

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



EFFECTO DE HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS
EN EL MEJILLÓN *Mytella strigata* DEL ESTERO DE URÍAS,
SINALOA.

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

LUZ ELVIRA PIÑA CHACÓN

Directora de Tesis: DRA. CECILIA VANEGAS PÉREZ

Comité Tutorial: DR. ALFONSO VÁZQUEZ BOTELLO
DRA. SILKE CRAM HEYDRICH
DRA. LUZ MA. GARCÍA DE LA PARRA
DR. MIGUEL BETANCOURT LOZANO

México, D.F., 2008.



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.

A Erick, por su amor y su apoyo en esta etapa.

A Erick Eduardo y Marco Alberto, por iluminar mi vida.

A mi madre por su amor, su confianza y su apoyo incondicionales.

A todos ellos....

Su amor es mi baluarte.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia Vanegas, mi profundo agradecimiento por su guía y por la esmerada dirección para la elaboración de esta Tesis, así como por el enorme apoyo y las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo de investigación. Mil gracias por su confianza y su amistad.

A la Dra. Luz Ma. García de la Parra y al Dr. Miguel Betancourt Lozano por su apoyo y guía en las salidas de campo y en el trabajo de laboratorio realizado en Mazatlán, así como por su tutoría y los consejos y acotaciones para enriquecer esta Tesis de Maestría.

Al Dr. Alfonso V. Botello y a la Dra. Silke Cram Heydrich, por su tutoría, por las sugerencias y observaciones que contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, a sus autoridades y profesores, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría, así como por el apoyo y facilidades otorgadas.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento del Proyecto (IN238704) “Evaluación del efecto biológico de la contaminación en invertebrados de sistemas lagunares estuarinos del estado de Sinaloa mediante la propuesta de biomarcadores múltiples”, en el cual se inserta el trabajo de investigación de esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría, y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la asignación de una beca complementaria.

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán, por facilitar sus instalaciones y por el apoyo logístico proporcionado para la realización de las colectas, el procesamiento de muestras y las evaluaciones fisiológicas del presente trabajo de investigación.

A la Unidad de Análisis Ambiental y al Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias por otorgarme el espacio, equipo y materiales requeridos durante el procesamiento y análisis de muestras.

Al Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y a la M. en C. Lupita Ponce por la cuantificación de los hidrocarburos poliaromáticos en las muestras de agua, sedimentos y organismos.

Al M. en C. Sebastián Zúñiga por su invaluable guía y sus generosas enseñanzas, por su apoyo y por su valiosa amistad durante el desarrollo de este trabajo ¡Muchas gracias! A la M. en C. Susana Alejandre por su apoyo en la obtención y procesamiento de muestras y por el intercambio y discusión de información y sobre todo por su amistad. A Lindsay y César por su enorme apoyo en Mazatlán y por amistad y compañerismo.

Al M. en C. Manuel Hernández por su apoyo en el procesamiento y análisis de muestras en la Unidad de Análisis Ambiental, y por brindarme su amistad.

A Guille, Karla, Cecy R., Sherezada, Daniela y Fabiola por la agradable convivencia cotidiana y su amistad durante esta etapa. ¡Gracias!. A Jesús, por su entrañable y generosa amistad, mil gracias.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología y a Diana, Gabriela, Chantal, y Lupita por la atención y apoyo proporcionados.

A la familia Luna Rojero, particularmente a Janely y a Martha Alicia, por el valiosísimo apoyo que me proporcionaron para la realización de las salidas de campo. ¡De verdad, muchas gracias!

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1. Problemática ambiental de la zona de estudio.....	9
2.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	10
2.2.1. Características físicas y químicas.....	10
2.2.2. Fuentes.....	11
2.2.3. Efectos biológicos.....	13
2.3. Especie de estudio.....	15
2.4. Biomarcadores.....	17
2.4.1. Biomarcadores de exposición.....	18
2.4.1.1. Inducción de citocromo P450.....	18
2.4.2. Biomarcadores de efecto.....	23
2.4.2.1. Estabilidad lisosomal.....	24
2.4.2.2. Proteínas.....	26
2.4.2.3. Índice de condición.....	27
2.4.2.4. Relación atómica O:N.....	28
2.4.2.5. Campo de crecimiento.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1. Área de estudio.....	36
6.1.1. Meteorología.....	36
6.1.2. Parámetros fisicoquímicos.....	38
6.1.3. Dinámica de agua y sedimentos.....	39
6.1.4. Productividad.....	40
6.2. Estaciones de muestreo.....	41
6.3. Colecta de organismos.....	42
6.4. Cuantificación de contaminantes.....	43
6.4.1. Trabajo de campo.....	43
6.4.2. Trabajo de laboratorio.....	44
6.5. Respuestas biológicas. Biomarcadores de exposición y de efecto.....	47
6.5.1. Biomarcadores de exposición.....	
6.5.1.1. Actividad EROD.....	48

	Página
6.5.2. Biomarcadores de efecto	48
6.5.2.1. Estabilidad lisosomal	50
6.5.2.2. Proteínas solubles totales	50
6.5.2.3. Campo de crecimiento	51
6.5.2.3.1. Tasa de asimilación (<i>A</i>)	52
6.5.2.3.2. Tasa respiratoria (<i>R</i>)	53
6.5.2.3.3. Tasa de excreción nitrogenada (<i>N</i>)	57
6.5.2.3.4. Cálculo del campo de crecimiento (<i>P</i>)	58
6.5.2.4. Relación atómica O:N	58
6.5.2.5. Índice de condición	59
6.6. Análisis estadístico.....	59
7. RESULTADOS.....	61
7.1. Cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	61
7.1.1. Agua.	61
7.1.2.1. Sedimentos.	61
7.1.2.2. Identificación de fuentes de contaminación de HPAs en sedimentos	62
7.1.3. Organismos.	65
7.1.4. Correlaciones de HPA en sedimentos y organismos.	69
7.2. Respuestas biológicas.....	70
Biomarcadores de exposición	70
7.2.1.. Actividad EROD	70
Biomarcadores de efecto. Nivel sub-organismo	71
7.2.2. Estabilidad lisosomal	71
7.2.3. Proteínas	71
Biomarcadores de efecto. Nivel organismo.	73
7.2.4. Contenido hídrico	73
7.2.5. Índice de condición	74
7.2.6. Tasa de aclaramiento	75
7.2.7. Eficiencia de asimilación	75
7.2.8. Tasa de asimilación	76
7.2.9. Tasa de consumo de oxígeno	77
7.2.10 Tasa de excreción nitrogenada	77
7.2.11 Relación O:N	78
7.2.12 Campo de crecimiento	79
7.3. Correlaciones.....	80
8. DISCUSIÓN.....	83
8.1. Concentración de HPA.....	83
8.1.1. Agua	84
8.1.2. Sedimentos	84
8.1.3. Organismos	89
8.2. Biomarcadores de exposición. Actividad EROD.....	93
8.3. Biomarcadores de efecto. Nivel sub-organismo.....	96

	Página
8.4. Biomarcadores de efecto. Nivel organismo.....	98
8.5. Niveles de organización biológica.....	107
9. INTEGRACIÓN Y CONCLUSIONES.....	111
10. REFERENCIAS.....	115
ANEXOS.....	138

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Características y efectos tóxicos de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) considerados prioritarios por la Agencia Americana de Protección Ambiental (National Waste Minimization Program, US EPA 2008)*.	11
Tabla 2.	Reacciones catalizadas por los citocromos P450.	21
Tabla 3.	Aportes de contaminantes en las diferentes estaciones de muestreo en el Estero de Urías.	41
Tabla 4.	Hidrocarburos policíclicos aromáticos en los sedimentos superficiales del Estero de Urías.	63
Tabla 5:	Valores característicos de índices moleculares para determinar el origen de HPAs, e índices calculados para los sitios de estudio.	64
Tabla 6.	Hidrocarburos policíclicos aromáticos en los mejillones <i>Mytella strigata</i> del Estero de Urías.	66
Tabla 7.	Coefficientes de regresión (R^2) entre las concentraciones de HPAs en los sedimentos y en los organismos.	68
Tabla 8.	Biomarcadores de exposición. Evaluación de la actividad EROD en la glándula digestiva de <i>M. strigata</i> del Estero de Urías.	70
Tabla 9.	Respuestas biológicas a nivel suborganismo en individuos de <i>Mytella strigata</i> colectados en el Estero de Urías durante la temporada de secas 2005.	71
Tabla 10.	Respuestas biológicas a nivel organismo en individuos de <i>Mytella strigata</i> colectados en tres localidades del Estero de Urías durante la temporada de secas 2005.	73
Tabla 11.	Coefficientes de correlación entre las respuestas biológicas evaluadas y las concentraciones de HPAS totales, HPAS de alto peso molecular (APM) y de bajo peso molecular BPM. Se incluye el coeficiente de correlación (r) y la significatividad de la correlación ($p < 0.05$).	81
Tabla 12.	Correlaciones entre las respuestas biológicas evaluadas en <i>Mytella strigata</i> . Se incluye el coeficiente de correlación (r) y la significatividad de la correlación ($p < 0.05$).	82
Tabla 13.	Criterios de calidad sedimentaria para HPAs y concentraciones registradas en los sedimentos de los sitios de muestreo del Estero de Urías.	88
Tabla 14.	Distribución de la energía absorbida (A) entre los diferentes componentes del balance energético (N , R , P) en los mejillones de los diferentes sitios de estudio ($J/h/g$ PS). Entre paréntesis se muestra el porcentaje de cada componente respecto a la energía absorbida A .	107

ANEXOS

		Página
Tabla 1.	Características ambientales de las estaciones de muestreo en Estero de Urías. Se muestra valor promedio en clorofila <i>a</i> , MOP y % MO en sedimento.	138
Tabla 2.	Correlaciones entre las respuestas evaluadas y cada uno de los HPAs determinados en los tejidos de <i>M. strigata</i> en el Estero de Urías.	139
Tabla 3.	Correlaciones entre las diferentes respuestas biológicas (biomarcadores) evaluadas en diferentes niveles de organización biológica de <i>M. strigata</i> en el Estero de Urías.	140

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Fig. 1. Algunos ejemplos de HPA de alto peso molecular, como el benzo(a)pireno, y de HPA de bajo peso molecular, como el naftaleno.	2
Fig. 2. Conchas (A) y órganos internos (B) de <i>M. strigata</i> .	15
Fig. 3. Ciclo catalítico de monooxigenaciones P450-dependientes.	21
Fig. 4. Localización del Estero de Urías en Mazatlán, Sinaloa, y ubicación de las estaciones de muestreo.	37
Fig. 5. Sistema de flujo semicontinuo.	53
Fig. 6. HPAs en los sedimentos superficiales del Estero de Urías.	63
Fig. 7. Relaciones del índice molecular Fla/Fla+Pyr con los índices BaA/BaA+Cry (A) y Ant/Ant+Phe (B), determinados en los sedimentos de los diferentes sitios de muestreo en el Estero de Urías.	64
Fig. 8. Concentración de HPAs en tejidos de <i>Mytella strigata</i> del Estero de Urías.	66
Fig. 9. Proporción entre HPAs de alto peso molecular (APM) y de bajo peso molecular (BPM) en los sedimentos (A) y en los organismos (B) de las diferentes estaciones de muestreo en el Estero de Urías.	67
Fig. 10. HPAs de alto peso molecular (APM) y bajo peso molecular (BPM) cuantificados en los sedimentos y en los mejillones del Estero de Urías.	68
Fig. 11. Actividad EROD en la glándula digestiva de <i>M. strigata</i> del Estero de Urías.	70
Fig. 12. Estabilidad lisosomal en la hemolinfa de <i>M. strigata</i> .	71
Fig. 13. Concentración de proteínas solubles en hemolinfa (A) y músculo abductor posterior (B) de <i>M. strigata</i> en los diferentes sitios de estudio.	72
Fig. 14. Contenido hídrico en tejidos de <i>M. strigata</i> de los sitios de estudio en el Estero de Urías.	74
Fig. 15. Índice de condición determinado en los mejillones de P. Juárez, Astillero y El Castillo.	74
Fig. 16. Tasa de aclaramiento en <i>M. strigata</i> del Estero de Urías.	75
Fig. 17. Eficiencia de asimilación alimenticia en <i>M. strigata</i> proveniente de P. Juárez, Astillero y Castillo en el Estero de Urías.	76
Fig. 18. Tasa de absorción (J/h/g PS) de <i>M. strigata</i> colectados en los sitios de estudio.	76

	Página
Fig. 19. Consumo de oxígeno (mg O ₂ /h/g PS) de <i>M. strigata</i> provenientes de los sitios de estudio en Estero de Urías.	77
Fig. 20. Excreción nitrogenada de <i>M. strigata</i> provenientes de los sitios de estudio en Estero de Urías (mg N-AT/h/g PS).	78
Fig. 21. Relación O:N determinada en los mejillones colectados en Juárez, Astillero y Castillo.	79
Fig. 22. Campo de Crecimiento de <i>M. strigata</i> de los sitios de estudio en Estero de Urías (J/h/g PS).	80

RESUMEN

El Estero de Urías, ubicado en el sur de la costa de Sinaloa, se caracteriza por una compleja dinámica ambiental de multiestresores. Entre ellos se encuentran los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs), compuestos mutagénicos y carcinogénicos derivados de procesos de combustión incompletos o de contaminación petroquímica, que tienden a adsorberse en las partículas suspendidas y en los sedimentos de los sistemas acuáticos. En este escenario de complejidad ambiental, el objetivo del presente estudio fue discernir en el Estero de Urías, Mazatlán, la probable acción tóxica de los HPAs en el mejillón nativo *Mytella strigata*, organismo relevante por sus características como bioindicador y su posición clave en las redes tróficas, a través de la evaluación de biomarcadores múltiples y de su relación con la concentración de los HPAs en agua, sedimento y tejidos. En tres sitios de estudio (Puente Juárez, Astillero y El Castillo) se evaluaron biomarcadores de exposición (actividad EROD) y de efecto (estabilidad lisosomal, niveles proteicos, relación atómica O:N, índice de condición y campo de crecimiento). Las concentraciones de HPAs de bajo peso molecular (BPM) y de alto peso molecular (APM) en los sedimentos denotan que mientras Astillero y El Castillo son sitios de depósito, Puente Juárez presenta una elevada dinámica de corrientes con procesos de acumulación de HPAs diferentes de los de Astillero y El Castillo. Acorde a los criterios de calidad sedimentaria y a los efectos biológicos observados, las concentraciones de HPAs cuantificadas en los sedimentos así como los niveles bioacumulados de algunos compuestos, evidenciaron un riesgo para la biota. Sin embargo, no se observaron relaciones de causalidad entre los HPAs cuantificados en sedimento, los bioacumulados y los efectos biológicos observados. El comportamiento de la actividad EROD sugiere su inducción o inhibición adicional por otro grupo de contaminantes y/o por factores endógenos y se concluye que en sistemas sujetos a estresores múltiples no es un biomarcador de exposición a HPAs adecuado. La estabilidad lisosomal y los niveles de proteína en hemolinfa y músculo proporcionaron información valiosa sobre la condición fisiológica de los organismos y se asociaron con respuestas fisiológicas-individuales. De manera particular, el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada y la relación O:N refieren una mayor condición de estrés en los bivalvos provenientes de Puente Juárez y Astillero y se relacionaron con las mayores concentraciones de HPAs bioacumuladas. La evaluación del campo de crecimiento proporcionó una valoración cuantitativa del estado fisiológico de los mejillones, integrando el efecto adverso de múltiples estresores ambientales incluidos los HPAs, con la condición nutricional y el balance energético de los organismos. El comportamiento del índice de condición y del campo de crecimiento sugiere que, aún en ambientes altamente impactados como el Estero de Urías, el mejillón *M. strigata* presenta la capacidad de compensar el efecto adverso de estresores ambientales, incluida la acción tóxica de contaminantes, siempre y cuando disponga de un suministro energético adecuado. De manera particular, en P. Juárez la disponibilidad de alimento permite a *M. strigata* sostener un elevado potencial de crecimiento y un esfuerzo reproductivo constante (Leal-Tarín, 2007), lo cual puede a su vez influir sobre la bioacumulación de HPAs en estos organismos.

Los resultados obtenidos evidencian que en sistemas tan complejos como el Estero de Urías, las respuestas biológicas evaluadas no reflejan el efecto aislado de los HPAs, sino la acción conjunta de los múltiples estresores que inciden en el sistema. Se resalta la importancia de los estudios que evalúen múltiples biomarcadores de exposición y de efecto, en conjunción con la cuantificación de los compuestos tóxicos tanto del medio externo como de los bioacumulados.

1. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del acelerado incremento demográfico y el desarrollo industrial ribereño de las últimas décadas, se ha elevado considerablemente el flujo hacia el medio ambiente marino y hacia los sistemas costeros de una gran variedad de materiales naturales y sintéticos, contribuyendo a modificar la zona costera y deteriorar la calidad del agua y los sedimentos (Cajaraville, 2000; Páez-Osuna *et al.*, 1989).

Entre los químicos más relevantes en el ambiente acuático se encuentran los hidrocarburos, los cuales ingresan al ambiente costero como resultado de incendios forestales, quema agrícola, incineración de residuos, actividades de extracción, procesamiento, transporte y combustión de combustibles fósiles, así como de plantas de generación de energía eléctrica (Baumard *et al.* 1998, Cram *et al.* 2004; Yunker *et al.* 2002). Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son compuestos formados por al menos dos anillos fusionados de benceno, los cuales difieren en el número y posición de los anillos aromáticos (Furton y Pentzke, 1998). Se originan de procesos de combustión incompleta o de contaminación petroquímica y en el ambiente acuático tienden a adsorberse a partículas suspendidas (especialmente detritos de origen vegetal) y a sedimentos (Ariese *et al.*, 2001). Por ello, las condiciones de alta turbidez (por ejemplo en zonas portuarias o en condiciones de tormenta) favorecen el ingreso de los HPAs de alto peso molecular a los organismos, mientras que en condiciones de calma los HPAs más ligeros, que se encuentran en la fase disuelta, serán mayoritariamente prioritariamente absorbidos por los individuos (Baumard *et al.*, 1999) (Fig. 1). Dado su carácter carcinogénico/mutagénico, los HPAs y sus efectos deben ser monitoreados regularmente en el ambiente (Ariese *et al.*, 2001).

Pese a la relevancia de los sistemas costeros como ambientes de transición, en comparación con los estudios sobre cuantificación química en las diferentes matrices ambientales (agua, sedimentos, organismos), la literatura que aborda el efecto tóxico de los contaminantes antropogénicos sobre la biota en estos sitios resulta escasa. Los estudios realizados a la fecha con este enfoque corresponden a localidades ubicadas principalmente en países desarrollados, pertenecientes a latitudes templadas, por lo que tienen poca o nula relación con las condiciones ambientales de los sistemas costeros tropicales o subtropicales (Bordeau *et al.*, 1989; Lacher y Goldstein, 1997) característicos de la República Mexicana.

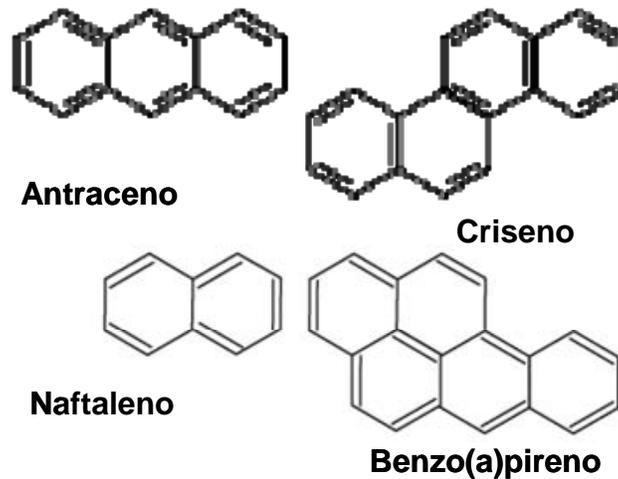


Fig. 1. Algunos ejemplos de HPA de alto peso molecular, como el benzo(a)pireno, y de HPA de bajo peso molecular, como el naftaleno (Eisler, 1987).

En el litoral mexicano, las actividades económicas que se desarrollan en puertos y bahías, así como aquellas que se desarrollan al interior del continente, pero que alcanzan la costa por medio de los efluentes, han impactado ostensiblemente a muchos ecosistemas costeros. El Estero de Urías, ubicado en el sur de la costa de Sinaloa, México, forma parte de un complejo sistema de transición continental-marino y es receptor de una vasta cantidad de contaminantes antropogénicos. Entre ellos se cuentan descargas de la industria alimentaria y urbana, efluentes de acuicultura y agricultura, descargas de combustibles derivadas de la actividad marítima del Puerto de Mazatlán, así como emisiones de las instalaciones de PEMEX y la termoeléctrica de CFE, por citar las más relevantes (CONABIO, 2004).

La preocupación por el aporte de contaminantes a este sistema estuarino-lagunar y su efecto nocivo sobre la comunidad de organismos que ahí reside, ha motivado la realización de diversos trabajos. Entre éstos destacan las evaluaciones de la concentración de metales y HPAs totales en la ostra de manglar *Crassostrea corteziensis* (Páez- Osuna *et al.*, 2002) y de la concentración de metales y su biodisponibilidad en organismos filtradores: una ostra (*Crassostrea corteziensis*), un mejillón (*Mytella strigata*) y un balano (*Fistilobalanus dentivarians*) (Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000). Asimismo se ha estudiado la distribución

y asociación de metales traza en el tejido blando y bisco de *M. strigata* y otros organismos bentónicos del sistema lagunar adyacente al Puerto de Mazatlán (Szefer *et al.*, 1998).

Sin embargo, la evaluación del estado de contaminación de un ecosistema no puede basarse únicamente en el análisis químico de las matrices ambientales, incluidos los organismos residentes, ya que no indican el efecto deletéreo de los contaminantes sobre la biota (Cajaraville *et al.*, 2000). Resulta incuestionable la necesidad de estudiar el efecto tóxico de los contaminantes sobre la comunidad autóctona y la sensibilidad de las especies residentes.

El efecto tóxico de los contaminantes se origina en los procesos químicos en el nivel molecular; cuando el efecto del contaminante excede la capacidad compensatoria de las respuestas bioquímicas y fisiológicas del organismo, su acción se manifiesta impactando los subsiguientes niveles jerárquicos de organización biológica, esto es, a nivel de población, comunidad y/o el mismo ecosistema. Por ello, los programas de monitoreo biológico ambiental deben considerar respuestas en niveles diferentes de organización biológica, incluyendo el molecular, bioquímico y fisiológico, donde pueden expresarse de manera temprana los efectos adversos de los tóxicos, respuestas denominadas “biomarcadores”.

Los biomarcadores se definen como respuestas biológicas que pueden medirse en muestras de tejidos, excretas o en el organismo completo, y de manera ideal indican tanto la exposición como la magnitud de los efectos adversos de numerosos químicos tóxicos y de otros estresores ambientales (Depledge y Billingham, 1999). De manera particular, los marcadores moleculares, bioquímicos y/o celulares constituyen una valiosa herramienta para el alertamiento temprano de los efectos biológicos adversos causados por la contaminación, la mayoría de las veces antropogénica, de un sistema natural. Así, los biomarcadores pueden definirse como indicadores a corto plazo de los efectos biológicos a largo plazo (Fent, 2004).

De acuerdo a Dissanayake (2001), el empleo de los biomarcadores representa numerosas ventajas respecto a la determinación aislada de las concentraciones de contaminantes químicos, entre los que destacan:

- Permiten la identificación de la interacción producida entre el contaminante y el organismo.

- Integran las respuestas biológicas y por lo tanto pueden evidenciar la presencia de contaminantes tanto conocidos como de aquellos desconocidos.
- Pueden facilitar la evaluación de cuáles contaminantes están biodisponibles para los organismos.
- Al integrarlos con el análisis químico de los contaminantes, pueden ayudar a establecer las relaciones de causalidad.
- Permiten la detección de posibles efectos subletales, lo cual contribuye a implementar medidas preventivas en el ambiente (Livingstone, 1993; Depledge, 1994).

Con el objetivo de reconocer el daño y los efectos potenciales que los contaminantes ejercen sobre la comunidad de organismos de un ecosistema, se ha impulsado la implementación de biomarcadores para determinar el estado de los ecosistemas marinos dentro del área de Evaluación de Riesgo Ambiental, enfatizándose que el uso simultáneo de varios biomarcadores permite elucidar el desempeño de cada uno de ellos (Lowe *et al.*, 1992; Moore, 1992; Moore y Evans, 1992; Moore y Simpson, 1992). Un enfoque de biomarcadores múltiples permite un mejor entendimiento del efecto de la contaminación sobre la biota mediante la identificación e integración de las distintas respuestas (Dissanayake, 2001).

Al respecto, varios autores han propuesto metodologías adecuadas para evaluar las variaciones globales en una batería de biomarcadores. Por ejemplo, las gráficas de estrella son un sencillo método gráfico multivariado donde se consigue una integración visual de los biomarcadores. (Beliaeff y Burgeot, 2002) y permite comparaciones espaciales o temporales visuales directas para un mismo biomarcador, o bien la comparación de biomarcadores integrados por sitio. Asimismo, se han realizado propuestas orientadas a la estandarización en la selección de biomarcadores a utilizar, con la finalidad de facilitar la integración, interpretación y comparación de resultados (Viarengo *et al.*, 2007).

El entendimiento de los efectos ecotoxicológicos en un ambiente contaminado sólo puede adquirirse a través de un enfoque integral, considerando conceptos tanto ecológicos como toxicológicos y químico-ambientales. La selección de los biomarcadores como una herramienta para la evaluación de los efectos biológicos adversos, permite discriminar de

manera gruesa algunos grupos de contaminantes (por ejemplo los tóxicos de tipo aromático y dioxinas vs. metales pesados) al igual que los mecanismos toxicológicos o las funciones biológicas afectadas (por ejemplo genotoxicidad vs. neurotoxicidad o daños reproductivos) (Fent, 2004). Así, evaluando de manera paralela la concentración de un tóxico en el medio, las características de su bioacumulación y los mecanismos de biotransformación que pueden estar involucrados, es posible discernir y establecer relaciones de causalidad entre la concentración de un tóxico en el medio, su concentración en el organismo y el efecto tóxico ocasionado.

Sin embargo, las relaciones de causa-efecto entre los tóxicos ambientales y las respuestas biológicas a los tóxicos ambientales (biomarcadores) y su impacto último sobre las poblaciones y los ecosistemas costeros tropicales, no han podido demostrarse adecuadamente a causa del desconocimiento de la dinámica particularmente compleja de estos ambientes (Frías-Espericueta *et al.*, 1999; Páez-Osuna *et. al.*, 1989; Montaña *et al.*, 2000). Por ello, se fundamenta la necesidad de implementar métodos de estudio eficientes, confiables y comprensibles tanto en campo como en laboratorio, que resulten aplicables a los sistemas costeros tropicales. Estos métodos deben orientarse a determinar las relaciones de causalidad y aportar mejores elementos para establecer programas de diagnóstico, monitoreo y remediación en el marco de la evaluación de riesgo ambiental.

Con la finalidad de monitorear el efecto de los contaminantes en la biota, se ha recurrido al estudio de la acumulación y del efecto de los contaminantes en organismos específicos. Los bioindicadores u organismos centinela son especies empleadas para cuantificar el nivel biológicamente disponible de los contaminantes en ecosistemas acuáticos. Los bioindicadores incorporan los contaminantes del agua y del alimento, y las concentraciones de estos químicos en sus tejidos (o algunas veces los *cambios* en esas concentraciones) proporcionan una medición de la biodisponibilidad del contaminante a través del tiempo (Phillips y Segar, 1986). Los invertebrados se han destacado como bioindicadores (biomonitores) de los niveles de contaminación de su ambiente, debido a que sus bajas tasas metabólicas respecto a los vertebrados favorecen la bioacumulación de una extensa variedad de contaminantes tanto orgánicos (diversas clases de hidrocarburos como los aromáticos, los alifáticos y los halogenados, y plaguicidas) como inorgánicos (metales) (Livingstone., 1992). Los moluscos, particularmente los bivalvos, presentan numerosas características que los hacen organismos

ideales para ser usados en programas de monitoreo ambiental en sistemas costeros y estuarinos a nivel mundial (Phillips, 1980a; Farrington *et al.*, 1983; Gosling, 1992; Farrington y Trip, 1995; Tanabe, 2000). Algunas de ellas son:

1) Las especies de bivalvos como ostras y mejillones pueden desarrollarse en un amplio intervalo de condiciones ambientales como salinidad, temperatura y estacionalidad, por lo que presentan una amplia distribución geográfica y son miembros dominantes en comunidades costeras y estuarinas. Asimismo, los bivalvos son relativamente tolerantes al mantenimiento y manipulación relacionados con estudios tanto de campo como de laboratorio.

2) Debido a que es posible coleccionar la misma especie en amplias regiones geográficas, se eliminan los problemas en la comparación de datos de especies diferentes. Este es un aspecto muy importante sobre todo en áreas tropicales de gran biodiversidad.

3) Los bivalvos son relativamente tolerantes a un amplio intervalo de contaminación, incluyendo niveles moderados de muchos tipos de tóxicos, sobreviviendo en ambientes con aportes simultáneos de diversos contaminantes.

4) Los bivalvos como las ostras y mejillones se presentan en poblaciones amplias y estables, por lo que pueden muestrearse repetidamente en diferentes épocas climáticas.

4) La longevidad de los bivalvos (1 a 8 años) permite estudios temporales de sus poblaciones (a corto, mediano y largo plazo) y pueden muestrearse fácilmente individuos de diferentes tallas para hacer comparaciones. Muchos de ellos presentan tallas convenientes para proporcionar muestras de tejido adecuadas para el análisis.

5) Son sedentarios, y por lo tanto mejores que las especies móviles, como integradores de la contaminación química de un área específica.

6) En comparación con muchos otros animales en el mismo nivel trófico, los bivalvos tienen un nivel muy bajo de metabolización de tóxicos y/o biotransformación. Por ello las concentraciones en los tejidos de los bivalvos reflejan con mayor exactitud la magnitud de la contaminación ambiental. Utilizando datos de la literatura sobre la acumulación de contaminantes por moluscos, Livingstone (1991, 1992) ha demostrado que generalmente la

tasa de entrada de hidrocarburos excede la tasa metabólica por un orden de magnitud o más, explicando la marcada bioacumulación de los moluscos por un sencillo equilibrio aceite/agua (Burns and Smith, 1981). Otros factores que indudablemente contribuyen a los largos tiempos de residencia de los xenobióticos orgánicos en los moluscos y otros invertebrados marinos, es la lenta liberación de metabolitos hacia el agua marina, y el enlace covalente de los xenobióticos a las macromoléculas (Livingstone, 1991, 1992). Asimismo, los bivalvos son organismos filtradores que bombean varios litros de agua cada hora y concentran muchos químicos en sus tejidos, por factores de 10 a 10^5 , respecto al agua. Usualmente existe una correlación entre el contenido del tóxico en el organismo y la concentración promedio en el medio externo. En particular, la bioconcentración de compuestos orgánicos (por ejemplo hidrocarburos poliaromáticos) y de algunos metales en moluscos bivalvos puede ser considerable. Esto facilita la medición de los contaminantes en los tejidos y proporciona una evaluación de biodisponibilidad que no es perceptible en el registro de los contaminantes en los compartimientos del ambiente (agua, materia suspendida y sedimento).

9) Debido a que la mayoría de los bivalvos son de interés comercial, la medición de contaminantes químicos en sus tejidos es de interés público.

Acorde a lo anterior, los bivalvos son de indudable relevancia en la distribución y destino de los tóxicos persistentes en los ecosistemas acuáticos, a la vez que ocupan una posición clave en las redes alimenticias. Debido a ello, se ha recurrido a estos organismos para implementar programas como *Mussel Watch* en Estados Unidos, el cual inició hace dos décadas y constituye uno de los programas de monitoreo ambiental de aguas costeras de mayor continuidad y extensión geográfica. El programa analiza una serie de contaminantes orgánicos y metales traza en sedimentos y en tejidos de bivalvos, buscando identificar en 300 localidades costeras las tendencias desde 1986 hasta la actualidad (CCMA, 2008).

Cabe subrayar la importancia de proponer estudios y estrategias para la evaluación del efecto biológico de los contaminantes, considerando las características propias de un ecosistema. Entre ellas se encuentran las fuentes, periodicidad y naturaleza específica de los aportes de tóxicos así como su distribución y biodisponibilidad en el sistema. Paralelamente, la selección de organismos nativos de relevancia ecológica, fundamentada en sus características biológicas

y capacidad de respuesta al estrés ambiental inducido por contaminantes, son aspectos centrales para estimar el potencial deterioro en el sistema.

El Estero de Urías se caracteriza por la recepción de una gran cantidad de contaminantes de naturaleza variada, y al igual que otras lagunas costeras mexicanas posee alta diversidad biológica y cadenas alimenticias complejas (Flores-Vardugo, 1990). Dado que los puertos y ciudades costeras más importantes de México se han desarrollado en las inmediaciones de sistemas lagunares costeros (Páez-Osuna *et al.*, 1999), los estudios en los que se implementen procedimientos aplicables al área de Evaluación de Riesgo Ambiental en ambientes lagunares estuarinos, pueden aportar herramientas que a mediano plazo permitan un monitoreo regional y la aplicación de medidas preventivas y correctivas al deterioro ambiental.

Con base en el planteamiento previo, el presente trabajo de investigación tiene por objeto la evaluación de diferentes biomarcadores en bivalvos de la especie nativa *Mytella strigata*, que permitan indicar la presencia de hidrocarburos poliaromáticos en el Estero de Urías, Sinaloa, así como valorar el efecto tóxico que ejercen por medio de la evaluación integral de biomarcadores. Con ello se pretende aportar información respecto a la relación causa-efecto de la toxicidad de dichas sustancias en los mejillones, organismos de importancia clave en los programas de monitoreo ambiental.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Problemática ambiental de la zona de estudio.

De acuerdo a la CONABIO (2004), en la Bahía de Mazatlán y en el Estero de Urías una de las principales actividades económicas es la pesca intensiva por parte de las cooperativas, la cual incluye a las prácticas acuículas, con extracción principalmente de crustáceos peneidos. Particularmente, se presenta turismo de alto impacto y ecoturismo, así como una intensa actividad portuaria y de transporte marítimo en el Puerto de Mazatlán. Asimismo, se refiere que la problemática ambiental de la Bahía de Mazatlán y del Estero de Urías se caracteriza por los siguientes aspectos:

- Alteración del ambiente por tala de manglar, relleno de áreas, dragados, cambio de barreras y construcción de marinas.
- Pesca artesanal no controlada, así como arrastres y pesca ilegal que afectan las poblaciones de peces y crustáceos. A la vez, las actividades agrícolas, pesqueras, acuícolas y turísticas generan conflictos ambientales en las lagunas costeras.
- Planeación inadecuada del desarrollo urbano, industrial, portuario, agrícola, acuícola y minero.
- Falta de ordenamiento para el acceso al recurso camarón (por pesca y cultivo) y conflictos entre usuarios, predominantemente en la zona de Mazatlán.
- Aportes directos e indirectos de basura, agroquímicos, plaguicidas, metales pesados, derrames de combustibles y aceites y contaminantes industriales, aunado a la emisión de gases y partículas de la Termoeléctrica “José Aceves Pozos”.

Asimismo, el sistema recibe 800 m³/h de descargas pluviales y de aguas negras por aporte directo urbano e industrial (Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990), así como contaminación térmica por el efluente de la termoeléctrica José Aceves Pozos, ubicada en el Estero de la Sirena, el cual descarga aproximadamente 28 000 m³/h de aguas sobrecalentadas, con temperaturas 2 a 6 °C superiores a las temperaturas máximas registradas en esa área (Osuna-López *et al.*, 1986). De esta manera, en el Estero de Urías se presentan diversas fuentes tanto puntuales como no puntuales de diferentes grupos de contaminantes.

Este entorno ha motivado la evaluación de contaminantes en el sistema, incluyendo la evaluación de metales pesados (Szefer *et al.*, 1988; Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990; Páez-Osuna *et al.*, 1990; Páez-Osuna *et al.*, 1995; Páez-Osuna *et al.* 1999; Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, F. 2000; Soto-Jiménez y Páez-Osuna, 2001; Ruelas, 2001) y compuestos orgánicos, fundamentalmente plaguicidas (Galindo-Reyes *et al.*, 1992; 1997; 2004) e hidrocarburos (Botello *et al.*, 2002; Páez-Osuna *et al.*, 2002), tanto en la biota como en agua y sedimentos. Si bien la literatura sobre metales pesados en el Estero Urías es abundante, es limitada para plaguicidas y más aún para hidrocarburos. De manera particular, sólo los estudios de Botello *et al.* (2002); y Páez-Osuna *et al.* (2002) analizan la acumulación de HPAs en bivalvos del Pacífico tropical mexicano, reportando los primeros registros de HPAs en el mejillón *M. strigata* en el Estero de Urías. Por ello es importante aportar más información sobre este grupo de contaminantes en este sistema de estudio.

2.2. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos constituyen un grupo de contaminantes ampliamente distribuido en el ambiente marino, y tanto su distribución como su depósito en los sedimentos y su bioacumulación son modificados por su hidrofobicidad y su peso molecular, entre otras características (Baumard *et al.*, 1998; Cram *et al.*, 2004).

2.2.1. Características físicas y químicas.

De acuerdo al número y arreglo de los anillos aromáticos, los HPAs difieren sustancialmente en sus propiedades físicas y químicas (Tabla 1). Los HPAs son compuestos no polares o muy débilmente polares que tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas (McBride, 1994), y presentan baja solubilidad, inmovilidad, bajas tasas de biodegradación, tendencia a acumularse y a ser persistentes en el ambiente (Ney, 1990).

En general los compuestos de bajo peso molecular (BPM, presentan 2 a 3 anillos aromáticos) son más volátiles, más solubles en agua y menos lipofílicos, por lo que su transferencia a otros compartimientos del ambiente y su degradación son mayores que las de compuestos de alto peso molecular (APM, presentan 4, 5 o más anillos aromáticos). Generalmente, mientras más anillos bencénicos posee la molécula, presenta menor solubilidad, movilidad y degradación, así como mayor adsorción, acumulación y persistencia en el ambiente (Cram *et al.*, 2004).

Tabla 1. Características y efectos tóxicos de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritarios* por la Agencia Americana de Protección Ambiental (National Waste Minimization Program, US EPA 2008).

HPAs	No. anillos	Peso Molecular	¹ Solubilidad en agua, mg/l	² Carcinogenicidad	³ Mutagenicidad
Naftaleno*	2	128	31.0	I	O
Acenaftileno	3	152	3.5	I	O
Acenafteno*	3	154	3.9	O	O
Fluoreno	3	166	1.98	I	O
Antraceno	3	178	0.073	O	O
Fenantreno	3	178	1.3	I	O
Fluoranteno	3	202	0.26	O	L
Pireno*	4	202	0.14	O	O
<i>Benzo(a)antraceno</i>	4	228	0.04	S	L
<i>Criseno</i>	4	228	0.002	L	L
<i>Benzo(b)fluoranteno</i>	5	252	0.0012	S	L
<i>Benzo(k)fluoranteno</i>	5	252	6.0×10^{-4}	S	L
<i>Benzo(a)pireno</i>	5	252	3.8×10^{-3}	S	L
<i>Dibenzo(ah)antraceno</i>	5	278	5.0×10^{-4}	S	L
<i>Benzo(ghi)perileno</i>	6	276	3.0×10^{-4}	I	O
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	6	276		S	L

* Con base en su toxicidad, su potencial de exposición humana, la frecuencia con que se presentan en residuos peligrosos y la cantidad de información disponible sobre cada uno.

¹Mackay y Callcott, 1998; ²Yan *et al.* 2004. O: No presenta evidencia; I: Evidencia inadecuada para evaluación; L: Evidencia limitada en animales; S: Evidencia suficiente en animales experimentales.

Itálicas: HPAs clasificados como probables carcinógenos humanos (IRIS, 2007).

2.2.2. Fuentes.

Los HPA constituyen un grupo de contaminantes ambientales ampliamente distribuido, y se generan a través de varios procesos: combustión incompleta de materia orgánica fósil y reciente (origen pirolítico o pirogénico), maduración lenta de la materia orgánica en el gradiente geotérmico (origen petrogénico) y degradación a corto plazo de precursores biogénicos (diagénesis) (Baumard *et al.*, 1998). La mayor parte de las aportaciones de HPAs al ambiente marino se asocian con actividades antropogénicas: residuos de áreas industriales y urbanizadas así como extracción y transporte de hidrocarburos mar adentro (McElroy *et al.*, 1989). Debido a que la distribución de estos compuestos se rige por sus propiedades cinéticas

y termodinámicas, así como por la naturaleza de la materia orgánica, es posible inferir los procesos que generan los HPAs en las matrices ambientales (fundamentalmente en sedimentos y en organismos). Así, cada fuente de HPAs origina patrones característicos (Baumard *et al.*, 1998; Soclo *et al.*, 2000).

La biodisponibilidad de los HPAs varía de acuerdo a estos diferentes orígenes. Se ha observado que los hidrocarburos petrogénicos son acumulados por los organismos con mayor facilidad que los compuestos pirogénicos (Farrington *et al.*, 1983; Burns y Yelle-Simons, 1994). Sin embargo, la biodisponibilidad de los HPAs depende también de muchos otros parámetros relacionados con las características fisicoquímicas de los compuestos, así como de las características del sedimento y de los organismos.

La determinación de las fuentes y composición de los HPAs que pueden estar disponibles para la biota, proporciona información valiosa e incluso necesaria para la evaluación del impacto antropogénico sobre un ecosistema, además de permitir la formulación adecuada de estrategias de control de contaminantes (Yunker *et al.*, 2002). Con este propósito se han desarrollado índices moleculares basados en las concentraciones de compuestos individuales orientados a evaluar los diferentes orígenes de los HPAs; sin embargo, es necesaria la consideración simultánea de varios índices para tener una mejor evaluación (Baumard *et al.*, 1998).

Los HPAs de masa molecular 178 y 202 se utilizan comúnmente para distinguir entre fuentes petrogénicas o de combustión (Budzinski *et al.*, 1997; Soclo *et al.*, 2000). Para la masa molecular 178 (An/178) usualmente una proporción de antraceno respecto a antraceno más fenantreno ($An/(An+Ph) < 0.10$) indica petróleo mientras que una proporción ($An/(An+Ph) > 0.10$) indica predominancia de combustión. Para la masa molecular 202 (Fl/202) una proporción de fluoranteno respecto a fluoranteno más pireno ($Fl/Fl+Py$) con valor de 0.5 usualmente define el punto de transición petróleo/combustión (Budzinski *et al.*, 1997), pero en la práctica este límite parece ser menos definitivo que 0.10 para An/178. Usualmente se sugiere que la proporción Fl/Fl+Py es superior a 0.5 en las de combustión de queroseno, pastos, la mayoría de muestras de combustión de madera, carbón y de creosota, e inferior a 0.5 para la mayoría de muestras de petróleo; no obstante también es menor que 0.5 para la combustión de gasolina, diesel, combustión de crudo y gasóleo y emisiones de autos y camiones diesel. (Yunker *et al.*, 2002). Al parecer la proporción límite del petróleo parece más cercana a 0.40 que a 0.50 para Fl/Fl+Py, y las proporciones entre 0.40 y 0.50 son más

características de la combustión de combustible fósil líquido (combustible para vehículos y crudo), mientras que las proporciones de 0.50 caracterizan la combustión de pasto, carbón y madera (Yunker *et al.*, 2002).

Los HPAs de masas moleculares 228 (228/BaA) donde se emplea la relación del benzo(a)antraceno respecto a la proporción de criseno y trifenileno (BaA)/BaA+Chry/trifenileno) son utilizados con menos frecuencia como indicadores de HPAs parentales. Debido a que raramente se encuentran antraceno o indeno en bajas concentraciones en las muestras de combustión, una proporción BaA/ BaA+Ch/trifenileno superior a 0.35 indica combustión, valores entre 0.2 y 0.35 señalan petróleo o combustión y un valor inferior a 0.2 refiere petróleo (Yunker *et al.*, 2002).

2.2.3. Efectos biológicos.

Los HPAs son altamente liposolubles y por lo tanto fácilmente adsorbidos en el tracto intestinal de los organismos. Se distribuyen en una amplia variedad de tejidos, con una marcada tendencia para localizarse en tejidos adiposos (Cram *et al.*, 2004). Varios estudios han demostrado que ya en el interior de la célula, los HPAs son activados por dos vías principales: 1) la oxidación de un electrón que produce radicales catiónicos reactivos y 2) la mono-oxigenación que origina dioles epóxicos. Los aductos de DNA se forman por la reacción de estos HPAs activados con los grupos nucleofílicos más reactivos de las dos bases purínicas del DNA, adenina (Ade) y guanina (Gua). Estos aductos pueden ser estables o despurinizantes; los aductos estables son aquellos que permanecen unidos covalentemente al DNA, a menos que sean removidos durante la reparación, mientras los aductos despurinizantes se liberan espontáneamente del DNA por la desestabilización del enlace glicosídico, dejando un “hueco” no-codificador o apurínico (Cavalieri y Rogan, 1998).

