



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

Bioacumulación y capacidad reguladora de los metales  
Zn, Ni y Cd en el erizo de mar (*Echinometra lucunter*).

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
CLAUDIA PATRICIA DORANTES MEJÍA

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. FERNANDO ANTONIO GONZÁLEZ FARÍAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Francisco Alonso Solís Marín  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología  
Dra. Claudia Alejandra Ponce de León Hill  
Facultad de Ciencias  
Dr. Alfonso Vázquez Botello  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología  
Dr. Luis Arturo Soto González  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

MÉXICO, D. F. JUNIO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

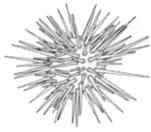


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	14
<b>2.1</b> Ubicación taxonómica de <i>E. lucunter</i> .....	14
<b>2.2</b> Distribución geográfica de <i>E. lucunter</i> .....	14
<b>2.3</b> Descripción morfológica de <i>E. lucunter</i> .....	15
<b>2.4</b> Ciclo de vida de <i>E. lucunter</i> .....	16
<b>2.5</b> Problemática de contaminación en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano .....	16
<b>2.6</b> Fuente de los metales pesados Cd, Zn y Ni .....	18
<b>2.7</b> Equinodermos como bioindicadores de contaminación .....	19
<b>2.8</b> Tipos de bioindicadores .....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>5.1</b> General .....	25
<b>5.2</b> Particulares .....	25
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	26
<b>6.1</b> Área de recolecta .....	26
<b>6.1.1</b> Recolecta de organismos .....	27
<b>6.1.2</b> Traslado de los organismos .....	28
<b>6.2</b> Etapas previas a la realización de los bioensayos .....	28



6.2.1	Aclimatación de organismos .....	28
6.2.2	Prueba de calidad de los lotes .....	29
6.3	Desarrollo de bioensayos .....	30
6.3.1	1 <sup>er</sup> Bioensayo. Determinación de la CL <sub>50</sub> -96h de los metales Cd, Ni y Zn en el erizo de mar <i>E. lucunter</i> .....	30
6.3.2	2 <sup>do</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de <i>E. lucunter</i> para acumular metales Cd, Ni y Zn .....	31
6.3.3	3 <sup>er</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de <i>E. lucunter</i> de regular los metales Cd, Ni y Zn .....	32
6.4	Procesamiento de las muestras de organismos .....	33
6.4.1	Digestión de espinas y testa .....	34
6.4.2	Digestión del tejido blando .....	34
6.4.3	Análisis de los metales .....	35
6.4.4	Cuantificación de metales .....	35
6.5	Análisis estadísticos .....	36
7.	<b>RESULTADOS</b> .....	37
7.1	Pruebas previas a la realización de los bioensayos .....	37
7.1.1	Calidad del agua .....	37
7.1.2	Pruebas de calidad de los lotes .....	38
7.1.3	Prueba de homogeneidad de los lotes de organismos .....	40
7.2	1 <sup>er</sup> Bioensayo. Determinación de la CL <sub>50</sub> -96h como criterio de tolerancia de <i>E. lucunter</i> a los metales Cd, Ni y Zn .....	43
7.2.1	Determinación de la CL <sub>50</sub> -96h del Cd .....	43
7.2.2	Determinación de la CL <sub>50</sub> -96h del Ni .....	44
7.2.3	Determinación de la CL <sub>50</sub> -96h del Zn .....	44
7.2.4	Comparación de la CL <sub>50</sub> -96h del Cd, Ni y Zn .....	45
7.3	2 <sup>do</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de acumulación de los metales .....	46



Cd, Ni y Zn por <i>E. lucunter</i> .....	
<b>7.3.1</b> Capacidad de acumulación del Cd .....	46
<b>7.3.2</b> Capacidad de acumulación del Ni .....	48
<b>7.3.3</b> Capacidad de acumulación del Zn .....	50
<b>7.4</b> 3 <sup>er</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de <i>E. lucunter</i> de regular los metales Cd, Ni y Zn .....	52
<b>7.4.1</b> Capacidad de regulación del Cd .....	52
<b>7.4.2</b> Capacidad de regulación del Ni .....	54
<b>7.4.3</b> Capacidad de regulación del Zn .....	55
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>8.1</b> Tolerancia de <i>E. lucunter</i> a los metales Cd, Ni y Zn .....	57
<b>8.2</b> Capacidad de acumulación de los metales Cd, Ni y Zn en <i>E. lucunter</i> .....	61
<b>8.3</b> Capacidad de regulación de los metales Cd, Ni y Zn en <i>E. lucunter</i> .....	67
<b>8.4</b> Propuesta de la utilización de <i>E. lucunter</i> como bioindicador de contaminación por los metales Cd, Ni y Zn .....	70
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	73
<b>11. ANEXOS</b> .....	87
<b>11.1</b> Anexo I. Resultados CL <sub>50</sub> de las pruebas Probit para la especie <i>E. lucunter</i> ....	87
<b>11.1.1</b> Prueba de CL <sub>50</sub> para Cd .....	87
<b>11.1.2</b> Prueba de CL <sub>50</sub> para Ni .....	87
<b>11.1.3</b> Prueba de CL <sub>50</sub> para Zn .....	88
<b>11.2</b> Anexo II. Curvas de calibración de cada uno de los metales .....	88
<b>11.2.1</b> Curva de calibración para el Cd .....	88
<b>11.2.2</b> Curva de calibración para el Ni .....	89
<b>11.2.3</b> Curva de calibración para el Zn .....	89



## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b>	Condiciones hidrológicas observadas durante el mantenimiento en estanques de erizos de la especie <i>E. lucunter</i> .....	37
<b>Tabla 2.</b>	Parámetros fisicoquímicos monitoreados al inicio y antes de cada recambio de agua marina artificial durante los bioensayos con <i>E. lucunter</i> .....	38
<b>Tabla 3.</b>	Promedios $\pm$ D.E de peso y velocidad promedio de los organismos de <i>E. lucunter</i> que fueron sometidos a bioensayos .....	39
<b>Tabla 4.</b>	Porcentaje de organismos de <i>E. lucunter</i> que presentaron movimiento de espinas al ser extraídos del agua .....	40
<b>Tabla 5.</b>	Promedio $\pm$ D.E. de los caracteres biométricos medidos a cada organismo de <i>E. lucunter</i> que fue sometido al bioensayo de Zn .....	41
<b>Tabla 5.1</b>	Prueba de contraste de igualdad de medias .....	41
<b>Tabla 6.</b>	Promedio $\pm$ D.E. de los caracteres biométricos medidos a cada organismo de <i>E. lucunter</i> que fue sometido al bioensayo de Ni .....	41
<b>Tabla 6.1</b>	Prueba de contraste de igualdad de medias .....	42
<b>Tabla 7.</b>	Promedio $\pm$ D.E. de los caracteres biométricos medidos a cada organismo de <i>E. lucunter</i> que fue sometido al bioensayo de Cd .....	42
<b>Tabla 7.1</b>	Prueba de contraste de igualdad de medias .....	42
<b>Tabla 8.</b>	Resultados de la prueba Shapiro-Wilks para el contraste de hipótesis de normalidad en las concentraciones de los tres metales (Cd, Ni, Zn).....	46
<b>Tabla 9.</b>	Concentración promedio de Cd determinado en <i>E. lucunter</i> (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de bioacumulación .....	47
<b>Tabla 10.</b>	Resultados de la prueba <i>t</i> -Student para determinar diferencias entre las concentraciones de Cd encontradas en los erizos del lote experimental vs. erizos del lote blanco .....	47
<b>Tabla 11.</b>	Concentración promedio de Ni determinado en <i>E. lucunter</i> (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de bioacumulación .....	48
<b>Tabla 12.</b>	Resultados de la prueba <i>t</i> -Student para determinar diferencias entre las concentraciones de Ni encontradas en los erizos del lote experimental vs. los erizos del lote blanco .....	49
<b>Tabla 13.</b>	Concentración promedio de Zn determinado en <i>E. lucunter</i> (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de bioacumulación .....	50



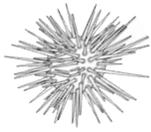
<b>Tabla 14.</b>	Resultados de la prueba <i>t</i> -Student para determinar diferencias entre las concentraciones de Zn encontradas en los erizos del lote experimental vs. los erizos del lote blanco .....	51
<b>Tabla 15.</b>	Concentración promedio de Cd determinado en <i>E. lucunter</i> (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de regulación .....	52
<b>Tabla 16.</b>	Resultados del ANOVA para determinar diferencias en la regulación de Cd de las diferentes estructuras a través del tiempo .....	53
<b>Tabla 17.</b>	Concentración promedio de Ni determinado en <i>E. lucunter</i> (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de regulación .....	54
<b>Tabla 18.</b>	Resultados del ANOVA para determinar diferencias en la regulación de Ni a través del tiempo .....	55
<b>Tabla 19.</b>	Concentración promedio de Zn determinado en <i>E. lucunter</i> (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de regulación .....	56
<b>Tabla 20.</b>	Resultados del ANOVA para determinar diferencias entre la regulación de Zn a través del tiempo .....	56
<b>Tabla 21.</b>	Concentraciones de metales Cd, Ni y Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en aguas costeras del Golfo de México y estándares mundiales de calidad de agua .....	59
<b>Tabla 22.</b>	Químicos que tienen efectos de disrupción endócrina en invertebrados .....	64
<b>Tabla 23.</b>	Ejemplos de los cambios inducidos químicamente en el desarrollo de los invertebrados .....	65
<b>Tabla 24.</b>	Tipos de bioindicadores que son las espinas, la testa y el tejido blando de <i>E. lucunter</i> para los metales Cd, Ni y Zn .....	70



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b>	Distribución geográfica del erizo rojo <i>E. lucunter</i> .....	15
<b>Figura 2.</b>	Respuesta dosis-efecto que muestran los organismos bioindicador y bioregulador .....	23
<b>Figura 3.</b>	Ubicación geográfica del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, Veracruz, México .....	26
<b>Figura 4.</b>	Mapa de ubicación de la zona de recolecta del erizo <i>E. lucunter</i> .....	27
<b>Figura 5.</b>	Vistas del estanque de aclimatación y mantenimiento de organismos .....	29
<b>Figura 6.</b>	Montaje del sistema para bioensayos de CL <sub>50</sub> .....	31
<b>Figura 7.</b>	Montaje del sistema para bioensayos de acumulación .....	32
<b>Figura 8.</b>	Esquema en el que se ejemplifican los bioensayos de acumulación y regulación .....	33
<b>Figura 9.</b>	Curva dosis-efecto para las concentraciones de Cd .....	43
<b>Figura 10.</b>	Curva dosis-efecto para las concentraciones de Ni .....	44
<b>Figura 11.</b>	Curva dosis-efecto para las concentraciones de Zn .....	45
<b>Figura 12.</b>	Acumulación media de Cd en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando de <i>E. lucunter</i> al día 0, 5 y 10 de exposición.....	48
<b>Figura 13.</b>	Acumulación media de Ni en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando de <i>E. lucunter</i> al día 0, 5 y 10 de exposición .....	49
<b>Figura 14.</b>	Acumulación media de Zn en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando de <i>E. lucunter</i> al día 0, 5 y 10 de exposición .....	51
<b>Figura 15.</b>	Regulación media de Cd en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando de <i>E. lucunter</i> al día 10, 15 y 20 de exposición.....	53
<b>Figura 16.</b>	Regulación media de Ni en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando de <i>E. lucunter</i> al día 10, 15 y 20 de exposición .....	54
<b>Figura 17.</b>	Regulación media de Zn en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando de <i>E. lucunter</i> al día 10, 15 y 20 de exposición .....	55



## I. RESUMEN

---

En el presente estudio se evaluó la toxicidad de los metales Cd, Ni y Zn, así como la capacidad de acumulación y excreción de éstos, en tres diferentes estructuras del erizo de mar *E. lucunter*. La toxicidad de cada uno de los metales se realizó calculando la  $CL_{50-96h}$  por medio del método Probit; encontrando que en orden de toxicidad Cd resultó ser el metal más tóxico para el organismo seguido de Zn y por último Ni, lo cual concuerda con la función esencial y no esencial de los metales. Por otra parte se ha visto que los invertebrados marinos absorben y acumulan metales traza ya sean esenciales o no, de los cuales todos tienen la potencialidad de causar efectos tóxicos. Los metales acumulados en el tejido o el cuerpo del organismo muestran una gran variabilidad entre los metales y las distintas estructuras. Los niveles de los metales Cd, Ni y Zn fueron determinados en la testa, espinas y tejido blando (entendiéndose por éste, todos los órganos internos: gónadas, intestinos, tracto digestivo) del erizo de mar *E. lucunter*. Las diferencias entre metales y estructuras fueron comparadas. La cinética de absorción y excreción de los metales evaluados en *E. lucunter* expuestos por un periodo de 10 días a una concentración constante del metal en cuestión (Cd,  $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Ni,  $76.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Zn  $1,120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) disueltos en agua marina artificial, fueron evaluados midiendo la concentración de éstos en las estructuras antes mencionadas. La tasa de acumulación que presentó *E. lucunter* para los tres metales no fue la misma. *E. lucunter* tuvo la capacidad de acumular Cd en sus espinas, testa y tejido blando; Ni en su tejido blando y Zn en sus espinas, testa y tejido blando. De las tres estructuras probadas, el tejido blando presentó una mayor capacidad de acumulación de los metales, seguido de la testa y por último las espinas. Por último, los erizos que fueron expuestos a los metales, fueron devueltos a un ambiente libre de contaminantes y se registró la capacidad de excreción en cada una de las estructuras probadas. Durante este bioensayo se demostró que *E. lucunter* tuvo una tasa de excreción diferencial para los tres metales. De la misma manera, los metales fueron excretados de manera diferencial en la testa y el tejido blando; mientras que este último excretó Cd y Ni, la testa mostró este mismo fenómeno con el Zn. Las espinas no tuvieron la capacidad de excretar ninguno de los metales. Por lo que pueden servir como una estructura de monitoreo de contaminación ambiental sin tener que sacrificar al organismo.

Palabras clave: equinodermo, metales, contaminación, acumulación, regulación, toxicidad.



## 1. ABSTRACT

---

The aim of the present study is to evaluate the toxicity of Cd, Ni and Zn, as well as the comparative examination of accumulation and detoxification of the three metals before listed, in bland tissue, spines and test of *Echinometra lucunter*, using atomic absorption spectro-photometry.

The toxicity of each metal was performed calculating the  $CL_{50}$ -96 hrs by Probit method. In order of toxicity, Cd was the most toxic metal to the organism, followed by Zn and finally Ni, related to their essential or not essential function.

The bioaccumulation of three metals (Cd, Ni, Zn) dissolved in artificial sea water was assessed measuring the concentrations recorded in test, spines and soft tissue (understanding for it all the internal organs: gonads, intestine, digestive tract, axial gland) of sea urchin *Echinometra lucunter*. The sea urchins were exposed to a constant metal concentration (Cd,  $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Ni,  $76.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Zn  $1,120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for a period of 10 days.

Subsequent tissue and body concentrations of accumulated trace metals show enormous variability across metals and different structures. Toxicity does not depend on total accumulated metal concentration but is related to a threshold concentration of internal metabolically available metal. Toxicity ensues when the rate of metal uptake from all sources exceeds the combined rates of detoxification or excretion (if present) of the metal concerned.

*E. lucunter* had the ability to accumulate Cd in its spines, test and soft tissue; Ni in its soft tissue and Zn in its spines, test and soft tissue. Of the three structures tested, the soft tissue had a higher accumulation capacity of metals, followed by the test and finally the spines. Finally, the sea urchins who were exposed to metals and were not sacrificed in the bioaccumulation period, were returned to an environment free of contaminants by a period of 10 days more and the excretion capacity in each structure was recorded. During this bioassay was demonstrated that *E. lucunter* was a differential excretion rate by the three metals. In the same way, the metals were excreted in differential ways in test and soft tissue. Soft tissue had the ability to excrete Cd and Ni, the test showed the same pattern with Zn. The spines had not the ability to excrete any of the metals, so it can be use like monitoring structure of environmental pollution without sacrificing the organism.

Key words: echinoderm, metals, pollution, accumulation, detoxification, toxicity.



## 1. INTRODUCCIÓN

---

Los metales conforman uno de los principales agentes de contaminación de las zonas costeras, los cuales no son biodegradables y tienden a acumularse a diferentes niveles en los ecosistemas (Botello *et al.*, 1996).

Se ha calculado que alrededor del 95% de los metales transportados por los ríos son removidos y depositados en las márgenes oceánicas tales como los estuarios, la plataforma y pendientes continentales (Vázquez-Botello *et al.*, 2004).

Las principales fuentes de metales depositados en las aguas del Golfo de México son producto de actividades industriales como las refinerías de petróleo, la producción y la aplicación de fertilizantes y plaguicidas en zonas agrícolas, actividades de minería y metalurgia, el dragado y la perforación de pozos petroleros donde emplean grandes cantidades de lodos de perforación que contienen metales como cromo y bario (Vázquez-Botello *et al.*, 2004). De igual manera, los efluentes domésticos son considerados una fuente importante de metales en las aguas costeras, las partículas sólidas retenidas en las aguas residuales contienen un enriquecimiento de varios metales como Ni, Cu, Ag, Pb, Zn, Cd y Cr, este enriquecimiento se debe a la corrosión que ocurre dentro de la red urbana de suministro de agua (Páez-Osuna, 2005). Así mismo, el empleo de detergentes resulta otra fuente de aporte de metales, ya que se ha encontrado que la mayoría de los detergentes con enzimas contienen cantidades importantes de metales (Fe, Mn, Cr, Co, Zn, Sr y B) (Angino *et al.*, 1970). Los metales también son introducidos en los ambientes marino y costero por el intemperismo o meteorización de las rocas, la degasificación, el vulcanismo terrestre y submarino y por transporte atmosférico (Páez-Osuna, 2005).



Los metales se presentan en diferentes formas en el ambiente acuático y la mayoría de ellos son insolubles en agua a valores de pH neutro o básicos, pero son fácilmente adsorbidos en el material particulado o sedimentos, los cuales son el sitio final de depósito; desde ahí pueden ser asimilados por los organismos bentónicos y debido a esta interacción directa con los sedimentos, éstos pueden reducir drásticamente su potencial de sobrevivencia y en ocasiones propiciar su total desaparición (Vázquez-Botello *et al.*, 2004).

Con base en el requerimiento de metales por los organismos, éstos pueden dividirse en dos categorías; en la primera se ubican los elementos denominados como *metales esenciales*, los cuales participan de forma activa en diferentes procesos metabólicos y son requeridos por los organismos vivos en cantidades traza; sin embargo, altos niveles de estos metales pueden llegar a inducir efectos biológicos adversos (Long *et al.*, 1995). La segunda categoría agrupa a los *metales no esenciales*, es decir, no requeridos para el metabolismo, estos elementos son tóxicos incluso en cantidades muy bajas (Wright y Welbourn, 2001).

