | 16 | 1 | 0 | | 0.020 |
| | | 2 | 0 | 0.164 | 0.020 |
| | | 3 | 0 | | 0.028 |
| 7.4 | 0 | 1 | 6.5 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 8 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 7.8 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.327 | 0.055 |
| | | 2 | 0 | 0.452 | 0.052 |
| | | 3 | 0 | 0.457 | 0.045 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.264 | 0.019 |
| | | 2 | | | |
| | | 3 | | | |

| Tratamientos | Día | Réplica | soluciones | organismos | sedimentos |
|--------------|-----|---------|------------|------------|------------|
| 8.7 | 0 | 1 | 9.35 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 8 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 8.6 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.368 | 0.040 |
| | | 2 | 0.35 | 0.241 | 0.026 |
| | | 3 | 0 | 0.330 | 0.020 |
| | 16 | 1 | | | |
| | | 2 | | | |
| | | 3 | | | |
| 9 | 0 | 1 | 8 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 10 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.374 | 0.027 |
| | | 2 | 0 | 0.358 | 0.032 |
| | | 3 | 0 | 0.252 | 0.187 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.284 | 0.017 |
| | | 2 | 0 | 0.282 | 0.022 |
| | | 3 | 0 | 0.273 | 0.036 |
| 11 | 0 | 1 | 10 | 0.158 | 0.025 |
| | | 2 | 11.6 | 0.110 | 0.024 |
| | | 3 | 10 | 0.138 | 0.027 |
| | 8 | 1 | 0 | 0.658 | 0.040 |
| | | 2 | 0 | 1.000 | 0.085 |
| | | 3 | 0 | 1.240 | 0.057 |
| | 16 | 1 | 0 | 0.611 | 0.027 |
| | | 2 | 0 | 0.820 | 0.025 |
| | | 3 | | | |