El metabolismo de los HPAs es catalizado principalmente por el sistema enzimático citocromo P450, convirtiendo a los HPAs en moléculas más polares y solubles en agua para ser excretados fuera del organismo. Sin embargo, el metabolismo de los HPAs puede generar intermediarios reactivos que producen genotoxicidad (Yu, 2002). No todos los HPAs son carcinógenos o mutagénicos y su toxicidad es variable. Los HPAs de bajo peso molecular (BPM), muestran una significativa toxicidad aguda y otros efectos adversos en los organismos, pero no presentan evidencias de carcinogenicidad. Los HPAs de alto peso molecular (APM),

son significativamente menos tóxicos; no obstante se ha demostrado que son carcinógenos, mutagénicos o teratogénicos para una gran variedad de especies, incluyendo peces y otros organismos acuáticos, anfibios, aves y mamíferos (Eisler, 1987) (Tabla 1). Asimismo, la toxicidad (aguda y subletal) de los HPAs se puede incrementar significativamente si los organismos son expuestos a la radiación UV (fototoxicidad), formándose especies reactivas que dañan los constituyentes celulares, resultando en un proceso de toxicidad aguda o en genotoxicidad (Arfsten *et al.*, 1996).

Dado el potencial de efectos adversos que la exposición crónica a los HPAs representa para la biota marina, es necesario que estos efectos sean evaluados a través de un análisis integral de respuestas que den cuenta tanto de los mecanismos de acción tóxica de los HPAs, como de los daños o alteraciones en los niveles sub-organismo y organismo que puedan proyectarse en las poblaciones y en los ecosistemas. Debido a ello, numerosos estudios tanto en el campo como en el laboratorio han abordado el uso de biomarcadores para estimar el efecto de los HPAs en los organismos (Yawetz *et al.*, 1992; Risso de Faverney *et al.*, 2000; Elbekai y El-Kadi, 2005 ; Laffon *et al.* 2006; Auffret , 1988; Widdows *et al.* 1982, 1987, 1995, 1997, 2002).

En los bivalvos, se ha investigado el efecto de los contaminantes sobre la bioquímica y la fisiología de los organismos a través de la evaluación de diversos biomarcadores en estudios de laboratorio. Se ha evaluado la alteración causada por la exposición a HPAs en las enzimas del sistema P450 (Yawetz *et al.*, 1992; Risso de Faverney *et al.*, 2000; Elbekai y El-Kadi, 2005), el daño en el material genético (Ariese *et al.*, 2001; Boutet *et al.*, 2004), así como el efecto de contaminantes en las concentraciones de proteínas (Sreedevi *et al.*, 1992) en la estabilidad lisosomal de hemocitos y células digestivas (Wedderburn *et al.*, 2000; Moore, 1985; Nicholson, 1999, Moore *et al.*, 2006), en la tasa de aclaramiento (Donkin *et al.*, 1989; Widdows, 1990), en la eficiencia de asimilación (Widdows *et al.*, 1982, 1987), en el consumo de oxígeno (Bayne *et al.*, 1982, Stekoll *et al.*, 1980) y sobre la relación atómica O:N (Axiak y George, 1987).

Asimismo, numerosos autores han documentan el uso de biomarcadores en estudios de campo en los que se ha observado el efecto de los HPAs sobre la biota de sistemas naturales. Laffon *et al.* (2006) evalúan el efecto del derrame de petróleo del *Prestige* a través de la acumulación de HPAs en tejido y del daño genético; Auffret (1988) refiere cambios histopatológicos relacionados con la contaminación química en el campo mientras que Widdows *et al.* (1982;

1987; 1995; 1997; 2002) investigan el efecto de HPAs en la tasa de aclaramiento, la eficiencia de asimilación y el campo de crecimiento de diferentes especies de mejillones en sitios como el Mar de Irlanda, la Laguna de Venecia y las Islas Bermuda. Además, Bayne *et al.*, (1982) reportan las consecuencias ecológicas derivadas de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas por compuestos petrogénicos en los bivalvos marinos.

No obstante, estos trabajos de investigación se han desarrollado en sistemas de latitudes templadas y subtempladas. Los estudios del efecto de la contaminación de HPAs mediante biomarcadores resultan escasos en localidades tropicales y no se cuenta con ellos ni a nivel nacional ni para la especie *Mytella strigata*.

2.3. Especie de estudio.

El mejillón *Mytella strigata* es una especie abundante en ambientes costeros y estuarinos y se distribuye en varias lagunas del Pacífico mexicano, incluyendo la costa de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Guerrero (Estévez, 1975; Stuardo y Villaroel, 1976; Baqueiro y Aldana, 2000). La clasificación taxonómica de *Mytella strigata* (Keen, 1971) es la siguiente:

Phyllum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Subclase: Lamellibranquia

Superorden: Filibranquia

Orden: Mytiloidea

Superfamilia: Mytiliacea

Familia: Mytilidae

Género: *Mytella*

Especie: *Mytella strigata* (Hanley, 1843)

Sinonimia: *Mytilus falcatus* (Orbigny, 1846); *Mytilus charruanus*

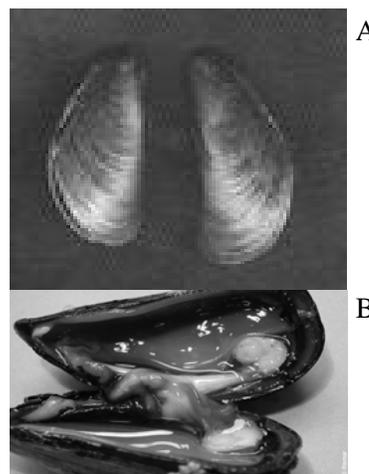


Fig. 2. Valvas (A) y órganos internos (B) de *M. strigata*. (ifremer, 2007).

Los moluscos constituyen un grupo numeroso cuyo origen se remonta al Precámbrico. Han sido descritas más de 70 000 especies vivientes y aproximadamente 35 000 especies fósiles de este *Phyllum*.

Los moluscos bivalvos tienen el cuerpo lateralmente comprimido y encerrado en una concha rígida calcárea formada por dos piezas llamadas valvas, que pueden abrirse y cerrarse mediante el juego de una articulación llamada charnela y la presencia de un ligamento elástico. La concha protege a los órganos internos y es segregada por el manto o palio (Fig. 2). El manto forma una cavidad paleal o cavidad del manto, en cuyo interior se alojan las branquias y las aberturas de los nefridios. Estas branquias, situadas a cada lado de la cavidad del manto, contienen elementos nerviosos, musculares y sanguíneos, y tienen una estructura filamentosa en la que destaca la presencia de glándulas mucosas y abundantes cilios, que permiten crear corrientes de agua que aportan alimento y oxígeno al organismo. La región cefálica en los bivalvos no está diferenciada. El aparato digestivo comienza en la boca, a la que sigue una porción esofágica tubular que conduce al estómago, en el que desembocan dos conductos procedentes de las glándulas o divertículos digestivos. En el estómago existe una estructura denominada estilo cristalino, de naturaleza proteínica, cuya rotación concentra y mezcla el alimento ayudándose de las secreciones enzimáticas. En esta región, las partículas con valor alimenticio pasan a las glándulas digestivas, donde ocurre la digestión intracelular, aunque también existe alguna digestión extracelular. Las partículas de mayor tamaño o sin valor alimenticio pasan directamente al intestino y no son digeridas. El intestino, que acaba con el recto y el ano, es largo y en él se forman las heces; como pseudoheces se consideran a los restos y las partículas no digeridas, que son también eliminados. El sistema circulatorio es abierto y tiene un corazón dorsal rodeado por una membrana pericárdica: La sangre, antes de su regreso al corazón, se oxigena en las branquias y llega oxigenada a las aurículas. Los bivalvos tienen hemocianina como pigmento respiratorio. Su aparato excretor está constituido por un par de metanefridios que desembocan en la cavidad del manto mediante nefridioporos. Su sistema nervioso está constituido por un anillo nervioso que rodea al esófago, del que parten dos pares de cordones nerviosos en sentido posterior, un par ventral y un par de cordones viscerales. Los órganos de los sentidos se localizan en el borde del manto, que en ocasiones presenta tentáculos provistos de células táctiles y de células quimiorreceptoras,

además de ocelos sensibles a la luz. Su cuerpo está provisto de una estructura ventral musculosa llamada pie que pueden utilizar para desplazarse por el sustrato (Bautista, 1989).

Respecto a la reproducción, la mayor parte de los bivalvos son dioicos, iteróparos, por lo que hay superposición de individuos de varias generaciones. Los mejillones no presentan dimorfismo sexual y se diferencian visualmente por el color del tejido reproductivo, de color anaranjado en las hembras y de color crema en los machos (Gosling, 1992). Presentan un par de gónadas en posición anterior y dorsolateral, que cuando maduran liberan al exterior los huevos o espermatozoides vía nefridial o a través de los gonoductos. La fecundación ocurre en el agua de mar. Durante su desarrollo larvario, una gástrula da lugar a una larva trocófora natatoria y de vida libre, que muy pronto se transforma en una larva veliger, que posteriormente sufre una metamorfosis y se convierte en un organismo sedentario y bentónico, con rasgos y características similares a las de un animal adulto. Los registros de los mejillones más longevos son de 12 a 20 años. Los adultos llegan a medir 5 a 7 cm (Thompson, 1980).

De acuerdo a estudios realizados por Estévez (1975) en varias lagunas del estado de Guerrero, las hembras de esta especie se encuentran en etapa de madurez en mayo y desovan en agosto; Leal-Tarín (2007) reporta que las poblaciones de esta especie residentes en las lagunas del estado de Sinaloa, presentan varios eventos reproductivos al año, con el pico reproductivo en el mes de abril durante el periodo de secas.

Los mejillones de esta especie se adhieren al sustrato y entre sí con filamentos bisales, formando nidos en las raíces del mangle o en las rocas del sitio. Los mejillones son filtradores de materia suspendida, y filtran plancton y pequeñas partículas. Los mejillones son depredados por equinodermos, gasterópodos y cangrejos (Thorson, 1971).

2.4. Biomarcadores.

De acuerdo al NRC, 1987, y al WHO, 1993, los biomarcadores pueden subdividirse en tres clases:

- a) Biomarcadores de exposición: incluyen la detección y medición de una sustancia exógena o de sus metabolitos, o del producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula blanco, que es medida en un compartimiento del organismo.

- b) Biomarcadores de efecto: incluyen alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo en los tejidos o en los fluidos corporales de un organismo; se ha establecido o resulta posible que tales alteraciones se asocien con una enfermedad o deterioro en la salud.
- c) Biomarcadores de susceptibilidad: indican la habilidad de un organismo, inherente o adquirida, para responder al compromiso de la exposición a una sustancia xenobiótica específica, incluyendo factores genéticos y cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad de un organismo a esa exposición.

Por ejemplo, la inducción del citocromo P450 se utiliza como biomarcador de exposición a bifenilos policlorados y HPAs, mientras que la actividad de las esterasas se utiliza como biomarcador de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos. (Binelli *et al.* 2005; Ricciardi, 2005, Bocquené *et al.* 1990).

Asimismo, los biomarcadores de efecto son respuestas biológicas a nivel sub-organismo, organismo y supra-organismo que revelan el riesgo de efecto tóxico a largo plazo (Fent, 2004), y dan cuenta de alteraciones en diferentes niveles de organización biológica (bioquímica, fisiológica, conductual), no específicas, que señalan un efecto adverso en el organismo y pueden dar cuenta de la magnitud de la acción tóxica de los contaminantes (Walker, 1995; Galloway, 2002b; Dissanayake, 2001). A la vez, la evaluación de las funciones fisiológicas proporciona elementos para vislumbrar las consecuencias de las enfermedades o el parasitismo en la adecuación ecológica de los moluscos bivalvos (Newell y Barber, 1988). Los biomarcadores de efecto que se evalúan con mayor frecuencia son la estabilidad lisosomal, los índices de condición, diversas tasas fisiológicas y el campo de crecimiento (Moore *et al.*, 2006; Allen y Moore, 2004; Widdows, *et al.*, 2002; Del Valle-Pignataro, 1987; Toro *et al.*, 2003).

2.4.1 Biomarcadores de exposición.

2.4.1.1. Inducción de citocromo P450.

Las enzimas que catalizan reacciones donde a partir de O₂ un átomo de oxígeno se incorpora al sustrato orgánico mientras otro átomo es reducido a H₂O se denominan monooxigenasas. Debido a que las monooxigenasas catalizan reacciones en las que el sustrato principal queda hidroxilado, también se les llama *hidroxilasas*, o bien se les llama *oxidadasas de función mixta* u

oxigenasas de función mixta, para indicar que oxidan simultáneamente dos sustratos diferentes. Las reacciones de monooxigenación más numerosas y complejas son aquellas donde participan los citocromos P450, por lo que se conocen también como monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (Nelson y Cox, 2005).

Los citocromos P450 presentan dos funciones principales en los organismos. Algunos están involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, esteroides y prostaglandinas mientras que otro grupo desempeña una función clave en la biotransformación oxidativa de moléculas exógenas provenientes del ambiente, facilitando su eliminación en los organismos vivos (Mansuy, 1998).

Al ingresar un xenobiótico, los organismos tienen la capacidad de eliminarlo para evitar su acumulación. Mientras que los compuestos hidrofílicos pueden ser excretados, los compuestos hidrofóbicos pueden seguir dos vías. La primera opción es almacenarlo en compartimientos corporales (como en el caso de los policlorados) donde una vez secuestrado, el compuesto se inactiva y puede permanecer así por períodos prolongados. Sólo a través de un metabolismo rápido de reservas lipídicas corporales, el compuesto puede ejercer un efecto tóxico (Boelsterli, 2007).

La segunda posibilidad es la conversión enzimática del xenobiótico en una especie más hidrofílica. Este proceso se denomina biotransformación y sigue dos rutas principales:

- 1) Adición o ruptura de un grupo funcional (referida como “fase I” de la biotransformación).
- 2) Acoplamiento del xenobiótico (o de su metabolito primario) con un sustrato endógeno (llamado “fase II”), aunque las reacciones de la fase II pueden presentarse sin una reacción previa de la fase I, o algunas veces ocurren antes de la fase I (Boelsterli, 2007).

Los citocromos P450 (CYP) son un tipo de hemoproteínas que poseen una fracción Fe^{2+} que puede enlazarse al oxígeno o al monóxido de carbono (Nelson y Cox, 2005). Este tipo de citocromos se encuentra en el retículo endoplásmico liso con mayor frecuencia que en la mitocondria. Estas enzimas fueron descubiertas en 1960 y hasta hace poco tiempo se creía que su función catalítica se reducía a la transferencia de un átomo de oxígeno de la molécula O_2 hacia diferentes sustratos (Mansuy, 1998), donde el citocromo P450 recibe electrones del

NADPH o NADH por medio de proteínas de transferencia de electrones, frecuentemente acopladas al citocromo dentro de las membranas celulares (Ortiz, 1995):



Actualmente es conocido que los citocromos P450 catalizan una gran variedad de reacciones, debido a la capacidad del Fe para presentar varios estados de oxidación con diferente reactividad y a la accesibilidad del Fe a diversos sustratos. Se han propuesto cinco diferentes estados intermedios de las monooxigenasas P450-dependientes en el ciclo catalítico de activación del dióxígeno (Mansuy, 1998) (Fig. 3, Tabla 2), si bien la única propiedad común a todos los P450 es la peculiar posición del pico de Soret (una banda de absorción muy fuerte en la región azul del espectro de absorción óptica de las proteínas hemo) del complejo Fe(II)-CO cerca de los 450 nm (de ahí el nombre de P450). Este pico señala la presencia de un ligando cisteinato de la proteína, unido al hierro en posición *trans* respecto al ligando CO.

La clasificación y nomenclatura de los P450 se basa en la homología de sus secuencias de genes. Algunas familias de CYP, especialmente las CYP 1, 2 y 3 desempeñan una función especialmente importante en la bioinactivación, bioactivación y toxicidad de xenobióticos (Boelsterli, 2007).

Dentro de las reacciones de la fase I, los P450 realizan una gran diversidad de funciones, como la oxidación o reducción, incluyendo hidroxilación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, epoxidación, N-, O-, o S- desalquilación, N-hidroxilación, sulfoxidación, desulfuración y deshalogenación oxidativa (Boerstersli, 2007) (Tabla 2).

Los citocromos P450 constituyen sin duda una de las familias enzimáticas más importantes en la toxicología mecanística (Boerstersli, 2007). La subfamilia citocromo P4501A (CYP1A) ha llamado particularmente la atención debido a su función clave en la biotransformación de dioxinas, furanos, HPAs y PCBs. La exposición de los organismos a estos compuestos induce la CYP1A mediante el receptor citosólico arilhidrocarburo (Ah) (Hankinson, 1995). La proteína CYP1A inducida convierte catalíticamente a los xenobióticos en compuestos más hidrofílicos, lo que constituye el primer paso hacia la excreción y la desintoxicación (Tabla 2). Sin embargo, algunos de estos metabolitos son muy reactivos y pueden, en última instancia, incrementar la toxicidad y carcinogenicidad de los compuestos parentales (Parkinson, 1995).

Tabla 2. Reacciones catalizadas por los citocromos P450 (Mansuy, 1998).

Especie de P450	Acción	Sustrato	Producto Final
Fe ^{III}	Transferencia de un electrón al enlace O-O	1) Prostaglandina H ₂ 2) Alquilperóxidos y alquilhidroperóxidos	1) Prostaciclina, tromboxano
Fe ^{II}	1) Reducción 2) Deshidratación	1) Xenobióticos (polihalogenados y nitroaromáticos) 2) Aldoximas	2) Glucósidos cianogénicos en <i>Sorghum bicolor</i> .
Fe ^{III} O-O ⁻	Ruptura de enlaces C-C	1) Aldehídos 2) Lanosterol	1) Esteroides (estrona) 2) Colesterol
Fe ^V =O	1) Transferencia de un átomo de O al sustrato 2) Deshidrogenación 3) Acoplamiento oxidativo	Alcanos, ácidos grasos, éteres, aminas, tioéteres, dobles enlaces C-C, compuestos aromáticos.	Epóxidos a partir de olefinas; óxidos de N a partir de aminas; sulfóxidos y sulfones a partir de tioéteres. Los HPAs son oxidados como metabolitos primarios que posteriormente forman dioles, fenoles o reaccionan con glutatión o proteínas durante el proceso de desintoxicación.

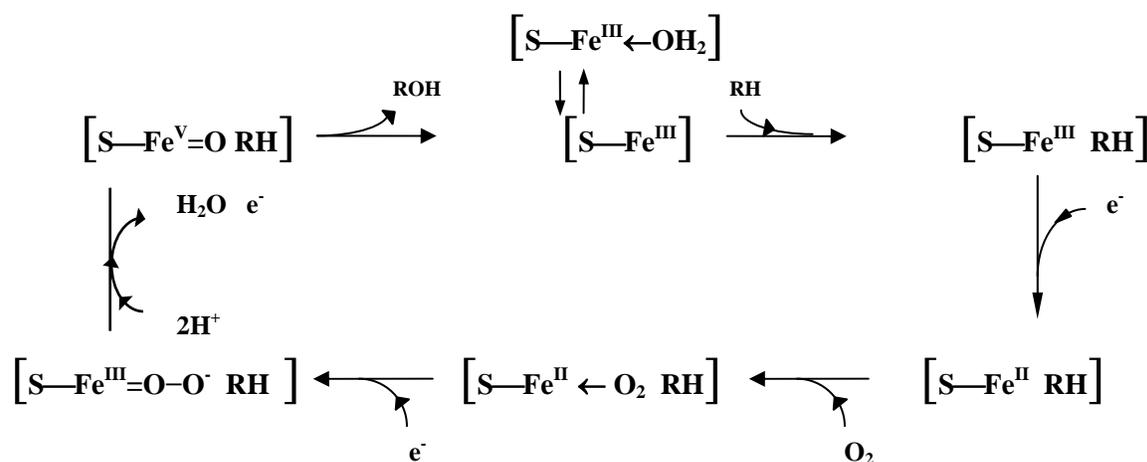


Fig. 3. Ciclo catalítico de monooxigenaciones P450-dependientes (Mansuy, 1998).

La inducción de CYP1A en peces tras la exposición a ciertos contaminantes orgánicos como los HPAs o PCBs ha motivado el uso del sistema citocromo P450 como biomarcador de exposición en el monitoreo ambiental (Payne, 1976; Cajaraville *et al.*, 2000; Fent, 2004), ya sea por su detección inmunológica o evaluándolo indirectamente a través de su actividad enzimática. Entre las actividades enzimáticas asociadas al sistema P450 se encuentran las de la 7-etoxiresorufin O-deetilasa (EROD), la 7-etoxicumarin deetilasa (ECOD) y la 7-

penthoxyresorufin-O-despentilasa (PROD). De manera particular, la concentración de la proteína CYP1A, la actividad de estas enzimas se ha relacionado con niveles ambientales de químicos CYP1A-inductores como los HPAs o PCBs (Fent, 2004).

No obstante, diversos estudios denotan que los moluscos generalmente muestran una limitada capacidad de metabolizar xenobióticos orgánicos a través del sistema citocromo P450 (Livingstone, 1991) y la respuesta de este sistema a los contaminantes no es consistente. Yawetz *et al.*, (1992) reportaron que en el bivalvo mediterráneo *Donax trunculus* expuesto a aroclor 1254 el incremento en los niveles de citocromo P450 no se asoció a un aumento, sino a un drástico decremento en la actividad EROD; de igual manera no se encontró relación entre la concentración del sistema citocromo y la actividad EROD en otras tres especies de moluscos. Argumentan que ello pudo tener origen en la inhibición de la actividad EROD por la elevada acumulación de hidrocarburos en la fracción microsomal.

Livingstone *et al* (1989) refieren asimismo que se han detectado tanto citocromo P450 como actividades oxidativas asociadas a esta familia de proteínas en 23 moluscos y aunque muestran un incremento relacionado con la exposición a xenobióticos, los resultados son irregulares y no se aprecia una correlación obvia entre el contenido de citocromo P450 y las actividades del sistema MFO registradas (benzo(a)pyreno hidroxilasa, BPH y ECOD). Al respecto se menciona la existencia de múltiples o particulares formas de citocromo P450 en los moluscos, señaladas por estudios de cinética e inhibición enzimática, de purificación de DNA y de estacionalidad. En este aspecto, en *Unio tumidus* se observó la inducción en la expresión de la enzima CYP4 por la exposición a dietilhexilftalato, aún cuando no se encontró amplificación de la secuencia CYP1A al ser tratados con Aroclor (Chaty *et al.*, 2004).

En contraparte, Torres *et al.* (2002) evaluaron el estrés oxidativo del mejillón *Mytella guyanensis* en manglares de Brasil, y encontraron un incremento en la actividad EROD de los organismos colectados en sitios contaminados respecto a la presentada por aquellos del sitio de referencia. Asimismo, Bebianno *et al.* (2007), evaluaron el contenido de CYP450 en ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* transplantados en diferentes sitios de la costa de Portugal; observaron una relación directa entre la CYP450 y la concentración de HPAs en los diferentes sitios, y afirman que la CYP450 en *M. galloprovincialis* resulta un biomarcador confiable de contaminantes orgánicos para la evaluación de riesgo en la costa portuguesa. De manera análoga, la actividad ECOD ha sido detectada en *Dreissena polymorpha*, mejillón

dulceacuícola, como respuesta a la adición *in vitro* de los organofosforados thiometon y disulfoton (Dauberschmidt, 1997). Recientemente, Binelli *et al.* (2005) y Ricciardi *et al.*, (2005) encontraron un incremento significativo de la actividad EROD en los mejillones cebra *D. polymorpha* colectados en varias estaciones de muestreo en diferentes lagos de Italia, el cual relacionan con la contaminación por compuestos planares y proponen que dicha activación se contrapone a su inhibición por metales pesados. Para esta misma especie, Lafontaine *et al.*, (2000) refieren una respuesta positiva de la actividad EROD, en la que encontraron un amplio intervalo de variación entre los diferentes sitios de muestreo en el Río St. Lawrence, Canadá. Asimismo, la actividad EROD evaluada en la glándula digestiva del mejillón unióido *Ellipitio complanata* se incrementó 1.5 veces en los individuos colocados corriente abajo de un efluente municipal, respecto a los organismos ubicados corriente arriba (Gagné *et al.*, 2002), resultados que se relacionaron con niveles elevados de HPAs, un componente común en los efluentes de drenajes y en los escurrimientos urbanos.

Cabe señalar que no siempre puede esperarse una relación linear dosis-respuesta entre la concentración de los químicos y el contenido o la actividad de la CYP1A en ambientes naturales, donde pueden actuar simultáneamente inhibidores e inductores de la CYP1A (Pluta, 1993). Factores como la temperatura, la estacionalidad o las hormonas sexuales pueden influenciar la capacidad de respuesta del sistema CYP1A (Stegeman y Hahn, 1994).

Así, aún cuando se ha reportado en varios trabajos que la actividad EROD en mejillones se encuentra en un nivel bajo o ausente, la contraposición de los resultados descritos en *M. guyanensis*, *M. galloprovincialis* y *D. polymorpha* denotan, aún en valoraciones de campo, relaciones causales para esta respuesta bioquímica. En *Mytella strigata*, organismo con gran potencial como bioindicador, no se ha explorado la actividad EROD. De tal manera la conjugación del potencial de la actividad EROD como biomarcador y de *Mytella strigata* como especie bioindicadora, señala la importancia de evaluar esta respuesta en la especie.

2.4.2. Biomarcadores de efecto.

Numerosas respuestas fisiológicas han sido sugeridas como marcadores del efecto biológico adverso ocasionado por los contaminantes del medio, cuya alteración temprana en los organismos puede dar cuenta de efectos posteriores en niveles mayores de organización biológica. En el presente estudio, se abordan diversas respuestas biológicas (bioquímicas y

fisiológicas) consideradas en conjunto como biomarcadores del efecto de xenobióticos y otros estresores ambientales en bivalvos (Cajaraville *et al.*, 2000; Moore, 2006; Sreedevi *et al.*, 1992; Catalán *et al.*, 2007; Lucas y Beninger, 1985; Widdows, 1993; 1995; Toro *et al.*, 2003).

2.4.2.1. Estabilidad lisosomal.

Los procesos de acumulación, metabolismo y toxicidad por la exposición a un contaminante se realizan en la célula, por lo cual se han utilizado ciertas respuestas celulares como biomarcadores en los monitoreos de contaminación ambiental (Cajaraville, 2000), ya que proporcionan respuestas rápidas y sensibles de adaptación a perturbaciones ambientales (Moore, 1985).

Los lisosomas son organelos citoplasmáticos que contienen hidrolasas ácidas capaces de degradar la mayoría de las macromoléculas celulares hacia productos de bajo peso molecular, por lo que se involucran en numerosas funciones como la digestión y el recambio de los constituyentes intracelulares y extracelulares, la muerte celular programada durante la embriogénesis, la digestión de los microorganismos fagocitados e incluso la nutrición celular; los lisosomas son el principal sitio de asimilación del colesterol a partir de las lipoproteínas séricas endocitadas, las que provienen de la digestión de organelos, partículas alimenticias y virus y bacterias previamente fagocitados (Holtzman, 1989). En los moluscos, los lisosomas participan en el secuestro y desintoxicación de xenobióticos metálicos y orgánicos (Moore, 1985), los que al acumularse en exceso pueden labilizar la membrana y provocar alteraciones patológicas importantes, como el aumento de tamaño, que a veces se acompaña por un mayor número de estos organelos en la célula. La desestabilización de las membranas lisosomales conduce a la liberación de enzimas hidrolíticas, permitiendo su libre acceso a otros componentes celulares y posteriormente a la autólisis (Allison y Paton, 1965; Young, 1982), lo que en ciertos casos implica un riesgo para la salud de la célula o del organismo entero (Cajaraville *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la estabilidad lisosomal es un indicador predictivo de daño y patología celulares (Moore *et al.*, 2006) y que la alteración de la estabilidad lisosomal es proporcional al nivel de estrés ambiental (Moore, 1985; Nicholson, 1999). Por ello, constituye un buen biomarcador diagnóstico del estado de salud de un organismo y resulta útil como marcador de contaminación. (Allen y Moore, 2004; Köhler *et al.*, 1992; Galloway *et al.*, 2002b).

Marigómez *et al.* (1996) realizaron un estudio de campo para validar la evaluación de cambios estructurales el sistema lisosomal digestivo de mejillones centinela como biomarcadores de estrés ambiental. Concluyeron que parámetros estereológicos como la densidad de volumen lisosomal, la densidad de superficie, la densidad numérica y la relación superficie-volumen, son sensibles al estrés ambiental inducido por contaminantes aún en las complejas condiciones de campo, donde muchos factores pueden interactuar para afectar la estructura del sistema lisosomal digestivo. Giambérini y Cajaraville (2005) analizaron recientemente el efecto de la exposición al Cd sobre la estructura del sistema lisosomal digestivo de *Dreissena polymorpha*, y encontraron que los cambios producidos se relacionan con el tiempo de exposición y la concentración del metal, demostrando el potencial de este biomarcador en el monitoreo de ambientes dulceacuícolas.

La estabilidad lisosomal en invertebrados, incluidos los moluscos, ha sido evaluada a través de la técnica del rojo neutro, que constituye una medición de la retención de un colorante base débil dentro del compartimento lisosomal dentro de células sanguíneas (Pipe *et al.*, 1995; Nicholson, 1999; 2003). La adición del colorante a las células sanguíneas vivas o a la hemolinfa de los invertebrados ocasiona que éste penetre al lisosoma. En organismos de lugares no contaminados, la integridad de la membrana lisosomal permite retener el colorante dentro de los lisosomas por largos períodos; en contraste, en organismos expuestos a contaminantes, el daño en la estabilidad de la membrana ocasiona tiempos menores de retención.

En este aspecto, Nicholson (1999; 2003) observó que las membranas lisosomales en hemocitos del bivalvo *Perna viridis* expuestos al cobre, presentaron una menor retención del rojo neutro respecto a los controles. Se plantea que el colorante es capturado rápidamente por las células y acumulado intralisosomalmente por una bomba de protones energético-dependiente unida a la membrana (Mego *et al.*, 1972). Al fallar esta bomba debido a, por ejemplo, la desnaturalización de sus enzimas por el cobre, el pH se incrementa en el interior del organelo, creando un estado de equilibrio entre ambos lados de la membrana y, en ausencia de un gradiente, permite el libre pasaje del contenido lisosomal (como el colorante rojo neutro) hacia el citosol (Lowe *et al.*, 1992). La retención del rojo neutro disminuye probablemente también por la formación intralisosomal, mediada por el cobre, de radicales altamente reactivos que inducen la lipo-peroxidación de la membrana (Chvapil *et al.*, 1972).

Así, la integridad de los hemocitos evaluada por la retención del rojo neutro es utilizada como un biomarcador general de la exposición a contaminantes (Wedderburn *et al.*, 2000).

2.4.2.2. Proteínas.

El deterioro fisiológico resultante de la exposición a concentraciones tóxicas de contaminantes se manifiesta a través de diferentes vías, incluyendo el catabolismo de proteínas. En peces, Sreedevi *et al.*, (1992) evaluaron el efecto de la exposición a Ni sobre las proteínas solubles, totales y estructurales en las branquias y el riñón de *Cyprinus carpio*. Los autores concluyen que en la exposición letal (1-4 d), el aumento en las actividades de la proteasa y de la glutamato deshidrogenasa concuerdan con el decremento progresivo de proteínas solubles, estructurales y totales, indicando deformaciones estructurales y funcionales y una patología severa. Los resultados muestran que en concentraciones letales la actividad proteolítica aumenta respecto a la síntesis, lo que puede explicarse por inestabilidad lisosomal o destrucción celular por concentraciones elevadas de xenobióticos (Sternlieb y Goldfischer, 1976). En contraste, en concentraciones y tiempo de exposición subletales (1 a 15 d) se presentó tanto un incremento en las concentraciones de proteínas estructurales, totales y solubles, como un decremento en los niveles de amonio y urea, sugiriendo la participación de mecanismos compensatorios de adaptación al estrés crónico. Así, mientras que el aumento de proteínas estructurales puede favorecer el fortalecimiento de los órganos del animal para desarrollar resistencia al estrés tóxico subletal, el incremento de proteínas solubles puede asociarse a la síntesis de enzimas necesarias para la desintoxicación.

En invertebrados, se ha observado una reducción en el contenido de proteínas solubles totales de la hemolinfa por la exposición a Cu en cangrejos (Weeks *et al.*, 1993) y camarones misidáceos (Lin y Chen, 2001). Brown *et al.* (2004) analizaron el contenido de proteínas en la hemolinfa de *Patella vulgata*, *Carcinus maenas* y *M. edulis* después de 7 días de exposición a este mismo metal, observando un decremento significativo en *M. edulis* y *P. vulgata*.

La evaluación del contenido proteínico del músculo en invertebrados y particularmente en bivalvos constituye a la vez un parámetro que da cuenta del nivel de deterioro y/o alteración de un organismo, dado que la utilización y movilización de las reservas energéticas disponibles en este tejido puede considerarse como un síntoma de estrés (Bayne, 1973). En condiciones de nutrición subóptima, el tejido muscular proporciona energía mediante la

degradación de proteínas (Pedersen *et al.*, 1990). En este sentido, Racotta *et al.* (1998) sugieren la participación de proteínas del músculo aductor del bivalvo *Argopecten ventricosus* como sustrato energético bajo condiciones de estrés alimenticio. Asimismo, Catalán *et al.* (2007), propusieron la determinación en el róbalo *Dicentrarchus labrax* de varios índices de condición bioquímicos, entre ellos la concentración de proteínas solubles totales en el músculo para estimar la condición fisiológica del organismo, considerando que en condiciones óptimas se promueve el crecimiento muscular.

De acuerdo a lo planteado, la concentración de proteínas solubles totales tanto en la hemolinfa como en el músculo aductor en bivalvos, puede considerarse un indicador valioso del estado fisiológico de un organismo.

2.4.2.3. Índice de condición.

La estimación de índices de condición proporciona una evaluación integral del estrés fisiológico. En los bivalvos, el índice de condición es un valor que refiere la cantidad de tejido de un organismo (Hickman e Illingworth, 1980). Esta respuesta indica el efecto de múltiples estresores sobre los organismos, dado que los tóxicos consumen las reservas energéticas potencialmente destinadas al crecimiento. Las reservas son canalizadas alternativamente hacia procesos de desintoxicación y los organismos de ambientes contaminados presentan crecimiento retardado y una pobre condición de sus tejidos. Los índices de condición resultan, por lo tanto, muy sensibles a la contaminación (Lucas y Beninger, 1985). Sin embargo, pueden a la vez ser influenciados por cambios estacionales a los que se asocia el estado nutricional y reproductivo, en sitios espacialmente diferentes (Roesijadi *et al.*, 1984; Leavitt *et al.*, 1990).

En bivalvos, el índice de peso seco tejidos / peso seco de valvas es ampliamente utilizado, en contraposición con el índice hepatosomático y gonadosomático, debido a que la naturaleza de las mediciones involucradas lo hacen más estandarizable y reproducible. Además, el uso del peso seco de los tejidos elimina la variabilidad causada por las fluctuaciones en el contenido de agua del tejido total. Un valor bajo para este índice refiere que se ha realizado un esfuerzo biológico mayor, ya sea como energía de mantenimiento bajo condiciones ambientales estresantes o enfermedad, o bien por la producción y liberación de gametos. De esta manera, el índice de condición PS tejidos / PS valvas proporciona información significativa respecto al

estado fisiológico del organismo, y constituye muy probablemente el mejor índice de condición asequible en bivalvos (Lucas y Beninger, 1985).

Al respecto, Nicholson (1999) señala que los individuos de *Perna viridis* provenientes de sitios contaminados presentaron menores índices de condición relacionados con una reducción en la estabilidad lisosomal de los hemocitos, en comparación con aquellos colectados en sitios de referencia más limpios. El autor plantea que el índice de condición es una respuesta de condición tisular que integra la patología y disfunción lisosomales con la fisiología de los divertículos digestivos, y establece enlaces funcionales entre biomarcadores celulares y fisiológicos.

2.4.2.4. Relación atómica oxígeno-nitrógeno.

La utilización de las reservas de nutrientes de un organismo es una respuesta general al estrés, originada por la necesidad de satisfacer un requerimiento metabólico superior al normal. En casos extremos, este fenómeno puede medirse en términos de la disminución de las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas, pero usualmente es recomendable recurrir a un índice más sensible que refleje las alteraciones del balance entre el catabolismo de carbohidratos, el de lípidos y el de proteínas (Bayne, 1973; Widdows, 1993).

En organismos amoniotélicos como los bivalvos, La relación atómica oxígeno:nitrógeno (O:N) se define como la relación, en equivalentes atómicos, del oxígeno consumido respecto al N-amonio excretado. Ambas respuestas fisiológicas son componentes del balance energético y señalan la utilización relativa de proteínas en el metabolismo energético. Una tasa alta de catabolización de proteínas respecto a la de lípidos y carbohidratos resulta en una baja relación O:N, la que generalmente indica condiciones de estrés. En consecuencia, un valor alto de O:N refiere predominio del catabolismo de carbohidratos y lípidos sobre la degradación de proteínas. El valor teórico para la relación O:N con catabolismo exclusivamente proteico es 7 (Mayzaud y Conover, 1988).

Dependiendo del nivel trófico y de sus reservas naturales, se presentan diferencias inter- e intra- específicas en la relación O:N de organismos no estresados. Así, la interpretación de O:N debe estar basada en los cambios relativos más que en valores absolutos. Para *M. edulis*, un valor mayor de 50 refiere a un mejillón sano metabolizando pocas proteínas, con una alta tasa de catabolismo de carbohidratos (Lucas y Beninger, 1985). Valores iguales o menores que

30 significan una tasa elevada de catabolización de proteínas, generalmente asociado a una condición de estrés (Widdows, 1993). Se ha observado que mejillones de la especie *Perna viridis*, tras 2 semanas de exposición a Cu y Hg, muestran valores significativamente reducidos en la relación O:N (10.1, 4.6) respecto al grupo control (68.6) como consecuencia del incremento en las tasas de consumo de oxígeno y de excreción nitrogenada (Krishnakumar *et al.*, 1990).

2.4.2.5. Campo de crecimiento

La tasa de crecimiento es una medida fundamental de adecuación y desempeño, y proporciona una de las más sensibles evaluaciones de estrés en un organismo. Sin embargo, el crecimiento en los bivalvos es difícil de cuantificar e interpretar, particularmente respecto a la contaminación ambiental, debido a la falta de correlación entre la valva y otros componentes de crecimiento (somático o gonadal, por ejemplo) así como a la dificultad para separar los “efectos nutricionales” de los “efectos por contaminación” (Lucas y Beninger, 1985; Widdows, 1993). Muchos de estos inconvenientes pueden superarse al determinar la energía disponible para crecimiento y reproducción (llamado campo de crecimiento *P*, o scope for growth, SFG, por sus siglas en inglés), basándose en el análisis fisiológico del balance energético (Widdows, 1993; Navarro *et al.*, 1991; Toro *et al.*, 2003). Se ha comprobado que en los bivalvos, este biomarcador resulta particularmente valioso en la evaluación de los efectos biológicos de la contaminación, especialmente en combinación con el análisis de contaminantes químicos en los tejidos de los organismos.

El balance energético de un animal representa una integración de las respuestas fisiológicas básicas como la alimentación, la asimilación del alimento, la respiración, la excreción y la producción de tejido (somático o gonádico). Cada uno de estos componentes puede convertirse en equivalentes energéticos (joules/h) y permitir cuantificar el balance energético de los organismos a través de la ecuación:

$$I = P + R + E + H$$

donde *I* = energía total ingerida por el alimento, *P* = producción total (valvas, tejido somático y gametos), *R* = energía canalizada al metabolismo respiratorio, *E* = energía perdida en excretas y la excreción nitrogenada, y *H* = pérdida energética en productos fecales. Dado que la

energía asimilada del alimento (A) es la diferencia entre la energía ingerida (I) y la perdida por las heces (F), $A = I - H$. La energía canalizada potencialmente a la producción, o campo de crecimiento, puede calcularse como:

$$P = A - (R + E)$$

Donde P (campo de crecimiento) se estima a partir de la diferencia entre la ganancia energética (energía asimilada, A), la canalizada al metabolismo respiratorio (R) y la perdida a través de los productos nitrogenados de excreción (E). El campo de crecimiento puede ir desde valores positivos máximos bajo condiciones óptimas, hasta valores negativos cuando el animal se encuentra severamente estresado y haciendo uso de sus reservas corporales (Widdows, 1993).

Este parámetro integrador fisiológico constituye una evaluación cuantitativa del estado energético de un molusco, y se ha utilizado ampliamente en la evaluación de efectos biológicos subletales producidos por contaminación en invertebrados marinos.

Con el fin de monitorear cambios en la calidad ambiental de la costa del Mar del Norte de Inglaterra, Widdows *et al.* (1995) evaluaron P así como las concentraciones de contaminantes en diferentes tejidos de *Mytilus edulis*. Estas determinaciones permitieron identificar algunos tóxicos importantes, de origen industrial y urbano, responsables de la perturbación inducida por la contaminación. La estimación de P en mejillones de esta misma especie en el Mar de Irlanda permitió asociar el decremento en el valor de este biomarcador con un incremento general de los contaminantes detectados en estos organismos. El estudio identificó varios sitios donde la reducción en P fue mucho mayor que la esperada de acuerdo al número de contaminantes analizados, señalando la presencia de “tóxicos desconocidos” (Widdows *et al.*, 2002).

Asimismo, la evaluación de la energía potencial para el crecimiento” en una especie nativa de nuestro país, *Mytilus californiensis*, permitió detectar diferencias significativas entre las épocas del año y también entre sitios de muestreo con diferentes grados de contaminación (Del Valle-Pignataro, 1987).

De la misma manera, Toro *et al* (2003) obtuvieron una correlación negativa entre el campo de crecimiento de diferentes poblaciones de *Choromytilus. chorus* colectados en sitios con

diferentes grados de contaminación en la costa chilena y la concentración de HPAs y plaguicidas organoclorados bioacumulados.

De tal manera, los estudios efectuados en bivalvos tanto en el laboratorio como en el medio natural, denotan que la evaluación del campo de crecimiento como una respuesta global, provee no sólo una evaluación rápida e instantánea del estado energético del animal, reflejando la integración del efecto tóxico de los contaminantes evaluados, sino que permite vislumbrar los mecanismos de toxicidad subyacentes así como los componentes que modifican la tasa de crecimiento (Widdows, 2002; Toro *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN.

El presente proyecto de Investigación forma parte del proyecto PAPIIT (IN238704; DGAPA, UNAM), cuyo propósito fundamental fue la evaluación del efecto biológico de la contaminación en especies de importancia ecológica del sistema lagunar Estero de Urías, del Estado de Sinaloa, mediante el uso de biomarcadores de exposición y de efecto, e incluyó la evaluación de los grupos más relevantes de contaminantes antropogénicos en sistemas marinos, como son los HPAs, los metales y los plaguicidas tanto organoclorados como organofosforados, en agua, sedimentos y organismos seleccionados. El estudio, enmarcado en la propuesta de la evaluación de biomarcadores múltiples, pretende discernir las relaciones de causalidad entre los tóxicos y los efectos biológicos observados a diferentes niveles de organización biológica (sub-organismo y organismo) y su probable proyección a niveles de organización biológica más elevados. A su vez, se realizó en especies bentónicas dada su relación con los sedimentos, principales reservorios de los tóxicos en los sistemas lagunares-estuarinos. Particularmente las especies locales *Uca princeps* (crustáceo) y *Mytella strigata* (bivalvo) son de amplia distribución y abundancia en la zona (Salgado, 2003) y desempeñan un papel ecológico relevante en la dinámica de las comunidades bentónicas (Chávez y Carmona, 1999; Landa, 2003). Asimismo, representan dos grupos tróficos diferentes; *Uca princeps* es un organismo de hábitos omnívoros mientras que *Mytella strigata* es un organismo filtrador con una tasa de biotransformación relativamente baja, la cual caracteriza a los bivalvos, y por ende puede ser considerado un bioindicador clave de tóxicos persistentes (Galloway *et al.*, 2002b).