Los metales son tomados y acumulados por los invertebrados marinos en su cuerpo y tejidos usualmente en concentraciones mayores que las encontradas en el agua circundante (Dallinger y Rainbow, 2000); éstos ingresan principalmente por tres rutas: i) vía alimento, ii) directamente del agua como sustancias disueltas, o iii) por ingestión de material particulado que contenga metales (Phillips, 1977). En general, el agua y el alimento representan las mejores rutas de la toma de metal por los invertebrados marinos (Dallinger y Rainbow, 2000).

El puerto de Veracruz, Veracruz, uno de los más importantes de México por las actividades comerciales, de tránsito e industriales que ahí se realizan, cuyos desechos en conjunto con los de la zona urbana son vertidos al mar (González de la Parra *et al.*, 1984), trae como



consecuencia problemas de contaminación en la zona marina, los cuales, producen daños considerables a los organismos que ahí habitan (Páez-Osuna *et al.*, 1986). Algunos de los organismos que pueden ser afectados por la contaminación son los que habitan en el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) localizado frente al Puerto de Veracruz.

Dado el nivel de contaminación que se presenta, la cuantificación de metales presentes en los sistemas y en la biota es importante para la salud de los ecosistemas y la salud pública, especialmente en el caso de especies que son comestibles o que pueden ser introducidas al mercado en un futuro (Temara *et al.*, 1996; Warnau *et al.*, 1997).

Actualmente en varios países, los equinodermos y particularmente los erizos y pepinos de mar, son comestibles. La importancia comercial del erizo de mar radica en el aprovechamiento de sus gónadas que se exportan a diversos mercados internacionales; siendo los países asiáticos el principal mercado de este producto. En nuestro país, en el estado de Baja California se explotan comercialmente dos especies de erizo: el rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y el morado *Strongylocentrotus purpuratus* (NOM-FF-112-SCFI-2009). En el noreste de Brasil ha sido documentado por Carneiro y Cerqueira (2008), el uso de las gónadas de *Echinometra lucunter* como fuente de alimento.

Además del valor económico-comercial de los erizos, también tienen una gran importancia ecológica, ya que desempeñan un papel fundamental en la trama trófica. Los erizos de mar controlan las poblaciones de algas al ser importantes consumidores de éstas, lo que lleva por un lado al aumento en la accesibilidad del sustrato para muchos organismos y en algunos otros casos, evita la muerte de la comunidad de corales hermatípicos tan importantes para los arrecifes marinos. Los erizos son organismos clave para el reciclaje de los elementos minerales y su incorporación al ciclo de los nutrientes, degradando la materia orgánica hasta un nivel que puedan ser nuevamente aprovechados por los productores primarios (Lawrence, 1975), así como también su capacidad para modificar las condiciones del sustrato en el que viven (bioturbación).



Los equinodermos son considerados removedores primarios de sedimentos y detritus en el mar, desempeñando un papel importante en el ciclo de los metales (Eisler, 1981). Del Phylum Echinodermata, los erizos de mar han sido uno de los grupos más empleados en los últimos años para investigar la toxicidad de diferentes metales y la calidad de las aguas, a través de estudios de laboratorio relacionados con cambios morfológicos y embriológicos, pero como indicadores de contaminación metálica *in situ*, han sido poco empleados (Ablanado *et al.*, 1990).

Es por todo esto que en el presente trabajo se pretende evaluar las capacidades de acumulación y excreción a ciertos metales en la especie *Echinometra lucunter* como posible organismo bioindicador de contaminación para el Sistema Arrecifal Veracruzano.



## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 Ubicación taxonómica de *E. lucunter*.

Reino **Animalia**

Phylum **Echinodermata** (Klein, 1734)

Clase **Echinoidea** (Leske, 1778)

Orden **Echinoida** (Claus, 1876)

Familia **Echinometridae** (Gray, 1825)

Género **Echinometra** (Gray, 1825)

Especie ***Echinometra lucunter*** (Linnaeus, 1758)



### 2.2 Distribución geográfica de *E. lucunter*.

El erizo rojo *E. lucunter*, es un miembro prolífico de la costa oriental de América; esta especie es común en zonas de rompiente ocupando una amplia diversidad de hábitats como arrecifes coralinos, fondos rocosos, praderas de la fanerógama *Thalassia testudinum*, rocas y arena (Monroy y Solano 2005, Astudillo *et al.* 2005), encontrándose principalmente en ambientes del sublitoral rocoso. Su distribución se extiende desde las costas de Beaufort, Carolina del Norte, las Bermudas, en todo el sur del Mar Caribe, hasta el Atlántico central en Brasil (Hendler *et al.*, 1995) (Figura 1), en México se distribuye en todas las costas del Golfo de México. Puede encontrarse en profundidades desde 1 hasta 45 m (Serafy, 1979).

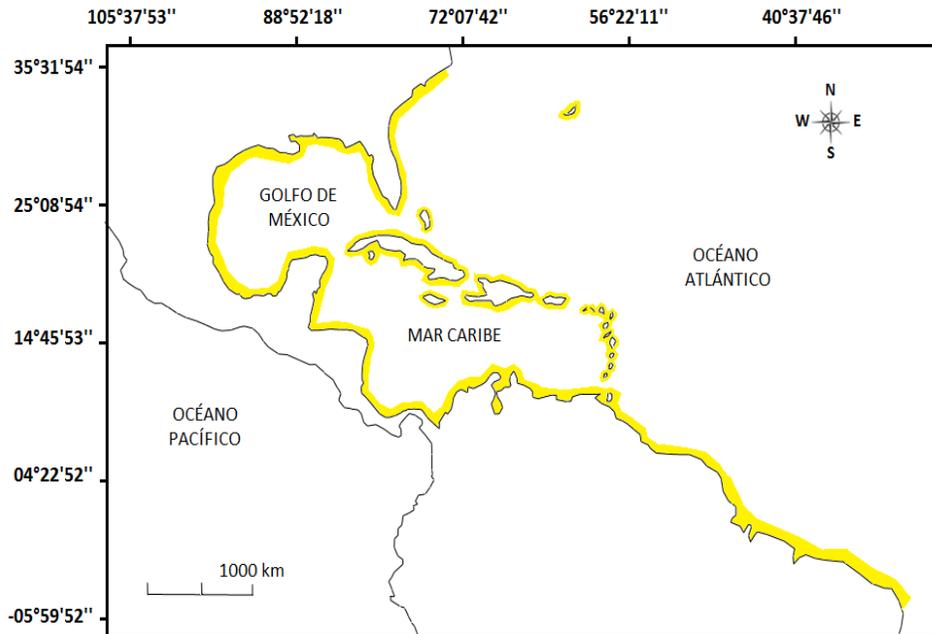
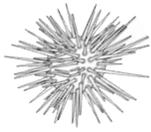


Figura 1. Distribución geográfica del erizo rojo, *E. lucunter*.

### 2.3 Descripción morfológica de *E. lucunter*.

*E. lucunter* es una especie de color muy variable, aunque predomina el pardo rojizo; con testa de origen calcáreo de forma elíptica que en estado adulto puede tener un diámetro de 30 a 64 mm y una longitud del caparazón de 33 a 71 mm. El cuerpo se encuentra cubierto por una media de 100 a 150 espinas. Posee espinas primarias, por lo general más cortas que el diámetro del caparazón, las cuales son robustas, cónicas, algo aplanadas y afiladas, estriadas longitudinalmente y de diversos tamaños; las espinas secundarias son finas, frágiles, con un aspecto semejante a las primarias, pero menores que la cuarta parte de ellas, el color de las espinas es muy variable, las cuales pueden llegar a tener color negruzco, marrón, verduzco, púrpura o rojizo. Las espinas orales suelen ser más claras que el resto de las espinas. Las placas genitales son pequeñas, con grandes aberturas genitales. La placa madreporica excede en mucho a las otras placas genitales. Posee placas



oculares pequeñas. Zonas ambulacrales muy angostas en relación con las interambulacrales, con seis a siete pares de poros dispuestos en arco por encima del ambitus (Caso,1953). Posee cinco dientes ubicados dentro de un aparato de alimentación especializado conocida como Linterna de Aristóteles. (Abbott, *et al.*, 1974; McPherson, 1969)

#### **2.4 Ciclo de vida de *E. lucunter*.**

Después de 24 a 28h de la fertilización, se desarrollan larvas planctónicas denominadas pluteus con cuatro brazos, esta larva es diminuta, libre nadadora, planctónica. Al cuarto día, aparecen los brazos posterodorsales. Al final de su etapa larval el rudimento de lo que es, se convierte en la forma de un erizo adulto dentro de la larva pluteus. Al llegar la metamorfosis, la cual ocurre aproximadamente a los 20 días, la larva se va al fondo y busca un substrato adecuado, ésta comienza a desintegrarse dejando un pequeño y típico erizo de mar, menor a 1mm en tamaño. Al final del primer año, el joven erizo crece varios milímetros en diámetro y puede alcanzar la madurez sexual en dos o tres años, el organismo no deja de crecer en toda su vida (McPherson, 1969).

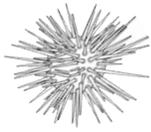
#### **2.5 Problemática de contaminación en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano.**

Las actividades humanas, sin duda, han contribuido al aumento de los niveles de contaminación en el ambiente, tanto terrestre como marino. En el mar este fenómeno es más evidente en áreas costeras, donde se presenta un incremento en la concentración de los metales tanto en agua y sedimentos, como en flora y fauna (Ponce-Vélez y Botello, 2006; Villanueva y Botello, 1992).



Se ha tomado especial interés en el estudio de la contaminación marina para evaluar el impacto que tiene ésta sobre la biota acuática, por lo que se han realizado trabajos donde se evalúa la salud del ambiente a través de la concentración del contaminante en organismos, sedimento y en la columna de agua.

Dentro del Sistema Arrecifal Veracruzano se han realizado diversos trabajos donde se ha evaluado la concentración de metales en diferentes sistemas bentónicos con la finalidad de conocer el nivel o la afectación del sistema arrecifal. Los metales que más han sido estudiados en la zona son: Al, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Fe y Mn, siendo la mayoría de éstos enfocados a los arrecifes más cercanos a la costa como son La Gallega, Hornos, Isla Sacrificios e Isla Verde, suponiendo que estos arrecifes al encontrarse más cercanos a la costa, son los más contaminados. De los estudios efectuados con metales destaca el de los corales como los trabajos hechos por Sánchez-Pérez (1994), quien evaluó los niveles de: Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en el coral pétreo *Madracis decactis* del arrecife de Isla Verde y el de Rivera-Ramírez (2006) quien realizó la determinación de metales traza (Cu, Ni, Pb, V y Fe) en agua de mar y en las especies de corales *Diploria strigosa* y *Copophyllia natans* en el Arrecife de Isla Sacrificios. También se han hecho trabajos con algas y pasto marino, destacando los realizados por Noriega-Escobar (2001), quien evaluó la concentración de los metales Al, Cu, Cd, Ni, Pb y Zn en el pasto marino *Thalassia testudinum* de seis arrecifes (Chopas, Isla Verde, La Gallega, Hornos, Punta Gorda y Punta Mocambo); Acosta-González (2002), efectuó una comparación de la concentración de metales pesados (Al, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) en el alga (*Dictyota guineensis*) en los arrecifes de Isla Verde y la Gallega; Morlán-Cahue (2003), determinó la concentración de algunos metales pesados (Fe, Mn, Pb y Zn) en macroalgas clorofitas en los mismos arrecifes y en otros cuatro más, Anegada de Adentro, Blanquilla, Galleguilla, Hornos, Pájaros y Sacrificios. Estos estudios han servido como marco de referencia respecto a la contaminación que se presenta en esta área, además de ayudar a comparar con trabajos actuales el status de la zona arrecifal.



## 2.6 Fuente de los metales pesados Cd, Zn y Ni.

El cadmio (Cd) es considerado como un elemento no esencial en animales, cuyas propiedades químicas son intermedias entre el zinc y el mercurio; en el mar, el 66% está presente como ion  $Cd^{+2}$  junto con  $CdCO_3$  (26%),  $Cd(OH)_2$  (5%),  $CdCl_2$  (1%) y  $CdSO_4$  (1%) (Whitfield *et al.*, 1981). Las principales fuentes de cadmio en ambientes acuáticos provienen del lavado de los suelos agrícolas y de las descargas de la minería y la industria. Otro origen importante son los desechos municipales y los lodos de las plantas de tratamiento (UNEP, 1985). Su presencia en ambientes marinos disminuye la capacidad de sobrevivencia de larvas y estadios juveniles de peces, moluscos y crustáceos (Förstner y Wittman, 1979).

El zinc (Zn) a diferencia del cadmio es considerado un elemento esencial que en bajas concentraciones es utilizado por el organismo para realizar ciertos procesos metabólicos, además de formar parte integral de ciertas enzimas como la anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa y varias hidrogenasas (Páez-Osuna, 2005), aunque en altas concentraciones puede ser tóxico para el organismo. El Zn junto con el Cd y el Pb son usados en las refinerías de petróleo, en la producción de acero, fertilizantes (Förstner y Wittmann, 1979) y pesticidas (Samyappan *et al.*, 2007); el zinc, también puede encontrarse en cantidades importantes en los detergentes (Angino *et al.*, 1970).

El níquel (Ni), al igual que otros elementos metálicos como el vanadio, cromo y el plomo, se le relaciona con la industria del petróleo, particularmente con los efluentes provenientes de los procesos de refinación de crudos, así como de la industria productora de fertilizantes, de la industria del transporte y fundidoras, por otro lado también es liberado a la atmósfera por plantas que queman petróleo o carbón y por industrias que manufacturan y usan este metal en sus aleaciones o compuestos (Wittman, 1979).



## **2.7 Equinodermos como bioindicadores de contaminación.**

La utilización de organismos para el monitoreo de la contaminación marina se ha hecho necesaria para tener un panorama completo de lo que sucede con los contaminantes al entrar al ambiente marino. En algunas ocasiones el análisis de muestras de agua y sedimento no son suficientes para ver el impacto de los contaminantes en el ambiente, al no ser biodisponibles para la biota marina (den Besten *et al.*, 2001), por lo que es necesario la utilización de organismos que determinen el verdadero impacto que tiene dicho contaminante en el ambiente.

Estos organismos utilizados para monitoreo ambiental reciben el nombre de “bioindicadores”, los cuales se definen como organismos que son utilizados para cuantificar el nivel de disponibilidad de los contaminantes en los ecosistemas y son elegidos por su capacidad de acumular un contaminante sin presentar una respuesta tóxica significativa; además de que son especies que presentan una relación estadística simple entre las concentraciones del contaminante en sus tejidos y la que hay en el ambiente (Beeby, 1999). En equinodermos adultos, la acumulación de Cd y Pb parece ser proporcional a las concentraciones de metales encontradas en el agua circundante, lo que permite considerarlos como bioindicadores de metales del medio ambiente (Crees *et al.*, 1998; Kremling y Streu, 2000; Anderson *et al.*, 2001; Cesar *et al.*, 2004; Deheyn *et al.*, 2005).

La capacidad de respuesta de los bioindicadores varía, dependiendo de muchos factores como son: la edad, talla, estacionalidad, sexo, hábitos alimenticios, duración o tiempo de exposición, respuestas tóxicas e interacciones con otras especies (incluyendo la flora) (Beeby, 2001). Idealmente, las especies elegidas como bioindicadores deben cumplir varios criterios entre los que destacan: ser sedentarios o de baja movilidad, fáciles de identificar y coleccionar, abundantes durante todo el año, de larga duración, resistentes a las



variaciones ambientales de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, también debe considerarse el hecho de que estos organismos se encuentren en poblaciones suficientemente abundantes en el área a evaluar para no alterar o perjudicar a la población, debe ser tolerante a altos niveles de contaminantes, pero acumuladores netos de los contaminantes en cuestión y ser el indicador de un importante grupo funcional o nivel trófico del ecosistema marino (Thebault, 2005).

Varios estudios han sugerido o utilizado a los equinoideos como bioindicadores de contaminación por metales pesados en el medio marino, ejemplos de estos trabajos son los realizados por Warnau *et al.*, (1997) quienes proponen al erizo *Paracentrotus lividus* como bioindicador para Cd; Hernández *et al.*, (2009), proponen al erizo de mar *Diadema antillarum* como un excelente bioindicador de contaminación por metales pesados. Adicionalmente, algunos estudios han demostrado que *Echinometra lucunter* posee la facilidad de acumular metales del ambiente, dado que es una especie que habita en las zonas intermareales, cercanas a la costa, lo que lo expone fácilmente a sitios contaminados o a fuentes contaminantes costeras (Ablanedo *et al.*, 1990).

Por otro lado, se han hecho trabajos acerca de la concentración de metales en erizos de diferentes especies, como el realizado por Radenac *et al.*, (2001), quienes evaluaron la bioacumulación y toxicidad de cuatro metales (Cd, Cu, Pb, Zn) en larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus*, encontrando que hay un alto potencial de acumulación durante las etapas iniciales del desarrollo de estos organismos, esta respuesta se vio reflejada en las anomalías encontradas en las larvas como malformaciones en el esqueleto, el bloqueo en el estadio de gástrula y blástula o hasta la muerte de algunas larvas. Bielmyer *et al.*, (2005), midieron el efecto de metales (Cu, Ag, Ni, Se) en la etapa larval y adulta del erizo de mar *Diadema antillarum*, observando una alta sensibilidad de los adultos y las larvas con estos metales. Por su parte, Warnau *et al.*, (1997), hicieron un estudio en donde analizaron la cinética de absorción y excreción de cadmio en el erizo de mar *Paracentrotus lividus* expuesto a diferentes concentraciones, catalogándolo como un excelente



bioindicador de estos metales. Hernández *et al.*, (2009), evaluaron la acumulación de los metales (Pb y Cd) en el erizo de mar *Diadema antillarum* en Tenerife, Islas Canarias, resaltando que presenta una amplia variación en el contenido de metales dependiendo de la zona de muestreo y tipo de tejido.

Adicional a estos grupos mencionados, se tienen registrados algunos estudios en el SAV referentes a la especie *E. lucunter*, éstos corresponden a Acosta-González *et al.*, (2000), donde se determinaron los niveles de Al, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en el erizo rojo en dos arrecifes, La Gallega e Isla Verde, con el propósito de determinar el grado de contaminación en el área; dos años después, se volvió a realizar la determinación de los mismos metales en sustrato coralino, un alga (*Dyctiota guineensis*) y en el esqueleto, gónadas y tracto digestivo del erizo *E. lucunter* de los mismos arrecifes, encontrando mayores concentraciones de Ni (en coral), Al (en el resto de las muestras) y concentraciones menores de Cd y Cr, concluyendo que el esqueleto de erizo es un buen indicador de metales, en especial para el Pb.

Todo lo expuesto sugiere que los equinodermos pueden ser considerados como excelentes bioindicadores de contaminación ambiental por metales.

## **2.8 Bioindicador, bioacumulador, bioregulador.**

Una vez que un metal traza entra en un organismo, por diferentes vías, éste puede ser acumulado o excretado en diversos grados. La acumulación puede ocurrir como resultado de algunos mecanismos fisiológicos; en el caso de los metales esenciales, el metal es llevado a los tejidos que requieren de él para alguna función metabólica. Por otra parte en el caso de los metales no esenciales, éstos al ser introducidos al organismo no tienen ningún requerimiento metabólico; por lo que es evidente, que tanto los iones metálicos en exceso de los requerimientos metabólicos (en el caso de los metales esenciales) o aquellos que no son requeridos por el organismo (no esenciales), son potencialmente



tóxicos y deben ser removidos del organismo; dando lugar a la excreción por un lado, por otro, a la acumulación (causando daños irreversibles en el organismo) o biotransformación, dando lugar a otras formas del metal dentro del organismo que sean menos tóxicas (Depledge y Rainbow, 1990).

La tasa a la cual ocurre la acumulación en un organismo, no sólo depende de la disponibilidad del contaminante en el ambiente, sino también, de toda la gama de factores ambientales, biológicos y químicos. El nivel máximo al que se llega se rige por la capacidad del organismo para excretar el contaminante o almacenarlo (Bryan, 1979). Dadas estas diferencias de acumulación, excreción, regulación de los metales dentro de los organismos, a continuación se define qué es un organismo bioindicador, bioacumulador y bioregulador:

1. Bioindicador. Es un organismo o parte de un organismo o de una comunidad de organismos que detectan la existencia de condiciones complejas que resultan de un grupo de factores bióticos y abióticos que son difíciles de medir por separado, por lo que contienen información de la calidad de su ambiente (Dauvin *et al.*, 2010).
2. Bioacumulador. Organismo con la capacidad de acumular contaminantes del ambiente (por factores bióticos o abióticos) en sus tejidos o en ciertos tejidos, pero sin la capacidad de excretarlos nuevamente al ambiente (Gray, 2002).
3. Bioregulador. Organismo con la capacidad de acumular contaminantes del ambiente en sus tejidos, para posteriormente excretarlos de su sistema cuando esos contaminantes hayan disminuido o desaparecido del ambiente.

La Figura 2 muestra la respuesta que presentan estos organismos (bioacumulador y bioregulador) frente a la presencia de algún contaminante. Para ser considerado un buen bioindicador, es necesario que el modelo presente, preferentemente, una respuesta de tipo bioacumulador, pues al acumular el metal y llegar a un umbral en donde el organismo



ya no excreta, ni sigue acumulando más, permite registrar lecturas apropiadas de la calidad del sistema. Por otra parte, los bioreguladores deben tratarse con reserva al ocuparse como indicadores de calidad, ya que sin el debido cuidado, pueden dar una idea errónea de la verdadera concentración del contaminante en el ambiente, pues al excretar a los contaminantes se tiende a subestimar la cantidad real de éstos (Bryan, 1979).

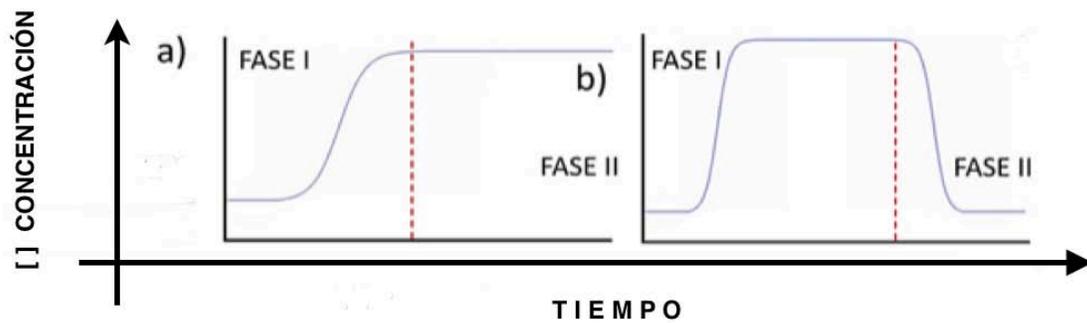


Figura 2. Respuesta dosis-efecto que muestran los organismos. a) bioacumulador y b) bioregulador. FASE I. Fase de exposición al contaminante. FASE II. Fase de no exposición al contaminante. La línea punteada indica donde terminan e inician las fases.



### 3. JUSTIFICACIÓN

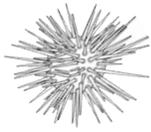
---

En el presente estudio se decidió trabajar con el erizo de mar *Echinometra lucunter* dado que cumple con la mayoría de los requisitos para ser un buen organismo indicador de contaminación, además de mostrar ser un organismo capaz de acumular niveles detectables de metales en sus tejidos; por ello se propone estudiar en condiciones de laboratorio, la capacidad de *E. lucunter* de regular el Cd, Zn y Ni para determinar su posible utilización como bioindicador de contaminación costera.

### 4. HIPÓTESIS

---

Si el erizo de mar *E. lucunter* tiene la capacidad de acumular metales del medio ambiente en sus tejidos, entonces sus espinas pueden servir como tejido blanco para monitoreo de contaminantes por lo que es posible que tenga la capacidad de regular metales esenciales como el zinc y el níquel y acumular no esenciales como el cadmio.



## 5. OBJETIVOS

---

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar en *Echinometra lucunter* la capacidad reguladora de metales como criterio para determinar su potencialidad como bioindicador de contaminación costera y determinar su sensibilidad a la exposición a metales, en particular Cd, Ni y Zn.

### 5.2 Objetivos particulares

- Precisar la CL<sub>50</sub>-96 horas para cada uno de los metales de manera individual en *E. lucunter*.
- Comparar la concentración detectada en la especie *E. lucunter* por exposición a Cd, Ni y Zn, con los valores establecidos en las normas nacionales existentes (NOM) y/o internacionales y con valores reales reportados para el Golfo de México.
- Determinar la acumulación de Zn, Ni y Cd en el tejido interno, espinas y testa de *E. lucunter*.
- Determinar la capacidad que tiene *E. lucunter* como regulador del Zn, Ni y Cd en las mismas estructuras.



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Área de recolecta.

La recolecta de erizos se realizó dentro del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) ubicado en la plataforma continental del estado de Veracruz, México, entre los límites geográficos 19°02'16.8" y 19°15'32.4" N; 95°46'55.2" y 96°11'45.6" W. El PNSAV es un área marina que comprende 23 arrecifes de diferentes tamaños, formas y profundidades, distribuidos en dos grandes grupos separados por la desembocadura del río Jamapa, que en su conjunto cubren un área aproximada de 52,238 ha (Winfield *et al.*, 2010). Después de los arrecifes del Caribe mexicano, esta área natural protegida constituye el segundo complejo arrecifal más importante en la Zona Económica Exclusiva del territorio nacional (Veron, 1995) (Figura 3).

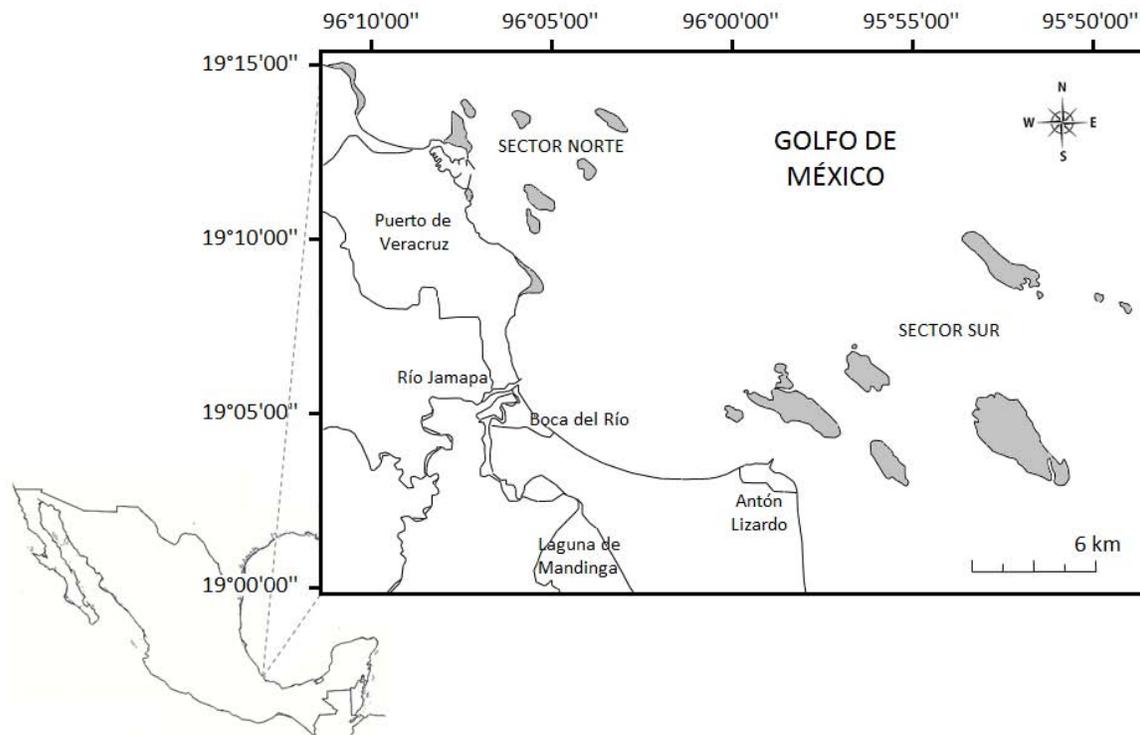


Figura 3. Ubicación geográfica del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, Veracruz, México. Las áreas grises representan los bancos arrecifales.



### 6.1.1 Recolecta de organismos.

En el periodo comprendido entre los meses de marzo a octubre de 2011, se recolectaron un total de 850 organismos del erizo de mar *E. lucunter*, en la zona intermareal del PNSAV entre las coordenadas 19°02'16.8" y 19°15'32.4"N; y 95°46'55.2" y 96°11'45.6"W del polígono trazado para el muestreo (Figura 4). Se realizaron cuatro muestreos, en cada uno se recolectaron aproximadamente 212-213 organismos de *E. lucunter* hasta alcanzar un total de 850 organismos, se recolectaron organismos adultos, tratando de elegir organismos mas o menos de la misma talla para tener una muestra homogénea. La recolecta contó con el permiso de pesca con número DGOPA.03037.090511.1273, otorgado por la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA).

Los organismos se desprendieron suavemente del sustrato rocoso, tratando de no lastimarlos, mediante el uso de guantes de carnaza y con una espátula de plástico. Para su transporte se colocaron en un contenedor plástico (Rotoplas con capacidad de 1000 L) previamente llenado con agua de mar del lugar, a temperatura ambiente y oxigenación continua (bombas portátiles AVANT®, código 10790).

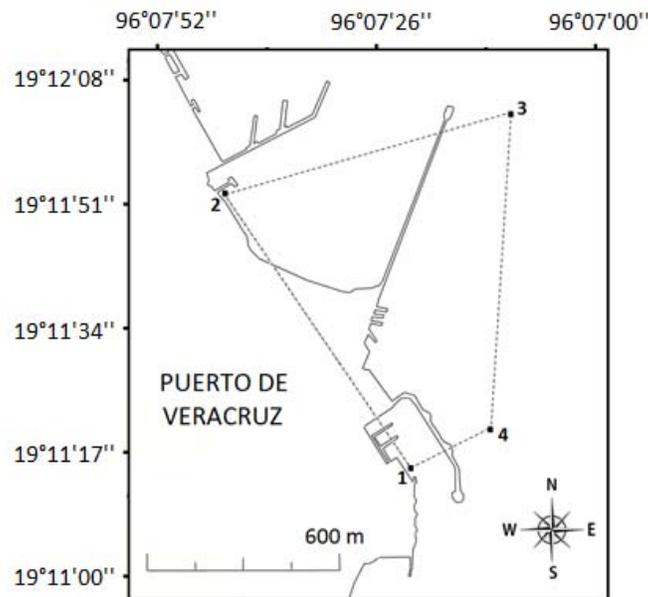


Figura 4. Mapa de ubicación de la zona de recolección del erizo *E. lucunter*. Coordenadas Polígono Muestras Erizos, (1) 19° 11' 16.98" N 96° 07' 22" W (2) 19° 11' 51.28" N 96° 07' 45.02" W (3) 19° 11' 0.71" N 96° 07' 9.23" W (4) 19° 11' 21.39" N 96° 07' 13.31" W



### **6.1.2 Traslado de los organismos.**

Los organismos fueron transportados vía terrestre realizando recambio de agua marina obtenida de la zona de recolección (cuando fuese necesario), con objeto de garantizar una adecuada oxigenación durante su traslado a la Estación “El Carmen” del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, en Ciudad del Carmen, Campeche.

El total de organismos recolectados se dividieron en tres grupos, 1) para el estudio de tolerancia (450 organismos), 2) acumulación (120 organismos), 3) regulación (240 organismos) y se reservaron 40 organismos más para el margen de mortandad.

## **6.2 Etapas previas a la realización de los bioensayos.**

Previo a la realización de los bioensayos, se llevaron a cabo distintas pruebas, que determinaron la igualdad de condiciones en el medio y en los lotes de organismos a experimentar, para evitar la variabilidad de los resultados que pudiera deberse a diferencias en las condiciones de los bioensayos. Dichas pruebas se describen a continuación.

### **6.2.1 Aclimatación de organismos.**

Los organismos estuvieron sujetos a un periodo de aclimatación de dos semanas en las condiciones de laboratorio (33 ups, pH 8, luminosidad natural y a 28°C), en estanques con capacidad de 2000 a 2500 litros (Figura 5) y fueron alimentados con alga marina *Porphyra* spp. (nori-sushi marca KAPORO®).

Durante el periodo de aclimatación, se llevó a cabo el monitoreo de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, salinidad, concentración de oxígeno disuelto, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>) con ayuda de un fotómetro multi-parámetro (marca HANNA C99); se midió con la



finalidad de establecer las condiciones de calidad del agua para organismos de esta especie; así mismo, también fueron monitoreados los mismos parámetros durante la fase experimental para verificar que los organismos se encontraran con buena calidad del agua durante los bioensayos.



Figura 5. Vistas del estanque de aclimatación y mantenimiento de organismos.

### **6.2.2 Pruebas de calidad de los lotes.**

Una vez concluido el periodo de aclimatación, a los organismos se les hizo una prueba de calidad (prueba de salud), tomando tres parámetros a) presencia/vigor/ausencia de movimiento de espinas en el momento de sacarlos del agua, b) tiempo transcurrido en recorrer 4 cm de distancia y c) peso de los organismos.

La presencia, ausencia y vigor de movimiento de las espinas, así como la velocidad de desplazamiento de los organismos son parámetros que fueron considerados debido a que, como se observó anteriormente en la mayoría de los organismos que se encuentran enfermos, pierden movilidad de las espinas, en casi todos los casos éstas se encuentran dirigidas hacia abajo, es decir, en dirección al sustrato y también dejan de desplazarse, quedándose en un solo lugar en donde poco a poco van perdiendo las espinas.



Las pruebas fueron realizadas con la finalidad de ver qué tan saludables se encontraban los organismos durante el periodo de aclimatación y antes de la realización de cada uno de los bioensayos.

### **6.3 Desarrollo de bioensayos.**

#### **6.3.1 1<sup>er</sup> Bioensayo. Determinación de la CL<sub>50</sub>-96h de los metales Cd, Ni y Zn en el erizo de mar *E. lucunter*.**

Los organismos fueron expuestos a una serie gradual de concentraciones nominales (ver Anexo I) de sales de Cd, Zn y Ni disueltas en agua marina artificial (Instant Ocean<sup>®</sup>). Las sales fueron: Cd (Aldrich-grado analítico: Núm. De Cat. Cd: 10008-1), Zn (ZnCl<sub>2</sub>; J.T. Baker, Lote J09476. Cod. 4322-01), Ni (NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; J.T. Baker, Lote E46613. Cod. 2768-04). Los organismos fueron expuestos por separado a las diferentes concentraciones de cada metal, por un periodo máximo de cuatro días. En todos los experimentos se utilizó agua marina artificial (Instant Ocean<sup>®</sup>) como medio reproducible, de acuerdo con el método propuesto por Núñez-Nogueira y Rainbow (2005a,b).

Los medios de exposición experimental fueron colocados en tinas de fibra de vidrio con oxigenación constante y sin recambio de agua; el volumen total colocado en cada medio de exposición fue de 10 L. En cada tina se colocaron cuatro organismos (Figura 6) los cuales no fueron alimentados durante los cuatro días del bioensayo. Muertes, pérdida de espinas o cualquier cambio conductual, fue registrado diariamente durante los experimentos.

Se tomaron muestras de agua de cada una de las concentraciones para cada metal, al principio y al finalizar del bioensayo, con la finalidad de hacer análisis posteriores y conocer las concentraciones reales a las que estuvieron sometidos los organismos. Cada prueba fue llevada a cabo por duplicado.



La prueba de toxicidad para determinar la  $CL_{50}$  se realizó acorde con la metodología propuesta por Wu y Chen, (2004) y la determinación matemática por el método Probit.

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) nos permitió comparar y clasificar la toxicidad entre los diferentes metales probados y determinar las concentraciones subletales a emplear en el siguiente bioensayo de acumulación.



Figura 6. Montaje del sistema para bioensayo de  $CL_{50}$ .

### 6.3.2 2<sup>do</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de *E. lucunter* para acumular metales Cd, Ni y Zn.

Los organismos fueron expuestos durante 10 días a las siguientes concentraciones subletales: Cd ( $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Ni ( $76.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y Zn ( $1120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Se colocaron 15 organismos en cada tina por grupo de prueba (control y experimental) (Figura 7). Cada dos días se hizo recambio de agua, colocando nuevamente en el sistema la concentración de metal inicial. Durante el recambio fueron tomadas muestras de agua para análisis químicos y se alimentaron a los organismos con alga marina *Porphyra* spp., la alimentación se llevó a cabo cinco horas antes de hacer el recambio de agua.



Se sacrificaron tres organismos iniciales, tres al quinto día y tres al décimo. Cada bioensayo de acumulación de cada uno de los metales se realizó por duplicado. Los organismos sacrificados fueron colocados en bolsas plásticas, perfectamente etiquetadas y posteriormente se mantuvieron en congelación para su ulterior tratamiento.



Figura 7. Montaje del sistema para bioensayo de acumulación.

### 6.3.3 3<sup>er</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de *E. lucunter* de regular los metales Cd, Ni y Zn.

El último de los bioensayos fue realizado para evaluar la capacidad de excreción de *E. lucunter* a ciertos metales. Los organismos que no fueron sacrificados y que estuvieron expuestos a la concentración de cada uno de los metales durante 10 días, fueron trasladados a otras tinas libres de éstos, en donde estuvieron 10 días más. Cada cinco días fueron sacrificados tres organismos para corroborar si hubo eliminación corporal del metal. Al igual que el bioensayo anterior, los organismos sacrificados fueron colocados en una bolsa plástica y después se introdujeron al congelador para ser procesados posteriormente. Así mismo, también fueron tomadas muestras de agua para análisis de los niveles de metales presentes.