Dada la magnitud del proyecto general referido, el presente Proyecto de Tesis de Maestría abordó la evaluación de los efectos biológicos producidos a nivel bioquímico y fisiológico por la exposición a hidrocarburos poliaromáticos relevantes en Estero de Urías, durante la temporada de secas. Para este fin se utilizaron biomarcadores de exposición y de efecto en poblaciones locales del bivalvo *Mytella strigata*.

Con frecuencia se plantea que en sistemas costeros la temporada de lluvias involucra un mayor aporte de tóxicos de origen continental, provenientes del escurrimiento de la cuenca. Sin embargo, de acuerdo a las características del sistema de estudio, se propone la evaluación de hidrocarburos así como de las diferentes respuestas biológicas durante la temporada de secas.

Esta propuesta se basa en el criterio de que las principales fuentes de origen de hidrocarburos, detectadas durante la prospección del sitio, mantienen una actividad constante a lo largo del año. La actividad portuaria, los desechos del parque industrial, la termoeléctrica y el efluente doméstico sin tratar de la Ciudad de Mazatlán, vierten continuamente contaminantes al sistema. Además, durante la temporada de secas se registran valores extremos de salinidad y temperatura (Peraza-Vizcarra, 2000), y por ello se espera una probable mayor concentración de los tóxicos en este sistema lagunar-estuarino. De manera adicional, si bien la reproducción de *Mytella strigata* ocurre a lo largo de todo el año, se reportan picos reproductivos en abril, durante la temporada de secas (Leal-Tarín, 2007). Así, la demanda energética en esta época climática derivada de la elevada actividad metabólica del organismo en esta fase de su ciclo de vida, incide sustancialmente en su capacidad de compensar el estrés externo.

Cabe destacar que en el presente trabajo de investigación se efectúa un estudio espacial en el que se abordan diferentes escenarios de exposición a los HPAs en las poblaciones locales de *M. strigata*, considerando fuentes y aportes de los tóxicos así como características hidrodinámicas particulares de los sitios (ver Área de estudio) que influyen el comportamiento tanto de la biota como de los contaminantes de estudio.

De esta manera, la evaluación en *Mytella strigata* de los diferentes biomarcadores de exposición y de efecto durante la temporada de secas, en conjunción con la cuantificación de los HPAs en las matrices ambientales bajo estudio (agua, sedimento y bivalvos) permitirá profundizar sobre la capacidad de respuesta de la especie al estrés impuesto por los tóxicos ambientales, a la vez que permitirá valorar su potencialidad como biomonitor de la contaminación por xenobióticos, particularmente de HPAs en sistemas lagunares estuarinos. La aportación generada puede aportar herramientas útiles que pueden ser integradas en programas de monitoreo ambiental así como en estudios de evaluación de riesgo ambiental en sistemas costeros.

4. HIPÓTESIS

- De acuerdo a los diferentes escenarios de exposición, se esperan encontrar diferencias cuantitativas en las concentraciones de los HPAs en las matrices ambientales estudiadas (agua, sedimento y organismos) entre los diferentes sitios de muestreo seleccionados en el Estero de Urías.
- Dado que se ha demostrado en diferentes especies de bivalvos que la actividad de la 7-etoxioresufin O-deetilasa (actividad EROD) es un biomarcador que refleja la relativa especificidad de la acción tóxica de contaminantes orgánicos, entre ellos los HPAs, se espera detectar en el mejillón *Mytella strigata* relaciones de causalidad entre los HPAs bioacumulados y la respuesta biológica evaluada. Así, se plantea una mayor inhibición en la actividad EROD en los organismos que presentan una mayor concentración de HPAs.
- Las alteraciones biológicas por efecto de los tóxicos ambientales son consecuencia en última instancia del deterioro de los procesos bioquímicos y celulares, los cuales se expresan de manera global a nivel fisiológico y conductual. Tales alteraciones se han relacionado con el nivel de los xenobióticos en el medio externo y en los organismos. De tal manera se esperan encontrar relaciones de causalidad entre la concentración de los contaminantes en el medio externo y en los organismos, con los efectos biológicos producidos a nivel bioquímico y fisiológico. De manera particular, se espera encontrar relaciones de causalidad entre el campo de crecimiento en los bivalvos como integrador de los procesos energéticos en los organismos y los HPAs bioacumulados.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Determinar el potencial efecto tóxico de los hidrocarburos poliaromáticos en el bivalvo residente en el Estero de Urías, *Mytella strigata*, a través de biomarcadores de exposición y de efecto durante la temporada de secas.

Objetivos particulares:

1. Cuantificar las concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos en dicho sistema lagunar, tanto en el medio externo (sedimento y agua) como en los organismos de estudio, bajo tres escenarios de exposición diferentes y establecer las probables relaciones entre los niveles de HPAs en las matrices ambientales analizadas.
2. Determinar la afectación biológica en *M. strigata* ocasionada por hidrocarburos poliaromáticos presentes en el Estero de Urías, mediante la evaluación de diferentes respuestas biológicas consideradas como biomarcadores de exposición (actividad EROD) y de efecto (concentraciones de proteínas solubles en hemolinfa y en músculo, estabilidad lisosomal, índice de condición, balance hídrico, consumo de oxígeno, excreción nitrogenada, relación O:N, tasa de aclaramiento y campo de crecimiento).
3. Establecer relaciones de causalidad en *M. strigata* considerando la concentración externa de los HPAs, la bioacumulación y los efectos biológicos observados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Área de estudio.

En la parte sur del Estado de Sinaloa, en la costa del Pacífico mexicano, se localiza el Puerto de Mazatlán. Este Puerto se ubica en las márgenes del Estero de Urías, el cual representa uno de los sistemas estuarino-lagunares más extensos de esta región, con profundidades someras (1-10 m) y un área de 800 Ha, presentando una morfología típicamente lagunar (Lankford, 1977) (Fig.4).

De acuerdo a la clasificación de Lagunas Costeras de México, se considera del Tipo III B (III A), es decir, una laguna costera con barrera de plataforma interna, en la cual los ejes de orientación son paralelos a la línea de costa (Lankford, 1977). De acuerdo a la clasificación de estuarios (Pritchard, 1967), puede considerarse como un estuario negativo o antiestuario, debido a que la entrada de agua dulce al sistema fue drásticamente reducida con motivo del aislamiento del Río Presidio por procesos naturales de azolvamiento y la construcción del Aeropuerto Internacional de Mazatlán (Montaño-Ley y Páez-Osuna, 1990).

6.1.1. Meteorología.

El régimen de clima de la región es tropical y subtropical, lluvioso en verano con una temporada de sequía muy marcada (García, 1988). La época de lluvias se presenta de julio a octubre y la temporada de secas de noviembre a junio (García, 1988); frecuentemente se presentan a finales de verano huracanes y tormentas tropicales, con índice promedio anual de evaporación, durante este período, de 2146.8 mm (Dirección de Estadísticas y Estudios Económicos, 1985).

Sobre la planicie costera se manifiesta un clima semi-cálido, semi-seco. En Mazatlán la temperatura media anual en el periodo 1986-2004 fue de 24.5 °C, y la precipitación total anual fue de 840.9 mm (INEGI, 2005).

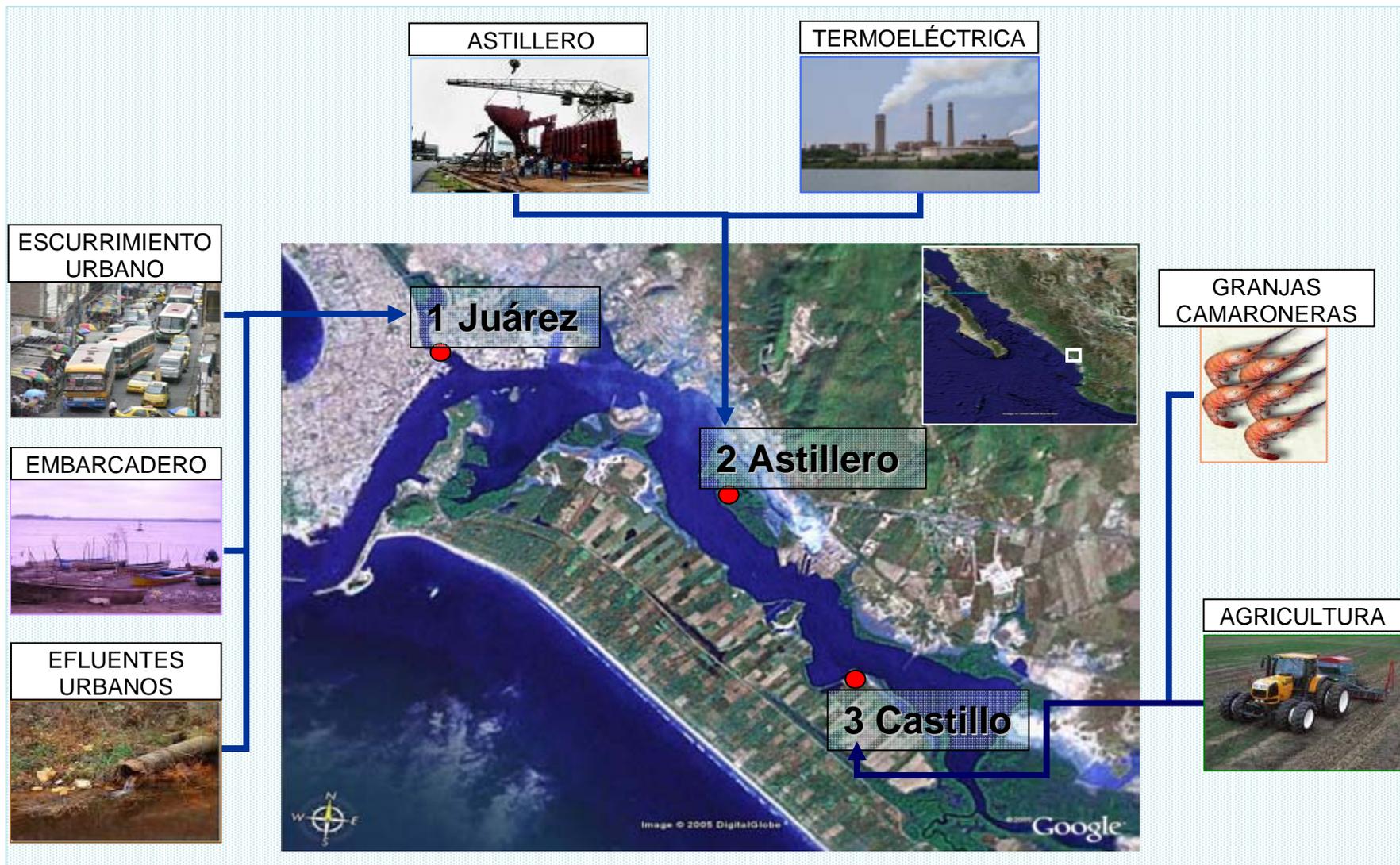


Fig. 4. Localización del Estero de Urías en Mazatlán, Sinaloa, y ubicación de las estaciones de muestreo: Estación 1: Puente Juárez ($23^{\circ} 12' 33''$ N, $106^{\circ} 24' 27''$ W); Estación 2: Astillero ($23^{\circ} 11' 23''$ N, $106^{\circ} 21' 40''$ W); Estación 3: El Castillo ($23^{\circ} 10' 13''$ N, $106^{\circ} 20' 24''$ W). Se muestran las principales fuentes de contaminantes por sitio. Fotografías satelitales tomadas de Google Earth© (2005).

6.1.2. Parámetros fisicoquímicos.

De acuerdo a Peraza-Vizcarra (2000), la temperatura del agua en el sistema mantiene una relación estrecha con la temperatura del ambiente, alcanzando valores mínimos de 19 a 23 °C de febrero a mayo, y máximos de 29 a 32 °C durante los meses de junio a noviembre. La temperatura del agua, por lo general, aumenta de la boca a la cabecera del Estero de Urías, con un gradiente térmico longitudinal de 0.3 a 5 °C. El sistema se caracteriza por tener un cuerpo de agua bien mezclado, con salinidad superior a la del mar durante la mayor parte del año. En años de precipitaciones normales, la salinidad en la boca alcanza desde 32 ‰ en septiembre, hasta 37 ‰ en junio, antes del inicio de las lluvias. En la cabecera del sistema la variación de la salinidad es mayor; durante los meses de estiaje se presentan salinidades arriba de 38 ‰ debido al efecto de la evaporación y a la baja profundidad. En época de lluvias se registran salinidades menores a 30 ‰ debido al aporte de agua de un complejo sistema de esteros: Pichichines, Confite, Barrón y del Caimán, situados en la parte meridional del sistema. La salinidad del agua de fondo tiene muy pocas variaciones con respecto a la de la superficie, manteniéndose diferencias máximas de 0.3 ‰ (Alvarez-León, 1977; Heredia *et al.*, 1988).

Por lo general, existe en el sistema un gradiente de salinidad positivo de la boca a la cabecera, que varía entre 1-6.5 ‰, registrándose el gradiente máximo al final del estiaje. Solamente bajo condiciones prolongadas de precipitación alta en la zona, la salinidad aumenta de la cabecera a la boca, y el sistema se comporta de acuerdo a la clasificación de Pritchard (1952), como un estuario positivo; sin embargo, de acuerdo a esa misma clasificación, el Estero de Urías funciona la mayor parte del año como un estuario negativo o antiestuario, ya que presenta salinidades más elevadas en la cabecera que en la boca del sistema (Villalba, 1986; Peraza-Vizcarra, 2003).

La densidad del agua tiende a aumentar durante los meses finales del estiaje, de la parte media a la cabecera del estero, debido fundamentalmente a los valores altos de salinidad que prevalecen en esta zona. Estos gradientes horizontales de densidad deben inducir corrientes de tipo baroclínico de la cabecera a la parte media del sistema (Peraza-Vizcarra, 2000).

6.1.3. Dinámica de agua y sedimentos.

En el Estero de Urías, la marea oceánica gobierna la dinámica de las aguas. En la pleamar el agua oceánica fluye hacia el estero a través de la sección transversal ubicada entre las dos escolleras del puerto, mientras que en la bajamar el flujo se invierte debido al descenso del nivel de la marea del océano (Montaño-Ley y Páez-Osuna, 1990). Villalba (1986) reporta velocidades de 20 cm/seg en la cabecera del Estero de Urías, las que resultan bajas pero explicables debido a que en la cabecera del sistema las corrientes son débiles (Montaño-Ley y Páez-Osuna, 1990).

Los procesos de transporte de sedimentos en la laguna costera de Urías están modulados por la marea oceánica astronómica, la geometría de la laguna y el aporte de sedimentos. La energía disponible para transporte de sedimentos la proporciona la marea, la que genera corrientes superficiales de más de 70 cm/seg en la entrada de la laguna (Montaño-Ley *et al.*, 2000).

La concentración de sedimentos suspendidos a lo largo del eje de la laguna, muestra valores máximos de 19.9 mg/l en la cabecera y disminuye hacia la boca, donde se presenta una concentración de 3.2 mg/l. Esta distribución puede explicarse como resultado del escurrimiento de las áreas marginales y de las diferentes corrientes de marea, así como de las condiciones de oleaje entre la boca y la cabecera de la laguna, donde la baja profundidad favorece el aumento en la turbidez (Montaño-Ley *et al.*, 2000).

La dispersión y distribución de contaminantes en el Estero de Urías dependen de las tasas y vías de circulación de agua y de transporte de sedimentos, más que de otros agentes físicos. Dado que los sedimentos actúan como reservorios, los sitios con mayores concentraciones de sedimentos pueden considerarse susceptibles a la contaminación. Específicamente en la cabecera de la laguna, es difícil que el sedimento sea removido por las corrientes de marea. En contraste, en el canal principal la velocidad de la marea excedió 70 cm/seg, y las tasas de transporte de sedimento llegan a 0.26 kg/m/s, por lo que resulta un conducto natural para el agua y el sedimento, y con ello el mejor mecanismo para expulsar los contaminantes asociados al material suspendido (Montaño-Ley *et al.*, 2000).

El sistema de Urías tiene buena capacidad de renovación de sus aguas. Villalba (1986), Páez Osuna *et al.* (1990) y Peraza-Vizcarra (2001) estimaron para el cuerpo principal del sistema un

tiempo de recambio hidrodinámico del orden de 2 a 7.5 días. Esto permite que la mayoría de las aguas negras, los desechos industriales, las aguas sobrecalentadas y de sentina, sean reemplazadas en un período corto. Sin embargo, en las áreas tranquilas como canales meándricos, marismas, zonas de manglares y muelles, se acumula una cantidad apreciable de materiales y contaminantes vertidos al Estero de Urías, representando potencialmente un peligro para la biota del sistema (Osuna-López *et al.*, 1986).

Por otra parte, el proceso de sedimentación natural ha sido acelerado por el crecimiento poblacional en la ribera del sistema y el incremento de infraestructura industrial y portuaria, ya que en la mayoría de estos casos se destruyen las zonas de manglar, las cuales retienen sedimentos en las orillas del estero; aunado a lo anterior, en el año de 1987 se inició la construcción de un tapo para una mejor explotación del camarón que indudablemente repercutirá en la dinámica sedimentaria del sistema, conduciendo al azolve de esteros como es el caso de El Infiernillo (Montaño-Ley *et al.*, 2000). En cuanto a los sustratos sedimentarios, varían desde fangosos y limo-arenosos hasta arenas, siendo los sedimentos arenosos los que predominan en el canal de navegación el cual periódicamente es dragado (Osuna-López *et al.*, 1986).

6.1.4. Productividad.

El Estero de Urías tiene una tasa de productividad primaria elevada comparada con otros ecosistemas similares. Su productividad neta diaria es del orden de 2.36 g C/m³/d equivalente a un valor anual de 0.86 kg C/m³/año. Con una distribución estacional bimodal, con máximos en primavera-verano (5.34 g C/m³/d) y mínimos en invierno (0.1 g C/m³/d) (Robles, 1985). La elevada productividad de esta laguna puede atribuirse al exceso de material orgánico de origen antropogénico que recibe, conduciendo a niveles elevados de nutrientes durante la remineralización de la materia orgánica. Ello favorece la productividad primaria de una amplia diversidad de especies fitoplanctónicas estuarino-lagunares y marinas, predominando diatomeas y dinoflagelados (Priego, 1985), así como de macroalgas bentónicas en las que predominan *Rhizoclonicem sp*, *Hydrocoleumsp*, y *Chaetomorpha sp* (Alvarez-León, 1980).

6.2. Estaciones de muestreo.

Con base en una prospección del sistema así como en la bibliografía referente a este sistema lagunar (Osuna-López *et al.*, 1990; Páez-Osuna *et al.*, 2002; Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000; Frías-Espericueta *et al.*, 1999; Szefer *et al.*, 1998), se definieron tres estaciones de muestreo. Para la ubicación de éstas se consideraron la presencia de poblaciones de mejillones y su ubicación respecto a fuentes puntuales y no puntuales de diferentes contaminantes con probables emisiones de HPAs (Tabla 3).

Tabla 3. Aportes de contaminantes en las diferentes estaciones de muestreo en el Estero de Urías.

Sitio	Fuente de emisión	Contaminantes
Juárez	Efluentes y escurrimientos urbanos (6)	HPAs (3), Metales (6), Plaguicidas (7), Nitrógeno, Fósforo (8), MO (1), microbiológicos (8).
	Enlatadoras de productos pesqueros y procesadoras de alimentos	MO (1), grasas y aceites, HPAs (3), Metales (6)
	Instalaciones de PEMEX	Hidrocarburos diversos (3), Metales (6)
	Embarcaciones pesqueras y turísticas (3)	HPA (3), Metales
Astillero	“Cementerio” de embarcaciones	Metales
	Mantenimiento de barcos	Metales (6), biocidas, HPA (3)
	Termoeléctrica (5)	HPAs (3), Metales, Biocidas, Agua sobrecalentada (3)
El Castillo	Acuicultura (4, 5)	Antibióticos (6), Nitrógeno y Fósforo (8), MO (1), Hidrocarburos (3)
	Agricultura (5)	Plaguicidas (7), Metales (8), Nitrógeno y Fósforo (8)
	Termoeléctrica (5)	HPAs (3), Biocidas, Agua sobrecalentada (3), Metales (6).

(1) Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990; (2) Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000; (3) Álvarez, 1980; (4) Hernández-Cornejo y Ruiz-Luna, 2000; (5): Ruiz-Luna y Berlanga-Robles, 2003; (6) Soto-Jiménez y Páez-Osuna, 2001 (7) Galindo *et al.*, 1992; (8) Páez-Osuna *et al.*, 1998.

Estación 1 (23° 12' 33'' N, 106° 24' 27'' W): “Puente Juárez”. Se ubica en el Estero de Infiernillo y recibe directamente efluentes domésticos no tratados, así como derrames de combustible derivados de la actividad de los pescadores en el embarcadero y de aportes urbanos. La población de mejillones se localiza en la base de la estructura del Puente Juárez.

Estación 2 (23° 11' 23'' N, 106° 21' 40'' W): “Astillero”. Probablemente se encuentra contaminado por metales pesados provenientes de la pintura utilizada en el mantenimiento de

los barcos, así como por derrames de combustibles fósiles. Las poblaciones de mejillones se localizan sobre las estructuras sumergidas de los barcos.

Estación 3 (23° 10' 13'' N, 106° 20' 24'' W): “El Castillo”. Se localiza hacia la cabecera del sistema lagunar en el área localmente conocida como “La Sirena”. En este sitio se ha observado la presencia de un creciente número de granjas camaroneras, las que potencialmente emiten compuestos nitrogenados, fertilizantes, antibióticos y hormonas al sistema, aunado a los aportes de combustible utilizado en el bombeo de agua a los estanques de cultivo. Los mejillones se encuentran formando nidos bisales sobre las raíces de los mangles.

6.3. Colecta de organismos.

Los estudios se realizaron en la especie local *Mytella strigata* (Mollusca: Bivalvia) de amplia distribución y abundancia en la zona (Salgado, 2003) y que desempeña un papel ecológico relevante en la dinámica de las comunidades bentónicas (Chávez y Carmona, 1999; Landa, 2003). *Mytella strigata* es un organismo filtrador y aunado a su relativamente baja tasa de biotransformación puede ser considerado un bioindicador clave de tóxicos persistentes (Galloway *et al.*, 2002).

Los muestreos en las diferentes estaciones (Puente Juárez, Astillero y El Castillo) se realizaron los días 6, 7 y 8 de mayo de 2005, respectivamente, durante la temporada de secas. Todos los organismos fueron colectados durante la marea baja, con la finalidad de facilitar el acceso a los mismos, así como disminuir el estrés inducido por la captura, considerando que durante la exposición aérea presentan un período de baja actividad (Widdows, 1993).

Los organismos se colectaron en la base de la estructura del puente en la estación 1, de los cascos de embarcaciones abandonadas en la estación 2 y de las raíces de mangle en la estación 3. En el sitio se realizó la inspección visual de mejillones pertenecientes a la especie *M. strigata* seleccionándose organismos mayores a 4 cm de longitud total de valvas, se cortaron cuidadosamente las fibras del biso y fueron transportados al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán, en un lapso máximo de 1 hora. Por estación se colectaron de 70 a 80 organismos y aproximadamente 40 l de agua (con el fin de utilizarla en las diferentes evaluaciones fisiológicas). Se destinaron 10 organismos para las evaluaciones

bioquímicas y celulares, 18 para las determinaciones fisiológicas y el resto para la cuantificación de HPAs.

6.4. Cuantificación de HPAs.

6.4.1. Trabajo de campo.

En cada estación de muestreo, se realizó el geoposicionamiento (*Magellan, Meridian Gold*), se determinaron la salinidad y la temperatura (*YSI 30*), el oxígeno disuelto (oxímetro *YSI 54A*) y el pH (*Hanna Instruments HI 8314*) de una muestra de agua obtenida a profundidad media con una botella van Dorn. Asimismo se colectaron muestras de agua y de sedimentos para la determinación de hidrocarburos poliaromáticos. Para la obtención del sedimento se usó una draga de caja tipo Eckman, de acero inoxidable, cuidando de no alterar la disposición original del sedimento; se determinó el pH del sedimento (*Kelway, HB-2*). De la parte media de la muestra de sedimento obtenido, las submuestras destinadas al análisis de hidrocarburos poliaromáticos se colocaron en frascos de vidrio de 500 ml pre-lavados con hexano. El agua para el análisis de hidrocarburos se colectó en un recipiente de 1 galón de capacidad, con volumen al ras previamente registrado. El recipiente se colocó en el extremo de la lancha orientado en contra de la corriente, para evitar su contaminación con el motor de la misma. Se sumergió de 30 a 50 cm y de manera tangencial se colectó el agua del sitio a evaluar. Se retiraron 100 ml y se conservaron en un vaso de precipitados; se agregaron 50 ml de n-hexano grado espectroscópico (*Uvasol-Merck*), y se agitó vigorosamente la muestra acuosa durante 5 min; con una pipeta volumétrica se extrajeron los hidrocarburos (50 ml) colocándolos en un frasco de vidrio ámbar; la operación se repitió, reuniendo al final 100 ml de extracto (*USEPA, 1990*). Todas las muestras se mantuvieron en hielo durante su traslado al laboratorio, donde se congelaron hasta el momento de su análisis.

Para la determinación de HPAs en los organismos de cada una de las estaciones, se removieron las valvas de una submuestra de los mejillones y se reunieron aproximadamente 40 g PH de tejido blando. Los valores de longitud de las valvas (cm) y peso húmedo (g PH) de los individuos de Puente Juárez, de Astillero y de Castillo fueron (promedio \pm error estándar, ES): 4.4 \pm 0.1 cm y 6.52 \pm 0.28 g PH; 4.18 \pm 0.17 cm y 6.32 \pm 0.23 g PH; 4.45 \pm 0.07 cm y 7.7 \pm 0.29 g PH, respectivamente. Los tejidos se envolvieron en papel aluminio nuevo y se

guardaron en bolsas de polietileno, las que se introdujeron en nitrógeno líquido y posteriormente se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

La determinación de los hidrocarburos aromáticos se realizó en el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. La determinación de HPAs en las muestras de agua se realizó de acuerdo a los métodos estandarizados reportados por UNESCO (1976) y USEPA (1990), mientras que los sedimentos y tejidos se analizaron siguiendo los métodos señalados por UNEP/IOAC/IAEA (1992) y UNEP/IAEA/FAI/IOC (1993), respectivamente.

6.4.2. Trabajo de laboratorio.

Análisis de agua. Se descongelaron los extractos hexánicos a temperatura ambiente, se midió el volumen real del mismo y se concentró en un rotoevaporador ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 40 psi) bajo corriente de N_2 . Para analizar la concentración de HPA totales, el extracto hexánico se analizó por espectrofotometría con referencia al criseno. Para cuantificar separadamente los HAP y los alifáticos por cromatografía de gases (CG), el extracto se purificó y se fraccionó, de la forma siguiente:

Para la limpieza del extracto se utilizaron columnas de adsorción de vidrio de 2 cm de diámetro interno x 30 cm de longitud. Se empacaron en el siguiente orden: fibra de vidrio + hexano + 5 g de sílica (en hexano) + 10 g de alúmina (en hexano) + sulfato de sodio anhidro + hexano. La sílica y la alúmina se activaron a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h y se desactivaron al 5 % peso/peso con agua tridestilada. Se añadió la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur o directamente del matraz; se dieron varios enjuagues al matraz de balón (3-5 con hexano) y se agregaron 20 ml de hexano para obtener la fracción 1 (hidrocarburos alifáticos) colectándolos en un matraz de balón de 50 mL. La fracción 2 (HPAs) se obtuvo eluyendo con 20 ml de una mezcla hexano : diclorometano (8:2) + 20 ml de una mezcla hexano : diclorometano (50:50) y se colectó en un matraz de balón de 125 ml.

Las dos fracciones se concentraron en un rotoevaporador hasta 2-5 ml y se trasvasaron a viales, utilizando nitrógeno de alta pureza para llevar a sequedad los mismos. Se dieron 3 a 4 enjuagues a los matraces de balón que contenían las fracciones 1 y 2 con los disolventes respectivos.

Las muestras se analizaron por cromatografía de gases capilar de alta resolución (CG-FID).

Análisis de sedimentos. El sedimento húmedo se secó a 40-50 °C, se maceró en un mortero mecánico de ágata y se tamizó a través de una malla de 250 µm. Se tomó una submuestra de 5 g PS del sedimento tamizado para realizar la extracción en un equipo Soxhlet, utilizando un disco de papel filtro Whatman No. 2, previamente lavado. Se agregaron 250 ml de una mezcla de hexano : diclorometano (50:50) al matraz de balón de 500 ml y se realizó la extracción durante 8 h con ciclos de sifón de 10 min. Posteriormente se concentró el extracto proveniente de la etapa anterior en un rotoevaporador hasta obtener un volumen de 5-8 ml. La temperatura del baño fue menor a 40 °C y la presión de la bomba de vacío fue de 40 psi.

El extracto concentrado se limpió en columnas de adsorción de vidrio de 2 cm de diámetro interno por 30 cm de longitud. Se empaclaron en el siguiente orden: fibra de vidrio + hexano + 5 g de sílica (en hexano) + 10 g de alúmina (en hexano) + sulfato de sodio anhidro + hexano. La sílica y la alúmina se activaron a 200 °C durante 4 h y se desactivaron al 5 % peso/peso con agua tridestilada. Se añadió la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur o directamente del matraz; se dieron varios enjuagues al matraz de balón (3-5 con hexano), se agregaron 20 ml de hexano para obtener la fracción 1 (hidrocarburos alifáticos) colectándolos en un matraz de balón de 50 mL. La fracción 2 (HPAs) se obtuvieron eluyendo con 20 mL de una mezcla hexano : diclorometano (8:2) + 20 ml de una mezcla hexano : diclorometano (50:50) y se colectaron en un matraz de balón de 125 ml.

Posteriormente se concentraron las 2 fracciones en un rotoevaporador hasta un volumen de 2-5 mL. Se trasvasaron a viales y se llevaron a sequedad con nitrógeno de alta pureza. Se hicieron 3-4 enjuagues a los matraces de balón que contenían las fracciones 1 y 2 con los disolventes respectivos.

Las muestras se analizaron por Cromatografía de Gases (FID) Capilar de Alta Resolución con “fit” para HPAs.

Análisis de tejidos. Las muestras se secaron y homogenizaron de la misma manera descrita para los sedimentos. Se tomaron alícuotas de 3-5 g PS y se colocaron en el extractor Soxhlet usando como soporte un papel filtro. Se agregaron 250 ml de metanol en un matraz de balón de 500 ml y se dejó correr la extracción por 8 horas para después añadir 20 ml de KOH 0.7 M + 30 ml de agua tridestilada al matraz de balón y dejar por 2 horas más. El extracto de la

muestra se colocó en embudos de separación de 500 ml o de 1 l. Se enjuagó varias veces el matraz de balón para evitar pérdidas y se añadieron 90 ml de hexano. Se agitó y se esperó a que se formaran dos fases para colectar en un matraz de balón de 250 ml la fase hexánica (superior); la fase de potasa metanólica se regresó al matraz y nuevamente se realizaron dos extracciones sucesivas con 50 ml de hexano cada una. Al final se filtró con fibra de vidrio y Na_2SO_4 la porción hexánica en el embudo.

La fase hexánica se concentró en un rotoevaporador hasta aproximadamente 5 ml. La temperatura del baño se mantuvo inferior a 40 °C y la presión de la bomba de vacío a 40 psi. Para la limpieza del extracto se utilizaron columnas de 2 cm de diámetro interno por 30 cm de longitud, que fueron empacadas en el siguiente orden: fibra de vidrio + hexano + 5g sílica (en hexano) + 10g alúmina (en hexano) + sulfato de sodio + hexano. La sílica y la alúmina se activaron a 200 °C durante 4 horas y se desactivaron al 5 % en peso. Se añadió la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur y se dieron varios enjuagues al matraz de balón con hexano; se agregaron 20 ml de hexano como eluyente y se estableció un goteo lento para una buena separación. La fracción 1 con los hidrocarburos alifáticos, parafinas o saturados se colectó en un matraz de balón de 50 ml. Se agregaron 30 ml de una mezcla hexano : cloruro de metileno (9:1) y se formó la fracción 2 que contiene los hidrocarburos no saturados y aromáticos, que se colectó en un matraz de balón de 50 ml.

Posteriormente se concentraron las dos fracciones en un rotoevaporador hasta un volumen de 5 ml y se trasvasaron a viales, utilizando nitrógeno para llevar a sequedad los viales y dar varios enjuagues a los matraces de balón que contenían las fracciones (F1 con Hexano y F2 con la mezcla 9:1 hexano : cloruro de metileno).

Las muestras se analizaron por Cromatografía de Gases (FID) Capilar de alta Resolución.

Como control de calidad se incluyó el análisis de blanco de reactivos (1 por cada 5 muestras problema), materiales de referencia, duplicados de laboratorio, blancos fortificados, curvas de calibración, así como mediciones con estándares internos y/o deuterados.

Todos los reactivos utilizados en las determinaciones de HPAs en las matrices ambientales y en los análisis de las respuestas biológicas fueron de grado analítico (Merck; Sigma). Asimismo, se utilizó como estándar una mezcla de 16 HPAs (*Chemical Service, Inc.*),

catalogados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) (Tabla 1).

Cálculo de los índices moleculares de los sedimentos. Los índices moleculares se calcularon de acuerdo a Yunker *et al.* (2002), efectuando los cálculos aritméticos correspondientes a partir de las concentraciones de los HPAs individuales, que se determinaron en los sedimentos de las estaciones de estudio ($\mu\text{g} / \text{g PS}$). Los índices moleculares BaA228, Fl 228 y An 178, se calcularon a través de las operaciones $[\text{BaA}] \div ([\text{BaA}] + [\text{Chry}])$; $[\text{Fl}] \div ([\text{Fl}] + [\text{Py}])$ y $[\text{An}] \div ([\text{An}] + [\text{Ph}])$, respectivamente. Los nombres completos de los compuestos son: BaA: benzo (a) antraceno; Chry: criseno; Fl: fluoranteno; Py: pireno; An: antraceno y Ph: fenantreno.

6.5. Respuestas Biológicas. Biomarcadores de exposición y de efecto.

Los organismos se trasladaron al laboratorio en recipientes con agua del medio, provistos con ramas de mangle para disminuir el estrés y la insolación de los mejillones. Por cada estación muestreada, en el laboratorio se seleccionaron alrededor de 30 organismos de talla homogénea para la evaluación de biomarcadores. 10 organismos se seleccionaron para la determinación de respuestas bioquímicas y celulares (actividad EROD, estabilidad lisosomal y concentración de proteínas solubles). El peso húmedo de estos organismos fue (promedio \pm ES): Puente Juárez 7.84 ± 0.26 g, Astillero 7.98 ± 0.25 g y Castillo 8.72 ± 0.21 g. Para las evaluaciones fisiológicas (tasa de aclaramiento, respiración, excreción nitrogenada, eficiencia de asimilación) se utilizaron 18 organismos de cada sitio de muestreo, con valores de longitud de las valvas y de peso húmedo correspondientes a (promedio \pm ES): 4.76 ± 0.063 cm y 7.36 ± 0.13 g; 4.78 ± 0.039 cm y 7.96 ± 0.275 g; 4.71 ± 0.02 cm y 8.19 ± 0.22 g para Puente Juárez, Astillero y Castillo respectivamente.

Las muestras de tejidos necesarias para las evaluaciones bioquímicas y celulares fueron obtenidas inmediatamente después de la llegada de los organismos al laboratorio. En primer término se extrajo hemolinfa del músculo abductor posterior de cada ejemplar, utilizando tijeras de disección para mantener las valvas abiertas y permitir la inserción de la aguja. La hemolinfa se colectó en jeringas tipo tuberculina de 1 ml previamente cebadas con solución fisiológica para bivalvos (Hepes 0.18 M, NaCl 0.43 M, MgSO₄ 0.11 M, KCl 0.01 M, CaCl₂ 0.013 M, pH 7.3; Cohen, 1997) y se transfirió a tubos Eppendorf. Durante todo el

procedimiento se mantuvieron en hielo tanto el material como las muestras de hemolinfa. Al terminar la extracción de hemolinfa de los organismos, inmediatamente se procedió a la determinación de la estabilidad lisosomal y del contenido proteínico de estas muestras.

Después de extraer la hemolinfa los organismos, fueron disectados, se colocaron sobre placas de hielo y los tejidos se bañaron continuamente con solución de lavado (sacarosa 0.5 M y EDTA). Se disectó el músculo abductor posterior para determinar su concentración de proteínas solubles, y la glándula digestiva para la evaluación de la actividad EROD y de la concentración de proteínas correspondiente. Los tejidos se depositaron individualmente en tubos Eppendorf. En el caso de la glándula digestiva, como solución protectora se adicionaron 500 µl de solución de homogenado (Tris-HCl 10 mM, KCl 150mM, ditioneitol (DTT) 0.5 mM, Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 400 µM y sacarosa 0.5M; modificado de Fossi *et al.*, 1998 y Morcillo y Porte, 1997). Todos los tejidos se almacenaron en nitrógeno líquido de manera temporal y posteriormente se trasladaron a un ultracongelador *Revco* en la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias, donde permanecieron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

6.5.1. Biomarcadores de exposición.

6.5.1.1. Actividad EROD.

La inducción del Citocromo P450 se estimó indirectamente mediante la determinación de la actividad enzimática de la 7-etoxiresorufin O-deetilasa (EROD) (Adams, 1990). La evaluación se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se evaluó la actividad EROD en la glándula digestiva de 10 individuos de cada sitio de estudio, tejidos previamente conservados en ultracongelación (-80 °C). De acuerdo al procedimiento descrito por Burke y Mayer (1974) modificado por Burgeot *et al.* (1994), la actividad EROD se analizó en la fracción S9. Una vez descongeladas las glándulas digestivas se homogenizaron en grupos de 3, adicionando solución de homogenado en proporción 1:4 de tejido : solución. Se utilizó un pistilo de teflón *Glas-Col*. El homogenado se centrifugó dos veces consecutivas a 10000 g (9600 rpm) por 20 minutos, a 4°C (Centrífuga *Eppendorf 5417 R*). Se decantó el sobrenadante (fracción S9) y se mantuvo en frío hasta su análisis.

La actividad enzimática EROD se registró en un espectrofluorómetro para microplaca *Fluosorkan Ascent (FL, Labsystem)*, a una longitud de onda de 544 nm emisión y 590 nm excitación. Antes de la evaluación de la actividad EROD en las muestras de estudio, se realizó una curva patrón utilizando concentraciones conocidas de etoxiresorufin O-deetilasa (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9 nM de resorufin, en 300 μ l. Para evaluar la actividad de esta enzima en la glándula digestiva de *M. strigata* se colocaron 50 μ l de la fracción S9 de cada muestra en los pozos de las microplacas y se adicionaron 50 de 7-etoxiresorufin 2.2 μ M; inmediatamente se agitó y se realizaron las lecturas cada minuto por un lapso de 15 minutos. Inmediatamente después se adicionaron 10 μ l de NADPH (24 mM) y se efectuaron las lecturas cada minuto por 60 minutos.

A diferencia de lo observado en la el blanco reactivo, donde antes de adicionar el NADPH no se detecta la formación del producto de la reacción enzimática (resorufin), en las muestras de *M. strigata* se registró la formación de resorufin desde antes de adicionar el NADPH. Esto se atribuyó a la probable presencia de residuos de un donador de electrones en la fracción S9, lo que permitió la formación de resorufin aún sin la participación del NADPH. Para corregir este efecto, a la concentración de resorufin registrada en el minuto 1 después de la adición de NADPH, se le sustrajo el valor de resorufin determinado en el primer minuto después de haber adicionado la etoxiresorufin (en ausencia de NADPH). En cada una de las lecturas restantes, nuevamente se sustrajo el valor de resorufin determinado en ausencia de NADPH para el minuto correspondiente. Con los datos obtenidos se efectuó una regresión lineal, donde la pendiente de la recta refiere la cantidad de resorufin formado por unidad de tiempo (pmoles/min) (Fig. 5). Con el fin de expresar los resultados de la actividad enzimática como actividad específica (pmoles de resorufin / min / mg proteína), se aplicó la siguiente fórmula:

$$AE = m / (P*0.05)$$

Donde:

AE: actividad enzimática específica, pmol/min/mg proteína

m: pendiente de la recta (pmoles de resorufin/min)

P: concentración de proteína, mg/ml

0.05: factor de corrección de acuerdo al volumen de muestra utilizado (0.05 ml)

Con el objetivo de comprobar la reproducibilidad del método utilizado, se evaluó de manera paralela la actividad EROD en peces poecílidos de agua dulce (*Xiphophorus montezumae*) previamente expuestos por 24 h en acuarios con β -naftoflavona 1.5 μ M, la cual induce la

actividad del sistema P450. Las muestras obtenidas de los peces expuestos a este hidrocarburo se emplearon como control positivo durante la evaluación de las muestras de *M. strigata*.

La concentración de proteínas de las muestras fue evaluada mediante el *kit* de ensayo de proteínas *BIO-RAD*, basado en la técnica de Bradford (1976) y utilizando el método de microensayo (Sedmarck y Grossberg, 1977) en un lector de microplacas (*BioRad 550*) (ver acápite 6.5.2.2).

6.5.2. Biomarcadores de efecto.

6.5.2.1. Estabilidad Lisosomal.

Para valorar la estabilidad lisosomal de los hemocitos de la hemolinfa de *Mytella strigata* se utilizó el método de microplaca de rojo neutro acorde a los protocolos establecidos para bivalvos (Pipe *et al.*, 1995). El método evalúa la incorporación del colorante rojo neutro por los lisosomas, proceso que es alterado por los tóxicos ambientales. De manera global, el método se fundamenta en la capacidad de las células de retener el rojo neutro; de tal manera una mayor retención del colorante vital se relaciona con una mejor condición celular.

La hemolinfa de los mejillones se diluyó 1:1 con solución salina fisiológica para bivalvos (Hepes 0.18 M, NaCl 0.43 M, MgSO₄ 0.11 M, KCl 0.01 M, CaCl₂ 0.013 M, pH 7.3, Cohen, 1997). Se adicionaron 200 µl de esta muestra en las celdas de la microplaca, por triplicado (se utilizaron microplacas de fondo plano con superficie certificada *Nunclon Delta* para adhesión de células), considerando testigos negativos. En los testigos negativos se colocaron 100 µl de solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10% y Triton 1%, Pipe *et al.* 1995). Se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente por 1.5 h para permitir la adhesión de las células.

Posteriormente se desechó la solución de lisis y se adicionaron 200 µl de rojo neutro 0.004%, en el que las células se incubaron a 25 °C por 3h en oscuridad. Después se desechó el colorante y la microplaca se lavó con solución salina para bivalvos; entonces se adicionaron 200 µl de solución de ácido acético (ácido acético 1%, etanol 50%) para recuperar el rojo neutro retenido por los lisosomas, se cubrió y se dejó reaccionar por 10 min a 25 °C en condiciones de oscuridad. A continuación colocó la placa en el lector de microplaca, se agitó 9 segundos y se leyó a 540 nm. Al finalizar las lecturas se desechó el reactivo residual, tomando

10 µl de muestra homogenizada de cada pozo para determinar el contenido de proteínas mediante el *kit* de ensayo de proteínas *BIO-RAD*, basado en la técnica de Bradford (1976), utilizando el método de microensayo (Sedmark y Grossberg, 1977) en microplaca (Galgani y Bocquené, 1991).

Los resultados se expresaron en términos de densidad óptica (punto final del ensayo) por unidad de proteína de la hemolinfa (DO/mg/ml proteína).

6.5.2.2 Proteínas solubles totales.

La determinación de las proteínas solubles totales de la hemolinfa de cada ejemplar se analizó mediante el *kit* de ensayo de proteínas *BIO-RAD*, basado en la técnica de Bradford (1976), utilizando el método de microensayo (Sedmark y Grossberg, 1977) en microplaca (*Bio Rad 550*). Este análisis involucra la adición de una solución ácida del colorante de Azul Brillante de Coomassie (G-250), el cual cambia de un color café-rojizo a azul indicando la unión de la proteína al colorante, donde la intensidad del color azul es proporcional a la concentración de proteína de la muestra. Se colocaron 10 µl de hemolinfa de cada ejemplar en cada pozo de la microplaca y se adicionaron 200 µl de la solución *BIORAD*. Se agitó la microplaca para mezclar las muestras e inmediatamente después se leyeron en un lector de microplaca *Bio-Rad 550* a 595 nm. Los resultados se transformaron a mg proteína/ml hemolinfa a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

La concentración de proteína muscular se determinó en el músculo abductor posterior de los mejillones disectados. El tejido se homogenizó con solución de homogenado (Tris-HCl 0.1 M, sacarosa 0.25, pH 7.2) en una proporción 1:5 tejido : solución, a 2200 -2500 rpm por 2 min, utilizando un homogenizador *Polytron PT 1200*. El homogenado nuevamente se diluyó para obtener una proporción final de 1:10; se centrifugó a 10 000 g (9600 rpm) a 4 °C por 10 minutos y se decantó el sobrenadante, el cual se mantuvo en frío hasta su análisis. Estas muestras se procesaron de la misma manera que la hemolinfa, relacionando al final la concentración de proteína determinada con el peso húmedo del tejido utilizado (mg proteína/ g PH).