El siguiente esquema resume la manera en que se llevaron a cabo los bioensayos de acumulación y regulación (Figura 8).

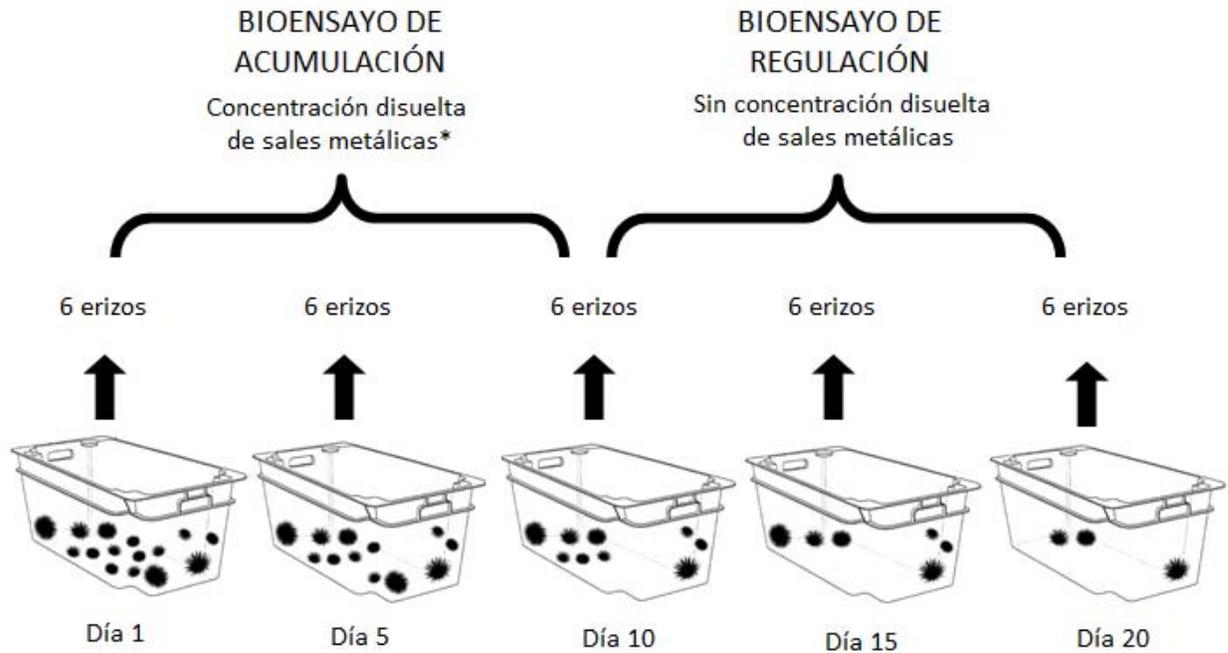


Figura 8. En el esquema se ejemplifican los bioensayos de acumulación y regulación. \* La concentración de las sales metálicas en los bioensayos de acumulación fueron: Zn  $1,120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , Ni  $76.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y Cd  $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 6.4 Procesamiento de las muestras de organismos.

Los organismos procedentes de cada tiempo del proceso de acumulación y regulación fueron descongelados a temperatura ambiente; así mismo, se tomaron datos morfométricos de cada uno de ellos con ayuda de un vernier. A cada ejemplar se le midieron los siguientes caracteres: a) altura de la testa, b) diámetro del mismo, c) longitud total de la espina más larga y d) diámetro del peristoma; estas medidas fueron tomadas con la finalidad de que los erizos utilizados en todos los bioensayos formaran un grupo con características homogéneas y de esa manera evitar la variación de los resultados, debido al desarrollo ontogenético de los individuos y poder hacer un mejor análisis de éstos. Posteriormente se procedió a disectarlos, removiendo espinas, testa y tejido blando.



Las muestras de testa y espinas fueron colocadas en cajas de Petri, el tejido blando se colocó en un tubo de ensayo; posteriormente todas las muestras fueron deshidratadas con la ayuda de una incubadora microbiológica (marca Binder BD 115) a 80°C por un tiempo de 48 h. Una vez secas las muestras, espinas y testa fueron maceradas y tamizadas por medio de un tamiz con malla plástica de 1mm de luz.

Todas las muestras fueron almacenadas para su posterior análisis químico.

#### **6.4.1 Digestión de espinas y testa.**

Las muestras de espina y testa fueron procesadas por el método de digestión en frío; para ello, se pesó 0.5 g de cada muestra y se colocó en un tubo de ensayo, añadiendo 4 ml de HNO<sub>3</sub> redestilado dejándose reposar por un lapso de 24 h. Una vez terminada la digestión, se comprobó que el digesto fuera claro y no se observaran partículas suspendidas. El digesto se vació en un tubo previamente tarado y se aforó en peso en una balanza analítica a un peso aproximado de 10 g con agua desionizada. Se registró el peso. Se agitaron los tubos en vórtex para homogenizar bien la muestra. Se tomó la muestra digerida con jeringa y se pasó por un filtro de 0.22 µm. Las muestras se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta el momento del análisis del metal de interés.

#### **6.4.2 Digestión del tejido blando.**

La digestión se llevó a cabo en un digestor (baño seco) (marca Thermolyne No. DB104325) utilizando ácido nítrico concentrado ultrapuro (J.T Baker ULTREX II, Núm. Reg. 6901-05). A cada muestra se le vertió una cantidad de 1 a 3 ml de ácido, dependiendo del peso seco de la muestra; por debajo de 250 mg se adicionó 1 ml de ácido y por arriba de 250 mg se adicionaron 3 ml en cada tubo.



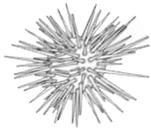
Las muestras fueron calentadas a una temperatura de 80°C durante 6 horas, aproximadamente, para asegurar una total digestión. Posteriormente el digesto fue filtrado con papel filtro (marca Whatman 55 mmØ No. cat. 1442055) y aforado en matraces volumétricos de 5 ml de volumen. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en frascos plásticos perfectamente etiquetados y mantenidos en refrigeración para su posterior análisis.

#### **6.4.3 Análisis de los metales.**

Las muestras fueron analizadas por el método de flama en un espectrofotómetro de Absorción Atómica (AAAnalyst 800 marca Perkin Elmer) por el método de flama. En todos los casos se utilizaron lámparas de cátodo hueco, específicas para la determinación de cada metal evaluado (Zn, Ni y Cd). Se corrieron blancos de reactivos para realizar las correcciones necesarias. Para cada uno de los metales se realizó una curva de calibración, usando soluciones estándar a partir de una solución patrón de 1000 mg·L<sup>-1</sup> de cada metal (Anexo II); posteriormente se realizaron lecturas de absorbancia. La confiabilidad de la metodología se comprobó mediante el empleo de material de referencia, hepatopáncreas de langosta (TORT-2 National Research Council Canada) para el tejido blando y el estándar de hueso (Bone Ash SRM-1400 National Institute of Standards and Technology) para las espinas y testa. Los resultados se reportan en mg/kg de peso seco de la muestra.

#### **6.4.4 Cuantificación de metales.**

La cuantificación de metales, realizada por absorción atómica por el método de flama, se expresa en mg/kg y para ello se utilizaron los siguientes cálculos:



$$\frac{mg}{kg} \text{ de metal} = \frac{((A - B) * F * D)}{G}$$

Donde:

A= lectura en  $mg \cdot L^{-1}$  del equipo

B= lectura promedio de los blancos

F= aforo

D= factor de dilución

G= peso seco de tejido en gramos

## 6.5 Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar que se cumplan los supuestos de normalidad, en los casos donde no se cumple este supuesto, se transformaron los valores con logaritmo base diez, para de esta manera ser tratados por medio de pruebas paramétricas.

Se realizaron pruebas de *t-student* para comparar los valores obtenidos de la cuantificación de los metales de las muestras de erizos pertenecientes a los lotes blanco y experimental. Por otra parte, para analizar la cinética de acumulación y excreción de metales se utilizaron pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA), con una confianza del 95%, conjuntamente con pruebas de contrastes de *Tuckey*. De la misma manera, para contrastar los resultados de acumulación y excreción de los metales en las tres estructuras probadas: espinas, testa y tejido blando; se utilizaron Análisis de Varianza con pruebas de *Tuckey* como pruebas de contraste.

Las distintas pruebas estadísticas utilizadas en esta tesis, se realizaron mediante el paquete estadístico especializado R.



## 7. RESULTADOS

---

### 7.1 Pruebas previas a la realización de los bioensayos.

A continuación se muestran los resultados de las pruebas, sobre calidad del agua, calidad y homogeneidad de los lotes de organismos, que se realizaron antes de llevar a cabo los bioensayos de este estudio.

#### 7.1.1 Calidad del agua.

Durante el mantenimiento-aclimatación de los organismos de *E. lucunter* las condiciones de calidad del agua observada fueron las que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones hidrológicas observadas durante el mantenimiento en estanques de erizos de la especie *E. lucunter*.

Parámetro fisicoquímico	Intervalos
pH	8.1 – 8.4
Temperatura	24 – 27
Salinidad	30 - 35 ups
Oxígeno disuelto	4.3 – 4.7 mg/L
NO <sub>2</sub>	1 – 6 mg/L
NO <sub>3</sub>	2.1 – 4.0 mg/L
NH <sub>4</sub>	0.30 – 0.88 mg/L

Así mismo en la Tabla 2 se presentan los intervalos de los parámetros de calidad del agua, medidos en el transcurso de los bioensayos.



Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos monitoreados al inicio y antes de cada recambio de agua marina artificial durante los bioensayos con *E. lucunter*.

Parámetro fisicoquímico	Intervalos
pH	8.3 – 8.5
Temperatura	28.3 – 28.8
Salinidad	33 ups
Oxígeno disuelto	4.0 – 5.1 mg/L
NO <sub>2</sub>	0.0 – 0.19 mg/L
NO <sub>3</sub>	0.0 – 3.4 mg/L
NH <sub>4</sub>	<b>1.25 - 2.49 mg/L</b>

Como se puede observar en la Tabla 2, la concentración de amonio resultó elevada durante los bioensayos, a diferencia de las concentraciones medidas en el agua de los estanques durante la aclimatación de los organismos, esto se debió a que durante los bioensayos no se colocaron sistemas de filtración, por lo que se realizaron recambios de agua cada dos días y de esta manera se aseguró que las concentraciones de amonio no aumentaran a concentraciones mayores, que pudieran generar algún efecto adverso y perjudicar la salud de los organismos.

### 7.1.2 Pruebas de calidad de los lotes.

Antes de iniciar cada una de las pruebas anteriormente descritas, fue importante verificar si los erizos se encontraban en condiciones óptimas de salud, por lo que se realizaron diferentes pruebas para verificar lo anterior; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.



Tabla 3. Promedios  $\pm$  DE de peso y velocidad promedio de los organismos de *E. lucunter* que fueron sometidos a bioensayos.

Variable	Lote A	Lote A <sub>1</sub>	Lote A <sub>2</sub>	Lote A <sub>3</sub>	Lote B	Lote B <sub>1</sub>
<b>Peso (g)</b>	24.95 $\pm$ 12.58	22.98 $\pm$ 6.07	22.93 $\pm$ 6.32	23.74 $\pm$ 4.65	27.03 $\pm$ 4.97	23.33 $\pm$ 6.34
<b>Velocidad (cm/s)</b>	0.119 $\pm$ 0.03	0.137 $\pm$ 0.05	0.093 $\pm$ 0.03	0.094 $\pm$ 0.01	0.125 $\pm$ 0.05	0.088 $\pm$ 0.03

**Lote A.** Organismos recién llegados de la zona de recolección. **Lote A<sub>1</sub>.** Previo a CL<sub>50</sub> Ni. **Lote A<sub>2</sub>.** Previo a CL<sub>50</sub> Zn. **Lote A<sub>3</sub>.** Previo a CL<sub>50</sub> Cd. **Lote B.** Organismos recién llegados de la zona de recolección. **Lote B<sub>1</sub>.** Previo a bioensayo acumulación y regulación.

De acuerdo al análisis estadístico, la comparación entre los pesos promedio de los dos lotes correspondientes a las dos recolectas hechas, de acuerdo al análisis estadístico, no encontró diferencias significativas entre ambos lotes ( $t_{0.05,2}=0.74$ ;  $P>0.05$ ), por lo que el grupo de organismos con los que se realizaron todas las pruebas mostró ser un grupo de peso homogéneo.

En el caso de la velocidad, los organismos en general mostraron una rápida respuesta, recorriendo 4 cm de distancia en poco tiempo. Los análisis estadísticos no mostraron diferencia significativa ( $t_{0.05,2}=1.84$ ;  $P>0.05$ ) entre ambos lotes, lo cual sugiere que los organismos, respecto a este parámetro medido, se encontraban sanos y realizando movimientos rápidos.

Otro de los parámetros que se tomó en cuenta para considerar la salud de los organismos fue el movimiento de las espinas, en la Tabla 4 se muestra el comportamiento de los organismos respecto a este parámetro.



Tabla 4. Porcentaje de organismos de *E. lucunter* que presentaron movimiento de espinas al ser extraídos del agua.

	Presencia de movimiento en espinas (%)	Movimiento rápido (%)	Movimiento lento (%)
Lote A	80	60	20
Lote A <sub>1</sub>	100	100	—
Lote A <sub>2</sub>	100	90	10
Lote A <sub>3</sub>	100	90	10
Lote B	100	80	20
Lote B <sub>1</sub>	90	70	20

Como se mencionó con anterioridad, la presencia, ausencia y vigor de movimiento de las espinas fue un parámetro considerado para verificar la salud de los erizos, y como se puede observar en la Tabla 4, la mayoría de los organismos presentaron movilidad de éstas y con un rápido movimiento, lo cual resulta un buen indicador externo de la salud de éstos.

### 7.1.3 Prueba de homogeneidad de los lotes de organismos.

Como se mencionó en la metodología, a cada ejemplar se le midieron diferentes caracteres morfométricos para ver si cada grupo de organismos que fueron sometidos a los diferentes bioensayos conformaban una muestra homogénea y de esta manera poder hacer un mejor análisis de los resultados; los datos obtenidos en el bioensayo de Zn se muestran en la Tabla 5.



Tabla 5. Promedio  $\pm$  D.E de los caracteres biométricos medidos a cada organismo de *E. lucunter* que fue sometido al bioensayo de Zn.

Grupo	Peso (g)	Altura (cm)	Diámetro (cm)	L.T. Espina (cm)	Peristoma (cm)
<b>Control</b>	<b>22.04 <math>\pm</math> 5.33</b>	<b>1.74 <math>\pm</math> 0.20</b>	<b>3.24 <math>\pm</math> 0.31</b>	<b>3.39 <math>\pm</math> 0.20</b>	<b>1.60 <math>\pm</math> 0.13</b>
<b>R Control</b>	<b>27.33 <math>\pm</math> 8.88</b>	<b>1.97 <math>\pm</math> 0.27</b>	<b>3.57 <math>\pm</math> 0.51</b>	<b>3.60 <math>\pm</math> 0.23</b>	<b>1.72 <math>\pm</math> 0.21</b>
<b>Zn</b>	<b>26.10 <math>\pm</math> 10.13</b>	<b>1.81 <math>\pm</math> 0.28</b>	<b>3.53 <math>\pm</math> 0.46</b>	<b>3.52 <math>\pm</math> 0.47</b>	<b>1.71 <math>\pm</math> 0.16</b>
<b>R Zn</b>	<b>23.47 <math>\pm</math> 5.87</b>	<b>1.81 <math>\pm</math> 0.22</b>	<b>3.43 <math>\pm</math> 0.35</b>	<b>3.39 <math>\pm</math> 0.24</b>	<b>1.69 <math>\pm</math> 0.13</b>

R= Réplica L.T. Espina= Longitud total de la espina más larga

Se realizó una comparación entre los promedios de los diferentes caracteres medidos a cada uno de los grupos anteriores (Tabla 5), de acuerdo al análisis estadístico de Wilks, no se encontró diferencias significativas entre ellos ( $p=0.23$ ;  $p>0.05$ ) (Tabla 5.1), por lo que el grupo de organismos con los que se realizó el bioensayo correspondiente al Zn, mostró ser un grupo homogéneo, relacionado con los caracteres medidos.

Tabla 5.1 Prueba de contraste de igualdad de medias.						
	Prueba	Valor	F	Efecto	Error	p
<b>Grupo</b>	Wilks	0.710075	1.267	15	143.9505	0.230320

Tabla 6. Promedio  $\pm$  D.E de los caracteres biométricos medidos a cada organismo de *E. lucunter* que fue sometido al bioensayo de Ni.

Grupo	Peso (g)	Altura (cm)	Diámetro (cm)	L.T. Espina (cm)	Peristoma (cm)
<b>Control</b>	<b>23.85 <math>\pm</math> 6.57</b>	<b>1.77 <math>\pm</math> 0.25</b>	<b>3.41 <math>\pm</math> 0.40</b>	<b>3.31 <math>\pm</math> 0.36</b>	<b>1.69 <math>\pm</math> 0.16</b>
<b>R Control</b>	<b>28.50 <math>\pm</math> 10.21</b>	<b>1.76 <math>\pm</math> 0.34</b>	<b>3.50 <math>\pm</math> 0.60</b>	<b>3.46 <math>\pm</math> 0.35</b>	<b>1.72 <math>\pm</math> 0.20</b>
<b>Ni</b>	<b>31.58 <math>\pm</math> 9.96</b>	<b>1.86 <math>\pm</math> 0.32</b>	<b>3.66 <math>\pm</math> 0.56</b>	<b>3.37 <math>\pm</math> 0.21</b>	<b>1.81 <math>\pm</math> 0.24</b>
<b>R Ni</b>	<b>35.65 <math>\pm</math> 17.17</b>	<b>1.95 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>3.65 <math>\pm</math> 0.83</b>	<b>3.59 <math>\pm</math> 0.47</b>	<b>1.77 <math>\pm</math> 0.26</b>

R= Réplica L.T. Espina= Longitud total de la espina más larga



La comparación entre los promedios de los diferentes caracteres medidos a cada uno de los grupos anteriores (Tabla 6), de acuerdo al análisis estadístico de Wilks, no encontró diferencias significativas entre ellos ( $p=0.055$ ;  $p>0.05$ ) (Tabla 6.1), por lo que el grupo de organismos en general con los que se realizó el bioensayo correspondiente al Ni mostró también ser un grupo homogéneo.

Tabla 6.1 Prueba de contraste de igualdad de medias

	Prueba	Valor	F	Efecto	Error	p
<b>Grupo</b>	Wilks	0.636578	1.706	15	143.9505	0.055723

Tabla 7. Promedio  $\pm$  D.E de los caracteres biométricos medidos a cada organismo de *E. lucunter* que fue sometido al bioensayo de Cd.

Grupo	Peso (g)	Altura (cm)	Diámetro (cm)	L.T. Espina (cm)	Peristoma (cm)
<b>Control</b>	<b>25.59 <math>\pm</math> 7.53</b>	<b>1.72 <math>\pm</math> 0.33</b>	<b>3.48 <math>\pm</math> 0.36</b>	<b>3.50 <math>\pm</math> 0.27</b>	<b>1.67 <math>\pm</math> 0.14</b>
<b>R Control</b>	<b>25.60 <math>\pm</math> 7.52</b>	<b>1.65 <math>\pm</math> 0.22</b>	<b>3.38 <math>\pm</math> 0.34</b>	<b>3.51 <math>\pm</math> 0.36</b>	<b>1.66 <math>\pm</math> 0.16</b>
<b>Cd</b>	<b>33.75 <math>\pm</math> 9.34</b>	<b>2.00 <math>\pm</math> 0.22</b>	<b>3.85 <math>\pm</math> 0.40</b>	<b>3.50 <math>\pm</math> 0.23</b>	<b>1.85 <math>\pm</math> 0.15</b>
<b>R Cd</b>	<b>30.51 <math>\pm</math> 9.50</b>	<b>1.98 <math>\pm</math> 0.30</b>	<b>3.72 <math>\pm</math> 0.47</b>	<b>3.44 <math>\pm</math> 0.25</b>	<b>1.77 <math>\pm</math> 0.20</b>

R= Réplica L.T. Espina= Longitud total de la espina más larga

En el caso de los organismos utilizados para la prueba de Cd (Tabla 7), los análisis estadísticos de Wilks no mostraron diferencia significativa ( $p=0.071$ ;  $p>0.05$ ) (Tabla 7.1), lo cual sugiere que los organismos, respecto a los caracteres medidos, presentan ser un grupo homogéneo.

Tabla 7.1 Prueba de contraste de igualdad de medias

	Prueba	Valor	F	Efecto	Error	p
<b>Grupo</b>	Wilks	0.647662	1.635	15	143.9505	0.071262



## 7.2 1<sup>er</sup> Bioensayo. Determinación de la CL<sub>50</sub>-96h como criterio de tolerancia de *E. lucunter* a los metales Cd, Ni y Zn.

Dado que no se encontró información bibliográfica disponible que indicara la CL<sub>50</sub> de cada uno de los metales, Zn, Ni y Cd, para la especie *E. lucunter*, se realizaron pruebas de toxicidad con diferentes concentraciones de los metales para determinarla. Para Cd, Ni y Zn disueltos la CL<sub>50</sub> fue calculada por medio del método Probit (Stephan, 1977), el cual permitió establecer el valor estimado y el correspondiente intervalo de confianza (95%).

### 7.2.1 Determinación de la CL<sub>50</sub>-96h del Cd.

La Figura 9 muestra la curva dosis-efecto para las distintas concentraciones de Cd calculada por el método Probit. El efecto medido fue el porcentaje de mortandad asociada a cada una de las concentraciones. La figura se construyó graficando en el eje de las ordenadas el porcentaje de mortalidad y en las abscisas, el logaritmo de la dosis suministrada. De acuerdo a estos resultados, la CL<sub>50</sub> para el Cd se calculó en 2 mg·L<sup>-1</sup> con los límites del 95% entre 1.90 – 2.08 mg·L<sup>-1</sup>.

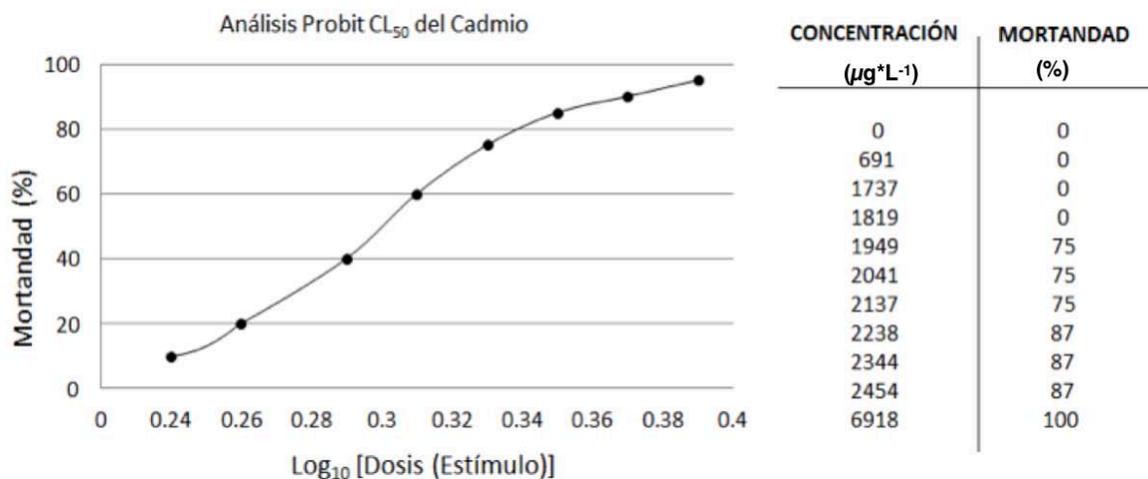


Figura 9. Curva dosis-efecto para las concentraciones de Cd.



### 7.2.2 Determinación de la CL<sub>50</sub>-96h del Ni.

La curva dosis-efecto de Níquel (Figura 10), permite calcular una CL<sub>50</sub> para este metal de 25.93 mg·L<sup>-1</sup>, con límites ubicados de 24.90–27.06 mg·L<sup>-1</sup>. Como cabría esperar, la relación dosis-respuesta se ajusta bien a una forma sigmoide.

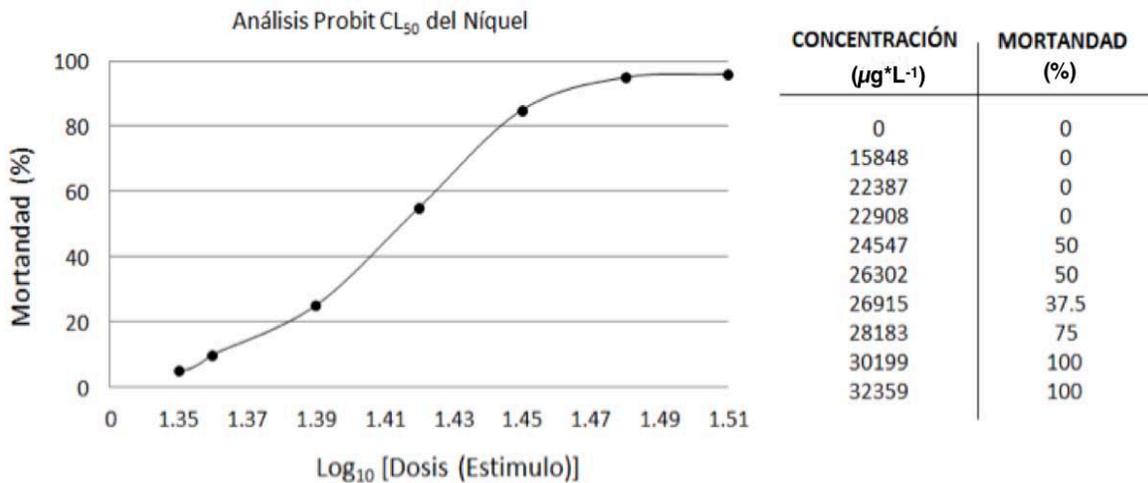


Figura 10. Curva dosis-efecto para las concentraciones de Ni.

### 7.2.3 Determinación de la CL<sub>50</sub>-96h del Zn.

De acuerdo a la Figura 11, donde se muestra la curva para el Zinc, la CL<sub>50</sub> tuvo un valor de 2.75 mg·L<sup>-1</sup>, con límites ubicados de 2.46–3.12 mg·L<sup>-1</sup>. De la misma manera que los otros metales, este gráfico se ajustó a una forma sigmoide, típica de las relaciones bivariadas dosis-efecto.

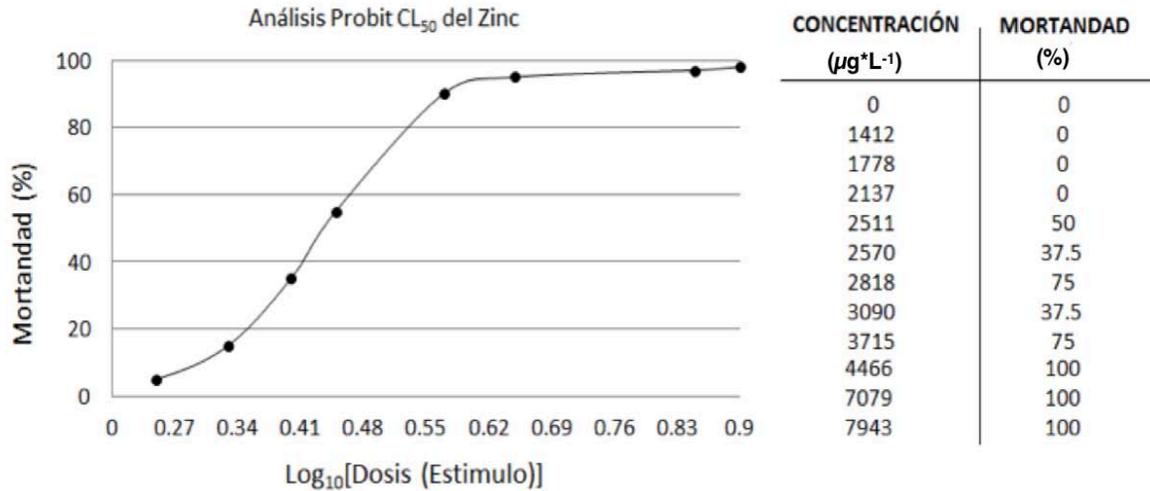


Figura 11. Curva dosis-efecto para las concentraciones de Zn.

#### 7.2.4 Comparación de la CL<sub>50</sub>-96h del Cd, Ni y Zn.

Al comparar los valores obtenidos de la CL<sub>50</sub> de los tres metales, se observó que el metal con mayor toxicidad para *E. lucunter*, fue el Cd, el cual desde una concentración de 1.81 mg·L<sup>-1</sup> inició la mortandad en los erizos. El segundo metal en orden de toxicidad fue el Zn, pues con dosis por encima de 2.40 mg·L<sup>-1</sup> tuvo repercusiones en los erizos. Por último, el Ni tuvo una dosis mínima letal en los erizos de 22.90 mg·L<sup>-1</sup>. Por medio de un ANOVA, se confirmó que existe diferencia significativa entre los valores de la CL<sub>50</sub>-96h ( $p < 0.001$ ,  $f = 575.56$ ), mientras que la prueba de *Tukey* demostró que los valores de los tres metales se diferenciaban entre sí.

#### 7.3 2<sup>do</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de acumulación de los metales Cd, Ni y Zn por *E. lucunter*.

Se determinó la capacidad de acumulación de los tres metales estudiados en espinas, testa y tejido blando de *E. lucunter*. Debido a que los datos obtenidos para este bioensayo



no adoptaron una distribución normal (Tabla 8), éstos fueron transformados con logaritmo base 10, para poder ser analizados con pruebas paramétricas. Los resultados para cada metal se muestran a continuación.

Tabla 8. Resultados de la prueba Shapiro-Wilks para el contraste de hipótesis de normalidad en las concentraciones de los tres metales (Cd, Ni y Zn).

Metal	Estructura	Valor de <i>W</i>	Valor de <i>p</i>	Distribución normal
<b>Cd</b>	<b>Espinas</b>	0.89	0.04	No
	<b>Testa</b>	0.84	0.04	No
	<b>Tejido blando</b>	0.81	0.003	No
<b>Ni</b>	<b>Espinas</b>	0.89	0.05	No
	<b>Testa</b>	0.84	0.04	No
	<b>Tejido blando</b>	0.81	0.003	No
<b>Zn</b>	<b>Espinas</b>	0.84	0.006	No
	<b>Testa</b>	0.85	0.01	No
	<b>Tejido blando</b>	0.84	0.04	No

### 7.3.1 Capacidad de acumulación del Cd.

En la Figura 12 se observan los valores de la acumulación del Cd en las diferentes estructuras del erizo *E. lucunter* (espinas Figura 12a, testa Figura 12b y tejido blando Figura 12c) durante la exposición a una concentración de  $23.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , en una salinidad de 33 ups y  $28^{\circ}\text{C}$ . El lote experimental estuvo compuesto por erizos que fueron expuestos a la concentración de cadmio anteriormente mencionada, mientras que el grupo control, por erizos que estuvieron libres de cualquier tipo de contaminante.

La concentración media del Cd en las diferentes estructuras de *E. lucunter* fueron comparadas (Tabla 9) para saber si éstas acumularon el metal durante el tiempo que estuvieron expuestas al contaminante, para ello se comparó la concentración del metal de los erizos del lote experimental contra la concentración de los erizos del grupo control (Tabla 10).



Tabla 9. Concentración promedio de Cd determinado en *E. lucunter* en espinas, testa y tejido blando (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de bioacumulación.

Estructura	Día 0	Día 5	Día 10
Espina	3.10 ± 0.99	2.69 ± 0.43	3.41 ± 0.25
Testa	2.68 ± 0.45	3.17 ± 0.42	3.91 ± 0.32
Tejido blando	0.46 ± 0.22	5.03 ± 1.04	12.71 ± 4.34

Con lo anterior, se comprobó que en el tejido blando se presentó una acumulación significativamente mayor entre los erizos expuestos al contaminante con respecto a los que estuvieron libres de ésta, no siendo tan notable en las otras estructuras (espinas y testa) aunque en ambas estructuras se presentó también una diferencia significativa en la acumulación.

Tabla 10. Resultados de la prueba t-Student para determinar diferencias entre las concentraciones de Cd encontradas en los erizos del lote experimental vs. erizos del grupo control.

Estructura	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>p</i>	Diferencia significativa
Espinas	-3.24	0.0038	Sí
Testa	-0.77	0.0074	Sí
Tejido blando	-4.90	0.0010	Sí

Por otra parte, se realizó un ANOVA para contrastar la capacidad de concentración en las tres estructuras estudiadas. De acuerdo a los resultados de este análisis ( $f=4.519$ ,  $p=0.015$ ), conjuntamente con el de la prueba de *Tukey*, se determinó que existe diferencia en la capacidad de acumulación del Cd, siendo el tejido blando la estructura con mayor capacidad de absorción de este metal, mientras que las espinas y la testa no presentaron diferencia en su capacidad de acumulación respecto al Cd.

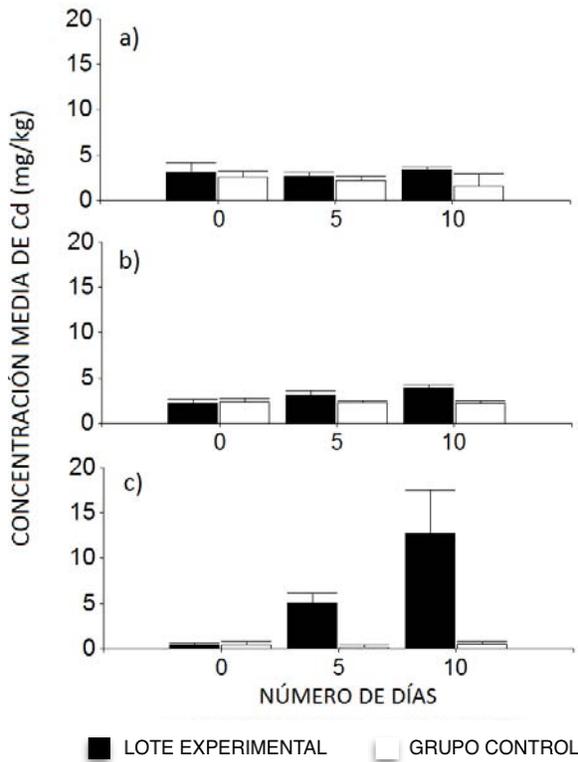


Figura 12. Acumulación media de Cd en:  
a) espinas, b) testa y c) tejido blando  
de *E. lucunter* al día 0, 5 y 10 de exposición.

### 7.3.2 Capacidad de acumulación del Ni.

En la Figura 13 se muestra la acumulación media del níquel en espinas (Figura 13a), testa (Figura 13b) y tejido blando (Figura 13c) de *E. lucunter*. El lote experimental estuvo expuesto a una concentración de  $76.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En la (Tabla 11) se muestra la concentración promedio de Ni acumulado en cada una de las estructuras de *E. lucunter* durante el bioensayo.

Tabla 11. Concentración promedio de Ni determinado en *E. lucunter* en espinas, testa y tejido blando (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de bioacumulación.

Estructura	Día 0	Día 5	Día 10
<b>Espina</b>	$13.49 \pm 0.78$	$14.46 \pm 0.91$	$15.35 \pm 1.17$
<b>Testa</b>	$16.75 \pm 0.84$	$17.69 \pm 0.76$	$17.25 \pm 0.54$
<b>Tejido blando</b>	$1.24 \pm 0.57$	$6.55 \pm 3.06$	$7.78 \pm 0.56$

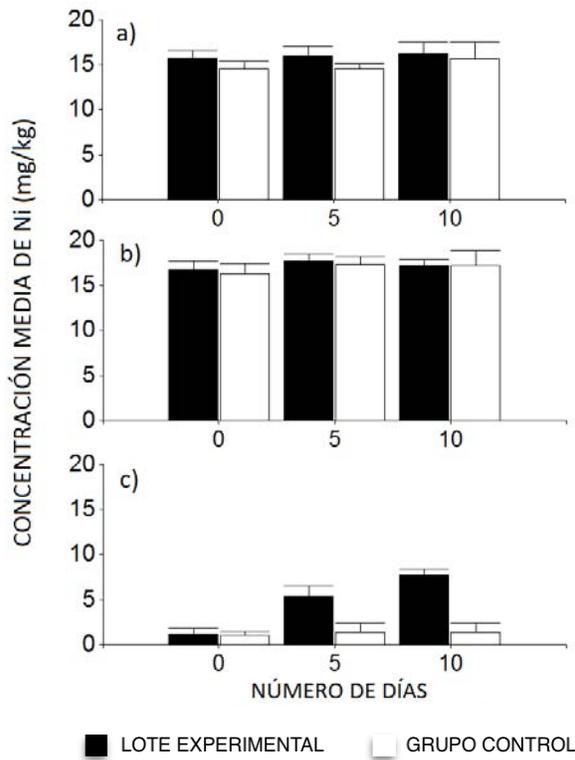


Figura 13. Acumulación media de Ni en:  
a) espinas, b) testa y c) tejido blando  
de *E. lucunter* al día 0, 5 y 10 de exposición.

En el caso de la acumulación del Ni en las diferentes estructuras de *E. lucunter* los promedios de la concentración del metal fueron más elevados en el tejido blando como se puede observar en la Figura 13c, respecto al grupo control, lo que sugiere que hubo una acumulación notable del metal con el paso del tiempo.

En el caso de la muestras de espinas y testa, no hubo diferencia entre los dos lotes (el experimental y el grupo control) sugiriendo que no hubo una acumulación significativa de Ni en estas estructuras.