6.5.2.3. Campo de Crecimiento.

El Campo de Crecimiento (P) se estimó como la diferencia entre la energía asimilada del alimento (A) o tasa de asimilación, la energía invertida en el metabolismo respiratorio (R) y la energía perdida por la excreción de compuestos nitrogenados (Widdows, 1993), acorde a la ecuación del balance energético en el que cada parámetro se expresó en J/h/g PS:

$$P = A - (R + N)$$

Para evaluar las respuestas fisiológicas de los mejillones de cada sitio de estudio, se utilizaron dos sistemas de flujo de agua semicontinuo, regulado, adecuado para determinaciones *in situ* y en laboratorio, diseñados y construidos *ex profeso* en la Facultad de Ciencias de la UNAM (Fig. 5). Cada sistema está constituido por 10 cámaras circulares de acrílico de flujo regulado de agua, conectadas a un reservorio que las abastece de agua colectada en el sitio de estudio correspondiente, previamente filtrada con malla de 100 μm para descartar la presencia de partículas no filtrables por los bivalvos. El efluente de las cámaras es re-enviado al reservorio mediante una bomba y la caída de agua en el reservorio provee un medio adecuado de homogenización de las partículas suspendidas.

Cabe señalar que un sistema se utilizó para la determinación del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los mejillones mientras que el segundo se utilizó para la evaluación de las respuestas fisiológicas requeridas para estimar la tasa de asimilación del alimento ingerido por los bivalvos.

Las determinaciones se efectuaron de manera paralela. En cada sistema se colocaron 9 organismos provenientes de cada sitio de estudio, los cuales se limpiaron previamente de detritos y epibiontes; una cámara sin organismo se consideró como control. En cada sistema se ajustó el flujo de las cámaras a 70 ml/seg y se permitió la aclimatación de los organismos por un lapso de 2 h.

El intervalo de tiempo en el cual se efectuaron todas las evaluaciones (incluida la etapa de aclimatación) coincidió con las mareas altas máximas para asegurar la actividad circadiana de filtración en los mejillones.

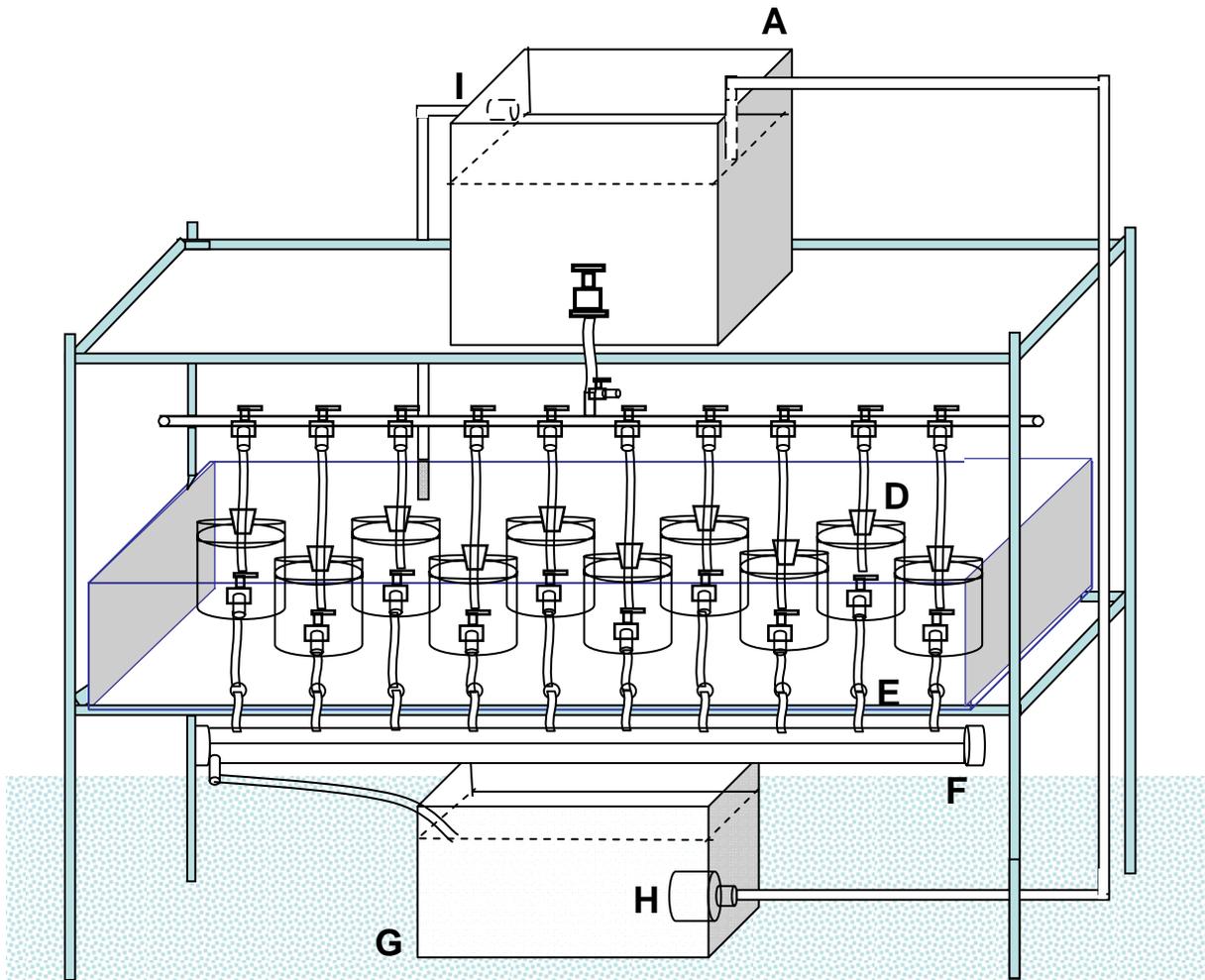


Fig. 5. Sistema de flujo semicontinuo. A: Reservorio superior; B: Llave para muestreo de agua de entrada; C: Sistema de distribución de agua hacia las cámaras; D: Cámaras individuales; E: Salida de agua; F: Colector de agua; G: Reservorio inferior; H: Bomba sumergible; I: Rebosadero.

6.5.2.3.1. Tasa de asimilación (A).

La tasa de asimilación del alimento consumido por los bivalvos A (J/h/g PS) se calculó a partir de la tasa de ingestión I (J/h/g PS) y de la eficiencia de asimilación $Ef. As.$ (Widdows, 1993; Bayne, 1973):

$$A = (I) \times Ef. As.$$

A su vez, la tasa de ingestión se calculó como (Widdows 1993):

$$I = TA) \times C \times CC$$

Donde:

TA: tasa de aclaramiento (l/h/g PS)

C: concentración de partículas suspendidas (partículas/l)

CC: contenido calórico de las partículas suspendidas (J / mg PS MOP)

De tal manera, para calcular la tasa de asimilación fue necesario determinar previamente la tasa de aclaramiento, la eficiencia de asimilación del alimento ingerido por los mejillones, la concentración de partículas suspendidas y su respectivo contenido calórico.

A. Tasa de aclaramiento. En organismos filtradores, la tasa de alimentación se expresa como *tasa de aclaramiento* y se define como el volumen de agua aclarado de partículas por hora (p. ej. partículas $>3 \mu\text{m}$ de diámetro retenidas con 100% eficiencia) y puede evaluarse en un sistema de flujo continuo o en un sistema estático, determinando la remoción de partículas suspendidas en periodos establecidos (Widdows, 1993).

Para la determinación de la tasa de aclaramiento de *M. strigata* se utilizaron 9 mejillones provenientes de cada una de las estaciones de muestreo y se utilizó el sistema de flujo de agua descrito previamente.

Una vez transcurrido el período de aclimatación se tomaron muestras de agua de la salida de cada cámara (250 ml) en frascos de polietileno y se registró la velocidad de flujo del agua de manera individual (1 7 h). Asimismo se tomaron 3 muestras del agua de entrada al sistema, intercalándolas al principio, a la mitad y al final del muestreo del agua de salida de la serie de cámaras, con el propósito de obtener un valor promedio adecuado de la concentración inicial de partículas presente durante el lapso de medición de flujo y colecta de muestras, que fue de aproximadamente 20 minutos. Al finalizar este muestreo se reajustó el flujo de agua a 70 ml/seg. El procedimiento anteriormente descrito se refiere como un registro de muestreo. Al cabo de 2 horas se realizó un nuevo registro de muestreo, repitiendo la medición del flujo y la colecta de agua de la salida de las cámaras, así como la colecta de agua de entrada a las mismas. En total se realizaron tres registros de muestreo, con intervalo de dos horas entre cada uno, para asegurar la disponibilidad de un número de datos adecuado.

Durante el transcurso de las evaluaciones se midió la temperatura y salinidad del agua. En las muestras de agua colectadas en los tres registros de muestreo se determinó la concentración de clorofila, la concentración de partículas suspendidas y la concentración de la materia orgánica

particulada (MOP) (ver inciso D, Eficiencia de asimilación). Cabe destacar que en el caso de Puente Juárez la MOP sólo se determinó en la muestras de agua del primer registro de muestreo.

Las muestras de agua para determinar la concentración de partículas suspendidas se fijaron con 3 ml de formol, para realizar posteriormente los conteos al microscopio utilizando una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Se realizó el conteo de partículas de 6 a 10 alícuotas por muestra.

La tasa de aclaramiento de cada individuo se calculó de acuerdo a la ecuación (Widdows, 1993):

$$TA = [(Ce-Cs)/Cs] * F$$

Donde:

TA: tasa de aclaramiento (l/h)

Ce: concentración de partículas de entrada (inicial) (número de partículas/l)

Cs: concentración de partículas de salida (final) (número de partículas/l)

F: flujo de salida del agua (l/h)

Los valores obtenidos en las cámaras experimentales fueron corregidos por el valor obtenido en la cámara control, para discriminar el depósito de partículas en las cámaras. Para cada organismo se calculó el valor promedio de la TA de los tres registros efectuados.

B. Concentración de partículas suspendidas (C). Esta concentración corresponde a la concentración de partículas de las muestras de agua provenientes de cada sitio de estudio, determinada como la concentración inicial calculada (número de partículas / litro) para evaluar la tasa de aclaramiento de los mejillones.

C. Contenido calórico de las partículas suspendidas (CC). El valor energético de la materia orgánica contenida en las partículas filtradas por los mejillones se obtuvo de un valor estándar de contenido energético para materia orgánica particulada referido en la literatura, el cual propone un valor promedio de los coeficientes oxicalóricos de los tres nutrientes principales (carbohidratos, lípidos y proteínas) correspondiente a 20.78 J/mg de materia orgánica (Crisp, 1971). Asimismo, la concentración de la MOP de las muestras de agua de los diferentes sitios de estudio se determinó a partir de la diferencia entre el peso seco y el peso seco libre de cenizas de las partículas filtradas del agua de cada sitio (Widdows, 1993). Los parámetros

anteriores se obtuvieron durante el procedimiento descrito para la evaluación de la eficiencia de asimilación de los organismos (ver inciso D, eficiencia de asimilación).

D. Eficiencia de asimilación (Ef. As.). La eficiencia de asimilación se estimó por el método de proporción de Conover (1996) y representa la eficiencia con que la materia orgánica es asimilada a partir de la materia alimenticia ingerida. La *Ef. As.* se calcula como:

$$Ef. As.(\%) = (F - E) / [(1 - E) F] * 100$$

Donde

F : relación peso seco libre de cenizas / peso seco del alimento ingerido

E : relación peso seco libre de cenizas / peso seco de las heces

Para el análisis del alimento ingerido por los mejillones se estimaron el peso seco (PS) y el peso seco libre de cenizas (PSLC) de las partículas del agua de cada sitio de estudio. Para ello, al inicio de las mediciones de la tasa de aclaramiento de los mejillones de cada sitio de estudio, se colectaron por duplicado 500 ml de agua del sistema de flujo, utilizando la llave de muestreo de agua de entrada (Fig. 5). El agua colectada se filtró con filtros de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y retención de 1.2µm (*Whatman 934-AH*), pre-quemados y pre-pesados (Widdows, 1993); los filtros empleados se almacenaron en un desecador, junto con 2 filtros blanco. Al término de la evaluación de la tasa de aclaramiento, se colectaron las heces de los organismos acumuladas en las cámaras; se enjuagaron con agua destilada para eliminar las sales y se guardaron en tubos Eppendorf a -20 °C. Posteriormente los filtros y las heces se secaron a 90 °C por 48 h y se registró su peso seco; a continuación se incineraron (450±10 °C por 6 h, mufla *Felisa Fe-960*) y se pesaron para estimar su PSLC (balanza analítica *Precisa XT120A*; ± 0.0001 g), corrigiendo los valores por el filtro blanco (Widdows, 1993). En el caso de las muestras conteniendo partículas filtradas la diferencia entre el PSLC y el PS de los respectivos filtros, corregidos por el valor de los filtros blanco, permitió calcular el contenido de la materia orgánica particulada, MOP:

Obtenidos todos los parámetros requeridos, se calculó la tasa de asimilación *A* de los mejillones.

E. Concentración de clorofila *a*. Se determinó la concentración de clorofila *a* como un parámetro que refiere la calidad alimentaria de las partículas suspendidas. El material utilizado

se lavó previamente con acetona, de acuerdo al protocolo para determinación de clorofila EPA 445.0 (Arar y Collins, 1997). Para cada sitio de estudio se colectaron 250 ml de agua en botellas de polietileno y se filtraron con filtros de fibra de vidrio *Whatman 934-AH*. Los filtros, protegidos con papel aluminio y bolsas de polietileno, se conservaron temporalmente en hielo, protegidos de la luz, y en un lapso máximo de 2 horas se transfirieron a nitrógeno líquido. Al llegar a la Cd. de México se colocaron en un ultracongelador *Revco* a -80°C hasta el momento de su análisis.

Para analizar la concentración de clorofila *a* en los filtros, éstos se homogenizaron individualmente en un volumen de 10 ml de acetona 90% HPLC (*Tecsiquim*, de acuerdo a especificaciones ACS) utilizando un homogenizador *Polytron PT1200*. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3850 g por 10 min. El sobrenadante se decantó y se conservó para utilizarse posteriormente y los residuos del filtro se desecharon. Los extractos obtenidos se mantuvieron en hielo hasta el momento de su lectura en un fluorómetro *Turner 10AU*, facilitado por el Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. El fluorómetro se encuentra equipado con el *kit* óptico *10-040R* para eliminar interferencias de feofitinas en la lectura, por lo que no fue necesaria la acidificación de la muestra como lo indica el protocolo de la EPA. Los resultados se expresaron en μg clorofila *a/l*.

6.5.2.3.2. Tasa respiratoria (R).

La tasa respiratoria de los organismos se determinó a través del metabolismo de rutina, para lo cual se utilizó el segundo sistema de flujo de agua, similar al utilizado para evaluar la tasa de aclaramiento de los mejillones. Este sistema regulado para flujo semicontinuo permitió evaluar de manera simultánea el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los organismos en estudio. Estas respuestas fisiológicas se evaluaron en grupos de organismos diferentes a los empleados para evaluar la tasa de aclaramiento. Como se señaló previamente, de cada sitio de estudio se colocaron de manera individual 9 organismos en las cámaras respirométricas, y se consideró una cámara sin organismo como cámara control. Se ajustó el flujo de las cámaras a 70 ml/seg y se permitió la aclimatación de los organismos a las cámaras por un lapso de 2 h. Transcurrido este período, se registró la concentración de oxígeno de una muestra de agua colectada antes y después de 45 minutos de cierre de flujo en las cámaras. Inmediatamente después se restableció el flujo de agua durante 2 h, posterior a lo cual se efectuó un segundo

registro, considerado como réplica. La concentración del oxígeno disuelto en las muestras de agua se registró por medio de un oxímetro (YSI 5000 \pm 0.005 mg O₂/l). El consumo de oxígeno de cada organismo (mg O₂ / h) se calculó por la diferencia entre la concentración inicial y final del oxígeno disuelto en el medio (mg O₂/ l) y se corrigió por los valores obtenidos en la cámara control. La tasa respiratoria se expresó en mg O₂ / h / g PS y se transformó en valores energéticos utilizando el coeficiente de 13.36 J/mg O₂ (Elliot y Davison, 1975).

6.5.2.3.3. Tasa de excreción nitrogenada (N).

La tasa de excreción nitrogenada se evaluó simultáneamente a la tasa de consumo de oxígeno. La concentración de nitrógeno amoniacal de cada muestra de agua (mg N-amonio total/ l) se determinó mediante la técnica de azul de indofenol modificada por Gutman y Bergmeyer (1974), adaptada para microplaca (Zúñiga 2007) a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de N-amonio total. Las lecturas se efectuaron a 640 nm en un lector de microplacas (*BioRad 550*). La tasa de excreción nitrogenada de los organismos se expresó en mg N-AT/h/ g PS y se transformó en su equivalente energético utilizando el coeficiente de 24.865 J/mg N-NH⁺₄ (Elliot y Davison, 1975).

Después de evaluar las tasas fisiológicas, los organismos se sacrificaron, se registró el peso húmedo total y el peso vivo (mg PH). Posteriormente se obtuvo el peso seco del tejido por deshidratación en una estufa (*Blue M*) hasta peso constante (60 °C, 48 h).

6.5.2.3.4. Cálculo del campo de crecimiento (P). El campo de crecimiento se calculó para cada individuo evaluado. Debido a que el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada se evaluaron en organismos diferentes de aquellos en los que se determinó la tasa de asimilación *A* para cada sitio de estudio, a cada uno de los valores individuales de *A* se le sustrajo el promedio de la tasa de consumo de oxígeno (*R*) y el promedio de la tasa de excreción nitrogenada (*N*) obtenida de los mejillones del sitio correspondiente ($P=A-(R+N)$).

6.5.2.4. Relación atómica O:N.

Para establecer la relación atómica O:N de cada uno de los organismos, se utilizaron la tasa de consumo de oxígeno (mg O₂/h/g PS) y la tasa de excreción nitrogenada (mg N-NAT/h/g PS)

determinadas para la evaluación del campo de crecimiento. Los valores de la relación O:N se calcularon de acuerdo a la ecuación (Bayne, 1973; Widdows, 1993):

$$\text{O:N} = [(\text{mgO}_2/\text{h/g PS}) / 16] : [(\text{mg N-NAT}/\text{h/g PS}) / 14]$$

Donde 16 y 14 corresponden a los equivalentes atómicos del oxígeno y el nitrógeno, respectivamente (Widdows, 1993).

6.5.2.5. Índice de condición.

El índice de condición en los mejillones (IC) se calculó de acuerdo a la ecuación (Lucas y Beninger, 1984):

$$\text{IC} = (\text{PS tejidos}/\text{PS valvas}) \times 100.$$

Para determinar el peso seco (g PS) de los tejidos y de las valvas, se removieron las valvas y el tejido húmedo completo en 18 organismos procedentes de las evaluaciones de la tasa respiratoria y de la tasa de aclaramiento. Las valvas y los tejidos se colocaron de manera independiente en una estufa *Precisa* a 60 °C por 48 h; al término de este lapso se midió individualmente el peso seco de los tejidos y de las valvas en una balanza analítica *Sartorius BP 210 S* (± 0.05 mg). El IC calculado se expresó en unidades porcentuales (%).

6.6. Análisis Estadístico.

En cada respuesta evaluada se determinó tanto la normalidad en la distribución de los datos (prueba de Shapiro-Wilcoxon) como la homogeneidad de varianza entre las muestras de los diferentes sitios (prueba de Levene) para aplicar de manera adecuada pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas (Zar, 1999).

Las diferencias significativas entre los sitios de muestreo para cada respuesta biológica evaluada, se determinaron por ANOVA de una vía (entre grupos con distribución normal) o bien por el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (entre grupos sin distribución normal). En caso de presentar diferencias significativas, se aplicó la prueba HSD para datos desiguales (*Unequal N HSD*) o bien la prueba de Newman-Keuls no paramétrica, respectivamente, para identificar los sitios entre los que se presentaron estas diferencias (Zar, 1999).

Asimismo se analizaron las correlaciones entre las concentraciones de hidrocarburos y las respuestas biológicas evaluadas, y las correlaciones de las respuestas biológicas entre sí, utilizando pruebas tanto paramétricas (Pearson) como no paramétricas (Spearman) (Zar, 1999). Todas las pruebas se realizaron con el paquete de cómputo *Statistica 6.0*.

7. RESULTADOS.

7.1. Cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

7.1.1. Agua.

Se analizó la concentración de 16 HPA's en agua. Las concentraciones evaluadas para todos los HPAs fueron inferiores a los límites de detección del método ($< 0.01\mu\text{g/l}$) en los diferentes sitios de Estero de Urías, excepto para el benzo(a)antraceno que presentó una concentración de $0.01\mu\text{g/l}$ en El Castillo.

7.1.2.1. Concentración de HPAs en sedimentos.

Los sedimentos de Estero de Urías registraron 15 de los 16 HPAs evaluados; el benzo(*ghi*)perileno no fue detectado en ninguno de los sitios de estudio. La concentración global del sistema fue de $3.92\mu\text{g/g}$. Asimismo, Puente Juárez presentó la menor concentración de HPAs totales, correspondiente a $1.08\mu\text{g/g}$ mientras Astillero presentó el valor más elevado, de $6.88\mu\text{g/g}$. En El Castillo se registraron $3.83\mu\text{g/g}$ de HPAs totales (Tabla 3).

El compuesto que alcanzó la mayor concentración registrada para los diferentes sitios fue el BaA, con $3.71\mu\text{g/g}$ PS en Astillero; en orden descendente le siguieron el indeno con $1.5\mu\text{g/g}$ PS en El Castillo y el acenafteno con $1.28\mu\text{g/g}$ PS en Astillero (Tabla 4, Fig. 6). Cabe señalar que El Castillo fue el único sitio donde se detectó indeno, y en una concentración elevada respecto al resto de los HPAs.

En los sedimentos de Puente Juárez se registraron sólo 7 de los 16 compuestos evaluados; la mayor parte de ellos fueron HPAs de bajo peso molecular (BPM). Destaca el acenafteno, que representa el 63% de la concentración de HPAs totales y el 80% de los HPAs de BPM; otros compuestos de BPM detectados fueron acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno. Del grupo de HPAs de alto peso molecular (APM) se registraron sólo el fluoranteno y el pireno (Tabla 4). Este último constituye el 12% de la concentración de HPAs totales y el 56% de los compuestos de APM.

En Astillero los sedimentos presentaron 13 de los 16 HPAs evaluados. Los compuestos de mayor concentración fueron el acenafteno, el benzo(a)antraceno y el benzo(a)pireno (18.7%, 54.1% y 9.5% de los HPAs totales, respectivamente). (Tabla 4, Fig. 6). Mientras el acenafteno representa el 75% de los compuestos de BPM, el BaA aporta el 72% de los compuestos de APM.

En El Castillo se registró la mayor variedad de HPAs, pues se detectaron 15 diferentes compuestos. En mayor concentración se encontraron el indeno, el acenafteno, el benzo(a)antraceno y el benzo(a)pireno, los que constituyen respectivamente el 40%, 24%, 17% y 11% de los HPAs totales. Los compuestos más relevantes por grupo son el acenafteno en los HPAs de BPM, con el 89%, y el indeno en los de APM, con el 54% (Tabla 4, Fig. 6).

En la figura 9 (A) se muestra la relación entre los HPA's de alto peso molecular (APM) y los de bajo peso molecular (BPM), en los sedimentos de los tres sitios de estudio. Se observa que en Astillero y en El Castillo predomina la proporción de HPAs de APM, aportando 75 % y 73% a los HPAs totales, respectivamente. En los sedimentos de Puente Juárez este comportamiento es opuesto, dado que los HPAs de BPM constituyen el 78% de los HPAs totales.

7.1.2.2. Identificación de fuentes de contaminación de HPAs en sedimentos.

Con el fin de inferir las posibles fuentes de origen de los hidrocarburos policíclicos encontrados en las muestras de sedimentos de Estero de Urías (pirogénico o por combustión; petrogénico o por petróleo), se calcularon los índices An/An+Phe, Fla/Fla+Py y BaA/BaA+Chry (Soclo *et al.*, 2000; Yunker *et al.*, 2002). En el caso de Puente Juárez los índices calculados refieren un origen de HPAs predominantemente pirogénico; en particular el índice Fla/Fla+Py (Tabla 5, Fig. 7) ubica el valor resultante en la zona de combustión de combustibles líquidos. En el caso de Astillero las relaciones calculadas señalan un origen pirogénico para los HPAs, pero en este caso el índice Fla/Fla+Py sugiere combustión de pasto, madera y carbón (Tabla 5, Fig. 7). Los índices calculados para El Castillo muestran una participación similar de fuentes petrogénicas y pirolíticas, pues en este sitio los índices calculados, correspondientes a Ant/Ant+Phe y Fla/Fla+Pyr, refieren un origen petrogénico (Tabla 5), si bien en el caso de la relación Ant/Ant+Phe el valor se ubica muy cerca de la línea de transición petróleo / combustión (Fig. 7A).

Tabla 4. Hidrocarburos policíclicos aromáticos en los sedimentos superficiales del Estero de Urías. Valores en µg/g PS.

No. An.	Nombre ^a	JUÁREZ			ASTILLERO			CASTILLO		
		µg/g	% Tot ^b	% grupo ^c	µg/g	% Tot	% grupo	µg/g	% Tot	% grupo
2	Naftaleno ⁵	ND	-	-	0.10	1.5	5.9	0.05	1.3	4.8
2	Acenaftileno ²	0.01	0.9	1.2	0.05	0.7	2.9	0.02	0.5	1.9
2	Acenafteno ¹	0.68	63.0	80.0	1.28	18.7	75.3	0.92	24.0	89.3
3	Fluoreno ³	0.07	6.5	8.2	0.03	0.4	1.8	0.01	0.3	1.0
3	Fenantreno ⁶	0.05	4.6	5.9	0.11	1.6	6.5	0.02	0.5	1.9
3	Antraceno ⁴	0.04	3.7	4.7	0.13	1.9	7.6	0.01	0.3	1.0
Total BPM		0.85	78.7	100	1.7	24.8	100	1.03	26.9	100
4	Fluoranteno ⁶	0.10	9.3	43.5	0.14	2.0	2.7	0.08	2.1	2.9
4	Pireno ⁷	0.13	12.0	56.5	0.40	5.8	7.7	0.07	1.8	2.5
4	Benzo(a)antraceno ¹	ND	-	-	3.71	54.1	71.9	0.64	16.7	22.9
4	Criseno ⁵	ND	-	-	0.17	2.5	3.3	0.01	0.3	0.4
4	Benzo(b)fluoranteno ³	ND	-	-	ND	-	-	0.02	0.5	0.7
4	Benzo(k)fluoranteno ²	ND	-	-	0.03	0.4	0.6	0.01	0.3	0.4
4	Benzo(a)pireno ⁴	ND	-	-	0.65	9.5	12.6	0.44	11.5	15.7
5	Indeno (123-cd) pireno	ND	-	-	ND	-	-	1.52	39.7	54.3
5	Dibenzo(ah)antraceno	ND	-	-	0.06	0.9	1.2	0.01	0.3	0.4
5	Benzo(ghi)perileno	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
Total APM		0.23	21.3	100	5.16	75.2	100	2.8	73.1	100
HPAs totales		1.08			6.86			3.83		

APM: alto peso molecular; BPM: bajo peso molecular.

^aA la derecha del nombre de cada compuesto se muestra su nivel de toxicidad en relación a los otros compuestos del grupo de APM o BPM, considerando diferentes guías de calidad sedimentaria (Swartz, 1999.). Se asignó "1" al compuesto que con menor concentración presenta efectos deletéreos.

^bLa columna "% total" indica el % del compuesto respecto a HPAs totales.

^cLa columna "% grupo" indica el % del compuesto respecto a la concentración total de compuestos de BPM o APM.

No. An.: Número de Anillos aromáticos.

Valores en negritas: muestran los dos valores más elevados de cada grupo (APM o BPM).

N.D.: Inferior al límite de detección del método (0.01 µg/l).

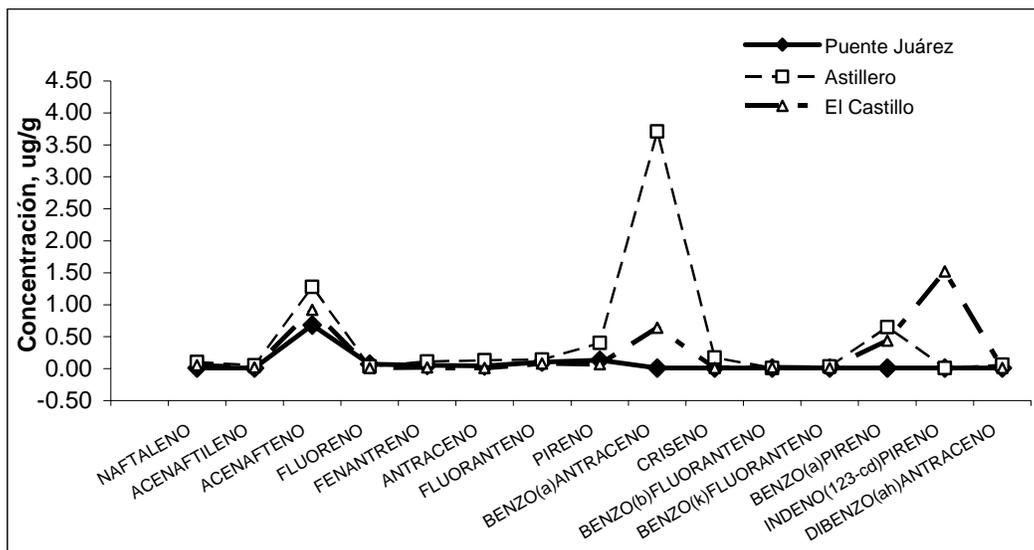


Fig. 6. HPAs en los sedimentos superficiales del Estero de Urías (µg/g PS)

Tabla 5: Valores característicos de índices moleculares para determinar el origen de HPAs, e índices calculados para los sitios de estudio.

Índice	Valores Característicos	Juárez	Astillero	Castillo
*An/An+Phe	>0.1 Combustión <0.1 Petróleo	0.43 (combustión)	0.26 (combustión)	0.1 Petróleo?
*Fla/Fla+Py	<0.4 Petróleo 0.4-0.5 Combustión de CFL >0.5 Combustión de PMC	0.44 (combustión de CFL)	0.54 (combustión de PMC)	0.33 (Petróleo)
*BaA/BaA+Chry	<0.2 Petróleo 0.2-0.35 Origen mixto >0.35 Combustión	(ND)	0.96 (combustión)	0.98 (combustión)

Yunker *et al.*, 2002. CFL: combustible fósil líquido
 ND: No determinado PMC: pasto, madera o carbón

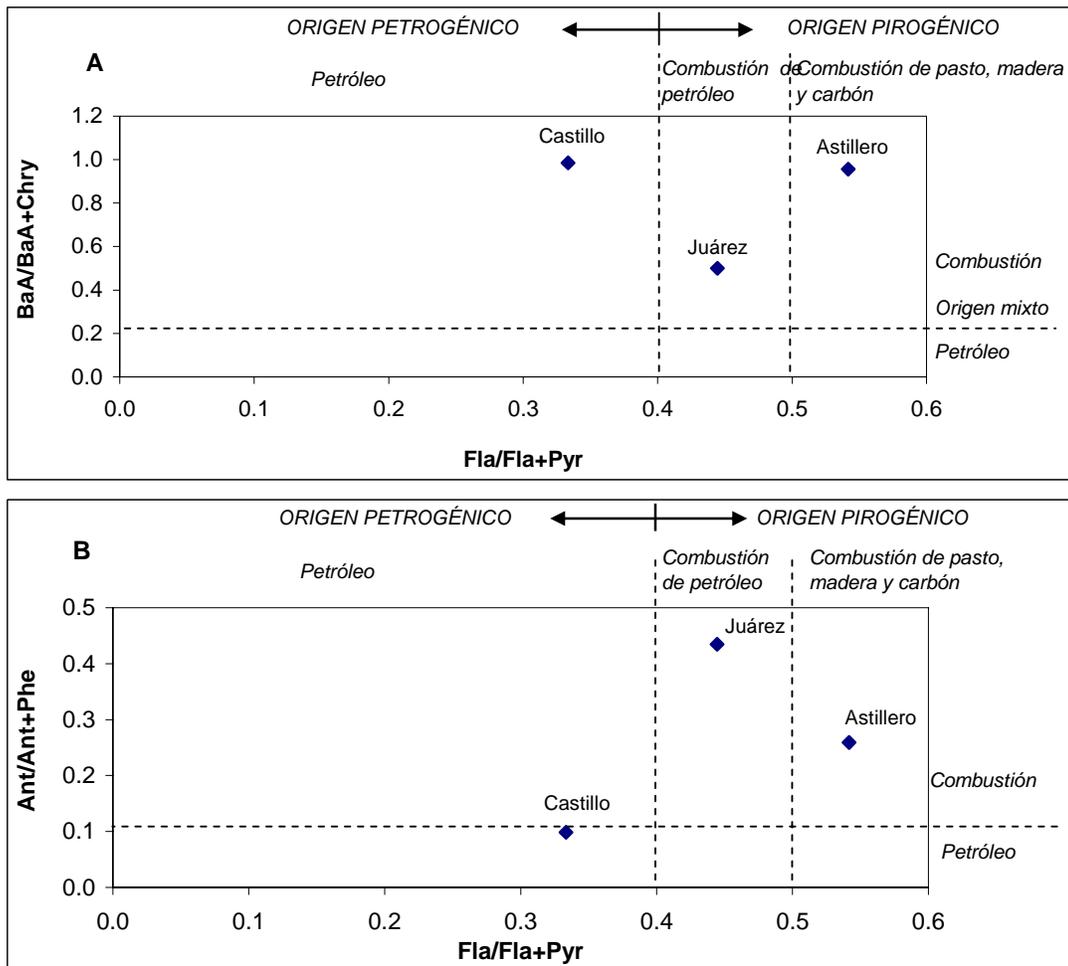


Fig. 7. Relaciones del índice molecular Fla/Fla+Pyr con los índices BaA/BaA+Chry (A) y Ant/Ant+Phe (B), determinados en los sedimentos de los diferentes sitios de muestreo en el Estero de Urías.

7.1.3. Organismos.

En ninguno de los sitios se encontró naftaleno, benzo(*k*)fluoranteno, dibenzo(*a*)antraceno o benzo(*ghi*)perileno acumulado por los organismos. De los sitios muestreados, los organismos de El Castillo presentaron la menor concentración de HPAs totales, con 0.96 µg/g PS, mientras que los de Juárez y Astillero registraron valores similares, de 2.81 y 2.71 µg/g PS, respectivamente (Tabla 6, Fig. 8). El compuesto que presentó una mayor concentración en los organismos fue el benzo(*a*)pireno (1.54 µg/g PS), en Astillero, seguido del indeno(1,2,3, *cd*)pireno con 1.31 µg/g PS en Puente de Juárez. Cabe señalar que el indeno fue detectado sólo en los organismos de Puente Juárez, los que sin embargo no presentaron benzo(*a*)pireno, compuesto presente en los registros de Astillero y El Castillo. Los organismos de El Castillo no presentaron acenaftileno o benzo(*b*)fluoranteno, compuestos que se detectaron en los otros dos sitios de estudio.

En los organismos colectados en Puente Juárez el compuesto con mayor concentración fue el indeno, que representó el 47% de la concentración de los HPAs totales, seguido del acenafteno y el pireno, que presentaron una concentración similar entre ellos, constituyendo el 15.7% y 13.9% de la concentración total de HPAs. Asimismo, el acenafteno representó el 77% de los compuestos de BPM acumulados en los organismos, mientras el indeno y el pireno fueron el 58% y 17% de los compuestos de APM, respectivamente (Tabla 6, Fig. 8).

Los mejillones de Astillero presentaron benzo(*a*)pireno, benzo(*a*)antraceno y acenafteno como los HPAs más concentrados, los que constituyeron el 57%, 14% y 12% de la concentración de HPAs totales. El BaP y el BaA representaron el 71% y 17% de los compuestos de APM, respectivamente, mientras el acenafteno aportó el 63% de los compuestos de BPM (Tabla 6, Fig. 8). En los organismos de El Castillo los dos compuestos más concentrados fueron el BaP y el acenafteno, los que constituyeron el 52% y 29% de los HPAs totales. El BaP aportó el 74% de los compuestos de APM y el acenafteno el 85% de los HPAs de BPM (Tabla 6, Fig. 8).

Cabe resaltar que en los tres sitios, los compuestos de APM presentaron el mayor porcentaje de acumulación en los organismos respecto a los de BPM (Fig. 6 y 7).

Tabla 6. Hidrocarburos policíclicos aromáticos en los mejillones *Mytella strigata* del Estero de Urías. Valores en µg/g PS.

No. An.	Nombre ^a	JUÁREZ			ASTILLERO			CASTILLO		
		µg/g	% Tot ^b	% grupo ^c	µg/g	% Tot	% grupo	µg/g	% Tot	% grupo
2	Acenaftileno ²	0.01	0.4	1.7	0.01	0.4	1.8	ND	ND	ND
2	Acenafteno ¹	0.44	15.7	77.2	0.34	12.5	63	0.28	29.2	84.8
3	Fluoreno ³	0.01	0.4	1.7	0.06	2.2	11.1	0.01	1.0	3.0
3	Fenantreno ⁶	0.05	1.8	8.8	0.10	3.7	18.5	0.01	1.0	3.0
3	Antraceno ⁴	0.06	2.1	10.5	0.03	1.1	5.6	0.03	3.1	9.1
Total BPM		0.57		-	0.54		--	0.3		--
4	Fluoranteno ⁶	0.19	6.8	8.5	0.23	8.5	10.6	0.01	1.0	1.6
4	Pireno ⁷	0.39	13.9	17.4	0.37	13.7	17.1	0.01	1.0	1.6
4	Benzo(a)antraceno ¹	0.22	7.8	9.8	0.01	0.4	0.5	0.09	9.4	14.3
4	Criseno ⁵	0.12	4.3	5.4	0.01	0.4	0.5	0.02	2.1	3.2
4	Benzo(b)fluoranteno ³	0.01	0.4	0.4	0.01	0.4	0.5	ND	ND	ND
4	Benzo(a)pireno ⁴	ND	ND	ND	1.54	56.8	71.0	0.5	52.1	79.4
5	Indeno (123-cd) pireno	1.31	46.6	58.5	ND		ND	ND	ND	ND
5	Benzo(ghi)perileno	ND	-	-	ND	-	-	ND	-	-
Total APM		2.24			2.17			0.63		
HPAs totales		2.81			2.71			0.96		

APM: alto peso molecular; BPM: bajo peso molecular.

^aA la derecha del nombre de cada compuesto se muestra su nivel de toxicidad en relación a los otros compuestos del grupo de APM o BPM, considerando diferentes guías de calidad sedimentaria (Swartz, 1999.). Se asignó "1" al compuesto que con menor concentración presenta efectos deletéreos

^bLa columna "% total" indica % del compuesto respecto a HPAs totales.

^cLa columna "% grupo" indica % del compuesto respecto a la concentración total de compuestos de BPM o APM.

No. An.: Número de Anillos aromáticos

Valores en negritas: muestran los dos valores más elevados de cada grupo (APM o BPM)

N.D.: Inferior al límite de detección del método (0.01 µg/l)

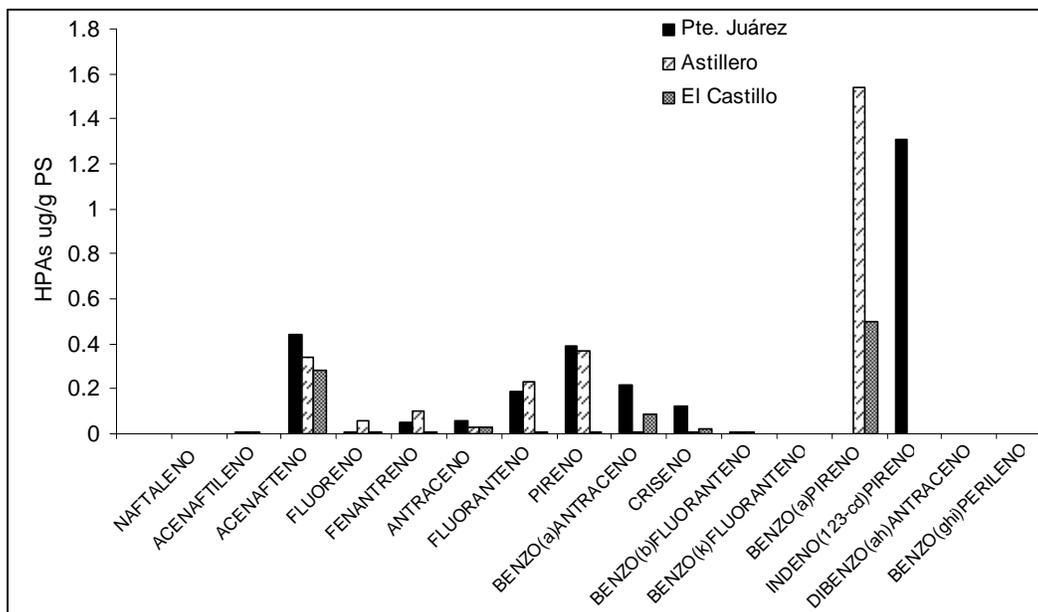


Fig. 8. Concentración de HPAs en tejidos de *Mytella strigata* del Estero de Urías.

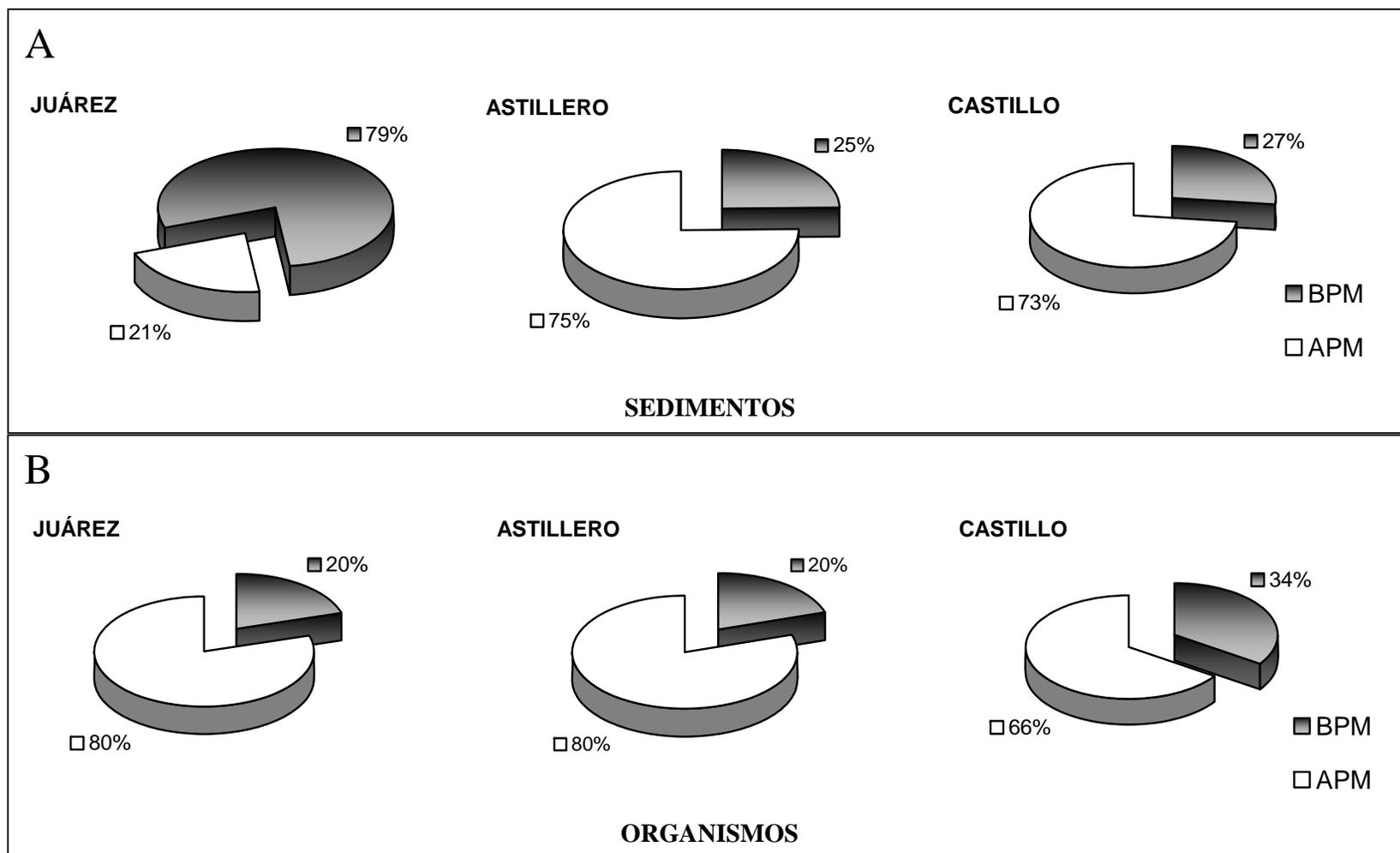


Fig. 9. Proporción entre HPAs de alto peso molecular (APM) y de bajo peso molecular (BPM) en los sedimentos (A) y en los organismos (B) de las diferentes estaciones de muestreo en el Estero de Urias.