Tabla 12. Resultados de la prueba t-Student para determinar diferencias entre las concentraciones de Ni encontradas en los erizos del lote experimental vs. los erizos del grupo control.

ESTRUCTURA	VALOR DE <i>t</i>	VALOR DE <i>p</i>	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Espinas	-0.86	0.347	No
Testa	-0.77	0.445	No
Tejido blando	-4.90	<0.0001	Sí



El resultado del ANOVA ( $f=48.96$ ,  $p=0.0001$ ), mostró que hay una diferencia significativa en la acumulación de Ni entre las estructuras probadas. La prueba de *Tukey*, determinó que dicha diferencia se dio entre las muestras del tejido blando, confirmando estadísticamente lo observado en la figura 13c.

### 7.3.3 Capacidad de acumulación del Zn.

En la Figura 14 se muestra el nivel de acumulación del zinc en espinas (figura 14a), testa (figura 14b) y tejido blando (figura 14c). Después de una exposición de  $1120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  por 10 días.

En la Tabla 13 se muestra la concentración promedio de Zn acumulado en cada una de las estructuras de *E. lucunter* durante el bioensayo.

Tabla 13. Concentración promedio de Zn determinado en *E. lucunter* en espinas, testa y tejido blando (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de bioacumulación.

Estructura	Día 0	Día 5	Día 10
<b>Espina</b>	$8.74 \pm 1.74$	$23.02 \pm 4.35$	$33.17 \pm 1.63$
<b>Testa</b>	$13.68 \pm 4.88$	$47.59 \pm 2.98$	$74.36 \pm 14.76$
<b>Tejido blando</b>	$45.52 \pm 17.15$	$159.29 \pm 57.90$	$160.21 \pm 26.55$

Contrastando las concentraciones de Zn en las estructuras de los erizos que estuvieron expuestos al contaminante contra el lote blanco (Tabla 13), se observó que las tres estructuras mostraron una concentración significativamente mayor en el lote experimental con respecto al lote blanco.



Tabla 14. Resultados de la prueba t-Student para determinar diferencias entre las concentraciones de Zn encontradas en los erizos del lote experimental vs. los erizos del grupo control.

ESTRUCTURA	VALOR DE <i>t</i>	VALOR DE <i>p</i>	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Espinas	-4.91	<0.0001	SI
Testa	-4.44	0.0004	SI
Tejido blando	-4.30	0.0003	SI

Con los resultados del ANOVA ( $f=22.26$ ,  $p=0.0001$ ), se comprobó que las diferentes estructuras, tienen una acumulación diferencial del Zn. Con la prueba de *Tukey*, se determinó que el tejido blando es la estructura que acumuló mayor cantidad de Zn durante el bioensayo.

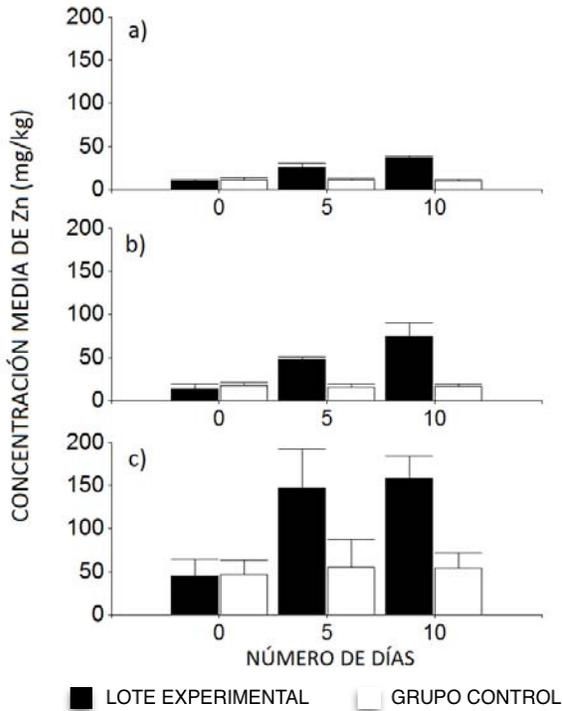


Figura 14. Acumulación media de Zn en:  
a) espinas, b) testa y c) tejido blando  
en *E. lucunter* al día 0, 5 y 10 de exposición.



#### 7.4 3<sup>er</sup> Bioensayo. Evaluación de la capacidad de *E. lucunter* de regular los metales Cd, Ni y Zn.

Se determinó la capacidad de regulación de los metales Cd, Ni y Zn en las diferentes estructuras (espinas, testa y tejido blando) de *E. lucunter*. Los erizos que estuvieron expuestos a cada uno de los metales por un periodo de 10 días, pertenecientes al lote experimental, fueron cambiados a un medio libre de éstos. Los resultados para cada uno de los metales se muestran a continuación.

##### 7.4.1 Capacidad de regulación del Cd.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos del bioensayo de regulación del Cd en las espinas (figura 15a), la testa (figura 15b) y el tejido blando (figura 15c).

En la Tabla 15 se muestra la concentración promedio de Cd encontrado en cada una de las estructuras de *E. lucunter* durante el bioensayo de regulación.

Tabla 15. Concentración promedio de Cd determinado en *E. lucunter* en espinas, testa y tejido blando (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de excreción.

Estructura	Día 10	Día 15	Día 20
Espina	3.41 ± 0.25	3.16 ± 0.43	2.95 ± 0.40
Testa	3.91 ± 0.32	3.85 ± 0.50	3.39 ± 0.47
Tejido blando	12.71 ± 4.34	8.88 ± 2.01	7.89 ± 1.41

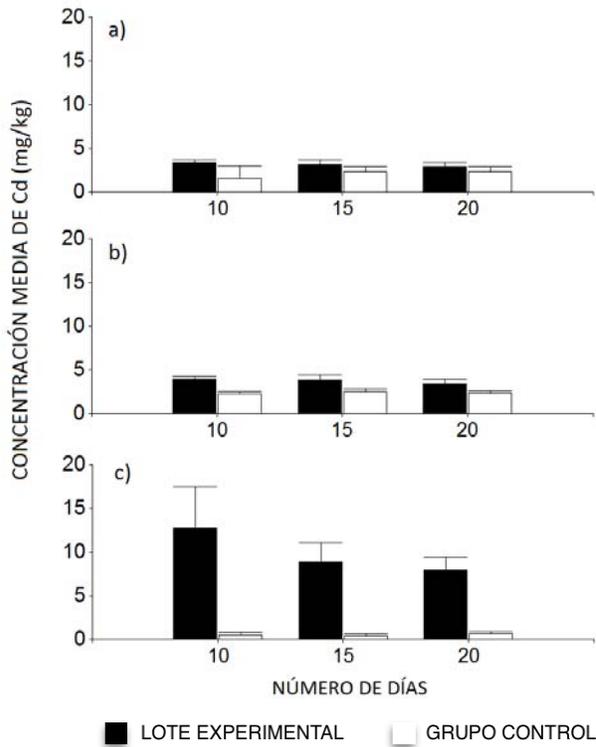


Figura 15. Regulación media de Cd en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando en *E. lucunter* al día 10, 15 y 20 de exposición.

Se realizó un Análisis de Varianza ( $\alpha=0.05$ ) para saber si a lo largo del tiempo, se presentó la excreción del metal en espinas, testa y tejido blando (Tabla 16). De las tres estructuras, el tejido blando presentó una excreción significativa a través de los días, demostrando que en el tiempo que duró este bioensayo (10 días) hubo una eliminación significativa del metal, en este tejido. Por el contrario, en espinas y testa no se encontraron diferencias significativas, lo que demuestra que no hubo depuración del metal en este periodo de tiempo.

Tabla 16. Resultados del ANOVA para determinar diferencias en la regulación de Cd de las diferentes estructuras a través del tiempo.

ESTRUCTURA	VALOR DE <i>F</i>	VALOR DE <i>p</i>	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Espinas	2.0	0.169	No
Testa	2.11	0.156	No
Tejido blando	-4.30	0.043	Sí



### 7.4.2 Capacidad de regulación del Ni.

La Figura 16 muestra la regulación de Ni en espinas (figura 16a), testa (figura 16b) y tejido blando (figura 16c). Al comparar la concentración de Ni entre las estructuras, se puede observar que el tejido blando mostró excretar este metal durante el periodo del bioensayo, mientras que espinas y testa no mostraron diferencias significativas.

En la Tabla 17 se muestra la concentración promedio de Ni encontrado en cada una de las estructuras de *E. lucunter* durante el bioensayo de depuración.

Tabla 17. Concentración promedio de Ni determinado en *E. lucunter* en espinas, testa y tejido blando (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de regulación.

Estructura	Día 10	Día 15	Día 20
Espina	15.35 ± 1.17	15.86 ± 1.10	17.01 ± 0.65
Testa	17.25 ± 0.54	17.23 ± 0.36	17.08 ± 1.14
Tejido blando	7.78 ± 0.56	3.66 ± 1.04	3.93 ± 1.82

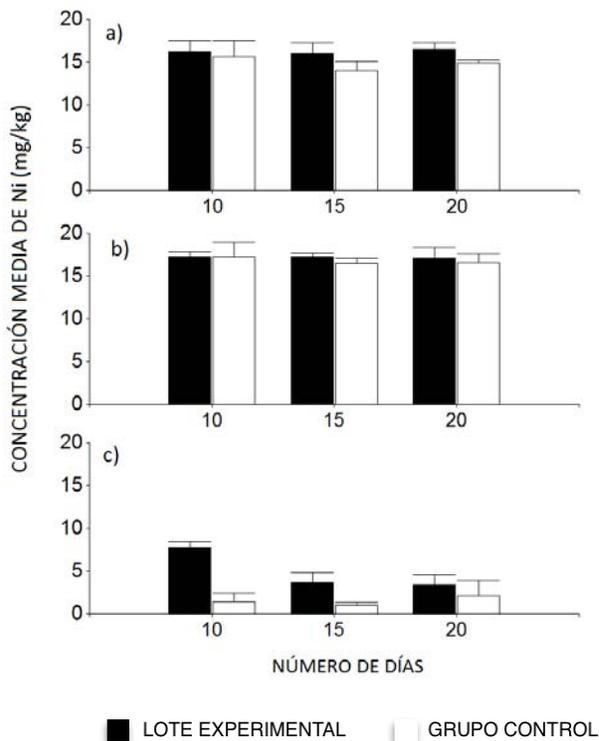


Figura 16. Regulación media de Ni en:  
a) espinas, b) testa y c) tejido blando  
en *E. lucunter* al día 10, 15 y 20 de exposición.



Utilizando una prueba de ANOVA (Tabla 18), se demostró que el tejido blando fue la única estructura que mostró diferencia en la eliminación del Ni a través del tiempo, sugiriendo que de las tres estructuras, solamente ésta fue la que reguló Ni.

Tabla 18. Resultados del ANOVA para determinar diferencias en la regulación de Ni a través del tiempo.

ESTRUCTURA	VALOR DE F	VALOR DE p	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Espinas	0.32	0.728	No
Testa	0.07	0.932	No
Tejido blando	34.89	<0.0001	Sí

### 7.4.3 Capacidad de regulación del Zn.

La Figura 17 muestra los niveles medios del Zn en espinas (figura 17a), testa (figura 17b) y tejido blando (figura 17c).

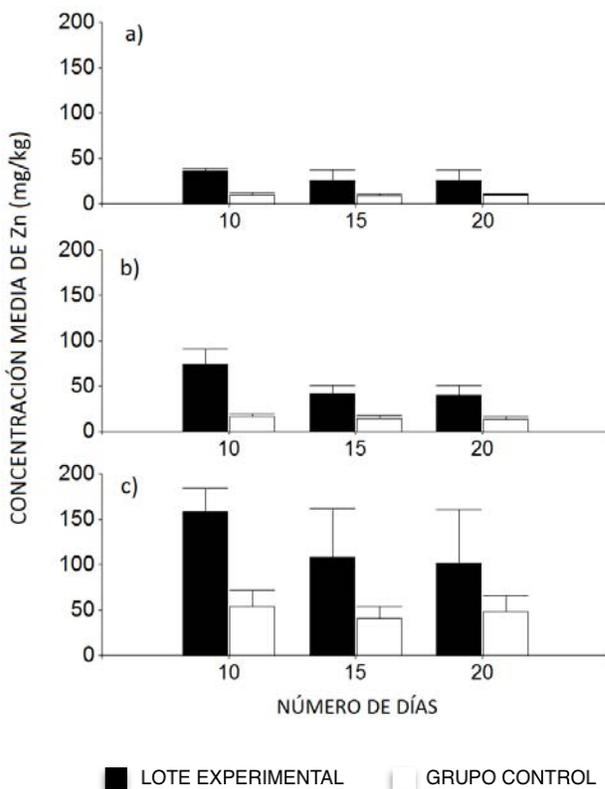


Figura 17. Regulación media de Zn en: a) espinas, b) testa y c) tejido blando en *E. lucunter* al día 10, 15 y 20 de exposición.



En la Tabla 19 se muestra la concentración promedio de Zn encontrado en cada una de las estructuras de *E. lucunter* durante el bioensayo.

Tabla 19. Concentración promedio de Zn determinado en *E. lucunter* en espinas, testa y tejido blando (mg/kg peso seco) durante los 10 días del periodo de regulación.

Estructura	Día 10	Día 15	Día 20
Espina	33.17 ± 1.63	24.64 ± 10.13	25.32 ± 10.47
Testa	74.36 ± 14.76	41.92 ± 8.44	40.31 ± 9.58
Tejido blando	160.21 ± 26.55	108.34 ± 48.62	101.35 ± 54.17

Los resultados del ANOVA (Tabla 20), demostraron que para el caso de la regulación del Zn, la testa fue la única estructura que tuvo una diferencia en la eliminación del metal a través de los días, mientras que las espinas y el tejido blando no manifestaron pérdidas significativas.

Tabla 20. Resultados del ANOVA para determinar diferencias entre la regulación de Zn a través del tiempo.

ESTRUCTURA	VALOR DE <i>F</i>	VALOR DE <i>p</i>	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Espinas	3.46	0.06	No
Testa	13.89	0.004	Sí
Tejido blando	2.37	0.127	No



## 8. DISCUSIÓN

---

### 8.1 Tolerancia de *Echinometra lucunter* a los metales Cd, Ni y Zn

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron conocer la toxicidad de los tres metales estudiados en el erizo de mar *E. lucunter*. En orden de toxicidad, el Cd fue el metal más tóxico para el equinodermo, ya que con una baja concentración, el efecto tóxico es evidente. Por arriba de una concentración de  $1.81 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  el Cd empieza a generar mortandad en un periodo de 96 horas, lo que permitió calcular una  $CL_{50}$  de  $2.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , lo que concuerda con su carácter de elemento metálico no esencial para la fauna (Núñez-Nogueira y Rainbow, 2005b).

El siguiente metal en orden de toxicidad fue el Zn, elemento esencial que en concentraciones elevadas induce efectos adversos en los organismos. En el caso de *E. lucunter*, concentraciones entre  $2.46$  y  $3.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  indujeron la mortandad, calculándose una  $CL_{50}$  de  $2.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cabe destacar que una de las manifestaciones conductuales que presentó el equinoideo durante el bioensayo, fue la liberación de gametos (la liberación de gametos se da por el alto nivel de estrés); aunque no en todos los grupos experimentales se vio este fenómeno. Se demuestra así, que a pesar de ser un elemento esencial, en cantidades mayores a las necesarias, puede comportarse como un agente estresante para estos organismos.

Por último, el Ni demostró ser el metal menos tóxico del grupo propuesto en la presente investigación. Las pruebas de letalidad mostraron que por arriba de los  $22.90 \text{ mg L}^{-1}$ , los organismos comienzan a sufrir los efectos que comprometen sus funciones vitales, obteniéndose así una  $CL_{50}$  de  $25.93 \text{ mg L}^{-1}$ .



Con el propósito de tener un marco de referencia comparativo, con el cual poder comparar las concentraciones de los metales determinados en la prueba de toxicidad, se han reportado algunos datos de concentraciones registradas en las aguas del Golfo de México (Tabla 21).

Tabla 21. Concentraciones de metales Cd, Ni y Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en aguas costeras del Golfo de México considerando los estándares mundiales de calidad de agua.

Área	Cd	Ni	Zn	Referencia
Costas de Veracruz	—	0.008 – 0.095	—	Vázquez, <i>et al.</i> , 1991
Isla Sacrificios, Veracruz	—	0.29 – 7.62	—	Rivera-Ramírez, 2006
Isla Sacrificios, Veracruz J	—	0.18 – 2.03	—	Rosales, <i>et al.</i> , 2009
Isla Sacrificios, Veracruz O	—	0.51 – 1.98	—	Rosales, <i>et al.</i> , 2009
Isla Sacrificios, Veracruz F	—	0.00 – 4.20	—	Rosales, <i>et al.</i> , 2009
Sonda de Campeche	0.007 – 2.35	0.024 – 4.96	0.006 - 112	Brant, <i>et al.</i> , 2009
Sonda de Campeche	0.001 – 0.366	0.025 – 2.842	0.022 – 6.378	Medina-Lemus, 2006
Bahía de Campeche A	—	4.2	—	Villanueva-Estrada, 2000
Bahía de Campeche B	—	3.5	—	Villanueva-Estrada, 2000
Bahía de Campeche C	—	3.4	—	Villanueva-Estrada, 2000
Bahía de Campeche D	—	2.9	—	Villanueva-Estrada, 2000
Estándares mundiales*	0.005 - 59	5 – 3900	0.5 - 200	Brant, <i>et al.</i> , 2009
	—	74	—	EPA (condición aguda)
	—	8.2	—	EPA (condición crónica)
Aguas costeras	100	2,000	10,000	NOM-001-ECOL-1996

J. Junio, O. Octubre, F. Febrero,

- A. Área localizada cerca de la descarga de los ríos Grijalva-Usumacinta.
- B. Área localizada dentro de la zona de exclusión de PEMEX, al suroeste de la misma.
- C. Área localizada dentro de la zona de exclusión de PEMEX, al noreste de la misma.
- D. Área localizada fuera del área de exclusión dentro de la provincia carbonatada.

\* Intervalo de valores para calidad del agua marina obtenidos de América del Norte, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda.

NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles para metales en aguas costeras.



Al comparar las concentraciones determinadas en *E. lucunter* con los valores registrados para el Golfo de México en todas las localidades, se observa que para el caso del Cd (Tabla 21) en todas las localidades, los niveles de este metal se encontraron muy por debajo de la  $CL_{50}$  calculada en este trabajo ( $2.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). De la misma manera, en México el límite máximo permisible para descarga de aguas residuales costeras de recreación y estuarios por promedio mensual es de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (NOM-001-ECOL-1996), por lo que la concentración de Cd determinada en este bioensayo de toxicidad, se encuentra veinte veces por arriba de estos límites permisibles. De acuerdo a esta norma y a las concentraciones ambientales reportadas para aguas del Golfo de México, no se estarían comprometiendo las funciones vitales de *E. lucunter* en el ambiente. Por otra parte, para algunas de las normas mundiales de calidad del agua, esta misma  $CL_{50}$  se encuentra aproximadamente 3,389 veces por encima de lo permitido, por lo que no se estaría ejerciendo un riesgo aparente en *E. lucunter* al exponerlo a concentraciones promedio de Cd encontradas en su medio natural.