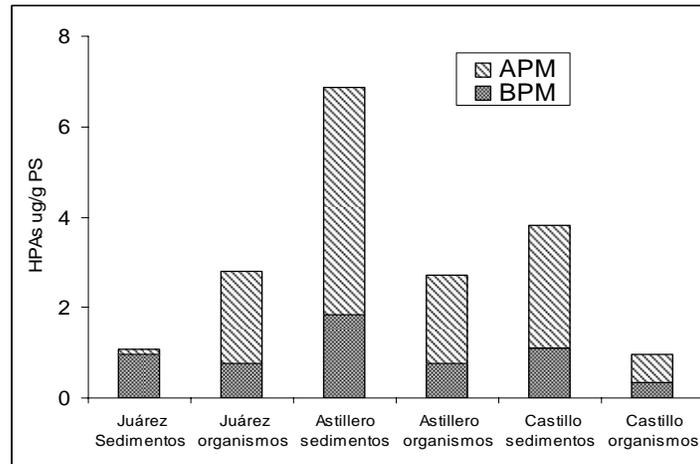


Fig. 10. HPAs de alto peso molecular (APM) y bajo peso molecular (BPM) cuantificados en los sedimentos y en los mejillones del Estero de Urías ($\mu\text{g/g PS}$).

Tabla 7. Coeficientes de regresión (R^2) entre las concentraciones de HPAs en los sedimentos y en los organismos (en todos los casos, $n=3$).

NO. ANILLOS	COMPUESTO	R^2
2	NAFTALENO	0
2	ACENAFTILENO	0
2	ACENAFTENO	0.275
2	FLUORENO	0.036
3	FENANTRENO	0.984
3	ANTRACENO	0.077
3	FLUORANTENO	0.734
4	PIRENO	0.365
4	BENZO(a)ANTRACENO	0.026
4	CRISENO	0.324
4	BENZO(b)FLUORANTENO	ND
4	BENZO(k)FLUORANTENO	ND
5	BENZO(a)PIRENO	0.848
5	INDENO(123-cd)PIRENO	0.250
5	DIBENZO(ah)ANTRACENO	ND
5	BENZO(ghi)PERILENO	ND
	HPAs TOTALES	0.004
2 y 3	BPM	0.134
4 y 5	APM	0.011

ND: no determinado

7.1.4. Correlaciones entre sedimentos y organismos.

Se realizó un análisis estadístico no paramétrico (prueba de Spearman) con el fin de determinar las correlaciones entre las concentraciones de HPAs en los sedimentos y las concentraciones presentadas por los organismos. No se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas para ninguno de los compuestos evaluados ($p > 0.05$). Sin embargo, con fines únicamente descriptivos y de visualización, se realizaron regresiones lineales entre las concentraciones de sedimentos y las concentraciones de organismos para HPA's totales, HPA's de APM y de BPM, así como para cada uno de los 16 diferentes HPA's evaluados (Tabla 7). Los mayores coeficientes de regresión se presentaron para fenantreno, fluoranteno y benzo (a) pireno, con valores de 0.98, 0.73 y 0.85, respectivamente. Los coeficientes de regresión restantes fueron inferiores a 0.7. No obstante, no se observó una relación de proporcionalidad entre la concentración de HPAs totales registrada en los sedimentos y aquella encontrada en los organismos. Mientras que en Astillero se presentó la mayor concentración de HPAs totales en sedimentos, 6.86 $\mu\text{g/g}$, los organismos de este sitio refirieron una concentración en sus tejidos de 2.71 $\mu\text{g/g}$, similar a la registrada para los de Juárez (2.81 $\mu\text{g/g}$), donde la concentración de HPAs totales en sedimentos fue de 1.08 $\mu\text{g/g}$ (Tabla 6, Fig. 9 y 10).

Los valores para compuestos de APM registrados en sedimentos y en organismos, no muestran una relación proporcional, pues mientras Astillero presenta un valor superior al de los otros sitios (5.02 $\mu\text{g/g}$), la concentración de HPAs de APM en los bivalvos de este sitio (2.17 $\mu\text{g/g}$) fue similar a la de Puente Juárez y 2.24 $\mu\text{g/g}$ (Tabla 6, Fig. 9 y 10).

7.2. Respuestas biológicas.

Los datos obtenidos en la actividad EROD, la concentración de proteína en hemolinfa, la estabilidad lisosomal, la tasa de absorción la relación atómica O:N y el campo de crecimiento no presentaron una distribución normal (análisis de Shapiro-Wilcoxon: $p < 0.05$) y/o no presentaron homosedasticidad (análisis de Levene: $p > 0.05$). Con el fin de homogenizar la visualización de lo resultados, las gráficas que se presentan para cada respuesta evaluada muestran valores de mediana; la caja incluye el 50% de los datos y las cotas superior e inferior integran el 50% restante. En las gráficas como en las tablas, letras diferentes denotan diferencias significativas.

7.2.1. Biomarcadores de exposición. Actividad EROD.

Los resultados obtenidos denotan que la actividad EROD calculada en la glándula digestiva fue similar en los organismos provenientes de las localidades de Astillero y Castillo, con una variación del 1.6% ($p > 0.05$). En Juárez se observó una disminución significativa de la actividad EROD de los mejillones, 15 veces menor que la evaluada en Astillero y Castillo ($p < 0.05$). (Tabla 8, Fig. 11).

Tabla 8. Biomarcadores de exposición. Evaluación de la actividad EROD en la glándula digestiva de *M. strigata* del Estero de Urias (pmoles resorufin /min/mg proteína) Se incluye número de datos analizado (n; valor entre paréntesis) para cada respuesta.

Sitio	Puente Juárez	Astillero	Castillo
Actividad EROD	0.04 ± 0.00^a (5)	0.61 ± 0.08^b (5)	0.62 ± 0.01^b (3)

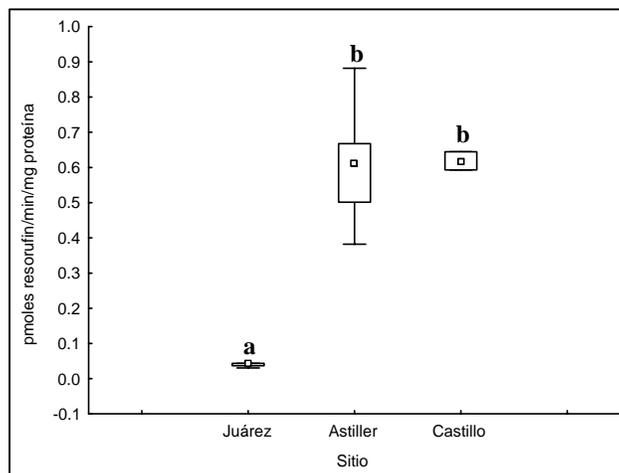


Fig. 11. Actividad EROD en la glándula digestiva de *M. strigata* del Estero de Urias (pmoles resorufin/min/mg proteína). Letras diferentes denotan diferencias significativas.

7.2.2. Biomarcadores de efecto. Nivel suborganismo.

7.2.2.1. Estabilidad Lisosomal.

La estabilidad de la membrana lisosomal en los hemocitos presentó valores similares entre los mejillones provenientes de Puente Juárez y Castillo ($p > 0.05$) y una reducción significativa en Astillero ($p < 0.05$). El valor determinado para este último sitio correspondió al 20% de los valores obtenidos en Puente Juárez y Castillo. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 9, Fig. 12).

Tabla 9. Respuestas biológicas a nivel suborganismo en individuos de *Mytella strigata* colectados en el Estero de Urías durante la temporada de secas 2005. (Media \pm ES). Se incluye el número de datos analizado (n; valor entre paréntesis) para cada respuesta.

	Puente Juárez	Astillero	Castillo
Estabilidad Lisosomal (D.O. / mg proteína)	65.89 \pm 14.0 ^a (7)	12.98 \pm 3.84 ^b (10)	66.46 \pm 22.49 ^a (4)
Proteínas en hemolinfa (mg/ ml)	0.79 \pm 0.07 ^a (9)	0.53 \pm 0.03 ^b (10)	0.67 \pm 0.06 ^a (10)
Proteínas en músculo (mg/g PH)	18.42 \pm 0.69 ^a (11)	14.90 \pm 0.78 ^b (10)	13.59 \pm 0.82 ^b (10)

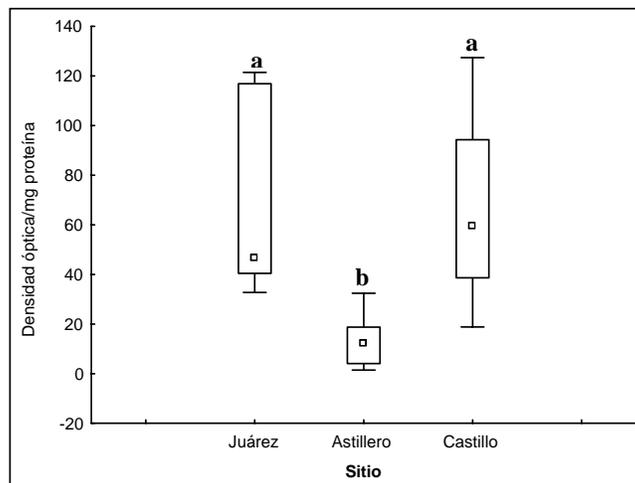


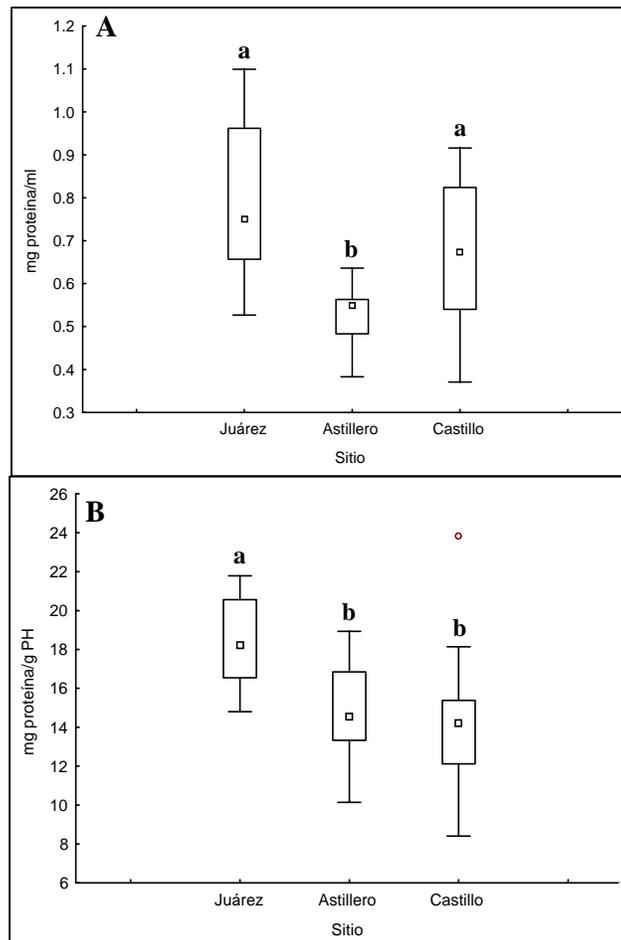
Fig. 12. Estabilidad lisosomal en la hemolinfa de *M. strigata* (densidad óptica / mg proteína). Letras diferentes denotan diferencias significativas.

7.2.2.2. Proteínas.

Los valores de la concentración de las proteínas solubles totales determinados tanto en la hemolinfa como en el músculo abductor de los mejillones de Puente Juárez fueron mayores que en los otros dos sitios muestreados. En la hemolinfa, los niveles proteínicos de los organismos provenientes de Juárez fueron 49% mayores que los de Astillero ($p < 0.05$);

pero similares a los de Castillo ($p > 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los organismos provenientes de Astillero y Castillo ($p > 0.05$). (Tabla 9, Fig. 13A).

En las muestras de tejido muscular (músculo abductor posterior), la concentración promedio registrada en Puente Juárez fue 24% superior a la de Astillero y 35% mayor que la de El Castillo ($p < 0.05$). (Tabla 9, Fig. 13B). En estas dos últimas localidades los niveles de proteínas solubles en el músculo abductor de los mejillones fue similar ($p > 0.05$).



7.2.3. Biomarcadores de efecto. Nivel organismo.

7.2.3.1. Contenido Hídrico.

Los valores de contenido hídrico de los mejillones colectados presentaron una variación aparentemente baja, de 77.9% a 81.4%. Sin embargo, los organismos de Astillero presentaron una mayor hidratación ($p < 0.05$) que los provenientes de Puente Juárez y Castillo. Estos últimos presentaron un contenido de agua similar ($p > 0.05$) (Tabla 10, Fig. 11).

Tabla 10. Respuestas biológicas a nivel organismo en individuos de *Mytella strigata* colectados en tres localidades del Estero de Urías durante la temporada de secas 2005. (Media \pm ES). Se incluye número de datos analizado (n; valor entre paréntesis) para cada respuesta.

	P. Juárez	Astillero	Castillo
Balance hídrico (%)	77.9 \pm 0.01 ^a (8)	81.4 \pm 0.00 ^b (9)	78.4 \pm 0.00 ^a (10)
Índice de condición	25.47 \pm 0.78 ^a (8)	18.01 \pm 0.98 ^b (9)	22.16 \pm 0.96 ^a (10)
Relación O:N	16.34 \pm 2.22 ^a (8)	15.34 \pm 2.79 ^a (8)	37.47 \pm 9.88 ^a (7)
Tasa de aclaramiento (l/h/g PS)	1.98 \pm 0.30 ^a (9)	1.26 \pm 0.21 ^a (7)	1.64 \pm 0.16 ^a (8)
Eficiencia de asimilación (%)	56.42 \pm 1.62 ^a (8)	45.50 \pm 3.66 ^a (7)	26.60 \pm 5.97 ^b (5)
Tasa de absorción (J/h/g PS) (A)	264.7 \pm 40.25 ^a (9)	149.51 \pm 31.21 ^{ab} (6)	91.14 \pm 10.56 ^b (4)
Consumo de oxígeno (mg O₂/h/g PS) (R)	1.41 \pm 0.09 ^a 18.83 \pm 1.20 (9)	1.49 \pm 0.04 ^a 19.90 \pm 0.58 (8)	1.01 \pm 0.09 ^b 13.44 \pm 1.15 (9)
Excreción nitrogenada (mg N-AT/h/g PS) (N)	0.076 \pm 0.01 ^a 1.89 \pm 0.31 (9)	0.084 \pm 0.01 ^a 2.09 \pm 0.36 (8)	0.029 \pm 0.01 ^b 0.73 \pm 0.19 (8)
Campo de crecimiento (J/h/g PS) (P)	244.0 \pm 40.25 ^a (9)	127.53 \pm 31.21 ^{ab} (6)	76.98 \pm 10.56 ^b (4)

Superíndices con letras diferentes en los valores para una respuesta, denotan diferencias significativas.

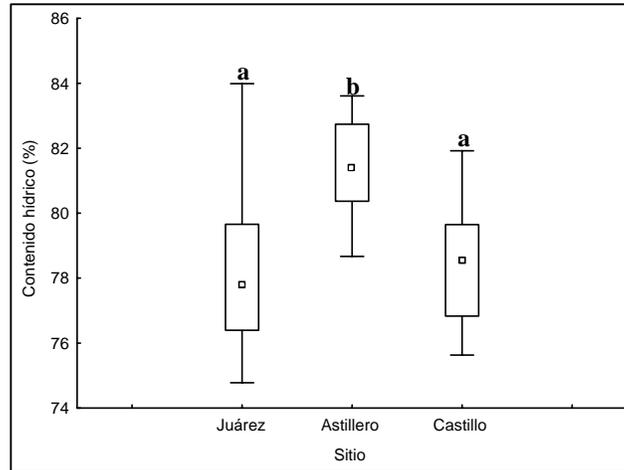


Fig. 14. Contenido hídrico en tejidos de *M. strigata* de los sitios de estudio en el Estero de Urías. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.2.3.2. Índice de condición.

Los organismos colectados en P. Juárez presentaron el mayor índice de condición promedio (IC= 25.47) mientras que en Astillero se determinó el valor más bajo, de 18.01. El IC de los mejillones colectados en Astillero fue 29% y 19% significativamente menor ($p < 0.05$) que el registrado en los organismos de Juárez y Castillo, respectivamente. El índice de condición de los mejillones de El Castillo y de Puente Juárez fue similar ($p > 0.05$). (Tabla 10, Fig. 15).

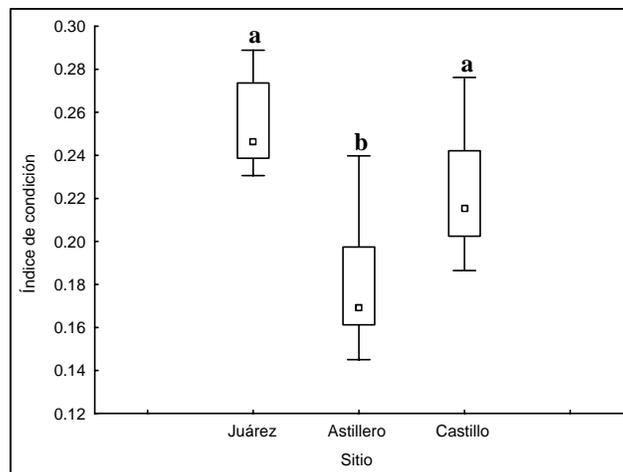


Fig. 15. Índice de condición determinado en los mejillones de P. Juárez, Astillero y Castillo. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.2.3.3. Tasa de aclaramiento.

La tasa de aclaramiento no presentó diferencias significativas entre los organismos de Puente Juárez, Astillero o Castillo ($p>0.05$), con valores promedio máximos de 1.98 l/h/g PS (P. Juárez) y mínimos de 1.26 l/h/g PS (Tabla 10, Fig. 16).

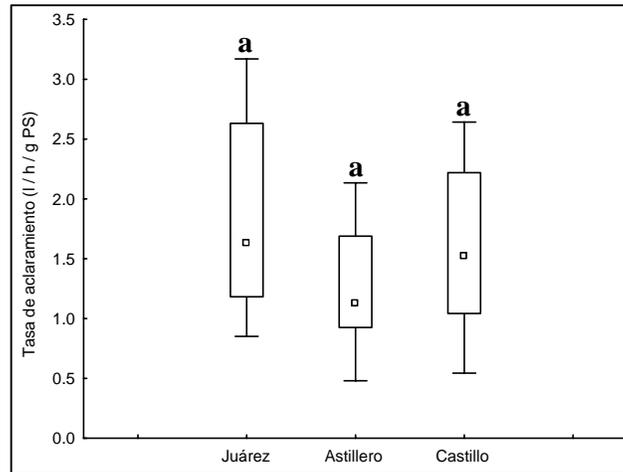


Fig. 16. Tasa de aclaramiento en *M. strigata* del Estero de Urías. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.2.3.4. Eficiencia de asimilación.

Los valores obtenidos para este parámetro fisiológico no presentaron diferencias significativas entre Juárez y Astillero ($p>0.05$), sitios para los que se determinaron valores de 56.42% y 45.50 % de eficiencia de asimilación del alimento filtrado, respectivamente. En contraste, los organismos de Castillo presentaron un valor promedio de 26.6%, que correspondió a una reducción significativa ($p<0.05$) en la eficiencia de asimilación del 53% Y 42% respecto a los mejillones colectados en P. Juárez y Astillero, respectivamente. (Tabla 10, Fig. 17).

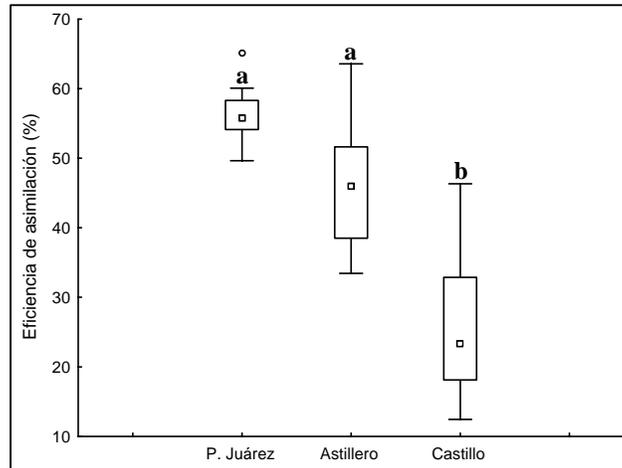


Fig. 17. Eficiencia de asimilación alimenticia en *M. strigata* proveniente de P. Juárez, Astillero y Castillo en el Estero de Urías. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.2.3.5. Tasa de asimilación.

La tasa de asimilación *A* presentó diferencias significativas entre los organismos provenientes de las diferentes localidades de estudio. La mayor tasa de asimilación se observó en los organismos colectados en P. Juárez, la cual fue 29% mayor que la determinada en el Castillo ($p < 0.05$), mientras que en Astillero no se observaron diferencias significativas respecto a ninguno de los otros dos sitios ($p > 0.05$). (Tabla 10, Fig. 18).

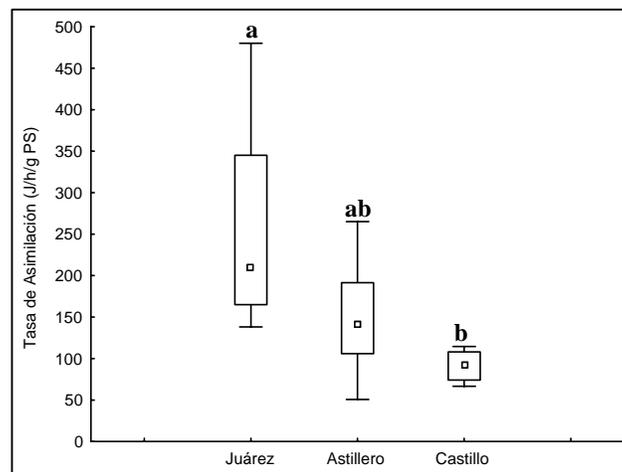


Fig. 18. Tasa de asimilación (J/h/g PS) de *M. strigata* colectados en los sitios de estudio Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.2.3.6. Consumo de oxígeno.

Los resultados obtenidos en la evaluación del consumo de oxígeno mostraron valores similares en los mejillones provenientes de Juárez y Astillero ($p>0.05$). En Castillo, la tasa respiratoria mostró una reducción significativa, 28% y 32% menor que la determinada en Juárez y Astillero, respectivamente ($p<0.05$). (Tabla 10, Fig. 19).

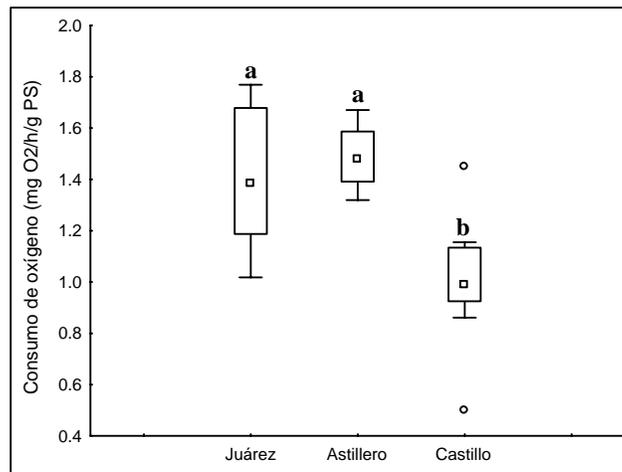


Fig. 19. Consumo de oxígeno (mg O₂/h/g PS) de *M. strigata* provenientes de los sitios de estudio en Estero de Urías. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

7.2.3.7. Excreción nitrogenada.

De manera similar al consumo de oxígeno, la tasa de excreción nitrogenada de los organismos provenientes de P. Juárez y Astillero fue similar ($p>0.05$); mientras la excreción de compuestos nitrogenados en los mejillones colectados en Castillo fue 62% y 65% más baja ($p<0.05$) que los de Puente Juárez y Astillero, respectivamente (Tabla 10, Fig. 20).

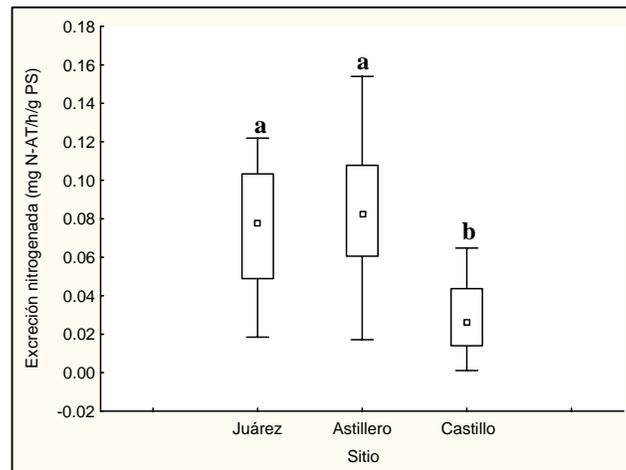


Fig. 20. Excreción nitrogenada de *M. strigata* provenientes de los sitios de estudio en Estero de Urías (mg N-AT/h/g PS). Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

7.2.3.8. Relación O:N.

A partir de la integración de los resultados correspondientes de las tasas respiratorias y de excreción nitrogenada, se calcularon los valores de la relación atómica O:N. De manera contrastante con las respuestas fisiológicas individuales, la relación ON obtenida en los mejillones de P. Juárez, Astillero y Castillo fue similar ($p > 0.05$). Sin embargo, el valor determinado para Castillo resultó 129% y 144% mayor respecto al obtenido en los organismos colectados en P. Juárez y Astillero, respectivamente (Tabla 10, Fig. 21).

Acorde a la literatura, en Juárez y Astillero los bivalvos utilizaron con fines energéticos exclusivamente a las proteínas. No obstante, en los mejillones provenientes del Castillo se observó un cambio en el sustrato energético utilizado por los organismos, denotando el uso adicional de carbohidratos y lípidos como fuente de energía. Cabe señalar la elevada variación en el comportamiento observado en esta última localidad, donde cerca del 50% de los organismos utilizaron estrictamente a las proteínas con fines energéticos mientras que en los demás organismos los lípidos y los carbohidratos constituyeron el principal sustrato energético.

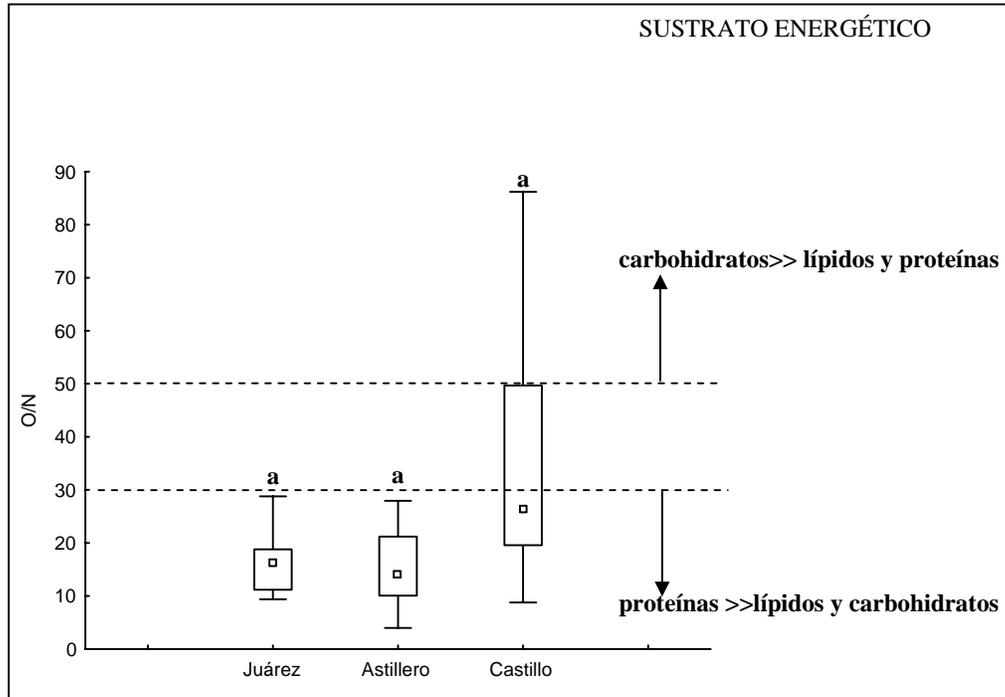


Fig. 21. Relación O:N determinada en los mejillones colectados en Juárez, Astillero y Castillo. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.2.3.9. Campo de crecimiento.

A partir de la integración de las tasas fisiológicas individuales expresadas en su valor calórico correspondiente (J/h/g PS) se calculó el campo de crecimiento (P) de los mejillones ($P=A-(R+N)$).

El campo de crecimiento P en los organismos provenientes de P. Juárez fue 3.2 veces mayor ($p<0.05$) que el calculado para los mejillones colectados en Castillo. No obstante, los organismos provenientes de Astillero presentaron un comportamiento similar al de los dos sitios anteriores ($p>0.05$) (Tabla 10, Fig. 22).

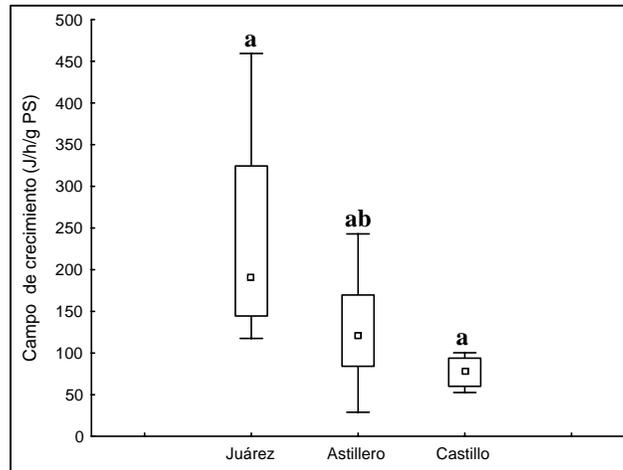


Fig. 22. Campo de Crecimiento de *M. strigata* de los sitios de estudio en Estero de Urías (J/h/g PS). Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

7.3. Correlaciones.

Las respuestas biológicas que presentaron correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con las concentraciones bioacumuladas de HPA totales así como con los compuestos de APM y compuestos de BPM, fueron la actividad EROD, el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada, la eficiencia de asimilación, la tasa de absorción y el campo de crecimiento; la concentración de proteína soluble se correlacionó significativamente sólo con los niveles bioacumulados de BPM. Cabe destacar que únicamente para la actividad EROD, la eficiencia de asimilación y la tasa de absorción registraron coeficientes de correlación superiores a 0.7 ($p < 0.05$). En contraste con las demás correlaciones estadísticamente significativas, sólo la actividad EROD presentó correlaciones negativas (Tabla 11). Al establecer correlaciones entre las respuestas biológicas y los HPAs específicos bioacumulados, el mayor número de correlaciones significativas ($p < 0.05$) se asociaron con el antraceno (7 correlaciones) y el benzo(a)antraceno (7 correlaciones), el pireno (6 correlaciones), el benzo(a)pireno (6 correlaciones) y el criseno (8 correlaciones), todos ellos de APM (Anexos, Tabla 2). Por otro lado, las respuestas biológicas evaluadas que presentaron correlaciones significativas con un mayor número de compuestos fueron la actividad EROD (7 correlaciones), la estabilidad lisosomal (7 correlaciones), el índice de condición (6 correlaciones) y el campo de crecimiento (7 correlaciones) (Anexos, Tabla 2).

Si bien se observaron numerosas correlaciones significativas entre HPA específicos bioacumulados y diversas respuestas biológicas evaluadas en *M. strigata*, la multiplicidad y complejidad de tales correlaciones dificulta establecer patrones claros. Tal es el caso del benzo(a)pireno que se correlacionó ($p < 0.05$) de manera negativa con las respuestas biológicas descritas previamente, a excepción de la actividad EROD con la cual se observó una correlación positiva ($p < 0.05$); sin embargo a excepción del BaP este biomarcador presentó una correlación negativa ($p < 0.05$) con los hidrocarburos específicos analizados (Anexos, Tabla 2).

Tabla 11. Coeficientes de correlación entre las respuestas biológicas evaluadas y las concentraciones de HPAS totales, HPAS de alto peso molecular (APM) y de bajo peso molecular BPM. Se incluye el coeficiente de correlación (*r*) y la significatividad de la correlación ($p < 0.05$).

	n	HPAS TOTALES		HPAS APM		HPAS BPM	
		r	p	r	p	r	p
Actividad EROD	13	-0.775	0.002	-0.775	0.002	-0.775	0.002
Proteína en hemolinfa	29	0.235	0.229	0.270	0.164	0.235	0.229
Proteína en músculo	31	<i>0.497</i>	<i>0.000</i>	<i>0.493</i>	<i>0.005</i>	0.526	0.002
Estabilidad lisosomal	21	0.190	0.440	0.190	0.440	0.190	0.440
Índice de condición	27	-0.106	0.607	-0.114	0.0581	-0.051	0.803
Consumo de oxígeno	26	0.686	0.000	0.688	0.000	0.676	0.000
Excreción nitrogenada	25	0.583	0.002	0.584	0.002	0.574	0.003
Relación ON	23	-0.344	0.108	-0.360	0.092	-0.344	0.108
Tasa de aclaramiento	24	0.061	0.776	0.058	0.789	.0859	0.690
Eficiencia de asimilación	20	0.765	0.000	0.762	0.000	0.783	0.000
Tasa de absorción	19	0.716	0.001	0.711	0.001	0.716	0.001
Campo de crecimiento	19	0.685	0.001	0.692	0.001	0.685	0.001

Negritas: coeficientes de correlación superiores a 0.5. Cursivas: correlaciones significativas ($p < 0.05$)

El análisis estadístico de los biomarcadores evaluados en *M. strigata* en diferentes niveles de organización biológica, denotó correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Anexos, Tabla 3) que se sintetizan en la Tabla 12. En contraste con los demás resultados, la actividad EROD mostró una correlación negativa, significativa ($p < 0.05$) con los niveles de proteína soluble en hemolinfa, el índice de condición, la eficiencia de asimilación y el campo de crecimiento. , la proteína en músculo se correlacionó positivamente con el índice de condición, la tasa de aclaramiento, la tasa de absorción y el campo de crecimiento. A su vez, la estabilidad lisosomal mostró correlación únicamente con el índice de condición, mientras que la eficiencia de asimilación se correlacionó sólo con la excreción nitrogenada.

Por otro lado, el índice de condición presentó correlación significativa con el campo de crecimiento, además de las relaciones previamente mencionadas con la actividad EROD, la estabilidad lisosomal y la concentración de proteína muscular. Cabe destacar que el campo

de crecimiento *P* mostró el mayor número de correlaciones con otras respuestas (5), tanto a nivel bioquímico como fisiológico, las que incluyen la actividad EROD, los niveles de proteína soluble muscular, el índice de condición, la tasa de aclaramiento y la tasa de absorción (Tabla 12).

Tabla 12. Correlaciones entre las respuestas biológicas evaluadas en *Mytella strigata*. Se incluye el coeficiente de correlación (*r*) y la significatividad de la correlación (*p*).

	n		Actividad EROD	Proteína en músculo	Índice de condición	Tasa de aclaramiento	Tasa de absorción	Excreción nitrogenada	Campo de crecimiento
Actividad EROD	13	r		-0.38	-0.62	0.03	-0.75	-0.27	-0.79
		p		0.22	0.02	0.93	0.05	0.42	0.04
Proteína en hemolinfa	29	r	-0.62	0.21	0.28	0.09	0.24	0.07	0.23
		p	0.02	0.30	0.17	0.67	0.34	0.74	0.38
Proteína en músculo	31	r	-0.38		0.92	0.93	0.95	-0.47	0.56
		p	0.22		0.02	0.02	0.01	0.43	0.01
Estabilidad lisosomal	21	r	-0.45	0.24	0.81	0.31	0.22	-0.30	0.48
		p	0.12	0.33	0.00	0.26	0.46	0.24	0.11
Índice de condición	27	r	-0.62	0.93		0.72	0.42	-0.50	0.62
		p	0.02	0.02		0.17	0.09	0.39	0.01
Tasa de aclaramiento	24	r	0.03	0.93	0.72		0.86	-0.40	0.66
		p	0.93	0.02	0.17		0.00	0.51	0.00
Eficiencia de asimilación	20	r	-0.75	-0.18	-0.12	-0.22	0.32	0.91	0.27
		p	0.01	0.78	0.84	0.73	0.24	0.03	0.36
Tasa de absorción	19	r	-0.75	0.64	0.42	0.86		0.25	0.98
		p	0.05	0.00	0.09	0.00		0.32	0.00
Relación ON	19	r	-0.09	-0.22	<i>0.49</i>	0.11	0.02	-0.84	-0.18
		p	0.80	0.32	<i>0.02</i>	0.64	0.93	0.00	0.52

Negritas: coeficientes de correlación superiores a 0.5. Cursivas: correlaciones significativas ($p < 0.05$)

8. DISCUSIÓN.

Los sistemas lagunares presentan variaciones espacio-temporales de múltiples variables ambientales, tales como salinidad, temperatura y contenido de materia orgánica, así como de los patrones de corrientes y sedimentación, que los caracterizan como complejos sistemas de transición continental-marinos (Frías-Espicueeta *et al.*, 1999; Páez-Osuna *et al.*, 1989; Montañaño *et al.*, 2000). Si además se presentan actividades antropogénicas que impactan el área química y físicamente, como es el caso del Estero de Urías (Ruelas, 2001; Galindo-Reyes *et al.*, 1992), la complejidad en la estructura y dinámica del sistema se incrementa de manera notable. Esto dificulta la interpretación de la información sobre la presencia y concentración de contaminantes en agua, sedimentos y organismos, así como de su efecto adverso en la biota, particularmente en el mejillón *Mytella strigata*, sujeto del presente estudio. Así, resulta conveniente que en primera instancia cada uno de estos aspectos se discuta de manera particular, y posteriormente se realice la integración de los mismos.

8.1. Concentración de HPAs.

Los resultados obtenidos denotan que el acenafteno, el benzo (a) antraceno, el pireno y el benzo (a) pireno, en ese orden de relevancia, son los HPAs que dominan en el Estero de Urías en el presente estudio. Estos compuestos se determinaron con mayor frecuencia y presentaron las concentraciones más elevadas tanto en las muestras de sedimentos como en los mejillones de las diferentes estaciones muestreadas en el sistema (Tablas 4 y 6).

Los HPAs son compuestos cuya concentración en agua y sedimentos es modificada por factores físicos y químicos, mientras que su acumulación en organismos depende además de factores biológicos como la edad, hábitos de alimentación, capacidad de biotransformación y contenido lipídico, por citar algunos (Kennish, 1992, Baumard *et al.*, 1998). De acuerdo a ello, es posible inferir la influencia de diversos factores sobre la presencia y concentración de HPAs en cada una de las diferentes matrices ambientales analizadas en el Estero de Urías.

8.1.1. Agua.

El único compuesto detectado en agua fue el benzo (a) antraceno (BaA, compuesto con 4 anillos aromáticos), que se registró únicamente en El Castillo. De los isómeros con número de masa 228, este compuesto es un isómero menos estable, “cinético”, que al aumentar su proporción respecto a los compuestos parentales termodinámicamente más estables, en este caso el criseno, refieren un origen antropogénico o de combustión (Yunker y McDonald, 1995). Asimismo, Yunker *et al.*, (2002) sugieren que la relación BaA/228 podría indicar de una manera más definitiva las emisiones vehiculares que cualquier otra de las relación molecular de HPAs. En El Castillo se detectaron varias granjas camaroneras, donde con frecuencia se recurre a máquinas de bombeo que utilizan diesel como combustible, por lo que puede sugerirse que la presencia de benzo (a) antraceno en El Castillo está asociada con los residuos de combustión de las bombas referidas o bien con actividades recientes de navegación en el sitio. Por otra parte, La concentración de HPAs en agua no rebasó, en ninguno de los sitios el Criterio de Calidad Ambiental (USEPA) correspondiente a 0.03 µg/l (Law *et al.*, 1997), ni la Concentración Máxima Permisible (Unión Europea), de 0.2 µg/l (Law *et al.*, 1997). Dado que los HPAs son compuestos hidrofóbicos y su solubilidad en agua es baja, la proporción de aquellos que pueden presentarse en forma disuelta es de aproximadamente el 33%, mientras que la fracción restante está asociada a la materia particulada (Lee y Grant, 1981). Los HPAs disueltos parecen degradarse rápidamente por foto-oxidación, proceso facilitado además por temperaturas elevadas, niveles altos de oxígeno disuelto y la incidencia de radiación solar (Baumard *et al.*, 1999), factores presentes en el sistema de estudio, por lo que los resultados obtenidos en agua se comportan de acuerdo a lo esperado.

8.1.2. Sedimentos.

Resulta notable que el acenafteno se haya registrado en los tres sitios de muestreo. La literatura señala que la presencia de acenafteno, fluoreno y fenantreno refiere aportes de cenizas de carboeléctricas (Daling *et al.*, 2002). Las partículas derivadas de la combustión pueden ser transportadas por el viento y depositarse en las zonas aledañas. De acuerdo a un estudio realizado respecto a las emisiones de termoeléctricas a nivel nacional (SEMARNAT – CEPAL, 2004) la termoeléctrica de Mazatlán “José Aceves Pozos” arroja al ambiente 4, 170 ton/año de partículas suspendidas, y se calcula que

localmente la pluma de contaminantes puede llegar a 50 km de la fuente, sin sufrir transformaciones químicas. Asimismo, las partículas depositadas *in situ* tienden a adsorberse a los sedimentos (Baumard *et al.*, 1999), y de esta manera pueden transportarse a través de la laguna. De tal manera es posible asociar la presencia de acenafteno, fluoreno y fenantreno con las emisiones de la termoeléctrica, las cuales extienden su influencia sobre todo el sistema de manera importante.

En Puente Juárez, la relación An/An+Phe refiere que los HPAs provienen de la combustión (Budzinski *et al.*, 1997; Soclo *et al.*, 2000). De manera particular, la proporción Fla/Fla+Pyr señala pirólisis de combustibles fósiles líquidos (Budzinski *et al.*, 1997; Yunker *et al.*, 2002). Este comportamiento puede relacionarse con la navegación de lanchas de pescadores, actividad que predomina en la zona. Estos vehículos pueden aportar HPAs derivados de la combustión incompleta del combustible de los vehículos, como lo señala el valor de la relación Fla/Fla+Pyr.

En los sedimentos de Astillero, de manera similar a los de Puente Juárez, el índice molecular Ant/Ant+Phe refiere un origen pirogénico (Budzinski *et al.*, 1997; Yunker *et al.*, 2002) para los HPAs del sitio. Adicionalmente, los registros obtenidos permitieron calcular también el índice BaA/BaA+Chry, que concuerda señalando un proceso de combustión como fuente principal de HPAs (Budzinski *et al.*, 1997; Soclo *et al.*, 2000). Asimismo, el índice Fla/Fla+Pyr indica combustión, particularmente de pasto, madera o carbón (Yunker *et al.*, 2002). Resulta notable que este sitio es el más cercano a la termoeléctrica José Aceves Pozos, donde el combustible usualmente es carbón o algún otro combustible pesado (SEMARNAT-CEPAL, 2004), por lo que este resultado concuerda con el tipo de contaminación esperada en este sitio.

Los índices moleculares calculados para El Castillo, muestran un comportamiento más complejo. La relación BaA/BaA+Chry refiere contaminación de HPAs provenientes de combustión, sin embargo tanto el índice Ant/Ant+Phe como el Fla/Fla+Pyr señalan fuentes petrogénicas (Budzinski *et al.*, 1997; Soclo *et al.*, 2000), contrastando con Puente Juárez y Astillero, sitios donde estos índices señalan contaminación por combustión. Cabe señalar que este sitio fue el único donde se detectó indeno(123cd) pireno, compuesto que en la literatura se refiere como indicador de la quema de vegetación (Schulz y Emeis, 2000), por lo que probablemente la presencia de este compuesto se asocie con las actividades agrícolas que se desarrollan en las zonas

adyacentes a la cabecera y la parte media de laguna. Resulta notable que este sitio es menos frecuentado por embarcaciones, por lo que la contaminación por combustibles sin quemar puede atribuirse a otras fuentes. El Castillo se ubica en la zona de la cabecera del sistema lagunar del Estero de Urías. De acuerdo a la literatura, la dinámica del sistema presenta un efecto predominante de la marea en el transporte de agua y sedimentos así como los escurrimientos marginales (Montaño-Ley *et al.*, 2000), lo que favorece que la cabecera de la laguna resulte un sitio de depósito (Montaño-Ley *et al.*, 2000). De esta manera los sedimentos provenientes de otras localidades, contaminados por fuentes petrogénicas, pueden llegar hasta este sitio. Por otra parte, en el área se presenta la actividad de diferentes granjas camaroneras, las que recurren al uso de bombas para renovar el agua de sus sistemas. Los sistemas de bombeo suelen ser operados por motores abastecidos por diesel o gasolina, y esto probablemente contamine los efluentes de la granja, que son vertidos al estero. En cuanto al aporte de HPAs derivados de la combustión, cabe esperar la influencia de la termoeléctrica mediante la depositación *in situ* de partículas atmosféricas (SEMARNAT-CEPAL, 2004) o por la llegada de sedimentos contaminados provenientes de otras localidades (Montaño-Ley *et al.*, 2000).

De manera global, puede sugerirse que aún cuando la termoeléctrica ejerce un efecto importante en todo el sistema, como lo refiere el comportamiento del acenafteno, cada uno de los sitios de estudio presenta particularidades respecto al origen y niveles de HPAs.

De las tres estaciones de estudio, Puente Juárez sobresale como un sitio de elevada dinámica por el efecto de la marea, lo cual dificulta el depósito de sedimentos, de materia orgánica y de contaminantes. En contraste con el comportamiento presentado por Astillero y El Castillo, los sedimentos de este sitio mostraron una proporción dominante de compuestos de BPM. Asimismo, aún cuando Puente Juárez presenta actividad de las embarcaciones de pescadores así como descargas domésticas directas y escurrimientos urbanos con residuos de la actividad vehicular (los que constituyen fuentes importantes de HPAs), la diversidad y concentraciones de estos compuestos fueron menores que en Astillero y El Castillo. Por otra parte, Astillero se encuentra menos influenciado que Puente Juárez por las corrientes de marea y tiene mayor proximidad a la fuente de HPAs probablemente más relevante del Estero de Urías, la termoeléctrica J. Aceves Pozos, por lo que puede suponerse que presente una mayor

tasa de depósito de contaminantes. Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta localidad, en la que se registró la mayor concentración de HPAs en sedimentos. Finalmente, en El Castillo la dinámica del sistema favorece el depósito de sedimentos y esto determina una composición de HPAs de origen diverso, lo que se suma a un aporte presumiblemente moderado de HPAs por las actividades acuícolas y agrícolas presentes en la zona.

Lo anteriormente planteado permite sugerir que los resultados obtenidos en la concentración de HPAs en las tres localidades de estudio muestran un comportamiento acorde a la naturaleza y ubicación de las fuentes de contaminación así como a la dinámica del sistema.

Por otra parte, la comparación de las concentraciones del contaminante presentes en el área de estudio respecto a los valores referidos por las guías de calidad sedimentaria (SQG por sus siglas en inglés, Long *et al.*, 1993), permitió determinar la probabilidad de efectos adversos en la biota.

Tanto el nivel de umbral de efectos (*Threshold Effect Level, TEL*), el nivel de efectos probables (*Probable Effect Level PEL*, propuestos por McDonald, 1994) y las Guías de Calidad Sedimentaria (propuestas por Long *et al.*, 1995, que constituyen la base para el desarrollo de la Guía Nacional de Calidad Sedimentaria del gobierno canadiense) refieren intervalos de concentración de HPAs con potencial de inducir efectos biológicos adversos (Tabla 13). De acuerdo a los criterios de calidad sedimentaria, en las tres localidades de estudio la concentración del acenafteno fue mayor que el TEL, el ERL (*Effects Range Low*, Intervalo de Efectos Mínimos, que refiere probabilidad escasa de efectos negativos en organismos), el ERM (*Effects Range Median*, Intervalo Medio de Efectos, con probabilidad frecuente de efectos negativos en organismos, correspondiente a 0.5 µg/g PS) y también que el PEL (nivel de efectos probables *Probable Effect Level*, 0.09 µg/g PS). En Astillero, la concentración de todos los HPAs determinados en los sedimentos, excepto el benzo(k)fluoranteno, rebasaron el TEL (*Threshold Effects Level*), mientras que el acenaftileno, el fluoreno, el antraceno y el benzo(a)pireno superaron los niveles del ERL. En este sitio la concentración de benzo(a)antraceno, de 3.71 µg/g PS, fue mayor que el PEL, el ERL y el ERM (el ERM es de 1.6 µg/g PS). En la localidad de El Castillo, las concentraciones de naftaleno, acenaftileno, benzo(a)antraceno y benzo(a)pireno rebasaron el TEL, pero sólo los dos

últimos compuestos superaron también el ERL. Finalmente, en Juárez sólo la concentración de fluoreno rebasó tanto el TEL como el ERL (Tabla 13).

Tabla 13. Criterios de calidad sedimentaria para HPAs y concentraciones registradas en los sedimentos de los sitios de muestreo del Estero de Urías ($\mu\text{g/g PS}$).

No. ANILLOS	COMPUESTO	Puente Juárez	Astillero	Castillo	TEL	PEL	ERL	ERM
2	Naftaleno	ND	0.10	0.05	0.03	0.39	0.16	2.10
2	Acenaftileno	0.01	0.05*	0.02	0.01	0.13	0.04	0.60
2	Acenafteno	0.68* ^o	1.28*^o	0.92*^o	0.01	0.09	0.02	0.50
2	Fluoreno	0.07*	0.03*	0.01	0.02	0.14	0.02	0.50
3	Fenantreno	0.05	0.11	0.02	0.09	0.54	0.24	1.50
3	Antraceno	0.04	0.13*	0.01	0.05	0.24	0.09	1.10
4	Fluoranteno	0.10	0.14	0.08	0.11	1.49	0.60	5.10
4	Pireno	0.13	0.40	0.07	0.15	1.40	0.70	2.60
4	Benzo (a) antraceno	ND	3.71*^o	0.64*	0.07	0.69	0.30	1.60
4	Criseno	ND	0.17	0.01	0.11	0.85	0.40	2.80
4	Benzo (b) fluoranteno	ND	ND	0.02	0.07	0.71	N.R.	N.R.
4	Benzo (k) fluoranteno	ND	0.03	0.01	0.06	0.61	N.R.	N.R.
5	Benzo (a) pireno	ND	0.65*	0.44*	0.09	0.76	0.40	1.60
5	Indeno (123-cd) pireno	ND	ND	1.52	NR	NR	N.R.	N.R.
5	Dibenzo (ah) antraceno	ND	0.06	0.01	NR	NR	0.06	0.30
CONCENTRACIÓN TOTAL		1.08	6.86*	3.83	-	-	4.02	44.8

TEL: *Threshold effects level*, nivel de umbral de efectos; PEL: *Probable effects level*, nivel de efectos probables; (MacDonald *et al.*, 1996).
 ERL: *Effects range-low*, intervalo inferior de efectos, ERM: *Effects range-median* intervalo medio de efectos (Long *et al.*, 1995).
Negrita: Valor superior al TEL; * Valor superior al PEL; • Valor superior a ERL ^o Valor superior al ERM
 N.R. No reportado por los autores

Con base en lo anterior, es posible afirmar que Astillero presentó los sedimentos con mayor contaminación por HPAs, pues todos los compuestos evaluados rebasan el TEL mientras que 6 de 16 compuestos evaluados presentaron concentraciones asociadas con probabilidad baja o media de efectos deletéreos en la biota. Asimismo, es el único de los tres sitios donde la concentración de HPAs totales ($6.86 \mu\text{g/g PS}$) se localiza en el intervalo de efectos mínimos (ERL, $4.02 \mu\text{g/g PS}$; Tabla 13).

Por otra parte, el promedio de las tres estaciones muestreadas en el Estero de Urías corresponde a 3.92 $\mu\text{g/g}$ PS de HPAs totales. Esta concentración resulta superior a la reportada para lagunas del Golfo de México con influencia antropogénica, como Pueblo Viejo y Tamiahua, donde se registraron promedios de 3.7 y 2.99 $\mu\text{g/g}$ PS, respectivamente, mientras que es inferior a la reportada para las lagunas de Tampamachoco, la Mancha, Salada, Mandinga y Llano para las que se reportaron concentraciones promedio de 7.65, 6.72, 6.65, 5.67, y 5.0 $\mu\text{g/g}$ PS (Botello y Calva, 1998; Botello *et al.*, 2001). Resulta de particular interés que en la laguna de Tampamachoco la concentración más elevada fue de 9.39 $\mu\text{g/g}$ PS y se registró en la estación más cercana a una termoeléctrica. De manera similar, en el presente estudio la mayor concentración de HPAs (6.86 $\mu\text{g/g}$ PS) se detectó en los sedimentos de Astillero, la estación más cercana a la termoeléctrica José Aceves Pozos.

Aún cuando la concentración promedio de HPAs totales en el Estero de Urías fue menor que en varias lagunas impactadas en el Golfo de México (Botello y Calva, 1998; Botello *et al.*, 2001), la concentración obtenida supera ampliamente la concentración reportada para ambientes estuarinos no impactados, como la referida en Tampa Bay y Charlotte Harbor, Florida, donde las concentraciones más bajas de HPAs en sedimentos fueron inferiores a 0.0005 $\mu\text{g/g}$ PS y 0.2 $\mu\text{g/g}$ PS, respectivamente (Pierce *et al.*, 1986; Van Vleet *et al.*, 1986).

Las concentraciones de HPAs totales así como las de HPAs específicos, rebasaron en varios casos los niveles de referencia de las guías de calidad sedimentaria, y ello señala la necesidad de realizar las evaluaciones que permitan determinar la toxicidad y magnitud del efecto tóxico de este grupo de contaminantes sobre los organismos residentes en el sistema de estudio (Chapman, 2007).

8.1.3. Organismos.

Los organismos de El Castillo presentaron la menor concentración de HPAs totales, mientras que los de Juárez y Astillero registraron valores similares (Tabla 6, Fig. 8). Los compuestos de mayor bioacumulación fueron el benzo(a)pireno, el indeno(1,2,3,cd)pireno y el acenafteno.

En relación a los HPAs de bajo peso molecular, cabe destacar que el acenafteno presentó las mayores concentraciones en los sedimentos de los tres sitios muestreados (superando todos los criterios de calidad sedimentaria y de protección a la biota; Tabla 13), y una de las mayores concentraciones detectadas en los mejillones de puente Juárez. No obstante, la correlación de las concentraciones entre estas matrices no resultó significativa ($p > 0.05$) y el coeficiente de regresión fue bajo ($R^2 = 0.28$, Tabla 7). Considerando que un compuesto de 2 anillos presenta una mayor posibilidad de ser depurado, su persistencia en los organismos sugiere aportes recientes o constantes al sistema de estudio. Dado que el aporte de acenafteno se asocia con las cenizas de termoeléctricas (Daling *et al.*, 2002), cabe esperar que se mantenga un aporte constante en el Estero de Urías, que se ve reflejado en la acumulación corporal de los mejillones en estudio.

Del mismo modo que el acenafteno, el fluoranteno se encuentra asociado a las cenizas arrojadas al ambiente por la Termoeléctrica J. Aceves Pozos (Daling *et al.*, 2002). Si bien las concentraciones de este compuesto no rebasaron los criterios de calidad sedimentaria en ninguno de los sitios de estudio, la regresión lineal efectuada entre las concentraciones registradas en los sedimentos y las bioacumuladas mostró un coeficiente de regresión elevado ($R^2 = 0.73$).

En los tres sitios de estudio, los compuestos de APM presentaron una mayor acumulación en los organismos respecto a los de BPM (Fig. 9 y 10), lo cual corrobora lo señalado en la literatura. Varios autores refieren que el factor de bioconcentración se incrementa al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos (Neff, 1982; Lee y Grant, 1981). Particularmente el benzo(a)pireno es un compuesto que puede ser eliminado por los organismos con menor facilidad. Neff (1982) señala que después de 7 días de depuración, individuos de *Crassostrea virginica* eliminaron 97% del naftaleno acumulado, 66% de fluoranteno y 0% de benzo(a)pireno.

Los valores de HPAs de APM cuantificados en sedimentos y en organismos de las diferentes estaciones de muestreo no mostraron correlaciones significativas entre sí, mientras Astillero presentó la mayor concentración de HPAs de alto peso molecular en sedimentos (5.02 $\mu\text{g/g}$), la concentración de estos compuestos en los bivalvos del sitio (1.94 $\mu\text{g/g}$ PS) fue similar a la de Puente Juárez (2.04 $\mu\text{g/g}$ PS), donde se registró la menor concentración de HPAs de APM (Tabla 6, Fig. 9 y 10). No obstante, de manera

particular, el benzo(a)pireno presentó un coeficiente de regresión elevado entre las concentraciones de sedimentos y las de tejidos evaluadas en el sistema de estudio (0.85, Tabla 7), lo que puede asociarse con su elevada capacidad de persistencia en los organismos marinos (Neff, 1982).

Dado que Astillero y Castillo fueron las localidades con mayor concentración de HPAs totales en sedimentos (6.86 y 3.83 $\mu\text{g/g}$ PS, respectivamente), mientras que los organismos que presentaron las concentraciones más elevadas de HPAs se ubicaron en Puente Juárez y Castillo (2.81 y 2.71 $\mu\text{g/g}$ PS, respectivamente), es posible sugerir varios factores que pueden estar modificando la biodisponibilidad y por ende la biocumulación de HPAs en cada una de las localidades.

Entre los factores externos, el contenido de materia orgánica en los sedimentos regula la proporción de compuestos orgánicos no iónicos presentes en las partículas y en el agua intersticial (Landrum, 1985). Se ha demostrado que el contenido de carbono orgánico afecta sustancialmente la toxicidad de estos compuestos en la biota (Burton, 1992). Swartz *et al.* (1990) encontraron que la CL_{50} del fluoranteno total sedimentario se incrementó al aumentar la concentración del carbono orgánico en el sedimento, señalando que el contaminante estaba menos biodisponible en los sedimentos de mayor contenido de materia orgánica.

El contenido de materia orgánica en los sedimentos de Puente Juárez, Astillero y Castillo fue de 6.2, 17.8 y 10.3 %, respectivamente. En Astillero se presentó la mayor concentración de hidrocarburos en el sedimento y también un porcentaje de materia orgánica más elevado que en el resto de los sitios, por lo que es posible sugerir que la fracción de hidrocarburos biodisponibles se haya visto sustancialmente disminuida en relación a las otras estaciones. En contraste, Puente Juárez presentó el menor contenido de materia orgánica, lo cual favorece que la proporción de hidrocarburos biodisponibles se incremente y favorezca su acumulación por los organismos. En El Castillo, las concentraciones de HPAs totales y de contenido de materia orgánica presentaron un valor intermedio, y presumiblemente ambos factores determinaron que en este sitio se encontrara la menor concentración de HPAs en los tejidos de los mejillones. De tal manera, el contenido de materia orgánica en los sedimentos del Estero de Urías puede explicar en parte los factores de bioconcentración de los HPAs totales calculados, de

acuerdo a Landrum (1985), en 2.60, 0.39 y 0.25 para los mejillones provenientes de P. Juárez, Astillero y Castillo, respectivamente.

Cabe señalar que tanto la toxicidad como la bioconcentración de los HPAs es muy variable entre los organismos estuarinos. Aún cuando la mayoría de ellos acumulan HPAs del agua o los sedimentos, la incorporación de los mismos es especie-específica (Eisler, 1987). Jackim y Lake (1978) señalan que mientras la depuración en *Mercenaria mercenaria* resulta escasa o nula, *C. virginica* elimina en 14 d hasta un 90% de los hidrocarburos acumulados. Pruell *et al.* (1986) reportan que *Mytilus edulis* acumula elevados niveles de HPAs (incluso 1000 veces la concentración de los organismos control) provenientes de sedimentos altamente contaminados en un período de 28 días de exposición, sin embargo, los depura rápidamente en las 5 semanas posteriores.

De acuerdo a lo anterior, se sugiere que las diferencias presentadas por los sitios de estudio tanto en el contenido de materia orgánica como en la distribución y naturaleza de los compuestos más abundantes, que se relacionan con la capacidad de incorporación y de depuración de los compuestos por los mitílidos, no permiten que se observe una correlación clara entre la concentración presente en los sedimentos y la concentración de HPAs en los tejidos de *M. strigata*. No obstante, la bioacumulación de HPAs observada denota que estos organismos resultan integradores adecuados que reflejan las condiciones prevalentes del sistema, constituyendo una matriz más estable para la evaluación de contaminantes, si bien esta capacidad integradora puede dificultar la detección de diferencias entre los sitios de estudio.

Los valores de HPAs totales registrados en *M. strigata* en el presente estudio, resultan superiores a los 0.12-0.24 µg/g PS reportados para *Crassostrea virginica* en lagunas de Tabasco donde las concentraciones de HPAs en sedimentos son similares a sitios de referencia en Florida (Gold-Bouchot *et al.*, 1997). Por otra parte, la literatura refiere concentraciones máximas de HPAs totales correspondientes a 22.7, 18.2, 13.2 y 10.2 µg/g PS registrados en organismos de *Crassostrea palmula*, *Mytella strigata*, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea iridiscens* colectados en el Pacífico subtropical mexicano (Botello *et al.*, 2002), mientras que Páez-Osuna *et al.* (2002) reportan concentraciones de 0.12 a 3.52 µg/g PS registrados en *C. corteziensis*. Estas concentraciones resultan notablemente superiores a las determinadas para *M. strigata* en el presente estudio.

De manera particular, Botello *et al.* (2002) refieren una concentración de aproximadamente 2.5 µg/g PS de HPAs totales para *Mytella strigata* en el Estero de Urías, similar a la determinada en el presente trabajo. La similitud en las concentraciones sugiere un aporte constante de HPAs a este sistema lagunar y su continua acumulación por los organismos del sitio, donde los efectos biológicos dependerán de la cantidad de hidrocarburos biodisponibles, de la capacidad de depuración de los organismos y de la bioacumulación de estos compuestos en los órganos blanco. Cabe esperar una repercusión en diferentes niveles de organización biológica, la cual puede impactar la estabilidad de las poblaciones de *M. strigata* en el sistema de estudio. Por ello es necesario considerar la información disponible respecto a las concentraciones en las que los HPAs pueden ejercer efectos adversos en la biota. La literatura relacionada es muy escasa, ya que la mayor parte de los autores señalan la toxicidad o los efectos adversos causados por los niveles de HPAs en el medio sin determinar la concentración bioacumulada. Asimismo, los estudios de toxicidad suelen realizarse para HPAs individuales y no para HPAs totales, por lo que resulta complejo establecer una comparación directa entre las referencias y los valores de HPAs totales encontrados para *M. strigata* en el Estero de Urías. No obstante, existen numerosos estudios en bivalvos realizados *in situ* donde se ha observado una correlación entre la concentración de HPAs bioacumulados y la magnitud del deterioro de diversas respuestas en diferentes niveles de organización biológica.

8.2. Biomarcadores de exposición. Actividad EROD.

En el presente estudio, la actividad EROD fue evaluada como un biomarcador específico de la presencia de HPAs en el sistema de estudio, con base en los numerosos reportes encontrados en la literatura. En ellos se refiere que la exposición de los organismos a estos contaminantes induce a la familia de proteínas CYP1A mediante el receptor aril hidrocarburo y constituye un biomarcador de exposición a los HPAs, proporcionando una valiosa herramienta para el monitoreo ambiental de estos compuestos orgánicos (Payne, 1976; Torres *et al.*, 2002; Fent, 2004; Bebianno *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, el valor máximo de la actividad EROD en *M. strigata* fue de 0.61 y 0.62 pmoles/min/mg proteína. Estos valores son similares al valor basal de *D.*

polymorpha, de 0.5 pmoles/min/mg proteína (Binelli *et al.*, 2005) y se encuentran alejado de los valores que en la literatura se han relacionado con una inducción por contaminantes. En *Dreissena polymorpha* se han reportado niveles hasta de 38.81 pmoles/min/mg proteína de actividad EROD máxima, por exposición a contaminantes ambientales en el Río St. Lawrence, Canadá (Lafontaine *et al.*, 2000). A la vez, la máxima actividad EROD registrada en un bivalvo mitílido, *Mytella guyanensis*, resultó cercana a 25 pmoles/min/mg proteína (Torres *et al.*, 2002); no obstante, los autores sugieren que pudo ser subestimada por el efecto inhibitorio de altas concentraciones de metales en el sitio de estudio.

Acorde a lo anterior y dado que en los tres sitios de estudio (Juárez, Astillero y Castillo) las concentraciones de varios HPAs fueron superiores a los criterios de calidad sedimentaria y al umbral de efectos biológicos, y se registró una concentración corporal de HPAs en *M. strigata* propia de sistemas lagunares impactados, se esperaba que en los mejillones se observara una inducción de la actividad EROD (indicadora de la actividad del sistema CYP1A), en contraste con los resultados obtenidos.

La relación inversa registrada entre la actividad enzimática EROD y los HPAs acumulados en *M. strigata* sugieren la inhibición del sistema CYP1A, comportamiento similar al descrito por Yawetz *et al.* (1992) en *Donax trunculus*. En este bivalvo, la exposición a aroclor 1254 se asoció a un decremento en la actividad EROD y se argumenta que la elevada acumulación de hidrocarburos en la fracción microsomal pudo inhibir esta actividad.

En *M. strigata* se observó una correlación significativa ($p < 0.05$, $r^2 = 0.75$) sólo entre la actividad EROD y los niveles acumulados de benzo(a)pireno; los mejillones de Astillero y Castillo presentaron los mayores valores de actividad EROD y también una elevada concentración de benzo(a)pireno, mientras que en los de Juárez, que mostraron la menor actividad enzimática, este compuesto no fue detectado en sus tejidos. Ello evidencia que la inducción/inhibición de esta enzima en bivalvos que habitan ambientes sujetos a multiestresores se encuentra afectada por la interacción de otros factores, como contaminantes inhibidores de esta enzima, o bien moduladores naturales, y resulta difícil correlacionarla con el efecto aislado de un sólo grupo de contaminantes como los HPAs. De esta manera, es necesario considerar el efecto de otros grupos de contaminantes y sus metabolitos sobre el sistema P450.

Diversos trabajos refieren que el Cu, Zn, Cd, Pb y As inhiben algunas actividades enzimáticas del sistema CYP como la actividad EROD asociada con CYP1A1 (Álvarez *et al.*, 1972; Lemaire-Gony y Lemaire, 1992; Elbekai y El-Kadi, *et al.*, 2004) y alteran la expresión de las iso-enzimas CYP (Risso-de Faverney *et al.*, 1999). De manera particular, el Cd y el Pb afecta negativamente la expresión del RNAm de la CYP1A1 y CYP1A2 (Risso de Faverney *et al.*, 2000; Vakharia *et al.*, 2001; Kaminsky (2006) señala que la magnitud del efecto de los metales en la inducción de los citocromos P4501A1, 1A2 y 1B1 depende tanto del HPAs inductor como del metal en cuestión, además de la especie y la dosis de este último, y que los mecanismos implicados en el decremento de las formas de CYP1 son transcripcionales y posttranscripcionales. Por otra parte, Kappas y Drummond (1984; 1986) refieren que muchos metales, ya sea en forma inorgánica, o unidos a complejos orgánicos, resultan potentes inductores de la hemo-oxigenasa, la cual es una enzima microsomal que limita la degradación del grupo *hemo*. El incremento en la tasa de degradación del *hemo* se refleja tanto en una depresión notable del contenido celular del CYP450 como en el abatimiento del metabolismo oxidativo que depende de esta proteína.

Cabe señalar que en el Puerto de Mazatlán se han reportado niveles de Cu, Zn, Cd, y Pb que señalan un enriquecimiento antropogénico (Osuna-López *et al.*, 1989; Soto-Jiménez y Páez Osuna, 2001). De tal manera, las referencias anteriores permiten sugerir que la baja actividad EROD registrada en *M. strigata* en el presente estudio puede deberse en parte a la inhibición de la CYP1A por la exposición de estos organismos a HPAs y metales, entre otros xenobióticos, los que pueden influir en la inducción de la proteína así como en la degradación del grupo *hemo* del CYP450. Asimismo, en ambientes naturales pueden actuar de manera conjunta, además de los contaminantes, otros inductores e inhibidores de CYP. Entre ellos, la temperatura, la estacionalidad y la actividad hormonal sexual pueden modular la capacidad de respuesta del sistema CYP1A (Pluta, 1993; Stegeman y Hahn, 1994).

Cabe señalar que en organismos de campo es difícil inferir una correlación entre respuestas biológicas y la concentración de contaminantes dado que los tóxicos presentan diferentes tiempos de vida media. En los mejillones, éste puede ser de días para cobre y pesticidas, de meses para metales como el cadmio y de años para compuestos orgánicos persistentes (Viarengo *et al.*, 1985; Poremski y Wiandt, 2000). A la vez, los tóxicos pueden ser parcialmente almacenados en los compartimentos

celulares bajo formas inactivas (Viarengo y Nott, 1993). Por ello, pueden presentarse en diferentes concentraciones en los individuos de edades diferentes. Adicionalmente, los organismos de campo pueden encontrarse en diferentes etapas de madurez gonadal y por ello presentar diferentes patrones de acumulación en los tejidos y diferentes respuestas biológicas (Viarengo *et al.*, 2007).

Dada la relevancia de los mejillones en los programas de monitoreo ambiental, se ha intentado identificar el gen CYP1A en el DNA nuclear así como aislar iso-proteínas CYP en los tejidos y purificar citocromos del retículo endoplásmico de la glándula digestiva, con resultados negativos (Viarengo *et al.*, 2007). Jonsson *et al.* (2004; 2006) reportan que incluso la expresión de citocromos CYP2 y CYP4, los cuales detectaron en mejillones, no fue afectada por la exposición a bifenilos policlorados a petróleo crudo o a HPAs. Debido a la multiplicidad de factores bióticos y abióticos involucrados, varios autores han referido que en los bivalvos la respuesta de la familia de proteínas CYP450 a los contaminantes no es consistente (Livingstone *et al.*, 1989; Yawetz *et al.*, 1992; Cajaraville *et al.*, 2000).

De tal manera, es pertinente que en los estudios de biomonitoreo donde se presentan contaminantes en mezclas complejas y no se pueda descartar la presencia de metales pesados, se utilice una batería de biomarcadores que incluya indicadores de estrés de tipo tanto específico como general, para realizar una evaluación más precisa.

8.3. Biomarcadores de efecto. Nivel sub-organismo.

Estabilidad lisosomal. Particularmente, los organismos colectados en Astillero presentaron los valores más bajos de estabilidad lisosomal, lo que refiere una condición celular más deteriorada por el efecto de contaminantes. No obstante, la concentración de HPAs en tejidos de los organismos de Astillero fue similar a los mejillones de Puente Juárez, si bien la estabilidad lisosomal en los mejillones de este último sitio resultó significativamente superior. La falta de relación entre los HPAs bioacumulados y la estabilidad lisosomal observada en los organismos del presente estudio puede derivarse de la exposición simultánea de *Mytella strigata* tanto a HPAs como a otros grupo de contaminantes, principalmente metales. En individuos de *Mytilus galloprovincialis* transplantados a sitios contaminados con metales, se observó un decremento

significativo de la estabilidad lisosomal (Donnini *et al.*, 2007). Así, en *M. strigata* al igual que en otros bivalvos, la estabilidad de la membrana lisosomal puede alterarse por la exposición a xenobióticos tanto orgánicos como metálicos (Moore, 1985).

Concentración de proteínas. Los organismos de Puente Juárez presentaron las mayores concentraciones de proteínas solubles tanto en hemolinfa como en músculo; los niveles de proteínas en hemolinfa de P. Juárez no presentaron diferencias significativas respecto a los valores determinados en El Castillo pero sí respecto a los de Astillero, mientras que la proteína muscular fue similar entre los organismos de Astillero y los de Castillo. No obstante, no se observó una relación entre los niveles de HPAs bioacumuladas por los organismos y las concentraciones de proteínas evaluadas.

Sreedevi *et al.* (1992) señalan que en *Cyprinus carpio* la exposición a metales en tiempos y concentraciones subletales incrementó la concentración de proteínas totales, solubles y estructurales en branquias y riñones; el aumento de las proteínas estructurales sugiere el fortalecimiento de los órganos del animal para desarrollar resistencia al estrés tóxico, mientras que el aumento de las proteínas solubles puede asociarse a la síntesis de proteínas necesarias para la desintoxicación de contaminantes. A la vez, la exposición a concentraciones letales de metales incrementó la concentración de proteínas solubles, lo que sugiere una mayor actividad proteolítica asociada con una mayor acción tóxica de los metales, presumiblemente debido a la liberación de enzimas hidrolíticas ocasionada por la inestabilidad lisosomal.

De manera similar, es posible sugerir que en los mejillones provenientes de Puente Juárez, en los cuales se registró la mayor bioacumulación de HPAs totales, la mayor concentración de proteínas solubles registrada probablemente se asocie al desarrollo de mecanismos de resistencia por la exposición crónica a estresores químicos, lo cual es factible cubrir siempre y cuando exista un suministro energético adecuado y constante.

En este escenario, es posible sugerir dos aspectos: las proteínas solubles en la hemolinfa aportan una información más adecuada de la condición fisiológica global de *M. strigata* que su evaluación en músculo. Así, la menor concentración de proteínas solubles en la hemolinfa de los mejillones provenientes de Astillero puede relacionarse con una menor estabilidad lisosomal y sugiere un mayor deterioro fisiológico que en los organismos de P. Juárez y Castillo. De manera paralela, la mayor concentración de proteínas solubles

en el músculo abductor de los mejillones de P. Juárez sugieren un incremento en la síntesis de proteínas estructurales, lo cual probablemente se asocie con una mejor control del cierre de las valvas y por ende con una mayor rapidez de respuesta a estímulos externos, a menudo estresantes. De esta manera, es posible advertir que las alteraciones bioquímico-celulares pueden tener una proyección a nivel fisiológico-individual.

8.4. Biomarcadores de efecto. Nivel organismo.

Contenido hídrico. El contenido hídrico en bivalvos ha sido utilizado como un indicador de la condición fisiológica (Lucas y Beninger, 1985), donde una mejor condición corresponde a un menor contenido hídrico. De acuerdo a lo anterior, los organismos de Astillero presentan una condición más deteriorada que los mejillones colectados en los otros sitios, reflejándose en una hidratación significativa. No obstante, el peso de los tejidos, sea húmedo o seco, puede variar debido al ciclo reproductivo y otros factores estacionales (Soto *et al.*, 2000), por lo que debe considerarse junto con otras respuestas fisiológicas para realizar una interpretación adecuada.

Índice de condición. Considerando que las concentraciones de HPAs totales determinadas en los tejidos de los organismos de P. Juárez fueron mayores que las encontradas en los otros sitios, cabría esperar que los mejillones de P. Juárez presentaran el menor índice de condición, reflejo de un mayor deterioro fisiológico (Lucas y Beninger, 1985). Contrario a lo esperado, los organismos provenientes de Puente Juárez presentaron un índice de condición 41% y 15% superior al de los mejillones de Astillero y El Castillo, respectivamente. Cabe destacar que en los bivalvos provenientes de P. Juárez, la mejor condición de estabilidad lisosomal aunada a los mayores niveles de proteínas solubles asociados a procesos de compensación, coincide con el mayor índice de condición registrado.

Aún cuando los índices de condición resultan biomarcadores fisiológicos muy sensibles a la contaminación, pueden ser influenciados por cambios estacionales a los que se asocian el estado nutricional y reproductivo (Roesijadi *et al.*, 1984, Leavitt *et al.*, 1990). Puente Juárez recibe efluentes domésticos sin tratar, presumiblemente con un alto contenido de materia orgánica, la que probablemente aporte a estos organismos

filtradores la energía necesaria para contrarrestar el efecto tóxico de los contaminantes ambientales. De esta manera, la participación de éste y otros factores nutricionales ejercen sobre el índice de condición una influencia mayor al efecto negativo de los HPAs, y puede dar cuenta de la falta de relación entre la bioacumulación de hidrocarburos y el índice de condición determinado en el presente trabajo.

Tasa de aclaramiento. En los bivalvos, la tasa de aclaramiento (TA) es modificada por diversos factores ambientales tales como la materia orgánica particulada (Rueda y Smaal, 2004; Sobral y Widdows, 2000), la materia orgánica total (Wong y Cheng, 2003), el contenido de clorofila a en las partículas filtradas (Rueda y Smaal, 2004; Savina y Pouvreau, 2004) y la velocidad de la corriente (Sobral y Widdows, 2000) entre otros, así como por efecto de tóxicos ambientales. Varios trabajos refieren que en bivalvos, la tasa de aclaramiento es el componente del balance energético más afectado por los tóxicos (Howell *et al.*, 1984; Bourdelin, 1996, Toro *et al.*, 2003). Los contaminantes orgánicos suelen tener un efecto narcotizante en los cilios ctenidiales o producir alteraciones morfológicas en los filamentos branquiales, así como severos desórdenes en las células ciliadas epiteliales (Bayne *et al.*, 1982; Auffret, 1988). De manera particular, Widdows y colaboradores (1995a, 1997) han comprobado el efecto adverso que particularmente los HPAs de 2 y 3 anillos ejercen sobre la tasa de aclaramiento y se refleja en el campo de crecimiento en diferentes especies de mejillones, si bien en *M. edulis* se documentó que en condiciones de laboratorio es necesaria una concentración de 100 µg/g PS tejido para disminuir al 50% la tasa de aclaramiento (Donkin *et al.*, 1989). En contraste, los compuestos de más de 4 anillos pueden acumularse en elevadas concentraciones con un efecto escaso o nulo en la tasa de aclaramiento (Donkin *et al.*, 1989; Widdows *et al.*, 1990). Sin embargo, la reducción en la TA de *Choromytilus chorus* se ha relacionado con la elevada acumulación corporal de HPAs de APM (3 y 4 anillos) y la acumulación de compuestos organoclorados, aún en bajas concentraciones. (Toro *et al.*, 2003) En el presente trabajo la tasa de aclaramiento registrada para los organismos de las diferentes localidades de estudio fue similar, e independiente tanto de la bioacumulación de los HPAs totales como de los HPAs de BPM o de APM. Mientras las concentraciones de hidrocarburos de BPM (2 y 3 anillos aromáticos) resultaron similares en los organismos de Puente Juárez y Astillero, en El Castillo esta concentración corresponde al 50% de la determinada para los sitios anteriores. Sin embargo, la concentración de acenafteno

(compuesto de 2 anillos) bioacumulado por *M. strigata* en El Castillo es apenas 12% menor que la de Astillero, y su concentración en sedimentos supera los niveles tanto del PEL como del ERM, de manera similar a lo presentado por Puente Juárez y Astillero. La TA de *M. strigata* proveniente de los tres sitios de estudio (1.26 a 1.98 l/h g PS) es mayor a la reportada en *C. chorus* proveniente de áreas de elevado impacto industrial, pero similar e incluso ligeramente mayor a la de los bivalvos provenientes de ambientes de baja influencia antrópica (Toro *et al.*, 2003), lo que sugiere respuestas especie-específicas.

Acorde a los resultados obtenidos, es posible suponer que la similitud en la TA de los bivalvos provenientes de los diferentes sitios de estudio obedezca a la interacción de los múltiples factores ambientales que modulan esta tasa, incluidos los diversos tóxicos ambientales, y no refleje el efecto aislado de contaminantes orgánicos particulares como los HPAs.

Eficiencia de asimilación. Al igual que la tasa de aclaramiento, la eficiencia de asimilación en los mejillones puede reducirse por la acción de contaminantes, principalmente hidrocarburos aromáticos (Widdows *et al.*, 1982, 1987), cuya exposición induce cambios patológicos en las células basófilas y digestivas del epitelio digestivo. Muchos xenobióticos inestabilizan la membrana lisosomal, aumentando su permeabilidad y con ello el paso de enzimas hidrolíticas hacia el citoplasma, acelerando la hidrólisis proteica y ocasionando atrofia celular (Lowe, 1988; Lowe y Clarke, 1989; Moore, 1988). De acuerdo a lo planteado cabría esperar una menor eficiencia de asimilación en los mejillones de P. Juárez y Astillero, los que acumularon una mayor concentración de hidrocarburos. Sin embargo, la menor eficiencia de asimilación se presentó en Castillo, con valores 53% y 42% menores respecto a la registrada en los mejillones de Puente Juárez y Astillero, respectivamente.

Cabe resaltar que la eficiencia de asimilación varía tanto con la cantidad como con la cantidad de alimento ingerido por los bivalvos ((Navarro *et al.*, 1991; Bayne, 1987). En condiciones de laboratorio, al utilizar combinaciones algales en la dieta de *M. edulis*, la eficiencia de asimilación no se relaciona con el porcentaje de materia orgánica y sí con la calidad alimenticia de las partículas, expresada como energía por unidad de volumen (Navarro *et al.*, 1991; Bayne, 1987). Bajo condiciones de baja calidad alimenticia *M. edulis* puede aumentar su capacidad de absorción de energía, mostrando un conjunto de

adaptaciones como incrementos en la capacidad digestiva y pérdidas metabólicas fecales minimizadas (Hawkins y Bayne, 1985; Bayne *et al.*, 1987).

En los organismos filtradores como los bivalvos, el contenido de clorofila en la materia orgánica particulada es considerado como referencia de su calidad nutricional (Paterson *et al.*, 2003). Al respecto, la concentración de clorofila registrada en el presente estudio en El Castillo (10.32 µg/l), fue superior a la de Astillero (9.25 µg/l) y mucho mayor que la determinada en P. Juárez (0.69 µg/l) (Anexos, Tabla 1). De tal manera, la concentración de clorofila en los sitios de estudio no da cuenta de la eficiencia de asimilación de *M. strigata*, la cual puede estar modulada por el aporte de otros sustratos energéticos en la columna de agua, no evaluados en este estudio, particularmente en Puente Juárez. Así, la interacción de un grupo de factores adicionales a la presencia de contaminantes, entre ellos las características de los aportes alimenticios y nutricionales particulares de Puente Juárez, pueden dar cuenta de la mayor eficiencia de asimilación en los organismos de este sitio.

Tasa de absorción. La tasa de aclaramiento suele ser el componente que más influye en la tasa de absorción y en el balance energético (Toro *et al.*, 2003, Widdows *et al.*, 1990). Si bien en el presente trabajo los valores de la tasa de aclaramiento fueron similares en los tres sitios de estudio, los mejillones de P. Juárez presentaron una tasa de absorción significativamente mayor que los organismos de El Castillo y Astillero, comportamiento resultante de la mayor eficiencia de asimilación observada en los mejillones de este sitio e independiente de los niveles de HPAs bioacumulados. Consecuentemente, la baja eficiencia de asimilación de los organismos de El Castillo contribuyó a disminuir significativamente su tasa de absorción. De tal manera, en este estudio la eficiencia de asimilación adquiere una relevancia superior a la tasa de aclaramiento en la modulación de la tasa de absorción.

Consumo de oxígeno. Los resultados obtenidos del metabolismo de rutina en *M. strigata* señalan un mayor consumo de oxígeno en los organismos de Puente Juárez y Astillero, los cuales presentaron los mayores niveles corporales de HPAs. De acuerdo a la literatura es posible relacionar una mayor tasa de consumo de oxígeno con un mayor gasto de energía metabólica inducido por la acumulación de contaminantes en los tejidos (Toro *et al.*, 2003). En los bivalvos se ha observado un incremento en el consumo de oxígeno como respuesta incluso a bajas concentraciones de hidrocarburos (Widdows

et al., 1982). Algunos autores sugieren que los hidrocarburos pueden causar un desacoplamiento en la fosforilación oxidativa, aumentando la tasa metabólica (Bayne *et al.*, 1982), mientras que otros sostienen que el incremento en el consumo de oxígeno se relaciona con la actividad enzimática asociada a la degradación de hidrocarburos (Stekoll *et al.*, 1980).

En la misma área de estudio y en la misma especie de bivalvos analizada en el presente estudio, Aztatzi-Aguilar (2007) evaluó el estrés oxidativo en mejillones provenientes de Puente Juárez y de La Sirena (este último correspondiente al sitio denominado El Castillo en el presente trabajo) mediante la cuantificación de la actividad de las enzimas GST (Glutación S-transferasa) y CAT (catalasa) tanto en las branquias como en la glándula digestiva. En todas estas evaluaciones la actividad de los organismos de Juárez fue superior a la de los mejillones de La Sirena, lo que refiere que los organismos de Juárez estuvieron sujetos a mayor estrés. De acuerdo a la literatura, xenobióticos orgánicos como los HPAs y los bifenilos policlorados aumentan la actividad de la CAT (Orbea *et al.*, 2002), mientras que la GST se considera un biomarcador de exposición a contaminantes como organofosforados, organoclorados y HPAs (Clark, 1989). Por otra parte, Durand *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la acumulación de benzo(a)pireno, compuesto relevante por su genotoxicidad y persistencia en el ambiente. Reportaron que tras 96 h de la adición inicial de 0.001 µg/g, los individuos de *M. edulis* bioacumularon el 56.4% de la concentración del medio (0.0006 µg/g) e incrementaron 2 a 4 veces la peroxidación lipídica respecto a los organismos control. La concentración de benzo(a)pireno bioacumulada anteriormente referida es 2 y 3 órdenes de magnitud inferior a la encontrada en los mejillones de Astillero y El Castillo, por lo que cabe esperar que se presente un efecto tóxico significativo de este compuesto sobre la fisiología de los organismos de estos sitios.

Con base en lo anterior, es posible sugerir que el aumento en el consumo de oxígeno en los mejillones de P. Juárez y de Astillero efectivamente corresponde a que los organismos de estos sitios enfrentan un mayor estrés asociado al incremento en la bioacumulación de HPAs, lo que puede asociarse a la canalización de una mayor cantidad de energía para mantener mecanismos de compensación (incluyendo el estrés oxidativo) y/o desintoxicación y protección celular, siempre y cuando los organismos cuenten con un suministro nutricional constante y adecuado en términos de cantidad y de calidad.

Excreción nitrogenada. De manera similar al consumo de oxígeno, la tasa de excreción nitrogenada de los organismos de P. Juárez y Astillero resultan similares entre sí y son mayores que las tasas registradas en los mejillones de Castillo. De acuerdo a Axiak y George, (1987), la exposición de *Venus verrucosa* a 100 µg /l de petróleo crudo por 145 días, produjo un aumento tanto en el consumo de oxígeno como en la excreción nitrogenada, y sugiere que el incremento en el catabolismo de proteínas indica condiciones de estrés. En bivalvos la tasa de producción amoniacal se ha relacionado frecuentemente con la disponibilidad de alimento, en función tanto de la cantidad del alimento ingerido como de la composición de la dieta, como ha sido señalado en *Mytilus trossulus* (Arifin y Bendell-Young, 2001). En este sentido, se esperaría una relación directa entre la cantidad de alimento ingerido y la tasa de excreción nitrogenada.

Al respecto, la mayor tasa de absorción se registró precisamente en los organismos de Puente Juárez y Castillo, lo que sugiere que la mayor excreción nitrogenada observada en estos organismos se relaciona con una mayor degradación proteica de los componentes dietéticos asimilados. Ello puede ser reflejo de un mayor nivel de estrés en estos mejillones asociado a la vez con una mayor bioacumulación de HPAs.

Relación atómica O:N. En organismos acuáticos amoniotéticos, la integración del consumo de oxígeno y de la excreción nitrogenada en la relación atómica O:N es referida como un índice de estrés y refleja la condición nutricional de los organismos (Lucas y Beninger, 1985; Widdows, 1993). En bivalvos, valores de la relación O:N menores a 30 indican un catabolismo predominante de proteínas, mientras que valores superiores a 50 denotan un elevado catabolismo de lípidos y carbohidratos; cuando se presentan condiciones de inanición o raciones alimenticias muy bajas, el valor de este índice es cercano a 20, pero se eleva a 40 o 50 cuando el alimento es abundante (Widdows, 1985; Bayne, 1973).