En el caso del Ni, la  $CL_{50}$  calculada para *E. lucunter* ( $25.93 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fue mucho mayor que los valores de concentración de este metal reportados en la literatura para las costas de Veracruz y Campeche. La mayor concentración de Ni encontrada en Veracruz fue la que reportó Rivera-Ramírez (2006), con  $7.62 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en aguas de Isla Sacrificios, aun así, el valor calculado en este bioensayo de toxicidad se encuentra 3.4 veces por arriba de ese valor que es el más alto registrado para la zona. En México el límite máximo permisible en aguas costeras por promedio mensual para Ni es de  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (NOM-001-ECOL-1996), por lo que se concluye que *E. lucunter* puede soportar concentraciones mucho mayores de las que se han detectado en su medio.

En cambio, el Ni de acuerdo a los parámetros de calidad del agua para la vida acuática según la EPA (2011), se encuentra que un valor de  $74 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tabla 21) representaría un problema de toxicidad crónica, por lo que comparando los valores reportados para el



Golfo de México con este otro, todos se encuentran muy por debajo de esa concentración, lo que indica que no podría representar un riesgo de toxicidad aguda en el medio. Aunque considerando el límite máximo permisible para toxicidad crónica, que es de  $8.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , el registrado por Rivera-Ramírez (2006), en aguas de Veracruz se encuentra muy cercano al límite, por lo que tal vez los efectos tóxicos del Ni no se vean a corto plazo pero sí podrían estar afectando a los organismos a largo plazo, de manera crónica.

Finalmente en el caso del Zn, la  $CL_{50}$  calculada para *E. lucunter* ( $2.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) también fue mayor que las concentraciones reportadas para la Sonda de Campeche y los estándares mundiales (Media-Lemus, 2006; Brandt *et al.*, 2009). Sin embargo, de acuerdo a la NOM-001-ECOL-1996 que marca como límite máximo permisible para descarga de aguas residuales costeras de recreación y estuarios un promedio mensual de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , en este caso, si se verían afectadas las funciones vitales del erizo *E. lucunter*, ya que con una concentración casi cuatro veces menor, probada en laboratorio, bajo las condiciones descritas en la metodología, le causa la muerte a este organismo.

En general, al comparar los valores de las  $CL_{50}$  para Cd, Ni y Zn obtenidas en este trabajo respecto a las concentraciones de estos mismos metales reportadas en la literatura, se demostró que el erizo de mar *E. lucunter* proveniente de la zona costera del puerto de Veracruz, posee una elevada tolerancia a estos metales disueltos, ya que parece requerirse una mayor concentración del metal, para comprometer la viabilidad de los equinoideos. Sin embargo, es importante señalar que en esta tesis se cuantificó la respuesta a corto plazo (96 h), el efecto crónico de estos tóxicos es muy difícil de interpretar (Cebrian *et al.*, 2003; Rivera-Ramírez, 2006). Si bien las dosis bajas del contaminante no matan inmediatamente al individuo, pueden influir sobre su fisiología y comportamiento y a la larga no sólo mata al individuo sino que compromete el éxito de la población (Newton y Mckenzie, 1995; Agell *et al.*, 2001).



## **8.2 Capacidad de acumulación de los metales Cd, Ni y Zn en *E. lucunter*.**

Para realizar un monitoreo de la calidad ambiental y evaluar el efecto que pueden tener los contaminantes (en este caso metales pesados) en la biota, las muestras a analizar no pueden centrarse únicamente en agua y sedimento, pues muchas veces, estos contaminantes no tienen repercusiones al no ser biodisponibles para la biota marina. Por lo que el monitoreo de los niveles de contaminantes utilizando modelos biológicos, proveen una medición de la fracción de los químicos que son biodisponibles y por tanto potencialmente tóxicos para el ecosistema (Phillips, 1980; Stebbing *et al.*, 1992).

Por ello, es necesario la utilización de modelos biológicos o bioindicadores, los cuales pueden ser herramientas útiles ya que pueden proveer señales de alerta temprana a la exposición de contaminantes y pueden además ser utilizados como herramientas de diagnóstico para la interpretación de los efectos observados en el organismo o al nivel de la población (den Besten *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que existe una diferencia en la afinidad que muestran distintas especies por determinados metales (Coteur *et al.*, 2003), por lo que no se puede utilizar un solo bioindicador para tratar de interpretar la contaminación de un ambiente (Gay y Maher, 2003). La selección de un bioindicador apropiado dependerá del tipo de contaminante que se quiera identificar, el estatus del ecosistema, el manejo de la estructura de la localidad, el hábitat, etc. No existe un bioindicador que pueda ser aplicado en todos los programas de biomonitoreo (Linton y Warner, 2003).

Los equinodermos comprenden un gran número de especies que dominan cuantitativamente y/o cualitativamente el bentos y por lo tanto juegan un rol estructural en este hábitat (Saier, 2001). Algunos equinodermos han demostrado ser importantes indicadores de contaminación ya que acumulan metales en función del nivel de



contaminación del entorno (Knickmeyer *et al.*, 1992; Temara *et al.*, 1998; Warnau *et al.*, 1998; Schweitzer *et al.*, 2000).

El presente estudio tuvo como objetivo dilucidar la respuesta de absorción y eliminación de los metales Cd, Ni y Zn en las distintas estructuras de *E. lucunter* para determinar la capacidad del organismo para acumular y regular dichos metales. Con los resultados obtenidos en esta tesis, se puede afirmar que el erizo rojo, *E. lucunter*, es una especie con la capacidad de acumular metales pesados independientemente si son esenciales o no, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Abladeno *et al.*, (1990), quienes encontraron que el erizo fue capaz de acumular metales pesados como Cu, Fe, Zn y Mn en partes duras y gónadas.

El análisis de las distintas estructuras del cuerpo del equinoideo mostró que la eficiencia de la bioacumulación de los metales estudiados difieren entre éstas y entre los metales. Danis *et al.*, (2005); Dallinger y Rainbow, (2000); Abladeno *et al.*, (1990); Coteur *et al.*, (2003); Depledge y Rainbow (1990); confirman lo anterior determinando que la bioacumulación del contaminante varía de acuerdo al tejido del organismo. Las concentraciones de metales traza en los tejidos de los invertebrados marinos varían enormemente (Eisler, 1981), incluso entre los organismos recolectados de la misma localidad.

Estas diferencias en la concentración del metal en los organismos varían entre especies, por la edad, talla, sexo, estado fisiológico (especialmente estado nutricional y condición reproductiva), temperatura y salinidad; además de que la absorción de los metales a partir del agua de mar se ve influenciada por la especiación del metal, la presencia de agentes quelantes, pH, condiciones redox, etc. (Leckie y James, 1974; Bryan, 1976; Mantoura *et al.*, 1978).



En el presente trabajo, si bien es cierto que se comprobó que *E. lucunter* acumuló los metales probados, es importante recalcar que la especie no tuvo la misma tasa de acumulación para los tres metales, lo cual concuerda con lo descrito anteriormente por otros autores.

El erizo presentó patrones de acumulación distintos en función del metal involucrado. El Cd y Zn bajo las condiciones de prueba, se acumularon en las tres estructuras, mientras que la acumulación del Ni en espinas y testa no fue significativa, solamente en el tejido blando.

El Cd fue el metal que presentó un excelente patrón de acumulación en la testa. Existen algunos indicios de que la incorporación de este metal a la estructura calcárea se lleva a cabo a través del transporte activo en las bombas de calcio, las cuales pueden hacer una importante contribución a la tasa total de absorción del metal en algunos organismos marinos (Bjerregaard y Depledge, 1988). Por otra parte, se ha visto que en los equinodermos la incorporación de metales a la estructura calcárea se debe a mecanismos de desintoxicación, combinados con la propiedad de algunos metales a asociarse con, o sustituir a los iones de calcio que forman el exoesqueleto (Ameye *et al.*, 2001; Samek *et al.*, 2001; Arslan y Paulson, 2003).

En el caso del tejido interno en los equinodermos, los niveles de cadmio en diferentes tejidos (principalmente en el intestino y las gónadas) se relacionan a la alta actividad metabólica de estos órganos y se ha visto que los niveles de este metal encontrados en estos tejidos, incrementan durante el periodo de reproducción (Warnau *et al.*, 1995a,1995b; Den Besten *et al.*, 2001). En *E. lucunter* se pudo apreciar, en el periodo de acumulación, que en el tejido blando también hubo absorción del metal. Las diferencias encontradas en la concentración del metal entre el tejido blando y partes duras, pudieran explicarse debido a que la especie contiene valores considerables de triacilglicéridos en su



tejido gonadal y un alto porcentaje de materia orgánica. Forstner y Wittmann (1979) reportaron que la capacidad de almacenaje de compuestos organo-metálicos se debe a la afinidad de éstos con los lípidos.

Por otra parte, se ha visto que un número considerable de químicos, tanto orgánicos como inorgánicos, han demostrado tener efectos de disrupción endócrina en los invertebrados (Tabla 22). La disrupción endócrina es definida como un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción, o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo y que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento (U.S. EPA, 1997).

Tabla 22. Químicos que tienen efectos de disrupción endócrina en invertebrados (Depledge y Billingshurst, 1999).

<b>Clase</b>	<b>Químicos identificados como disruptores endócrinos</b>
Metales	Cadmio, selenio, zinc, mercurio, plomo, tributilestaño.
Herbicidas	Diquat bromuro, Atrazina Simazina, Diuron
PCB's	Clophen A50, Aroclor 1254
Alquifenoles	Nonilfenol, pentilfenol
Esteroides de vertebrados naturales y sintéticos	Dietilstilbestrol, testosterona
Insecticidas	Piriproxifeno, DDT, MCPA, Endrin, Toxafeno, Butóxido de Piperonil, Metopreno, Endosulfán, Pentaclorofenol, Diflubenzuron, Keltano
Mezclas	Efluentes de curtidurías, efluentes de plantas de papel y celulosa, derivados del petróleo, efluentes de aguas residuales.



Entre estos disruptores endócrinos destacan metales como Cd y Zn que fueron utilizados en este trabajo, por lo que resulta preocupante encontrar una alta acumulación de estos metales en las estructuras de los organismos. La gama de efectos observados en los invertebrados, es considerable, ejemplos de éstos son dados en la Tabla 23.

Tabla 23. Ejemplos de los cambios inducidos químicamente en el desarrollo de los invertebrados.

Organismo	Químico	Efectos	Referencias
*Crustáceos	Cd, Se	Cambios en la muda	Fingerman <i>et al.</i> , (1996); Schultz <i>et al.</i> (1980)
*Mejillones	Cd	Alteración del desarrollo del folículo gonadal	Kluytmans <i>et al.</i> , (1988)
*Erizo de mar <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	Cd	Cambios en la oogénesis	Khristoforova <i>et al.</i> , (1984); Gnezdilova <i>et al.</i> , (1985)
*Estrella de mar <i>Asterias rubens</i>	Cd, Zn, PCB's	Alteración del metabolismo de los esteroides, anomalías en la reproducción	Voogt <i>et al.</i> , (1987); Den Besten <i>et al.</i> , (1989)
*Crustáceos estuarinos	Diflubenzuron	Inhibición en la muda y el desarrollo	Cunningham (1986)
*Camarón <i>Palaeomonetes pugio</i>	Endrín (30 µg L <sup>-1</sup> )	Retardo en el desove y reducción en la viabilidad del embrión	Tyler-Schroeder (1979)
*Crustáceos	Metopreno	Imitadores de la hormona juvenil	McKenney y Matthews (1990); Celestial y McKenney (1994)
Erizo de mar <i>Diadema antillarum</i>	Cu, Ag, Ni, Se	Alteración en el desarrollo larval, alteración fisiológica y en el comportamiento	Bielmyer <i>et al.</i> , (2005)
Erizo de mar <i>Paracentrotus lividus</i>	Cd, Cu, Pb, Zn	Anormalidades en el estadio larval	Radenac <i>et al.</i> , (2001)
Poliqueto marino <i>Hydroides elegans</i>	Hg, Cd, Pb, Ni, Zn	Reducción en la viabilidad espermática, alteración en el desarrollo embriológico, retraso en la división mitótica	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , (2008)

\*Estos datos fueron tomados de: Preston (2002).

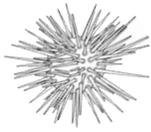


En la tabla anterior se puede apreciar que la mayoría de los metales afectan las etapas tempranas de desarrollo de los organismos, por lo que resulta importante detectar este tipo de metales en la biota para prevenir alteraciones en el ecosistema, en la población y éxito reproductivo de cada una de las especies.

Por otra parte, cabe mencionar que de los tres metales, el Zn fue el metal que presentó una mayor acumulación en las tres estructuras, aunque éste por ser un metal esencial, debe ser evaluado con sumo cuidado respecto a su relación con la contaminación, para no arribar a conclusiones erróneas, ya que éste es requerido por el organismo para realizar diferentes funciones vitales, ya que el zinc es un componente esencial de las enzimas, de ahí que en determinada época del año puedan incrementar o disminuir sus concentraciones dentro de los organismos, según los requerimientos metabólicos.

Por último, el Ni fue el metal que no presentó acumulación aparente en espinas y testa, sólo en el tejido blando. Lo cual concuerda con lo descrito por Villanueva *et al.*, (1988) quienes mencionan que a pesar de que el Ni es un metal esencial para los organismos vivos, también es el metal que menos tendencia tiene a bioacumularse y en el estudio realizado por los autores, sólo los moluscos de la laguna del Ostión, Veracruz, mostraron niveles importantes de este metal, con una concentración de  $84.00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , sin embargo, esta concentración no es tan elevada al comparar dicho valor con el que se reporta (Segar, 1971) en el gasterópodo *Crepidula fornicata* de  $850 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , donde el autor hace referencia a que esta concentración no tiene ningún efecto tóxico en el organismo.

En los tres metales se pudo observar que la mayor acumulación se dio entre la primera y segunda toma de muestras, es decir, del día cero al cinco de exposición de los metales. Este mismo fenómeno fue notado por Pinsino *et al.*, (2010), quienes evaluando la toxicidad del Mn en embriones de *P. lividus* observaron que la mayor concentración del contaminante se obtuvo en las primeras 48 h. Estos mismos autores sugieren la existencia



de un valor umbral para la tasa de acumulación del contaminante, que al ser alcanzado deja de absorber con la misma intensidad el metal.

### **8.3 Capacidad de regulación de los metales Cd, Ni y Zn en *E. lucunter*.**

Una vez absorbido el metal por los organismos, éste puede ser acumulado o excretado en diversos grados. La acumulación puede ocurrir como resultado de los mecanismos de manipulación fisiológicos en el caso de los metales esenciales, por lo que el metal es liberado a los tejidos que requieren del metal para alguna función metabólica.

Independientemente de los mecanismos de manipulación, es evidente que los iones metálicos en exceso a las necesidades metabólicas y capacidad de almacenamiento, son potencialmente tóxicos y deben ser removidos de las proximidades de importantes moléculas biológicas, al ser excretados del tejido específico. El metal puede entonces ser eliminado del organismo o ser transformado antes de su almacenamiento, posiblemente, dentro de los tejidos de almacenamiento específicos en formas inertes, no tóxicas (Depledge y Rainbow, 1990).

Por otra parte, los metales no esenciales, es decir, no requeridos para el metabolismo, son tóxicos incluso en concentraciones muy bajas (Wright y Welbourn, 2001).

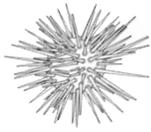
Existe una variedad de mecanismos de remoción de los contaminantes del organismo, la eliminación de los metales puede llevarse a cabo a través de la unión de algunos de éstos (p. ej. Cu, Cd, Hg, Ag y Zn) a metalotioneínas (proteínas de bajo peso molecular involucradas en la regulación y excreción de metales). La presencia de altas proporciones de azufre en los residuos de cisteína en dichas proteínas proporciona una alta afinidad del metal a la molécula, secuestrando los metales y reduciendo su disponibilidad metabólica (Rainbow, 2007).



Por otra parte, otro mecanismo de eliminación es en forma de uno o una variedad de gránulos insolubles, metabólicamente inertes; o también pueden ser depositados en los tejidos de los invertebrados (Hopkin, 1989; Marigomez *et al.*, 2002). En ambos casos la función de estos agentes es actuar como quelantes o secuestradores del metal para removerlos del organismo. El almacenamiento de los metales en los tejidos incluye también la deposición de éstos en material calcáreo como el hueso y deposición intracelular (Bryan, 1979).

En crustáceos decápodos, Bryan (1968) observó que la excreción de Zn se llevó a cabo a través de las heces, en la orina y a través de las branquias y la importancia de estas rutas varía con la concentración absorbida de Zn y de la especie. En peces, las mismas rutas parecen ser importantes en la excreción, con pérdida en las heces vía el hígado, la vesícula biliar y la bilis, siendo equivalente a la excreción vía el hepatopáncreas y las heces en los decápodos. La muda periódica es otro método potencial para la remoción de contaminantes en los crustáceos y se ha visto implicada en la excreción del Cd (Fowler y Benayoun, 1974). Aunque no es un método de excreción como tal, la producción de huevos es otro método a través del cual hay eliminación de los contaminantes del organismo (Cunningham y Tripp, 1973).

La regulación o excreción de los contaminantes acumulados, es un fenómeno observado en diferentes especies de invertebrados (Gibson y Barker, 1979; Dall y Moriarty, 1983; Rainbow, 1998; Bianchini *et al.*, 2007). En este estudio se demostró que *E. lucunter*, tiene la capacidad de excreción del Cd, Ni y Zn. Sin embargo, no todas las estructuras se comportaron de la misma manera, ni todos los metales tuvieron la misma tasa de excreción. El Cd y Ni fueron regulados por el tejido blando. La tasa de desintoxicación entre los dos metales fue muy distinta tanto en el tiempo en que se inició la desintoxicación, como en la cantidad del metal que se reguló. Esta diferencia en la regulación de dos metales distintos fue observada por Raftopoulou y Dimitriadis (2011), al



trabajar con la regulación de un metal esencial (Cu) y un no-esencial (Hg) en el mejillón *Mytillus galloprovincialis*.