La relación O:N con frecuencia se emplea en la evaluación del efecto tóxico de los contaminantes ambientales sobre los organismos acuáticos, y algunos autores sugieren que los valores bajos en este índice denotan condiciones de estrés (Widdows, 1993). Sin embargo, Ojea *et al.*, 2004, señalan que es necesario considerar la importante influencia de la cantidad y calidad alimenticia, así como del estado en el ciclo reproductivo sobre el tipo de reservas y utilización de nutrientes empleados para satisfacer las demandas

energéticas; asimismo, la interpretación de este índice debe considerar los cambios relativos y no basarse en valores absolutos. Si bien en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en la razón O:N entre los sitios de estudio, los valores obtenidos denotan el catabolismo principalmente de proteínas en los organismos de P. Juárez y Astillero (O:N: 16.3-15.3) mientras que en los individuos de Castillo los lípidos también participan en el metabolismo energético (O:N: 37.5). No obstante, para efectuar una interpretación adecuada de la relación O:N como un índice nutricional de estrés es pertinente considerar los recursos alimentarios disponibles en el entorno de los organismos o bien otros factores endógenos que determinaron un comportamiento notablemente diferente en su metabolismo energético.

Cabe destacar que los bivalvos analizados se encontraban en etapa reproductiva, lo cual permitía suponer el uso de un sustrato energético mixto para sustentar los requerimientos proteínicos y lipídicos de la maduración gonádica. De tal manera, los valores de la relación O:N en los organismos de Puente Juárez y Astillero reflejan una condición de estrés. De tal manera, mientras en El Castillo el sustrato energético utilizado es mixto, en Puente Juárez y en Astillero se presenta un cambio de sustrato probablemente relacionado con la cantidad y calidad del alimento. Sin embargo, este cambio en sí mismo sugiere condiciones de mayor estrés, lo cual puede además relacionarse con la mayor bioacumulación de HPAs registrada en los organismos de estos dos últimos sitios.

Campo de crecimiento. La integración de las respuestas fisiológicas evaluadas en el balance energético de los bivalvos determinó que los organismos de Puente Juárez y de Astillero presentaran el mayor campo de crecimiento, de 244 y 127 J/h/g PS respectivamente; si bien los valores de Astillero y Castillo no difirieron significativamente, en el último sitio se obtuvo el menor campo de crecimiento de los bivalvos, de 77 J/h/g PS.

En la literatura se refiere que los valores máximos del campo de crecimiento para el bivalvo mitílido *M. edulis*, determinados bajo condiciones “óptimas”, en ambientes prístinos con niveles mínimos de contaminación, son de 20-25 J/h/g (Widdows *et al.*, 1995). En esta especie, los valores entre 10-16 J/h/g son típicos de áreas con una influencia moderada de contaminantes (por ejemplo regiones costeras con influencia urbana), mientras que valores inferiores a 5 J/h/g son característicos de áreas

industrializadas y urbanizadas con niveles significativos de contaminación (Widdows *et al.*, 1995); los valores negativos indican un estrés severo, donde los animales se encuentran en un balance energético negativo y emplean sus reservas corporales para sobrevivir.

Asimismo, los trabajos que refieren una correlación negativa entre la cantidad de xenobióticos acumulados en mejillones provenientes de sitios altamente contaminados y el campo de crecimiento son numerosos (Toro *et al.*, 2003; Widdows *et al.*, 1995; Widdows *et al.*, 2002). Toro *et al.* (2003) realizaron un estudio a lo largo de la costa chilena, en tres estaciones con diferente grado de contaminación, y registraron una correlación negativa entre la concentración de HPAs en los tejidos de *Choromytilus chorus* y el consumo de oxígeno, la tasa de absorción, la tasa de aclaramiento y el campo de crecimiento. En los mejillones colectados en este sitio las concentraciones de HPAs en tejidos fueron de 3.4 y 3.0 µg/g PS en primavera y verano, respectivamente y el campo de crecimiento evaluado resultó negativo en ambas temporadas. Esto sugiere que los organismos se encuentran bajo un constante stress y resultan susceptibles a las enfermedades, parásitos y depredadores (Toro *et al.*, 2003). Cabe mencionar que las concentraciones antes referidas por Toro *et al.* resultan similares a las registradas en el presente estudio, por lo que se esperaría un efecto adverso en los mejillones de Estero de Urías; aún más, dado que en P. Juárez y Astillero se registró la mayor acumulación de hidrocarburos en los organismos, se esperarían los valores más bajos en el campo de crecimiento, en contraste con los resultados obtenidos.

Al respecto, cabe señalar que en la literatura también se reportan estudios donde la contaminación de un ecosistema no resulta en un decremento del campo de crecimiento. Widdows *et al.*, 1997, realizaron evaluaciones en *Mytilus galloprovincialis* de la Laguna de Venecia y determinaron altas concentraciones de metales e hidrocarburos tanto en el medio como en los organismos. Sin embargo, se presentaron valores de campo de crecimiento de 192 y 251 J/h/g PS, mostrando que los mejillones de este sitio tienen potencial para tasas de crecimiento elevadas. Los autores plantean que se debe a que las concentraciones de seston y de materia orgánica particulada, así como las condiciones de eutrofización en general, determinan grandes raciones de alimento para los organismos.

De manera similar, Puente Juárez recibe efluentes domésticos sin tratar, mientras que tanto este sitio como Astillero reciben la influencia de la Bahía de Mazatlán, la que ha sido categorizada como un sistema eutrofizado (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2000). De esta manera, puede sugerirse que aún cuando los organismos de Puente Juárez y Astillero presentan una mayor incorporación de hidrocarburos en sus tejidos, las condiciones alimenticias presentes en estos sitios les proporcionan, aún sin contar con la calidad nutrimental adecuada, los recursos energéticos necesarios para compensar el efecto deletéreo de los contaminantes e incluso presentar potencial de crecimiento y reproducción. Sin embargo, es necesario señalar que el contenido de materia orgánica determinado en el material orgánico particulado resultó similar en los tres sitios de estudio. Es probable que el muestreo del agua de cada sitio se haya realizado en un momento que no reflejó las condiciones que, ya sea por su frecuencia o por su relevancia, caracterizan las raciones alimenticias realmente disponibles para los mejillones.

Los resultados obtenidos en el campo de crecimiento en el presente trabajo, concuerdan con el estudio reportado por Leal-Tarin (2007), quien evaluó el esfuerzo reproductivo de *M. strigata* en el Estero de Urías comparándolo con el de poblaciones de mejillones de otros dos sistemas de la región. Los resultados muestran que los mejillones de Urías presentaron el mayor esfuerzo reproductivo, correspondiente al 70%, y que los eventos reproductivos se presentan durante todo el año, aún cuando fue uno de los sitios más contaminados. El autor sugiere que estas poblaciones con mayor estrés antropogénico, comprometen en la reproducción los recursos destinados al crecimiento, ya que en Urías se observó un decremento en la tasa de crecimiento. A la vez, propone que la exposición de los mejillones a los agentes tóxicos del medio puede disminuir la viabilidad de su descendencia. No obstante, el mayor campo de crecimiento registrado en el presente estudio en los mejillones de P. Juárez y Astillero sugiere que a pesar de la bioacumulación de HPAs, los bivalvos cuentan con un suministro energético constante que determina la canalización de recursos energéticos hacia el crecimiento (gonádico y/o somático). Adicionalmente, los eventos reproductivos puede constituir un importante mecanismo de depuración, dado que los HPAs así como los bifenilos policlorados son compartimentalizados en la envoltura lipídica de los ovocitos (Viarengo *et al.*, 2007). Sin embargo, se requiere efectuar estudios futuros que profundicen en la evaluación de la condición reproductiva y en la viabilidad de la

descendencia de estos organismos, considerando tanto el efecto de la contaminación química como la disponibilidad de recursos energéticos.

En *M. strigata*, la menor proporción de la energía absorbida se canalizó a la excreción nitrogenada (*N*) (0.7-1.4%, Tabla 14), comportamiento similar al descrito en otros bivalvos (Widdows, 1993). En contraste con los organismos de Astillero y Castillo, los provenientes de P. Juárez invirtieron en respiración (*R*) una menor proporción de la energía absorbida (*A*), maximizando así la canalización al crecimiento (*P*). De tal manera, el mayor campo de crecimiento en los mejillones de Puente Juárez se relaciona no sólo con la mayor energía absorbida sino con una distribución energética que eficientiza su potencial de crecimiento.

Tabla 14. Distribución de la energía absorbida (*A*) entre los diferentes componentes del balance energético (*N*, *R*, *P*) en los mejillones de los diferentes sitios de estudio (J/h/g PS). Entre paréntesis se muestra el porcentaje de cada componente respecto a la energía absorbida *A*.

Sitio	Absorción <i>A</i>	Respiración <i>R</i>	Excreción Nitrogenada <i>N</i>	Campo de Crecimiento <i>P</i>
Puente Juárez	264.74	18.83 (7.11)	1.89 (0.71)	244.02 (92.17)
Astillero	149.51	19.90 (13.31)	2.09 (1.40)	127.53 (85.30)
Castillo	91.14	13.44 (14.75)	0.13 (0.80)	76.98 (84.46)

Así, los resultados obtenidos en este estudio denotan la importancia de evaluar biomarcadores integrales que den cuenta tanto de la condición energética de los organismos como del efecto de los contaminantes, aún en escenarios de elevada complejidad ambiental como el Estero de Urías, sistema estuarino-lagunar donde se presenta un alto impacto antropogénico y suministros de materia orgánica de diverso origen.

8.5. Niveles de organización biológica.

Las correlaciones entre los HPAs totales bioacumulados y cada una de las respuesta biológicas evaluadas se han abordado previamente en esta discusión. Sin embargo, resulta relevante el análisis entre las respuestas biológicas evaluadas que pueda dar cuenta de relaciones explicativas y funcionales del efecto adverso de los xenobióticos a nivel suborganismo y organismo. Respecto a las correlaciones entre los biomarcadores

evaluados, la actividad EROD presentó correlaciones negativas con el índice de condición y el campo de crecimiento, por lo que sería posible sugerir que los valores más bajos de la actividad EROD señalan ausencia de inducción por contaminantes orgánicos y por lo tanto concuerda con un mejor estado fisiológico. Sin embargo, la falta de correlación de esta respuesta respecto a la concentración de HPAs totales y su sensibilidad a diversos factores naturales y antropogénicos, son elementos que dificultan aceptar la validez de la interpretación anterior y sugieren el probable efecto de factores diferentes a los evaluados en el presente trabajo. Asimismo, se encontró una correlación significativa, también negativa, entre la concentración de proteína en hemolinfa y la actividad EROD. Nuevamente la multiplicidad de factores involucrados dificulta encontrar elementos que expliquen de manera clara el origen o la naturaleza de la correlación. No obstante, los resultados obtenidos denotan que en un sistema costero sujeto a multiestresores, la actividad EROD no es un biomarcador adecuado de exposición a HPAs.

Por otra parte, la mayor parte de las correlaciones entre las respuestas biológicas evaluadas resultó acorde a la fisiología de los organismos, encontrándose correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre diversos biomarcadores de efecto. Entre ellas, la excreción nitrogenada se correlacionó con la eficiencia de asimilación y con la relación O:N. Si se considera que la mayor parte de la excreción nitrogenada representa al nitrógeno removido por la degradación de los aminoácidos dietarios excedentes (Campbell, 1990), cabe esperar que un incremento en la eficiencia de asimilación favorezca un mayor ingreso de nitrógeno orgánico e incremente la excreción nitrogenada. Así, en *M. strigata* como en otros bivalvos, el proceso de absorción de nutrientes se relaciona estrechamente con la excreción nitrogenada (Hawkins, 1983). Por otra parte, la correlación entre excreción nitrogenada y relación O:N resulta previsible, dado que la excreción nitrogenada es uno de los parámetros fundamentales en la determinación de la relación atómica O:N.

Cabe señalar que la concentración de proteína muscular, el índice de condición y el campo de crecimiento mostraron correlaciones con un mayor número de respuestas, en general con coeficientes superiores a 0.6, además de correlacionarse entre sí, denotando su carácter como biomarcadores integradores de procesos bioquímicos y fisiológicos.

La concentración de proteína en el músculo abductor se correlacionó con la tasa de aclaramiento, la tasa de absorción, el campo de crecimiento y el índice de condición. Esto sugiere que una mayor capacidad de filtración de partículas (indicada por la tasa de aclaramiento) permite incrementar la absorción de energía y la acumulación de proteínas en el músculo como sustancias de reserva, además de proporcionar recursos energéticos para crecimiento y reproducción, como lo indican las correlaciones con el campo de crecimiento. De esta manera, un biomarcador bioquímico como la concentración de proteína en músculo, puede dar indicios del estado del organismo en niveles de organización biológica superiores.

En el mismo sentido, el índice de condición se correlacionó positivamente con proteína muscular, estabilidad lisosomal, relación O:N y campo de crecimiento. La correlación entre la estabilidad lisosomal y el índice de condición refiere que las condiciones de estrés oxidativo, señaladas por una respuesta celular como la estabilidad lisosomal, efectivamente pueden dar cuenta del estado fisiológico general del organismo, expresado en el índice de condición. Asimismo, la correlación entre el campo de crecimiento y el índice de condición señala a estos dos biomarcadores como indicadores adecuados de la condición energética de los organismos, que integran tanto los procesos alimentarios como aquellos relacionados con la compensación, reparación, protección celular y desintoxicación de los xenobióticos.

Finalmente, el campo de crecimiento P presentó correlaciones significativas con la tasa de aclaramiento y la tasa de absorción, lo cual podría esperarse dada su relación en el procesamiento y obtención de datos (P se calcula a partir de la tasa de absorción y ésta a su vez considera la tasa de aclaramiento). Por otra parte, P se correlacionó con la actividad EROD, la concentración de proteína muscular y el índice de condición, correlaciones que se discutieron previamente. Así, el campo de crecimiento sobresale como un biomarcador ideal que refleja el estado fisiológico general del organismo e integra los procesos que, en diferentes niveles de organización biológica, se derivan de los efectos tanto adversos como favorables asociados a la alteración antropogénica del ambiente.

Cabe resaltar que la falta de correlaciones claras entre los HPAs bioacumulados en *M. strigata* y la magnitud de las respuestas biológicas observadas, sugiere la acción o interacción simultánea de múltiples estresores ambientales característicos del sistema de

estudio. De tal manera, la evaluación de biomarcadores múltiples que se relacionan explicativa y funcionalmente aunado al conocimiento de los recursos energéticos disponibles para los organismos, adquieren gran relevancia en ambientes sujetos a estresores múltiples como los ambientes lagunares estuarinos. Por ende es fundamental la selección de biomarcadores integradores que den cuenta del deterioro funcional global en los organismos expuestos a la interacción de múltiples tóxicos y otros estresores ambientales.

9. INTEGRACIÓN Y CONCLUSIONES.

El acenafteno, el benzo (a)antraceno, el pireno y el benzo (a)pireno fueron los HPAs dominantes en el sistema en términos de concentración y frecuencia. Asimismo, Astillero y El Castillo destacan como sitios de depósito de acuerdo a la concentración y diversidad de HPAs registrados en los sedimentos de estos sitios. Sin embargo, no se observó una relación entre la concentración de HPAs en el medio y la concentración acumulada por los individuos de *M. strigata*, dado que los organismos de P. Juárez y Astillero presentaron la mayor bioacumulación. Tanto la concentración de materia orgánica presente en los sedimentos como la naturaleza de los compuestos más abundantes de cada uno de los sitios, determinan diferencias notables en la biodisponibilidad de los HPAs y en la capacidad de los mitílidos para eliminarlos. Por otra parte, algunos rasgos fisiológicos particulares como la tasa de aclaramiento y la eficiencia de asimilación de los organismos pueden influir en la tasa de incorporación de contaminantes. Al respecto cabe señalar que los mejillones de P. Juárez y de Astillero presentaron la mayor eficiencia de asimilación y también la mayor biocumulación de HPAs, mientras que los organismos de El Castillo tuvieron los valores más bajos en estos parámetros. Puede sugerirse que una mayor eficiencia de asimilación involucre una mejor retención no sólo de nutrientes sino también de compuestos orgánicos, relacionándose con una bioacumulación más elevada. Todos los factores mencionados pudieron afectar la posibilidad de observar una relación entre la concentración de HPAs registrada en los sedimentos y la bioacumulación de estos compuestos.

La falta de concordancia entre los sedimentos y los organismos respecto a la presencia y concentración de los diferentes compuestos evaluados, resalta por una parte la complejidad hidrodinámica y geodinámica del Estero de Urías y la multiplicidad de factores involucrados en la biodisponibilidad de HPAs en un sistema como éste. Sin embargo, denota la eficiencia de *M. strigata* como un organismo bioindicador y muestra la conveniencia de evaluar este tipo de contaminantes en organismos, particularmente mejillones, cuya acumulación resulta menos “susceptible” a la dinámica del sistema y por ello más estable que otras matrices ambientales como agua y sedimentos. En los tejidos de este bivalvo se registraron compuestos, particularmente de alto peso molecular, que no se encontraron en los sedimentos en el momento del muestreo pero que estuvieron disponibles anteriormente para los organismos, por lo que resultan

mejores indicadores de la biodisponibilidad de los contaminantes y ello permite un mejor biomonitoreo del sistema. Asimismo, debe considerarse que la capacidad de acumulación de HPAs por parte de los mejillones, no es homogénea para todos los compuestos y por ello no siempre es posible observar concentraciones proporcionales entre los sedimentos y los organismos.

Entre las respuestas biológicas, la evaluación de la actividad EROD se propuso en primera instancia como un biomarcador de exposición a los HPAs. Sin embargo, no mostró un comportamiento consistente con los niveles de contaminantes acumulados en los organismos, lo cual evidencia su limitación como marcador biológico de los HPAs en ambientes sujetos a la acción múltiple de xenobióticos y otros estresores ambientales como el Estero de Urías. Así, sobresale la posibilidad de que se presente en la actividad EROD una inducción o inhibición adicional a la de los HPAs, ya sea por otro grupo de contaminantes o por factores endógenos. Cabe señalar que en relación con los otros biomarcadores evaluados, no se encontraron correlaciones de naturaleza evidente.

En cuanto a los biomarcadores de efecto, se observó que al incrementarse el nivel biológico de las respuestas evaluadas se encuentran resultados en apariencia más consistentes con la bioacumulación de HPAs de cada sitio. En el nivel suborganismo, Juárez y Astillero presentan respuestas con mayor probabilidad de asociarse a un estrés inducido por contaminantes, ya que la estabilidad lisosomal fue menor en estos dos sitios. Las concentraciones de proteína en hemolinfa y músculo presentan varias posibilidades de interpretación de acuerdo al planteamiento de un escenario de exposición a los contaminantes aguda o crónica, por lo que se requiere de la evaluación de otras respuestas para una mejor interpretación de la condición fisiológica de los organismos. No obstante, P. Juárez referiría el mayor estrés bajo condiciones de exposición crónica, mientras que los organismos de Astillero presentarían un mayor efecto tóxico al considerar una exposición aguda.

Asimismo, el índice de condición refiere que los mejillones de El Castillo presentan una condición fisiológica superior a los organismos de Astillero, lo que puede relacionarse tanto con un menor nivel de contaminantes como con condiciones nutricionales adecuadas, como lo indican la mayor concentración de clorofila registrada en este sitio y la eficiencia de asimilación significativamente diferente.

De las respuestas a nivel organismo, las tasas de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada, así como la relación O:N, presentaron una respuesta que en efecto parece relacionarse con la mayor concentración de HPAs en los bivalvos, donde Puente Juárez y Astillero presentaron un comportamiento similar entre sí pero diferente del presentado por los organismos de Castillo, los que presentaron la menor bioacumulación de HPAs.

En el mismo sentido, la evaluación del campo de crecimiento muestra una condición parecida entre los organismos de P. Juárez y los de Astillero. Aún cuando se plantea que están sometidos a un mayor estrés inducido por los contaminantes, en apariencia el constante suministro nutricional les permite adquirir un elevado potencial de crecimiento, si bien esto no garantiza la viabilidad de su descendencia (Leal-Tarín, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, Puente Juárez destaca como un sitio de alta dinámica de corrientes con procesos de acumulación de HPAs en los mejillones diferentes de los de Astillero y El Castillo, donde la disponibilidad de alimento permite a *M. strigata* sostener un esfuerzo reproductivo constante (Leal-Tarín, 2007) y un elevado potencial de crecimiento, lo cual a su vez podría influir la bioacumulación de HPAs.

Resulta notable que la evaluación de biomarcadores múltiples, particularmente en el nivel organismo, proporcionaron valiosa información sobre el efecto global ejercido por el ambiente, particularmente en P. Juárez y Astillero. En estos sitios, la estabilidad lisosomal, el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada refieren estrés por la probable acción tóxica de contaminantes, mientras que el índice de condición y el campo de crecimiento *P* señalan que los recursos nutricionales son adecuados para compensar este efecto adverso.

Los múltiples aportes de compuestos xenobióticos al Estero de Urías, generan un grado de complejidad temporal y espacial que incrementan a su vez la complejidad de la interpretación de los resultados obtenidos en el presente estudio. No obstante, una visión holística permitió una adecuada evaluación del sistema a través de la evaluación *in situ* de las respuestas biológicas de *M. strigata*.

El planteamiento previo resalta además la necesidad de establecer los niveles base de las respuestas (sitios de referencia; estudios en laboratorio; estudios de trasplante) para

adquirir elementos que conduzcan a conclusiones definitivas respecto al efecto de los HPAs o de otros grupos de contaminantes en las poblaciones de *Mytella strigata* en el Estero de Urías. Aún así, la carencia de un sitio de referencia no impide llegar a conclusiones útiles en un proceso de Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) realizado mediante la Ponderación de Líneas de Evidencia (WOE, por sus siglas en inglés), si la información disponible se evalúa de una manera adecuada para compensar la falta de una referencia de comparación (McPherson *et al.*, 2008).

En el mismo sentido, Chapman y Hollert (2006) refieren que la evaluación de biomarcadores de efecto de nivel orgánico, constituye una Línea de Evidencia (LOE, por sus siglas en inglés) en la Evaluación de Efectos de un estudio de ERA, y al integrarse con la formulación del problema, la evaluación de la exposición y la determinación de causalidad, permite determinar de manera definitiva la alteración de un sistema por los contaminantes o bien la necesidad de estudios adicionales para llegar a conclusiones definitivas (Chapman, 2007).

En el presente estudio, el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada parecen relacionarse con la concentración de HPAs bioacumulados, mientras que la estabilidad lisosomal, el índice de condición y el campo de crecimiento mostraron un comportamiento que refleja el efecto de estresores múltiples, por lo que resulta viable la integración de estos biomarcadores como líneas de evidencia. En el macroproyecto dentro del cual se inserta el presente estudio, al sumar a éstos los resultados obtenidos en especies de otros niveles tróficos, como está planteado, se podrá determinar con mayor precisión la relevancia ecológica de la exposición a los contaminantes presentes en el Estero de Urías (Galloway *et al.*, 2004).

Así, los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian la utilidad de un enfoque de biomarcadores múltiples en Evaluaciones de Riesgo Ambiental, además de señalar a *Mytella strigata* como un organismo adecuado para evaluar los efectos de estresores múltiples en ambientes tropicales complejos como el Estero de Urías.

9. REFERENCIAS.

- Adams, S.M. 1990. Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Symposium* 8. Bethesda, Maryland. 191 pp.
- Alduenda-Rincones, M.A. 1985. Estudio de contaminación por hidrocarburos y microorganismos patógenos en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. Tesis Maestría en Ciencias del Mar y Limnología. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán, UNAM.
- Allen, J. I., Moore, M.N. 2004. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate risk evaluation. *Mar. Env. Res.* 58:227-232.
- Allison, H.B., Paton, G.R. 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal system. *Nature* 207, 1170-1173.
- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F., Cortés-Altamirano, A. 2000. Trophic conditions and stoichiometric nutrient balance in subtropical waters influenced by municipal sewage effluents in Mazatlan Bay. (SE Gulf of California). *Mar. Poll. Bull.* 40:331-339.
- Álvarez-León, R. 1977. Estudio hidrobiológico de los esteros del Astillero, Urías y la Sirena, adyacentes a Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis de Maestría. UACPyP, CCH, Universidad Nacional Autónoma de México. 131 pp.
- Alvarez, A.P., Leigh, S., Cohn, J., Kappas, A. 1972. Lead and methyl mercury: effects of acute on cytochrome P450 and the mixed function oxidase system in the liver. *J. Exp. Med.* 135:1406-1409.
- Álvarez-León, R. 1980 Hidrología y zooplancton de tres esteros adyacentes a Mazatlán, Sinaloa, México. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. UNAM* 7:177-194.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Métayer, C. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106:73-89.
- Arar, E.J., Collins, G.B. 1997. *In vitro* determination of chlorophyll *a* and phaeophytin *a* in marine and freshwater algae by fluorescence. Office of Research and Development, USEPA. Disponible en: http://www.epa.gov/nerlcwww/m445_0.pdf.
- Arfsten, P.D., Schaeffer, J.D., Mulveny, C.D. 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. *Ecotox. Env. Saf.* 33:1-24.
- Ariese, F., Ernst, W., Sijm, D. 2001. Natural and synthetic organic compounds in the environment - a symposium reports. *Environm. Tox. Pharm.* 10:65-80.
- Arifin, Z., Bendell-Young, L. I. 2001. Cost of selective feeding by the blue mussel (*Mytilus trossulus*) as measured by respiration and ammonia excretion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 260(2):259-269.
- Astley, K. N., Meigh, H. C., Glegg, G. A., Braven, J., Depledge, M. H. 1999. Multivariate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Mar. Poll. Bull.* 39(1-12): 145-154.
- ATSDR 2005. Toxicology profile for polyaromatic hydrocarbons. ATSDR's Toxicological Profiles on CD-ROM, CRC Press, Boca Raton, USA.

- Auffret, M. 1988. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:101-107.
- Axiak, V., George, J. 1987. Effects of exposure to petroleum hydrocarbons on the gill function and ciliary activities of a marine bivalve. *Mar. Environ. Res.* 23:33-47.
- Aztatzi- Aguilar, O. G. 2007. Estrés oxidativo y crecimiento del mejillón de mangle, *Mytella strigata*, en tres sistemas estuarinos de Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Benemérita Universidad de Puebla. 100 pp.
- Baqueiro, C., Aldana, D. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 66(1):13-27.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Env. Res.* 47:415-439.
- Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., Bellocq, J. 1998. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Est. Coast. Shelf Sci.* 47:77-90.
- Bautista-Parejo, C. 1989. Moluscos. Tecnología de cultivo. Ediciones Mundi-prensa, Madrid. p. 15-22.
- Bayne, B.L. 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Neth. J. Sea Res.* 45A:793-806.
- Bayne, B.L., 1987. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 11:1-22.
- Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., Iglesias, J.I.P. 1989 . Effects of seston concentration on feeding, digestion and growth in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55:47-54.
- Bayne, B.L., Widdows, J., Moore, M.N., Salked, P., Worrall, C.M., Donkin, P. 1982. Some ecological consequences of the physiological and biochemical effects of petroleum compounds in marine mollusks. *Phil. Trans. Royal. Soc. Lond. B.* 297:219-239.
- Bebiano, M. J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A. M. 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Env. Int.* 33(4):550-558.
- Bebiano M. J., Machado, L. M. 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Mar. Poll. Bull.*, 34(8):666-671.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Env. Tox. Chem.* 21(6):1316-1322.
- Benzie, I., Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *An. Bioch.* 239: 70-76.
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A. 2005. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere*, In Press.

- Blackmore, G., Wang, W. X. 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se and Zinc accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at different salinities. *Aq. Tox.* 62:205-218.
- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Env. Res.* 30:75-80.
- Boelsterli, U.A., 2007. Mechanistic Toxicology. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Botello, A. V., Calva, L. G. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Pueblo Viejo, Tamiahua, and Tampamachoco lagoons in the southern Gulf of Mexico. *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 60:96-103.
- Botello, A. V., Calva, L. G., Ponce, G. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from coastal lagoons of Veracruz State, Gulf of Mexico. *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 67:889-897.
- Botello, A.V., García-Ruelas, C., Ponce-Vélez, G. 2002. PAH levels in bivalve mollusks from the Mexican Subtropical Pacific. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69:486-493.
- Bouquegneau, J. M., Gilles, R. 1979. Osmoregulation and pollution of the aquatic medium. In: Metabolism of osmoregulation in animals (Gilles, R., Ed.) pp563-580, New York.
- Bourdeau, P., Haines, J.A., Klein, W., Krishna-Murti C.R. 1989. Ecotoxicology and climate with special reference to hot and cold climates. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Bourdalin, F. 1996. Physiological responses of the tropical mussels, *Modiolus auriculatus* a possible biological monitor in French Polynesia. *Mar. Poll. Bull.* 332:480-485.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D. 2004. Response of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Bioch.* 72: 248-254.
- Brown, R. J., Galloway, T. S., Lowe, D., Browne, M. A., Dissanayake, A. Jones M. B., Depledge M. H. 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aq. Tox.*, 66(3):267-278.
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C., Garrigues, P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde Estuary. *Mar. Chem.* 58:85-97.
- Burgeot, T., Bocquene, G., Pingray, G., Godefroy, D., Legrand, J., Dimeet, J., Marco, F., Vincent, F., Henocque, Y., Jeanneret, H. O., Galgani, F. 1994. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotox. Env. Safe.* 29(2):131-147.
- Burke, M.D., Mayer, R.T. 1974. Ethoxyresorufin: Direct fluorometry assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Met. Disp.* 2(6):583-588.
- Burns, K. A., Smith, J.L. 1981. Biological monitoring of ambient water quality: the case for using bivalves as sentinel organisms for monitoring petroleum pollution in coastal waters. *Est. Coast. Shelf. Sci.* 13(4):433-443.

- Burns, K., Yelle-Simons, L. 1994. The Galeria oil spill. IV. Relationships between sediment and organism hydrocarbon load. *Env. Coast. Shelf Sci.* 38:397-412.
- Burton, A. Jr. 1992. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers Inc. U.S.A. p.185.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E. 1991. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. *Comp. Biochem. Physiol. C* 93:231-237.
- Cajaraville M.P., Robledo, Y., Etxeberria, M., Marigómez, J.A. 1995 Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. En: Cajaraville, M. P. (Ed.), Cell biology in environmental toxicology. Bilbo: University of the Basque Country Press Service, 1995:29-55.
- Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of Total Environment*, 247:295-311.
- Campbell, J. W. 1990. Excretory Nitrogen Metabolism. En: Prosser, C. L. Environmental and Metabolic Animal Physiology. p. 277. Wiley-Liss. New York.
- Cao, G., Prior, R. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 44 (6): 1309 - 1315.
- Carvalho, F. P., Gonzalez-Farias, F., Villeneuve, J. P., Cattini, C., Hernandez-Garza, M., Mee, L. D. Fowler, S. W. 2002. Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of northwestern Mexico. *Env. Tech.* 23:1257-1270.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. 1998. Mechanisms of tumor initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons in mammals. En: Nelson, A.H. (Ed.), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, part J, PAHs and related compounds, Springer, Berlin.
- Catalán, I. A., Berdalet, E., Olivar, M. P., Roldán, C. 2007. Response of muscle biochemical condition indices to short term variation in food availability in post-flexion reared sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). larvae. *J. Fish Biol.* 70, 391-405.
- CCMA: Center for Coastal Monitoring and Assessment. 2007. Disponible en: <http://ccma.nos.noaa.gov/about/coast/nsandt/welcome.html>
- Chan, H. M., Bjerregaard, P., Rainbow, P. S., Depledge, M. H. 1982. Uptake of zinc and cadmium by two populations of shore crabs *Carcinus maenas* at different salinities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 86:91-97.
- Chapman, P. M., 2007. Determining when contamination is pollution- weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Env. Int.*, 33:492-501.
- Chapman, P. M., Hollert, H. 2006. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad or even a hexad? *J. Soils & Sed.* 6(1):4-8.
- Chaty, S., Rodius, F., Vasseur, P., 2004. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel *Union tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aq. Tox.*, 69:81-93.
- Chávez, G., Carmona C. 1999. Estructura de la comunidad bentónica (infauna) en el delta del Río Colorado, México. *Rev. Biol. Trop.* 47: 4-8.

- Chvapil, M., Ryan, J. N., Zukoski, C. F., 1972. The effect of zinc and other metals on the stability of lysosomes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140:642-646.
- Clark, G. A. 1989. The comparative enzymology of the glutathion S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B(3):419-446.
- Clark, R. B., (Ed.). 1997. Marine Pollution. Oxford University Press. 161 pp.
- Cohen, W.D., Editor. 1997. Compendium of Physiological Solutions. Biological Bulletin Publications, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA. <http://www.mbl.edu/BiologicalBulletin/COMPENDIUM/Comp-TabCont.html>>
- CONABIO, 2004. www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rmp_020.html.
- Conover, R. J. 1996. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limn. Ocean.* 11:487-498.
- Cossa, D. 1988. Cadmium in *Mytilus* spp.: Worldwide survey and relationship between seawater and mussel content. *Mar. Environ. Res.*, 26:265-284.
- Cram, S., Ortiz, R. Páez; R. 2004. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. En: Fernández, A., Yarto, M., Castro, J. (Ed.), Las sustancias tóxicas persistentes. SEMARNAT, INE. México. p. 173-199.
- Crisp, D.J. 1971. Energy flow measurements. En: Holme, N.A., McIntyre, A.D. (Ed.), Methods for the study of marine benthos, IBP Handbook No. 16, pp. 197-279. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Daling, P. S., Faksness, L. G., Hansen, A. B., Stout, S. A. 2002. Improved and Standardized Methodology for Oil Spill Fingerprinting. *Env. Forens.* 3(3-4):263-278.
- Dauberschmidt, C., Dietrich, D. R., Schlatter, C. 1997. Investigations on the biotransformation capacity of organophosphates in the mollusc *Dreissena polymorpha*. *Aq. Tox.*, 37(4):283-294.
- Del Valle-Pignataro, G. 1987. Variación temporal y geográfica del estado de salud de *Mytilus californianus* de la costa nor-occidental de Baja California. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. División de Oceanología, Depto. de Ecología Marina Ensenada, Baja California.
- Depledge, M. H. 1990. Interactions between heavy metals and physiological processes in estuarine invertebrates. En: Chambers, P.L. y Chambers, C.M. (Eds). *Estuarine Ecotoxicology*. JAPAGA, Ashford, p. 89-100.
- Depledge, M. H., Billingham, Z. 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar. Poll. Bull.* 39:1-12, 32-38.
- Depledge, M. H., Fossi, M. C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment *Ecotoxicology* 3(3):161-172.
- Depledge M. H., Rainbow, P. S. 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 97(1):1-7.
- Dissanayake, A. 2001. The evaluation of a multi-biomarker approach in assessing environmental contamination in the field. Thesis. Degree of Mrs. Aquatic Toxicology. University of Plymouth, UK. 113 pp.

- Domouhtsidou, G. P., Dailianis, S., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V. K. 2004. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers: Combination with trace metal concentrations *Mar. Poll. Bull.*, 48 (5-6):572-586.
- Donkin, P., Widdows, J., Evans, S.W., Corral, C. M., Carr, M. 1989. Quantitative structure-activity relationship for the effect of hydrophobic organic chemicals on rate of feeding by mussels (*Mytilus edulis*). *Aq. Tox.* 14:227-294.
- Donnini, F., Dinelli, E., Sangiorgi, F., Fabbri, E. 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Env. Int.* 33:919-928.
- Durand, F., Peters, D., Livingstone, D. R. 2002. Effect of intertidal compared to subtidal exposure on the uptake, loss and oxidative toxicity of water-born benzo[a]pyrene in the mantle and whole tissues of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Env. Res.* 54(3-5):271-274.
- Eichhorn, G.L., Clark, P., Tarien, E. 1969. The interaction of metallic ions with polynucleotids and related compounds. *J. Biochem. Chem.* 244:937-942.
- Eichhorn, G. L. (1973). Complexes of polynucleotids and nucleic acids. En: Eichhorn, G.L. (Ed.), *Inorganic Biochemistry* Vol. 2. pp 1210-1245. Elsevier Scientifics, Amsterdam.
- Eisler, R. 1987. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hazard to Fish, Wildlife and Invertebrates: A Synoptic Review. *Rep.* 85(1.11), U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- Elbekai, R. H., El-Kadi, A. O. 2004. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium and chromium. *Toxicology* 202:249-269.
- Elbekai, R. H., El-Kadi, A. O. 2005. Role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As^{3+} , Cd^{2+} , and Cr^{6+} . *Free Rad. Biol. Med.* 39:1499-1511.
- Elliot, J. M. and W. Davison. 1975. Equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia.* 19: 195-201.
- Elliott, N. G., Swain, R., Ritz, D.A. 1985. The influence of cyclic exposure on the accumulation of heavy metals by *Mytilus edulis*. *Mar. Env. Res.* 15:17-30.
- EPA, 2004. <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>.
- Escartín, E., Porte, C. 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Env. Tox. Chem.* 16:2090-2095.
- Estévez, J., 1975. Aspectos generales de la biología y ecología del mejillón *Mytella strigata* (Hanley, 1843) en dos lagunas costeras del estado de Guerrero. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 63 pp.
- Etcheber, H. 1983. Biogéochimie de la matière organique en mileus estuarien: comportement, bilan, propriétés. Cas de la Gironde. Thèse de Doctorat d'État es Sciences, Université de Bordeaux.
- Etxeberria, M., Sastre, L., Cajaraville, M. P., Marigómez, L. 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from a Zn-polluted site. *Arch. Env. Cont. Tox.* 24:338-345.

- Farrington, J., Goldberg, E., Risebrough, R., Martin, J., Bowen, V. 1983. US "Mussel Watch" 1976-1978: An overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Env. Sci. Tech.* 17:490-496.
- Farrington, J.W., Trip, B.W. 1995. NOAA Technical memorandum NOS ORCA 95. International Mussel Watch Project, Initial Implementation Phase, Final Report, US Dept. Commerce, NOAA. p.63.
- Fent, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205:223-240.
- Ferron, A., Leggett, W. C. 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.* 30:217-303.
- Flores-Vardugo, F. 1990. Algunos aspectos sobre la ecología uso e importancia de los ecosistemas de manglar. In: Rosa-Vélez, J., González-Farías, F. (Eds.) Temas de Oceanografía Biológica en México. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, pp. 21-56.
- Forbes, V. E., Depledge, M. H. 1996. Environmental stress and the distribution of traits within populations. En: Baird, D.J., Maltby, L., Greig-Smith, P.W., Douben, P. E. T. (Eds.), *Ecotoxicology: Ecological dimensions*. Chapman & Hall, London, GB. pp. 72-86.
- Förstner, U., Wittman, G. T. W. 1979. Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 486 pp.
- Fossi, C., Savelli, C., Casini, S. 1998. Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*: field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to Mediterranean contaminants. *Comp. Biochem. Physiol. C*: 121(1-3):321-331.
- Frías-Espericueta, M. G., Osuna-López J. I., Páez-Osuna, F. 1999 Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: seasonal variation. *Sci. Total Env.* 231(2-3):115-123.
- Furton K. G., Pentzke, G. 1998. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En: Takayuki, S. (Ed.) *Chromatographic Analysis of Environmental and Food Toxicants*. Marcel Dekker Inc. Nueva York.
- Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P., Salazar, M. 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plum in two species of freshwater mussels. *Env. Tox.* 17:149-159.
- Galgani, F., Bocquené, G. 1991. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Wat. Res.* 25(2):147-150.
- Galindo-Reyes, G. 2004. En: Ávila-Ruvalcaba, J. "Mazatlán". Derecho Ecológico, Medios Informativos, Universidad de Sonora, México. http://www.uson.mx/medios_informativos/derecologico/toxicos/agro.shtml.
- Galindo J., Medina A., Villagrana, C. 1996. Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pesticides. *Mar. Poll. Bull.* 32 (12): 872-875.
- Galindo-Reyes J. G., Guerrero, M., Villagrana, C., Quezada, L. (1992). Contaminación por plaguicida en almeja y camarones en dos ecosistemas costeros de Sinaloa, UAS. *Época*. México. 1, 12: 6-11.

- Galindo-Reyes, J. G., Medina, M. A., Villagrana-Lizarraga, C. Ibarra, L. (1997). Environmental and pollution condition of the Huizache-Caimanero Lagoon, in the Northwest of Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 34(12):1072-1077.
- Galindo-Reyes, J.G., Venezia, L. D., Lazcano-Alvarez, G., Rivas-Mendoza, H. 2000. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere* 40(3):233-237.
- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M. B., Depledge, M. H. 2004. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Mar. Env. Res.* 58(2-5):233-237.
- Galloway, T. S., Millward, N., Browne, M. A., Depledge, M. H. 2002. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusk *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aq. Tox.* 61(3-4):169-180.
- Galloway T. S., Sanger, R., Smith, K., Fillmann, G., Readman, J., Ford T., Depledge, M. 2002b. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Env. Sci. Tech.* 36: 2219-2226.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climático de Köppen. 4ª. Ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. 217 pp.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotox. Env. Saf.* 61(2):209-220.
- George, S. G. 1983. Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis* - composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Com. Biochem. Physiol. C.* 76(1):53-57.
- Giambérini, L., Cajaraville, P. 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the fresh mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Env. Res.* 98:210-214.
- Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G. C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., Pellerin, J. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aq. Tox.*, 64(2):185-200.
- Gold-Bouchot, G., Zavala-Coral, M., Zapata-Pérez, O., Ceja Moreno, V. 1997. Hydrocarbon concentration in oysters (*Crassostrea virginica*) and recent sediments from three coastal lagoons in Tabasco, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59:430-437.
- González-Farías, F., Cisneros-Estrada, X., Fuentes-Ruiz, C., Díaz-González, G., Botello, A. V. 2002. Pesticides distribution in sediments of a tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in Northwest Mexico. *Env. Tech.* 23:1247-1256.
- Gosling, E. 1992. The mussel *Mytilus* : ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier, Amsterdam, p. 589.
- Habig, C., Di Giulio, R. T., Abou-Donia, M. B. 1988. Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 91:293-300.
- Hall, L. W. Jr., Anderson, R. D. 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit. Rev. Toxicol.* 25(4):281-346.

- Handy R. D. and M. H. Depledge. 1999. Physiological responses: the measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotox.* 8: 329-349.
- Hankinson, O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:307-340.
- Hart A. (Edit.). 2001. Probabilistic Risk Assessment for Pesticides in Europe. Implementation and Research Needs. EUPRA. Central Science Laboratory. York, U.K. 109 pp.
- Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L., Clarke, K. R. 1983. Coordinated rhythms of digestion, absorption and excretion in *Mytilus edulis* (Bivalvia:Mollusca). *Mar. Biol.* 74:41-48.
- Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L. 1985. Seasonal variations in the relative utilization of carbon and nitrogen by the mussel *Mytilus edulis*: budgets, conversion efficiencies and maintenance requirements. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25:181-188.
- Heredia, L. G., Mexia, J. H., Hernández, L. M. 1988. Estudio de la contaminación por plaguicidas en camarón *Penaeus sp.* y en agua del Estero de Urías, Mazatlán, México. Memoria Profesional. Escuela Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Hernández-Cornejo, R., Ruiz-Luna, A. 2000. Development of shrimp farming in the coastal zone of southern Sinaloa (Mexico): operating characteristics, environmental issues, and perspectives. *Ocean Coast. Manage.* 43:597-607.
- Hickman R., Illingworth, J. 1980. Condition cycle of the green lipped mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. *Mar. Biol.* 60: 27-38.
- Howell, R., Grant, A. M., MacCoy, N. E. J. 1984. Effect of treatment with reserpine on the change in filtration rate of *Mytilus edulis* subjected to dissolved copper. *Mar. Poll. Bull.* 15:436-439.
- Holtzman, E. 1989. Lysosomes. Plenum, New York.
- Ifremer, 2007. Disponible en www.ifremer.fr/.../200103/img/photo3_2.jpg y en www.patagonianshells.com.ar.
- Integrated Risk Assessment System (IRIS). 2008. US Environmental Protection Agency (US EPA). Disponible en <http://www.epa.gov/iris/subst/0455.htm>
- Jackim, E., Lake, C. 1978. Polynuclear aromatic hydrocarbons in estuarine and nearshore environments. En Wiley, M. L. (Ed.), *Estuarine Interactions*. Academic Press, N. Y.
- Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman and Hall. N. Y. 309 pp.
- Jonsson, H., Viken-Sandnes, K., Schiedek, D., Schneider, R., GrØsvik, B. E., GØksoyr, A. 2004. Development of two novel CYP-antibodies and their use in a PCB exposure experiment with *Mytilus edulis*. *Mar. Env. Res.* 58:655-658.
- Jonsson, H., Schiedek, D., GrØsvik, B. E., GØksoyr, A. 2006. Protein responses in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to organic pollutant: a combined CYP-antibody/proteomic approach. *Aquat. Toxicol.* 78S:49-56.
- Kaminsky, L. 2006. The role of trace metals in cytochrome P450 regulation. *Drug Met. Rev.* 38:227-234

- Kappas A., Drummond, G.S. 1984. Control of heme and cytochrome P-450 metabolism by inorganic metals, organometals and synthetic metalloporphyrins. *Env. Health Pers.* 57:301-306.
- Kappas, A., Drummond, G. S. 1986. Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J. Clin. Invest.* 77(2):335-9.
- Kennish, M. J. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons. En: Kennish, M. J. Practical Handbook of estuarine and marine pollution. CRC Press, Inc. p. 141-175.
- Keen, M. 1971. Sea shells of tropical West America: Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford, CA. Stanford University Press.
- Köhler A. 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. *Comp. Biochem Physiol. C.* 100:123-127.
- Köhler, A., Deisemann, H., Lauritzen, B. (1992). Ultrastructural and cytochemical indices of toxic injury in dab liver. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91:141-153.
- Krishnakumar, P. K., Asokan, P. K., Pillai, V. K. 1990. Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus). *Aq. Tox.*, 18(3):163-173.
- Lacerda, L. D., Carvalho, C. E. V., Tanizaki, K. F., Ovalle, A. R. C., Rezende, C. E. (1993). The biogeochemistry and trace metal distribution of mangrove rhizospheres. *Biotropica* 25(3): 252.
- Lacher, T. E. Jr., Goldstein, M. 1997. Tropical ecotoxicology: status and needs. *Env. Tox. Chem.* 16(1): 100-111.
- Laffon, B., Rábade, T., Pásaro, E., Méndez, J. 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Env. Int.* 23(3):342-348.
- Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H. M. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aq. Tox.* 50(1-2):51-71.
- Lake, J., Hoffman, G. L., Schimmel, S. C. 1985. Bioaccumulation of contaminants from Black Rock Harbor dredged material by mussels and polychaetes. *Tech. Rep. D-85-2*, U.S. Environmental Protection Agency.
- Landa, J. 2003. Asociaciones de moluscos bentónicos del sistema lagunar-estuarino Agua Dulce/El Ermitaño, Jalisco, México. *Cienc. Mar.* 29 (2): 169-184.
- Landrum, P.F. 1985. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontonopeia hoyi*. *Env. Sci. Tech.* 23:588-595.
- Langdon, C., Onal, E. 1999. Replacement of living microalga with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 180:283-294.
- Langston, W. J., Bebianno, M. J., Burt, G. 1998. Metabolic pathways in marine invertebrates. En: Langston, W. J., Bebianno, M. J. (Ed.), Metal metabolism in aquatic environments. Chapman and Hall, London. p. 209-283.
- Lankford, R.A. 1977. Estuarine Processes: Coastal lagoons of Mexico. Their origin and classification. Wiley M. Academic Press New York. 83-215.

- Law, R. J., Dawes, V. J., Woodhead, R. J., Matthiessen. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales. *Mar. Poll. Bull.* 34(5):306-322.
- Leavitt, D. F., Lancaster, B. A., Lancaster, A. S., Capuzzo, J. M. 1990. Changes in the biochemical composition of a subtropical bivalve, *Arca zebra*, in response to contaminants gradients in Bermuda. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138:85-98.
- Leal-Tarín, B. A. 2007. Análisis de la condición reproductiva del mejillón de mangle, *Mytella strigata*, en sistemas costeros de Sinaloa con diferentes escenarios de contaminación. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A. C. Mazatlán, México. 96 pp.
- Lecoeur, S., Videmann, B., Berny, P. 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Env. Res.* (94):2: 184-191.
- Lee, S. D., Grant, L. 1991. Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons, *Pathotex Publishing Park*, Park Forest Sout, IL.
- Lee, B. G., Wallace, W. G., Luoma, S. 1998. Uptake and loss kinetics of Cd, Cr and Zn in the bivalves *Potamocorbulus amurensis* and *Macoma balthica*: effects of size and salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 175:177-189.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P. 1992. Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the european eel *Anguilla anguilla*. *Aq. Tox.* 22:145-160.
- Lewis, N. A., Williams, T. D., Chipman, J. K. 2006. Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants. *Tox. Sci.* 92(2):387-393
- Lin, C. H., Chen, J. C. 2001. Haemolymph oxyhemocyanin and protein levels and acid-base balance in the tiger shrimp *Penaeus monodon* exposed to copper sulphate. *J. World. Aq. Soc.* 32:335-341.
- Livingstone, D. R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Adv. Comp. Env. Phys.* 7: 45-185.
- Livingstone, D. R., 1992. Persistent pollutants in marine invertebrates. En: Walker, C., Livingstone, D.R. (Eds.), *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. Pergamon Press, Oxford.
- Livingstone, D. R. 1993. Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotech.* 57(3):195-211.
- Livingstone, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 120: 43-49.
- Livingstone, D. R., Donkin, P., Walker, C. H. (1992). Pollutants in marine ecosystems: an overview. En: Walker, C.H., Livingstone, D.R. (Eds.) *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. Oxford, Pergamon Press. SETAC Special Publication. 235-263.
- Livingstone, D. R., Kirchin, M. A., Wiseman, A. 1989. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in mollusks. *Xenobiotica* 19(10):1041-1062.
- Livingstone, D. R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L. D., Porte, C., Fitzpatrick, P. J., Forlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldford, P. 1995. Assessment of the impact of organic

- pollutants on Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: Biochemical studies. *Mar. Env. Res.* 39:235-240.
- Logan, D. T., Epifanio., C. 1978. A laboratory energy balance for the larvae and juveniles of the american lobsters *Homarus americanus*. *Mar. Biol.* 47: 381-389.
- Long, E., Macdonald, D., Smith, S., Calder, F. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Env. Man.* 19(1):81-97.
- Lowe, D.M. 1988. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:91-100.
- Lowe D. M., Moore, M. N., Clarke, K. R. 1981 Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aq. Tox.* 1:213-226.
- Lowe, D. M., Clarke, K. R. 1989. Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aq. Tox.* 15:345-358.
- Lowe, D. M., Moore, M. N, Evans, B. M. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes of living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 91:132-140.
- Lowe, D. M., Pipe, R. K.. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aq. Tox.* 30: 357-365.
- Lowe, D. M., Moore, N. M., Evans, B. M. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91:135-140.
- Lucas A., Beninger, P.G. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44(3):187-200.
- MacDonald, D. D., Carr, R. S., Calder, F. D., Long, E. R., Ingersoll, C. G., 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5:253-278.
- MacKay, D., Callcott, D. 1998. Partitioning and physical chemical properties of PAH. En: Neilson, A.H. (Ed.). PAH and related compounds. The handbook of environmental chemistry. Springer, Berlin, Germany. p. 325-446.
- Magnusson, K., Ekelund, R., Dave, G., Granmo, A., Förlin, L., Wennberg, L., Samuelsson, M. O., Berggren, M., Brorström-Lundén, E. 1996. Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. *J. Sea Res.* 35(1-3):223-234.
- Mansuy, D. 1988. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121:5-14.
- Marigómez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M., Cajaraville, M. P. 1996. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel-watch programmes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113(2):291-297.
- Marigómez, J. A., Vega, M. M., Cajaraville, M. P., Angulo, E. 1989. Quantitative responses of the digestive lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cell Mol. Biol.* 35:555-562.

- Mayzaud, P., Conover, R. J. 1988. O:N atomic ratio as tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45:289-302.
- Mc Bride, M. B. 1994. Environmental chemistry of soils. Oxford University Press. U.S.A. 406 pp.
- Mc Elroy, A. E., Farrington, J., Teal, J. 1989. En: Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic environment. En: Varanasi, U. (Ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 1-40.
- Mc Pherson, C., Chapman, P., de Bruyn, A., Cooper, L. 2008. The importance of benthos in weight of evidence assessments - a case study. *Sci. Total Env.* 394:252-254.
- Mego, J. L., Farb, R. M., Barnes, J. (1972). An adenosinetriphosphate-dependent stabilization of proteolytic activity in heterolysosomes. *Biochem. J.* 128:763-769.
- Mendiburo, M. J., Flores, S., Pizarro, F. 2006. Heme oxygenase 1 overexpression increases iron fluxes in Caco-2 cells. *Biol. Res.*39(1):195-197.
- Monarca, S., Crebelli, R., Feretti, D., Zanardini, A., Fuselli, S., Filini, L., Resola, S., Bonardelli, P. G., Nardi, G. 1996. Mutagens and carcinogens in size-classified air particulates of a Northern Italian town. *Sci. Tot. Env.* 205(2-3):137-144.
- Montaño-Ley, Y., Páez-Osuna, F. 1990. Estudio preliminar del régimen hidráulico del Puerto de Mazatlán, Sinaloa, México. *Geof. Int.* 29(4):237-247.
- Montaño-Ley, Y., Páez-Osuna, F., Peraza-Vizcarra, R. 2000. Suspended and bed load sediment transport through a coastal lagoon entrance in Mazatlán, Sinaloa, México. *Rev. Int. Cont. Amb.* 16(1):27-36.
- Morcillo, C., Porte, Y. 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aq. Tox.* 38(1-3):35-46.
- Moore, M. N. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Poll. Bull.* 16:134-139.
- Moore, M. N. 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH - ferrohemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:81-89.
- Moore M. N. 1993. Biomarkers of contaminant exposure and effect: a way forward in marine environmental toxicology. *Sci. Tot. Env. (suppl.):*1335-1343.
- Moore, M. N. (1992). Molecular cell pathology of pollutant induced liver injury in flatfish: use of fluorescent probes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 94:127.
- Moore, M. N., Evans, B. (1992). Detection of oncoprotein in liver cells of flatfish (dab) from a contaminated site in the North Sea. *Mar. Env. Res.* 34, 33.
- Moore, M. N., Simpson, M. G. (1992). Molecular and cellular pathology in environmental impact assessment. *Aq. Tox.* 22,313.
- Moore, M., Allen, I., McVeigh, A. 2006. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar. Env. Res.* 61:278-304.

- Mora, P., Michel, X., Narbonne, J. F. 1999. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Env. Tox. Pharm.* 7:253-260.
- Morrison, G. M. P., 1989. Trace element speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters. En: Batley, G.E. (Ed.), Trace metals speciation analytical methods and problems. CRC Press, Boca Raton, p. 25-43.
- Nadal, M., Schumacher, M., Domingo, J. L. 2004. Levels of PAHs in soils and vegetation samples from Tarragona Country, Spain. *Env. Poll.* 132:1-11.
- Narbonne, J., Garrigues, P., Ribera, D. Raoux, C., Mathieu, A., Lemaire, P., Salaun, J. P., Lafaurie, M. 1991. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100(1-2):37-42.
- Nath, K. A. 2006. Heme oxygenase-1: A provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kid. Int.* 70:432-443.
- National Toxicology Program (NTP), 2005. Report on Carcinogens, eleventh ed. Public Health Service, US Department of Health and Human Services, Washington, D.C.
- National Waste Minimization Program, US. EPA, 2008. Disponible en: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/minimize/chemlist.htm>
- Navarro, E., Iglesias, J. I. P., Perez-Camacho A., Labarta, U., Beiras, R. 1991. The physiological energetics of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) from different cultivation rafts in the Ria de Arosa (Galicia, N.W. Spain). *Aquaculture* 94: 197-212.
- Neff, J. M. 1982. Accumulation and release of polycyclic aromatic hydrocarbons from water, food and sediment by marine animals. En: Richards, N.L., Jackson, B.L., (Eds.), Symposium: Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Marine Environment, Rep.600/9-82-103, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry, 4th. W.H. Freeman and Company, New York. p. 798-799.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T. 1996. P450 superfamily: update in new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42.
- Ney, R. 1990. Fate and transport of organic chemicals in the environment. Government Institutes, Maryland, EEUU. 302 pp.
- Newell, R. I. E., Barber, B. J. 1988. A physiological approach for the study of molluscan bivalve diseases. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18:269-280.
- Nicholson, S. 2003. Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere* 52(7):1147-1151.
- Nicholson, S. 1999. Cardiac and lysosomal responses to periodic copper in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar. Poll. Bull.* 38(12):1157-1162.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74:3-9.

- O'Hara, J. 1973. The influence of temperature and salinity on the toxicity of cadmium to fiddler crab *Uca pugilator*. *Fish. Bull. NOAA* 71: 147-153.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J. L., Abad, M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238:541-468.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M. P. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisomes proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdabai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aq. Tox.* 58:75-98.
- Osuna-López, J. I., Páez-Osuna, F., Marmolejo-Rivas, C., Ortega-Romero, P. 1989 Metales pesados disueltos y particulados en el Puerto de Mazatlán. *An. Inst. Cien. Mar Limnol. UNAM.* 16(2):307-320.
- Osuna-López, J. I., Páez-Osuna, F., Ortega-Romero, P. 1986. Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en los sedimentos del Puerto y Antepuerto de Mazatlán. *Cienc. Mar.* 35:4512.
- Osuna-López, J. I., Zazueta-Padilla, H.M., Rodríguez-Higuera, A., Páez-Osuna, F. 1990. Trace metal concentrations in mangrove oyster (*Crassostrea corteziensis*) from tropical lagoon environments, Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 21:486-488.
- Ortiz de Montellano, P. R. 1995. Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry. Plenum Press, New York.
- Páez-Osuna, F. 2000. The impact of shrimp aquaculture: a global perspectiva. *Env. Poll.* 112(2):229-231
- Páez-Osuna, F., Bojorquez-Leyva, H., Ruelas-Inzunza, J. 1999. Regional variations of heavy metal concentrations in tissues of barnacles from the subtropical Pacific coast of Mexico. *Env. Int.* 25, 647-654.
- Páez-Osuna, F., Frías-Espericueta, M. G., Osuna-López, J. I. 1995. Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassostrea iridescens*. *Mar. Env. Res.*, 40(1): 19-31.
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S., Ruiz-Fernández, A. 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 36(1):65-75.
- Páez-Osuna, F., Marmolejo-Rivas, C. 1990. Trace metals in tropical coastal lagoon bivalves: *Crassostrea corteziensis*. *Bull. Env. Cont. Tox.* 45, 538-544.
- Páez-Osuna, F., Montañón-Ley, J. Bojorquez-Leyva, H. 1990. Intercambio de agua, fósforo y material suspendido entre el sistema lagunar del puerto de Mazatlán y las aguas costeras adyacentes. *Rev. Int. Cont. Amb.* 6:19-32.
- Páez-Osuna, F., Osuna-López, J. I., Marmolejo-Rivas, C., Ortega-Romero, P. 1989. Metales pesados disueltos y particulados en el puerto de Mazatlán. *An. Ins. Cienc. Mar y Limnol.* 1989-2.
- Páez-Osuna, F., Ruiz-Fernández, A. C., Botello, A. V., Ponce-Vélez, G., Osuna-López, J. I., Frías-Espericueta, M. G., López-López G., Zazueta-Padilla, H. M. 2002. Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. *Mar. Poll. Bull.*, 44(11):1303-1308.

- Parkinson, A. 1995. Biotransformation of xenobiotics. En: Klassen, C.D. (Ed.), Cassarett and Doull's Toxicology. Mc Graw-Hill. N.Y. USA. p.113-186.
- Paterson, K., Schreider, M., Zimmerman, K. 2003. Anthropogenic effects on seston quality and quantity and the growth and survival of Sidney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) in two estuaries in NSW, Australia. *Aquaculture* 221:407-426.
- Payne J. F. 1976. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science* 191:945-946.
- Pedersen, B. H., Ugelstad, I., Hjelmeland, K. 1990. Effects of transitory, low food supply in the early life of larval herring (*Clupea harengus*) on mortality, growth and digestive capacity. *Mar. Biol.* 107:61-6
- Peraza-Vizcarra, R. 2003. Aspectos hidrográficos del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. *Memoria del Décimo congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, 23-25 de octubre de 2003. Boca del Río, Veracruz. DECyTM-SEP. (Disco compacto).*
- Peraza-Vizcarra, R. 2005. Espacios oceánicos y costeros de Sinaloa. Tópicos Oceanográficos. Universidad Nacional Autónoma de Sinaloa. México.
- Phillips, D. J. H. 1980a. Quantitative aquatic biological indicators. Their use to monitor trace metal and organochlorine pollution. *Appl. Sci. Pub.*, London, p. 488.
- Phillips, D. J. H. 1980. Toxicity and accumulation of cadmium in estuarine and marine biota. En Nriagu, J. O. (Ed.) Cadmium in the environment. 1. Ecological Cycling. Wiley-Interscience, New York, pp. 450-483.
- Phillips, D. J., Segar, D. A. 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programme design imperatives. *Mar. Poll. Bull.* 17(1):10-17.
- Pierce, R. H., Brown, R.C., Van Vleet, E. S., Joyce, R. M. (1986). Hydrocarbon contamination and coastal development. En: Sohn, M. L. (Ed.). Marine Geochemistry. p. 229-246. ACS Symposium Series No. 305, American Chemical Society, N. Y.
- Pipe R. K., Coles, J. A., Farley, S.R. 1995. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. *Techn. Fish Imm.* 4: 93-100.
- Pluta, H. J. 1993. Investigations on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In: Braunbeck, T., Hanke, W., Segner, H. (Eds.). Fish ecotoxicology and ecophysiology. VCH Weinheim. p. 13-33.
- Porte, C., Escartín E., García, L. M., Salé, M. y Albaigés, J. 2000. Xenobiotic metabolizing enzymes and antioxidant defenses in deep-sea: relationship with contaminant body burden. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 192: 259-266.
- Poremski, H. J., Wiandt, S. 2000. OSPAR programmes on hazardous substances dynamics selection and prioritization procedure. *GDCh.* 17: 55-70.
- Priego, B. C. 1985. Contribución al conocimiento de la composición fitoplanctónica del Estero de Urías y la Bahía de Mazatlán, Sinaloa. Tesis Profesional. Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Guadalajara. 62 pp.
- Prior R., Cao, P. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.* 27 (11/12): 1173-1181.

- Pritchard, D. W. 1967. Estuaries. What is an Estuary. Physical new point. *Am. Assoc. Adv. Sci. Publ.* 3-583.
- Pruell, R. J., Lake, J. L., Davis, W. R., Quinn, J. G. 1986. Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to environmentally contaminated sediments. *Mar. Biol.* 91(4):497-507.
- Racotta, I. S., Ramírez, J. L., Avila, S., Ibarra, A. M. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarin scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture* 163:111-122.
- Rainbow, P. S., Malik, I., O'Brien, P. 1993. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestra gammarellus*. *Aq. Tox.* 25:15-30.
- Randall O. J., Brauner, C. J., Thruston, R. V., Neuman, J. F. 1996. Water chemistry at the gill surfaces of fish and the uptake of xenobiotics. En: Taylor, E. W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution*. pp 1-16. Cambridge. University Press. Reino Unido.
- Raspor, B., Pavicic, J. 1991. Induction of metallothionein-like proteins in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to the mixture of trace metals. *Chem. Spec. Bioav.* 3:39-46.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E. 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aq. Tox.* 40:375-392.
- Ricciardi, F., Binelli, A., Provini, A. 2005. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotox. Env. Saf.* 63(3):406-412.
- Rice, J.A. 1990. Bioenergetics modeling approaches to evaluation of stress in fishes. p. 80-92. In: Adams S.M. (Edit). *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Symposium 8. Bethesda, Maryland. 191 pp.
- Risso-de Faverney, C., de Sousa, G., Lafaurie, M., Rahmani, R. 1999. Expression and induction of CYP1A1 in black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) hepatocyte cultures: effects of heavy metals. *Polycyclic Arom. Comp.* 13:285-299 .
- Risso-de Faverney, C., Lafaurie, M., Girard, J.P., Rahmani, R. 2000. The nitroxide stable radical tempo prevents metal-induced inhibition of CYP1A1 expression and induction. *Tox. Lett.* 111:219-227.
- Robles, E. G. 1985. Productividad primaria del fitoplancton y distribución temporo-espacial de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y feopigmentos) en el Estero de Urías, durante un ciclo anual (septiembre 1982- agosto 1983) Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Guadalajara. 76 pp.
- Roesijadi, G., Young, Y. S., Drum, A. S., Gurtisen, J. M. 1984. Behaviour of trace metals in *Mytilus edulis* during a reciprocal transplant field experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 18:155-170.
- Roesijadi, G. 1994. Behaviour of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Mar. Env. Res.* 38:147-168.
- Rueda, J. L., Smaal, A. C. 2004. Variation of the physiological energetics of the bivalve *Spisula subtruncata* (da Costa, 1778) within an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 301(2):141-157.

- Ruelas, J. 2001. Concentración y distribución de metales pesados en tejidos de organismos representativos de la flora y fauna del bajo Golfo de California y áreas adyacentes. Tesis de Grado. Doctorado en Ciencias del Mar y Limnología (Química Acuática). UNAM.
- Ruelas-Inzunza, J. R., Páez-Osuna, F. 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder organisms in a subtropical coastal environment (Southeast Gulf of California). *Env. Poll.* 107, 437-444.
- Ruiz-Luna, A., Berlanga-Robles, C. 2003. Land use, land cover changes and coastal lagoon surface reduction associated with urban growth in northwest Mexico. *Landscape Ecol.* 18:159-171.
- Sadiq, M., Alam, I. A., Zaidi, T. H. 1991. Bioaccumulation of cadmium by clams dwelling in different salinity regimes along the Saudi coast of the Arabian Gulf. *Water Air Soil Poll.* 57-58(1):181-190.
- Salgado, J. 2003. Evaluación del impacto de un sistema de camaricultura sobre la fauna asociada a un sistema lagunar aledaño. Tesis de Grado. Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM.
- Savina, M., Pouvreau, S. 2004. A comparative ecophysiological study of two infaunal filter-feeding bivalves: *Paphia rhomboïdes* and *Glycymeris glycymeris*. *Aquaculture* 239(1-4):289-306.
- Schlenk, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Mar. Poll. Bull.* 39(1-12): 48-53.
- Schrank, C. S., Cormier, S. M., Blazer, V.S. 1997. Contaminant exposure, biochemical and histopathological biomarkers in white suckers from contaminated and reference sites in the Sheboygan river, Wisconsin. *J. Great Lakes Res.* 23:119-130.
- Sedmark, J., Grossberg, S. 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *An. Bioch.* 79:544-552.
- SEMARNAT y CEPAL, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (2004). "Evaluación de las externalidades ambientales de la generación termoeléctrica en México", Reporte no. LCMEXL644, México, D.F. <http://www.semarnat.gob.mx/informacionambiental/Publicacion/ext.pdf>.
- Schulz, H. M., Emeis, K. C. 2000. Sources and pathways of natural and anthropogenic hydrocarbons into the natural dump Arkona Basin (southern Baltic Sea). *Environmental Geology.* 39(8): 839-848
- Soazig, L., Marc, L. 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar. Poll. Bull.* 46(11):1450-1455.
- Sobral, P., Widdows, J. 2000. Effects of increasing current velocity, turbidity and particle-size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 24(1):111-125
- Soclo, H. H., Garrigues, P. H., Ewald, M. 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar. Poll. Bull.* 40(5):387-396.

- Soto-Jiménez, M. F., Páez-Osuna, F. (2001). Distribution and normalization of heavy metal concentration in mangrove and lagoon sediments from Mazatlan Harbor (SE Gulf of California). *Est. Coast. Shelf Sci.* 53:259-274.
- Soto-Jiménez M., Páez-Osuna, F., Ruiz-Fernández, A. C. 2003. Geochemical evidences of the anthropogenic alteration of trace metal composition of the sediments of Chiricahueto marsh (SE Gulf of California). *Env. Poll.* 125(3):423-432.
- Soto-Jiménez, M., Páez-Osuna, F., Morales-Hernández, F. 2001. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridescens*) and sediments from the discharge zone of the submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (Southeast Gulf of California): chemical fractions and bioaccumulation factors. *Env. Poll.*, 114(3):57-370.
- Soto-Jiménez, M. F., Páez-Osuna, F. 2001. Distribution and normalization of heavy metal concentrations in mangrove and lagoon sediments from Mazatlán harbor (SE Gulf of California) *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 53(3): 259-274.
- Soto, M., Ireland, M. P., Marigómez, I. 2000. Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in "Mussel Watch" programmes. *Sci. Total Env.* 247:175-187.
- Spink, D. C., Katz, B. H., Hussain, M. M., Spink, B. C., Wu, S. J., Liu, N., Pause, R., Kaminsky, L. S. 2002. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47-D human breast cancer cells by benzo(a)pyrene is diminished by arsenite. *Drug Metab. Dispos.* 30:262-269.
- Sreedevi, P., Sivaramakrishna, B., Suresh, A., Radhakrishnaiah, K. (1992). Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* L. *Env. Poll.* 77:59-63.
- Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. En: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives*. Boca Raton: Aquatic Publishers. 87-203.
- Stekoll, M. S., Clement, L. E., Shaw, D. G. 1980. Sublethal effects of chronic oil exposure on the intertidal clam *Macoma balthica*. *Mar. Biol.* 57, 51-60.
- Sternlieb, I., Goldfischer, S. (1976). Heavy metals and lysosomes. En: Dingle, J. T., Dean, R. T. *Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 5*. American Elsevier Publishing Company, New York, pp. 185-200.
- Stuardo, J., Villarroel, M. 1976. Aspectos ecológicos y distribución de los moluscos en las lagunas costeras de Guerrero. *An. Centro Ciencias Mar y Limnología, UNAM.* 3:65-92.
- Swartz, R. C., Schults, D. W., De Witt, T. H., Ditsworth, G. R., Lamberson, J. O. 1990. Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods: a test of the Equilibrium Partitioning Approach to Sedimentary Quality Criteria. *Environm. Toxicol. Chem.* 9:1071-1080.
- Szefer, P., Geldon, J., Páez-Osuna F., Ruiz-Fernández, A. C., Guerrero-Galván S. R., Ali, A. A. 1998. Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytella strigata* and other benthic organisms from Mazatlan Harbor, mangrove lagoon of the Northwest coast of Mexico. *Envirom. Int.* 24 (3): 359-374.
- Tam, N. F., Wong, Y. S. 1996. Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. *Env. Poll.*, 94(3):283-291.

- Tanabe, S. 2000. Asia-Pacific Mussel Watch Progress Report. *Mar. Poll. Bull.* 40(8):651.
- Tanabe, S., Tatsukawa, R., Phillips, D. J. (1987). Mussels as bioindicators of PCB pollution: A case study of uptake and release of PCB isomers and congeners in green-lipped mussels *Perna viridis* in Hong-Kong Waters. *Env. Poll.* 47:41-62.
- Tanabe, S., Subramanian, A. 2003. Bioindicators suitable for monitoring POPs in developing countries. Scientific and Technical Advisory Panel (STAP) Workshop on: The use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries. STAP/GEF and Ministry of Environment, Government of Japan.
- Thompson, G. B. 1980. Distribution and population dynamics of the limpet *Patella vulgata* L. in Bantry Bay. *J. Exp. Biol. Ecol.* 45:127-173.
- Thompson, J. R., Bayne, B. L. 1974. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 27:317-326.
- Thorson, G. 1971. Life in the sea. World Univ. Library. Weidenfeld and Nicholson, London.
- Toro, B. Navarro, J. M., Palma-Fleming H. 2003. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: Mytilidae). *Aq. Tox.*, 63(3):257-269 .
- Torres, M. A., Pires Testa, C., Gáspari, C., Masutti, M., Neves, C. M. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Poll. Bull.*, 44(9):923-932.
- Turner, D. R., Whitfield, M., Dickson, A. G. 1981. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25 °C and at 1 atm pressure. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45:855-881.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1998. Contaminated sediment management strategy. EPA 823-R-98-001. Office of Water, Washington, DC.
- U.S. E.P.A., Environmental Protection Agency. 1990. Compilation of E.P.A.'s sampling and analysis methods. Compilado por Müeler, W. y D.L. Smith. En: Keith, I. (Eds.) EUA. 803 p.
- UNEP/IAEA. 1982. Determination of DDT's, PCB's and other hydrocarbons in marine sediments by gas liquid chromatography. *Ref. Meth. Mar. Poll. Stud.* 17.
- UNEP/IAEA/FAO/IOC. 1993. Guidelines for monitoring chemical contaminants in the sea using marine organisms. *Ref. Meth.* 6. UNEP.
- UNEP/IOAC/IAEA. 1992. Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. *Ref. Meth.* 20. UNEP.
- UNEP-FAO/IOC/IAEA. 1986. Determination of DDT's, PCB's in selected marine organisms by packed column gas chromatography. *Ref. Meth. Mar. Poll. Stud.* 14.
- Vakharia, D. D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q. Y., Kaminsky, L. S. 2001. Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Drug. Metab. Dispos.* 29:999-1006.
- Vanegas R. C. 1996. Efectos subletales del cadmio y zinc en el camarón blanco *Penaeus setiferus*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM, México. 118 pp.

- Van Vleet, E. S., Joyce, R. M., Sherwin, M. R. 1986. Comparison of anthropogenic hydrocarbons outputs to two subtropical marine estuaries. *Sci. Total Env.* 56:221-230.
- Vernberg, W. B., De Coursey, P. J. O'Hara, J. 1974. Multiple environmental factors effects on physiology and behavior of the fiddler crab, *Uca pugilator*. En Vernberg, F. J. y Vernberg, W.B. (Eds.), Pollution and physiology of marine organisms. Academic Presss, New York, pp. 381-425.
- Viarengo, A. 1985 Biochemical effects of trace metals. *Mar. Poll. Bull.*, 16(4):153-158.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146:281-300.
- Viarengo, A., Nott, J.A. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 104:355-372.
- Viarengo, A., Palmero, S., Zanicchi, G., Capelli, R., Vaissiere, R., Oronesu, M. 1985. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Environ. Res.* 16:23-36.
- Villalba, L. A., 1986. Descripción general del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. Universidad Autónoma de Sinaloa. *Cienc. Mar.* 8:32-37.
- Walker, C. H. 1995. Biochemical biomarkers in ecotoxicology-some recent developments. *Sci. Total Environ.* 171: 189-195.
- Wang, W. X., Fisher, N.S. 1996. Assimilation of trace elements and carbon by the mussels *Mytilus edulis*: effect of food composition. *Limnol. Ocean.* 41:197-207.
- Wedderburn, J., McFadzen, L., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Hornsby, M., Lowe, O. 2000. The field application of cellular and physiological biomarkers in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays. *Mar. Poll. Bull.* 40(3):257-267.
- Weeks, J. M., Jensen, F. B., Depledge, M. H. 1993. Acid-base status, haemolymph composition and tissue copper accumulation in the shore crab *Carcinus maenas* exposed to combined copper and salinity stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97:91-98.
- White, S. L., Rainbow, P. S. 1985. On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans. *Mar. Env. Res.* 16(3):215-229.
- WHO: International Programme on Chemical Safety (ICPS). 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environ. Health Crit.* 155, World Health Organization, Geneva.
- Widdows, J. 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 58:109-124.
- Widdows, J. 1993. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. En: Calow, P. (Ed.), Handbook of Ecotoxicology, Vol. I. Blackwell Scientific Publications, London. P. 145-166.
- Widdows, J., Bakke, T., Bayne, B.L., Donkin, P., Livingstone, D. R., Lowe, D. M., Moore, M. N., Evans, S. V., Moore, S. L. 1982. Response of *Mytilus edule* L. on exposure to the water accommodation fraction of North Sea oil. *Mar. Biol.* 67:15-31.

- Widdows, J., Donkin, P., Brinsley, M., Evans, C. V., Page, D. S., Salked, P. N. 1995a. Sublethal biological effects and contaminant monitoring of Sulloe Voe (Shetland) using mussels (*Mytilus edulis*). *Proc. Roy. Soc. Edim.* 103B:99-112.
- Widdows, J., Donkin, P., Brinsley, M., Evans, C. V., Salked, P. N., Franklin, A., Law, R., Waldoock, M. J. 1995b. Measurement of scope for growth and tissue hydrocarbon contamination of mussels (*Mytilus edulis*) at sites in the vicinity of Sullom Voe oil terminal: a case study. En: Kuiper, J., Van den Brink, W.J. (Eds.) *Fate and Effects of Oil in Marine Ecosystems*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 269-277.
- Widdows, J., Burns, K. A., Menon, N. R., Page, O. S., Soria, S. 1990. Measurement of physiological energetics (scope for growth) and chemical contaminants in mussels (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138(1-2):99-117.
- Widdows, J., Donkin, P., Evans, S. V. 1987. Physiological responses of *Mytilus edulis* during chronic oil exposure and recovery. *Mar. Env. Res.* 23:15-32.
- Widdows, J., Donkin, P., Staff, J. P., Matthiessen, F., Law, R. J., Allen, Y. T., Thain, J. E., Allchin, C. R., Jones, B. R. 2002. Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Mar. Env. Res.*, 53(4):327-356.
- Widdows, J., Nasci, C., Fossato, V. 1997. Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy. *Mar. Env. Res.* 43(1-2):69-79.
- Widdows, J., Oonkin, P., Brinsley, M. O., Evans., S. V., Salked, P. N., Franklin, A., Law, R. J., Waldoock, M. J. 1995. Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 127:131-148.
- Williams, T. D., Lee, J. S., Sheader, D. L., Chipman, J. K. (2000). The cytochrome P4501A gene (CYP1A) from european flounder (*Platichthys flesus*), analysis of regulatory regions and development of a dual luciferase reporter gene system. *Mar. Env. Res.* 50, 1-6.
- Winberg, G. G. 1960. Rate of metabolism and food requirement of fishes. *Fish. Res. Board. Can. Trans. Serv.* 194: 202-211.
- Wong, W. H., Cheung, S. G. 2003. Site-related differences in the feeding physiology of the green mussel *Perna viridis*: a reciprocal transplantation experiment. *Mar. ecol. Prog. Ser.* 258:147-159.
- Wright, D. A., Zamuda, C. D. 1987. Copper accumulation by two bivalve mollusks: salinity effect is independent of cupric ion activity. *Mar. Env. Res.* 23:1-14.
- Yan, J., Wang, L., Fu, P. P., Yu, H. 2004. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Res.* 557:99-108.
- Yawetz, A., Manelis, R., Fishelson, L. 1992. The effects of aroclor 1254 and petrochemical pollutants on cytochrome P450 from the digestive gland microsomes of four species of Mediterranean molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 103(3):607-614.
- Young, J. S. (1982). Toxic and adaptive response to copper by the sabellid polychaete *Evdistylia vancoveri*. En: Vernberg, W.B., Calabrese, F. P., Vernberg, F.J (Eds.). *Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity*. Academic Press, New York, pp. 53-73.
- Yu, H. 2002. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J. Env. Sci. Health.* 20(2):149-183.

Yunker, M. B. 1995. Composition and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mackenzie River and on the Beaufort Sea shelf. *Arctic* 48:118-129.

Yunker, M. B., McDonald, R. B., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., Sylvestre, S. 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geoch.* 33:489-515.

Zar, J. H., 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, USA. 123 pp.

Zúñiga-Lagunes, S. 2008. Manual de Métodos Bioquímicos y Fisiológicos en Estudios Ecotoxicológicos. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (en prensa)

ANEXOS.

Parámetros ambientales en las estaciones de muestreo.

Durante la colecta de organismos y muestras ambientales en las estaciones de muestreo del Estero de Urías, Sinaloa, se registraron diferentes parámetros fisicoquímicos (Tabla 1). Asimismo se determinaron otros parámetros importantes como el contenido de materia orgánica en agua y sedimentos, así como la concentración de clorofila en partículas suspendidas. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias en la temperatura, la salinidad, el pH del agua, el pH de sedimento o la concentración de materia orgánica particulada (MOP). Por otra parte, en Puente Juárez se presentó la menor concentración de clorofila y de MO en sedimentos, mientras que en Castillo se registró la mayor concentración de oxígeno disuelto. Astillero presenta el mayor contenido de materia orgánica en sedimentos y una concentración de clorofila cercana a la de Castillo.

Tabla 1. Características ambientales de las estaciones de muestreo en Estero de Urías. Se muestra valor promedio en clorofila *a*, MOP y % MO en sedimento.

	Hora de colecta	Temp ° C	Salinidad ups	pH agua	pH sedim.	OD mgO ₂ /l	Clorofila <i>a</i> µg/l	MOP mg/l	%MO sedim.
P. Juárez	9:44	25.1	34.4	7.69	7.0	4.8	0.694	0.112	6.23
Astillero	12:30	28.9	35.0	7.6	6.9	5.8	9.25	0.119	17.83
Castillo	14:49	28.3	36.4	7.39	7.0	8.3	10.318	0.120	10.28

2. Correlaciones

Se analizaron las correlaciones de todas las respuestas biológicas evaluadas con cada uno de los HPAs determinados en los tejidos de *M. strigata* (Tabla 2), así como las correlaciones entre las respuestas biológicas (Tabla 3). En el análisis de cada correlación, cuando al menos una de las respuestas biológicas de no presentó una distribución normal de los datos u homoscedasticidad se aplicó la prueba no paramétrica de Spearman, mientras que en los demás casos se aplicó el análisis de Pearson (Zar, 1999).

Tabla 2. Correlaciones entre las respuestas evaluadas y cada uno de los HPAs determinados en los tejidos de *M. strigata* en el Estero de Urías. Se incluye el coeficiente de correlación (r) y la significatividad de la correlación (p).

		acenafteno	fluoreno	fenantreno	antraceno	fluoranteno	pireno	Benzo(a) antraceno	criseno	Benzo(a) pireno	APM	BPM	TOTALES
Actividad EROD*	r	-0.775	0.508	0.164	-0.846	0.164	-0.775	-0.751	-0.751	0.751	-0.775	-0.775	-0.775
	p	0.002	0.076	0.592	0.000	0.592	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002	0.002
Proteína en hemolinfa*	r	0.235	-0.310	-0.275	0.446	-0.275	0.298	0.527	0.591	-0.567	0.270	0.235	0.235
	p	0.229	0.108	0.157	0.017	0.157	0.123	0.004	0.001	0.002	0.164	0.229	0.229
Proteína en músculo	r	0.66	-0.1831	0.1271	0.64	0.3867	0.496	0.535	0.627	-0.3753	0.493	0.5258	0.4971
	p	0.000	0.324	0.496	0.000	0.032	0.004	0.002	0.000	0.037	0.005	0.002	0.004
Estabilidad lisosomal*	r	0.186	-0.817	-0.759	0.518	-0.759	0.186	0.744	0.744	-0.744	0.186	0.186	0.186
	p	0.445	0.000	0.000	0.023	0.000	0.445	0.000	0.000	0.000	0.445	0.445	0.445
Índice de condición	r	0.392	-0.732	-0.546	0.627	-0.277	-0.107	0.759	0.664	-0.783	-0.114	-0.051	-0.106
	p	0.047	0.000	0.004	0.001	0.171	0.603	0.000	0.000	0.000	0.581	0.803	0.607
Tasa de aclaramiento	r	0.262	-0.321	-0.183	0.343	-0.023	0.061	0.383	0.356	-0.373	0.058	0.086	0.061
	p	0.217	0.126	0.393	0.101	0.915	0.778	0.065	0.088	0.073	0.789	0.690	0.776
Eficiencia de asimilación	r	0.768	0.035	0.395	0.628	0.673	0.765	0.422	0.589	-0.200	0.762	0.783	0.765
	p	0.000	0.885	0.085	0.003	0.001	0.000	0.064	0.006	0.398	0.000	0.000	0.000
Tasa de absorción*	r	0.716	-0.040	0.145	0.595	0.145	0.701	0.520	0.504	-0.514	0.711	0.716	0.716
	p	0.001	0.871	0.552	0.007	0.552	0.001	0.023	0.028	0.024	0.001	0.001	0.001
Consumo de oxígeno	r	0.489	0.429	0.635	0.276	0.700	0.687	0.014	0.223	0.226	0.688	0.676	0.686
	p	0.011	0.029	0.000	0.173	0.000	0.000	0.946	0.274	0.267	0.000	0.000	0.000
Excreción nitrogenada	r	0.413	0.347	0.528	0.233	0.592	0.583	0.018	0.189	0.178	0.584	0.574	0.583
	p	0.040	0.089	0.007	0.262	0.002	0.002	0.931	0.365	0.395	0.002	0.003	0.002
Relación ON*	r	-0.344	-0.392	-0.442	0.003	-0.442	-0.367	0.081	0.059	-0.071	-0.360	-0.344	-0.344
	p	0.108	0.064	0.035	0.988	0.035	0.085	0.712	0.791	0.748	0.092	0.108	0.108
Campo de crecimiento*	r	0.685	0.041	0.106	0.543	0.106	0.696	0.526	0.537	-0.533	0.692	0.685	0.685
	p	0.001	0.869	0.666	0.016	0.666	0.001	0.021	0.018	0.019	0.001	0.001	0.001

Negritas: $p < 0.05$, $r > 0.5$ *: Correlación analizada con prueba de Spearman.

Tabla 3. Correlaciones entre las diferentes respuestas biológicas (biomarcadores) evaluadas en diferentes niveles de organización biológica de *M. strigata* en el Estero de Uriás. Se incluye el coeficiente de correlación (r) y la significatividad de la correlación (p).

		Actividad EROD*	Proteína en hemolinfa*	Proteína en músculo	Estabilidad lisosomal*	Índice de condición	Tasa de aclaramiento	Eficiencia de asimilación	Tasa de absorción*	Consumo de oxígeno	Excreción nitrogenada	Relación ON*	Campo de crecimiento*
Actividad EROD*	r		-0.624	-0.382	-0.448	-0.619	0.033	-0.755	-0.750	-0.052	-0.269	-0.087	-0.786
	p		0.023	0.221	0.124	0.024	0.932	0.007	0.052	0.865	0.424	0.800	0.036
Proteína en hemolinfa*	r	-0.624		0.208	0.375	0.277	0.095	0.196	0.236	-0.022	0.070	-0.192	0.226
	p	0.023		0.297	0.113	0.171	0.667	0.420	0.345	0.914	0.738	0.380	0.367
Proteína en músculo	r	-0.382	0.208		0.245	0.923	0.927	-0.176	0.952	-0.493	-0.467	-0.205	0.951
	p	0.221	0.297		0.328	0.025	0.024	0.777	0.013	0.399	0.428	0.740	0.013
Estabilidad lisosomal*	r	-0.448	0.375	0.245		0.811	0.307	-0.147	0.225	-0.361	-0.301	0.329	0.483
	p	0.124	0.113	0.328		0.000	0.265	0.587	0.459	0.128	0.240	0.213	0.112
Índice de condición	r	-0.619	0.277	0.923	0.811		0.720	-0.122	0.424	-0.337	-0.450	0.494	0.624
	p	0.024	0.171	0.025	0.000		0.170	0.845	0.090	0.579	0.391	0.023	0.010
Tasa de aclaramiento	r	0.033	0.095	0.927	0.307	0.720		-0.216	0.865	-0.640	-0.397	0.114	0.656
	p	0.932	0.667	0.024	0.265	0.170		0.727	0.000	0.245	0.508	0.642	0.002
Eficiencia de asimilación	r	-0.755	0.196	-0.176	-0.147	-0.122	-0.2158		0.325	0.754	0.906	0.018	0.266
	p	0.007	0.420	0.777	0.587	0.845	0.727		0.237	0.141	0.034	0.950	0.358
Tasa de absorción*	r	-0.750	0.236	0.644	0.225	0.424	0.865	0.325		0.451	0.247	0.025	0.978
	p	0.052	0.345	0.003	0.459	0.090	0.000	0.237		0.069	0.324	0.930	0.000
Consumo de oxígeno	r	-0.052	-0.022	-0.493	-0.361	-0.337	-0.640	0.754	0.451		0.783	-0.368	0.279
	p	0.865	0.914	0.399	0.128	0.579	0.245	0.141	0.069		0.117	0.092	0.277
Excreción nitrogenada	r	-0.269	0.070	-0.467	-0.301	-0.499	-0.397	0.906	0.247	0.783		-0.844	0.240
	p	0.424	0.738	0.428	0.240	0.391	0.508	0.034	0.324	0.117		0.000	0.336
Relación ON*	r	-0.087	-0.192	-0.222	0.329	0.494	0.114	0.018	0.025	-0.368	-0.844		-0.179
	p	0.800	0.380	0.321	0.213	0.023	0.642	0.950	0.930	0.092	0.000		0.524
Campo de crecimiento*	r	-0.786	0.226	0.560	0.483	0.624	0.656	0.266	0.978	0.279	0.240	-0.179	
	p	0.036	0.367	0.013	0.112	0.010	0.002	0.358	0.000	0.277	0.336	0.524	

Negritas: p<0.05, r>0.5

***: Correlación analizada con prueba de Spearman**