En la testa y espinas el Cd y Ni no presentaron diferencias significativas en la concentración del metal a través del tiempo, por lo que parece ser que en estas estructuras no hubo excreción del metal. Rainbow (1998) menciona que ningún crustáceo regula la concentración corporal de Cd (metal no esencial). En carideos (*P. elegans*), anfípodos (*Echinogammarus pirloti*) y percebes (*E. modestus*), todo el cadmio tomado del medio acuático es acumulado sin ser excretado durante al menos un periodo de 28 días (Rainbow y White, 1989). Por otra parte Warnau *et al.*, (1997) mencionan que la vida media biológica de la mayor parte (73 a 85%) del Cd absorbido por los equinoideos fue del orden de 1 año. Esta vida media relativamente larga del Cd en los tejidos de los equinodermos podría explicar por qué Warnau *et al.*, (1995a) no observaron pérdida significativa del Cd de los compartimentos del cuerpo de *P. lividus*, previamente expuesto a este metal en agua marina, al igual que en el presente trabajo. De hecho, estos autores siguieron la cinética de pérdida del Cd por un periodo de tiempo igual al de este trabajo, 10 días. El órgano que mostró ser mejor regulador y acumulador de este metal fue el tejido blando, lo cual concuerda con lo descrito por Duquesne y Riddle (2002), quienes mencionan que en ambas especies de equinoideos *A. nimrodi* y *A. ingens*, todos los elementos evaluados (As, Cd, Cu, Pb, Zn, Cr, Ni) fueron significativamente mayores en el tracto digestivo que en la estructura calcárea.

Por su parte, el Zn solamente fue regulado por la testa, mientras que las espinas no demostraron la capacidad de regular ninguno de los tres metales. Esta variación de la capacidad excretora de las estructuras estudiadas, concuerda con Dallinger y Rainbow (2000), quienes afirman que existen tejidos que pueden ser considerados como reguladores y otros que no tienen la capacidad de desechar lo que han acumulado. El Zn parece ser regulado por encima de un cierto umbral de concentración.



Finalmente el Ni mediante la prueba estadística realizada demostró que el tejido blando fue la única estructura que mostró diferencia en la excreción de este metal a través del tiempo, sugiriendo que fue el único tejido capaz de regular Ni. La testa y espinas no mostraron ninguna diferencia.

#### 8.4 Propuesta de la utilización de *E. lucunter* como bioindicador de contaminación por los metales Cd, Ni y Zn.

De acuerdo con los términos expuestos en el apartado 2.8 TIPOS DE BIOINDICADORES, la Tabla 24 muestra el tipo de bioindicador que es cada una de las estructuras para los metales Cd, Ni y Zn. Basados en los resultados de esta tesis, se propone la utilización de las espinas como modelo de bioacumulador para el Cd y el Zn. A la testa como bioacumulador del Cd y bioregulador del Zn. Por último, al tejido blando como bioregulador del Cd y Ni y como bioacumulador del Zn.

Tabla 24. Tipos de bioindicadores que son las espinas, la testa y el tejido blando de *E. lucunter* para los metales Cd, Ni y Zn.

	ESTRUCTURAS	ACUMULACIÓN	REGULACIÓN	TIPO DE BIOINDICADOR
Cd	Espinas	X	-	Bioacumulador
	Testa	X	-	Bioacumulador
	Tejido blando	X	X	Bioregulador
Ni	Espinas	-	-	-
	Testa	-	-	-
	Tejido blando	X	X	Bioregulador
Zn	Espinas	X	-	Bioacumulador
	Testa	X	X	Bioregulador
	Tejido blando	X	-	Bioacumulador

X= indica la presencia del fenómeno

Con lo anterior se propone a *Echinometra lucunter* como un bioindicador de la contaminación del agua del área que compone el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano.



## 9. CONCLUSIONES

---

Las pruebas de toxicidad para los tres metales, Cd, Ni y Zn, mediante el método Probit, permiten establecer un criterio de concentración letal media. La  $CL_{50-96h}$  reportada para la especie *E. lucunter* bajo las condiciones experimentales de este trabajo fue de  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para Cd,  $2.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para Zn y de  $25.93 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para Ni.

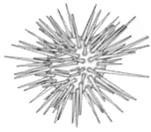
Observando que el Cd fue el metal que presentó una mayor toxicidad, seguido del Zn y por último el Ni, que resultó ser el metal más inofensivo para el organismo, calculándose una  $CL_{50}$  superior a los dos metales antes mencionados.

Las respuestas observadas indican concordancia del grado de letalidad con la función esencial o no del elemento involucrado, siendo el Cd el más tóxico, seguido de Zn y Ni respectivamente.

Durante la exposición de los organismos a estos metales, *E. lucunter* presentó respuestas tales como disminución de desplazamiento, pérdida de espinas, expulsión de gametos y ausencia de alimentación.

*E. lucunter* puede soportar concentraciones mayores de Cd, Ni y Zn, de las que se han detectado en su medio natural.

La determinación de la  $CL_{50}$  en el erizo *E. lucunter* es de utilidad, ya que esta información puede aportar nuevos datos que ayuden a revisar las normas existentes y/o establecer nuevos criterios que regulen la descarga de sustancias tóxicas en la zona costera o a establecer los límites máximos permisibles de descarga, evitando así, problemas ecológicos y ambientales.



*E. lucunter* presenta patrones de acumulación distintos en función del metal involucrado y de la estructura en cuestión.

*E. lucunter* tiene la capacidad de acumular Cd en sus espinas, testa y tejido blando, al igual que Zn y Ni solo en el tejido blando.

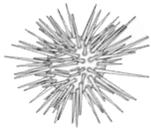
De las tres estructuras probadas, el tejido blando presentó una mayor capacidad de acumulación de los metales, seguido de la testa y por último las espinas.

Para la fase de regulación, el erizo *E. lucunter* presentó la capacidad de regular Cd, Ni y Zn de manera diferencial entre metales y estructuras.

El Cd fue regulado en el tejido blando de *E. lucunter*, mientras que Ni presentó el mismo patrón, a diferencia del Zn que sólo presentó diferencias en la concentración de este metal en la testa.

De las tres estructuras probadas en *E. lucunter*, el tejido blando presentó una mayor capacidad de regulación de los metales, seguido de la testa y por último las espinas.

Las espinas del erizo de mar *E. lucunter* no tuvieron la capacidad de regular ninguno de los metales estudiados, por lo que sugieren ser una estructura capaz de bioacumular el metal y de esta manera llevar a cabo un monitoreo ambiental sin tener que sacrificar al organismo en cuestión.



## 10. LITERATURA CITADA

---

Ablanedo, N., González H., Ramírez M. y Torres I. (1990). Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de la contaminación por metales pesados, Cuba. *Aquatic Living Resources*, 3:113-120.

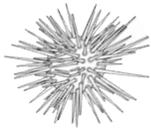
Acosta-González, G., Horta-Puga G. y Tovar-Juárez E. 2000. Metales pesados en esqueleto del erizo de mar *Echinometra lucunter* en el Sistema Arrecifal Veracruzano. *I Congreso Nacional de Arrecifes de Coral. Veracruz, Veracruz, México. Junio 28-julio 1º. 63 pp.*

Acosta-González, G. 2002. Metales pesados en un sistema bentónico de dos arrecifes de coral en Veracruz. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, 56 pp.

Addison R.F. 1976. Organochlorine compounds in aquatic organisms: their distribution, transport and physiological significance. *En Effects of pollutant on aquatic organisms*, (ed. A. P. M. Lockwood), pp. 127-143. Cambridge University Press.

Ameye L., De Becker G., Killian C., Wilt F., Kemps R., Kuypers S., Dubois P. 2001. Proteins and saccharides of the sea urchin organic matrix of mineralization: Characterization and localization in the spine skeleton. *Journal of Structural Biology* 134:56-66.

Anderson B. S., Hunt J. W., Phillips B. M., Fairey R., Puckett H. M., Stephenson M., Taberski K., Newman J. y Tjeerdema R. S. 2001. Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Marine Environmental Research* 51:191-211.



Angino E. E., Magnuson L. M., Waugh T. C., Galle O. K. y Bredfeldt J. 1970. Arsenic in detergents: possible danger and pollution hazard. *Science* 168:389–390.

Arslan Z., Paulson A. J. 2003. Solid phase extraction for analysis of biogenic carbonates by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS): An investigation of rare earth element signatures in otolith microchemistry. *Analytica Chimica Acta* 476:1-13.

Astudillo D., Rosas J., Velásquez A., Cabrera T. y Maneiro C. 2005. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Echinometra lucunter* (Echinoidea: Echinometridae) alimentadas con las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*. *Revista de Biología Tropical* 53(3):337-344.

Beeby A. 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112:285-298.

Bielmyer G. K., Brix K. V., Capo T. R. y Grosell M. 2005. The effects of metals on embryonal larval and adult life stages of the sea urchin, *Diadema antillarum*. *Aquatic Toxicology* 74:254-263.

Bjerregaard P. y Depledge M. H. 1988. Effect of salinity and calcium concentration on cadmium uptake in *Littorina littorea* (L.). In the collected abstracts of 1st *European Conference on Ecotoxicology* p.68. Copenhagen, Denmark, 17-19th October, 1988.

Botello A., Ponce G., Toledo A., Díaz González G. y Villanueva S. 1996. Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. 25-44 pp. En: A. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benitez, D. Zárate-Lomelí (eds.). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX, Serie Científica, México.



Brandt, C. A., N. J. Aimo, W. R. Barchet, J. M. Becker, T. O. Eschbach, Ma. del C. González-Macías, M. M. Molina, T. Miles, J. M. Neff, R. Villaseñor y J. A. Ward. 2009. Programa de vigilancia ambiental. Pp. 33-62. En: L. A. Soto y Ma. Del C. González-Macías (compiladores). PEMEX y la salud ambiental de la Sonda de Campeche. Batelle Memorial Institute, Instituto Mexicano del Petróleo, Universidad Autónoma Metropolitana y Universidad Nacional Autónoma de México. 397 pp.

Bryan G. W. 1968. Concentrations of zinc and copper in the tissues of decapod crustaceans. *Journal of de Marine Biological Associaton of the United Kingdom*. 48:303-321.

Bryan G. W., Waldichuk, M., Pentreath, R. J. y Darracott, A. 1979. Bioaccumulation of marine pollutants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 286 (1015), 483-505.

Capó-Martí M. A., 2007. Principios de Ecotoxicología, diagnóstico, tratamiento y gestión del Medio Ambiente. Editorial Tébar. Madrid, España, 320 pp.

Carneiro, L.S. y Cerqueira W.R.P. 2008. Informações sobre o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) para o litoral de salvador e adjacências. *Sitientibus série ciências biológicas* 8:168-171.

Caso M. M. E. 1961. Estado actual de los conocimientos acerca de los equinodermos de México. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Departamento de biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 388 p.



Cesar A, Marín A, Marín-Guirao L y Vita R. 2004. Amphipod and sea urchin test to assess the toxicity of Mediterranean sediments: The case of Portman Bay. *Scientia Marina* 67:205-213.

Crees N., Hornung H. y Herut B. 1998. Concentrations of Hg, Cd, Cu, Zn, Fe and Mn in deep sea benthic fauna from the southeastern Mediterranean Sea: A comparison study between fauna collected at a pristine area and two waste disposal sites. *Marine Pollution Bulletin* 36:911-921.

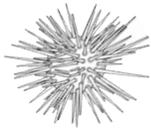
Coteur G., Gosselin P., Wantier P., Chambost-Manciet Y., Danis B., Pernet Ph., Warnau M., Dubois Ph. 2003. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea. *Environmental Contamination and Toxicology* 45:190-202.

Cunningham P. A. y Tripp M. R. 1973. Accumulation and depuration of mercury in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 20:14-19.

Dallinger R. y Rainbow P. (Eds). 2000. Ecotoxicology of metals in invertebrates. A special publication of SETAC. Lewis publisher, Florida, USA.

Deheyn D., Gendreau F., Baldwin R. J. y Latz M. L. 2005. Evidence for enhanced bioavailability of trace elements in the marine ecosystem of Deception Island, a volcano in Antarctica. *Marine Environmental Research* 60:1-33.

Den Besten P. J., Valk S., van Weerlee E., Nolting R. F., Postma J. F., Everaarts J.M. 2001. Bioaccumulation and biomarkers in the sea star *Asterias Rubens* (Echinodermata: Asteroidea): a North Sea field study. *Marine Environmental Research* 51:365-387.



Depledge M. H. y Rainbow P. S., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 97(1):1-7.

Domínguez A., Rosas J., Velázquez A., Cabrera T. y Mata E. 2007. Desarrollo, supervivencia y crecimiento del erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) alimentado con microalgas a dos salinidades y temperaturas diferentes. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 42(1):49-57.

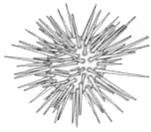
Duquesne S., Riddle M. J. 2002. Biological monitoring of heavy-metal contamination in coastal waters off Casey Station, Windmill Islands, East Antarctica. *Polar Biology* 25:206-215.

Eisler R., 1981. Trace metal concentrations in marine organisms. Pergamon Press, New York, 687 p.

EPA. 2011. Response to BP Spill in the Gulf of Mexico: water quality benchmark for aquatic life. [www.epa.gov/bpspill/water-benchmarks.html](http://www.epa.gov/bpspill/water-benchmarks.html).

Espina, S., y C. Vanegas, 2005. Ecofisiología y contaminación, p. 53-78. En: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.

Espinoza R. A., Reyes J.L., Himmelman J. H. y Lodeiros C. 2008. Actividad reproductiva de los erizos *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en



relación con factores ambientales en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 56:341-350.

Förstner U, y Wittmann G. T. W. 1979. Metal pollution in the aquatic environment. Springer, New York.

Fowler S. W. y Benayoun G. 1974. Experimental studies on cadmium flux through marine biota. En: Comparative studies of food and environmental contamination, pp 159-178. Viena: International Atomic Energy Agency.

Gay D., Maher W. 2003. Natural variation of copper, zinc, cadmium and selenium concentrations in *Bembicium nanum* and their potential use as a biomonitor of trace metals. *Water Research* 37:2173-2185.

González de la Parra A., Guzmán L. M. y Sánchez M. R. 1984. Manejo de la zona arrecifal de Antón Lizardo, Ver., Servicio Social, *Universidad Autónoma Metropolitana* 152 pp.

Hair, Jr., Black W.C., Babin B.J., y Anderson R.E. 2010. Multivariate Data Analysis, 7<sup>th</sup> ed. Pearson Prentice Hall.

Hendler, G., Miller J.E., Pawson D.L. y Kier P.M. 1995. Sea Stars, Sea Urchins, and Allies. Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution. Washington and London. 390 pp.

Hernández O. D., Gutiérrez A. J., González-Weller D., Lozano G., García E., Rubio C. y Hardisson A. 2009. Accumulation of Toxic Metals (Pb and Cd) in the Sea Urchin *Diadema* aff. *antillarum* Philippi, 1845, in an Oceanic Island (Tenerife, Canary Islands). *Environmental Toxicology* 25:227-233.



Knickmeyer R., Landgraff O., Steinhart H. 1992. Cyclic organochlorines in the sea star *Asterias rubens* from the German Bight, December 1988–May 1989. *Marine Environmental Research* 33:127-143.

Kremling K. y Streu P. 2000. Further evidence for a drastic decline of potentially hazardous trace metals in Baltic Sea surface waters. *Marine Pollution Bulletin* 42:1397-1402.

Lawrence, J. 1975. On the relationships between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, 13:213-286.

Linton D. M., Warner G. F. 2003. Biological indicators in the Caribbean coastal zone and their role in integrated coastal management. *Ocean & Coastal Management* 46:261-276.

Long E. R, Mcdonald D., Smith S. I. y Calder F. D. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19:81–97.

López de Buen, L. 2009. Caracterización de contaminación por plaguicidas organoclorados en el sistema arrecifal veracruzano, a través del erizo negro (*Echinometra lucunter*). Centro de Ecología y Pesquerías. Universidad Veracruzana. Documento interno.

Medina-Lemus, R. 2006. Determinación de metales disueltos en agua de la Sonda de Campeche, Golfo de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

McPherson B. F. 1969. Studies of the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. *Bulletin of Marine Science*, 19:194-213.



Monroy, L. M. & O. D. Solano. 2005. Estado poblacional de *Echinometra lucunter* (Echinoida: Echinometridae) y su fauna acompañante en el litoral rocoso del Caribe Colombiano *Rev. Biol. Trop* 53:291-297.

Morlán–Cahue, M. 2003. Determinación de metales pesados (Fe, Mn, Pb y Zn) en macroalgas clorofitas del Sistema Arrecifal Veracruzano. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 63 pp.

Nodarse A. 2001. Abundancia y distribución del erizo *Echinometra lucunter* (Linnaeus) en un arrecife del litoral Norte de Ciudad de La Habana. *Centro de Investigaciones Marinas*, 22(2):107-115.

NOM-FF-112-SCFI-2009. Productos de la Pesca-Gónada de erizo de mar fresco-Refrigerado-Especificaciones.

NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de diversas industrias.

Noriega–Escobar, E. 2001. Metales pesados en *Thalassia testudinum* (pasto marino) en el Sistema Arrecifal Veracruzano. Tesis Profesional Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, 48 pp.

Núñez-Nogueira, G. y Rainbow, P. S. 2005a. Kinetics of zinc uptake from solution, accumulation and excretion by the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine Biology*, 147: 93-103.

Núñez-Nogueira, G. y Rainbow, P. S. 2005b. Cadmium uptake and accumulation by the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine Environmental Research*, 60:339-354.



Páez, O. F., Botello, A.V. y Villanueva, S. 1986. Heavy metals in Coatzacoalcos estuary and Ostion Lagoon, México, *Marine Pollution Bulletin*, 17(11):516-519.

Páez-Osuna, F. 2005. Efectos de los metales, p. 343-360. *En*: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.

Páez-Osuna, F. 2005. Fuentes de Metales en la Zona Costera Marina, p. 329-342. *En*: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 pp.

Peña, Carlos E., Dean E. Carter and Felix Ayala-Fierro. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.

Phillips, D. J. F. 1980. Quantitative aquatic biological indicators. Applied Sciences, London.

Phillips, D. J. H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments-a review.

Pinsino A., Matranga V., Trinchella F., Roccheri M. C. 2010. Sea urchin embryos as an in vivo model for the assessment of manganese toxicity: development and stress response effects. *Ecotoxicology* 19:555-562.



Ponce-Vélez, G. y Botello A.V. 2006. Organic and inorganic pollutants in marine sediments from northern and southern continental shelf of the Gulf of Mexico. *International Journal of Environment and Pollution (IJEP)*, 26, Nos. 1/2/3.

Preston M. R. 2002. Endocrine-Disrupting Chemicals in Marine Environment. Pp. 309-323. *En: Chemistry of Marine Water and Sediments*. Gianguzza A., Pelizzetti E., Sammartano S. (Eds). Springer, 508 p.

Radenac G., Fichet D. y Miramand P. 2001. Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Marine Environmental Research* 51:151-166.

Rainbow, P.S. y Phillips, D.J. H. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, 26(11):593-601.

Rainbow P. S. 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International* 33:576-582.

Rivera-Ramírez, F. 2006. Determinación de metales traza (Cu, Ni, Pb, V y Fe) en agua de mar en dos especies de corales en el Arrecife Sacrificios del sistema arrecifal veracruzano (SAV). Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México, 105 pp.

Rosales, L., Carranza E. A., Sanvicente A. L., Alatorre M. M. A. y Rivera R. F., 2009. Distribution of Dissolved Trace Metals Around the Sacrificios Coral Reef Island, in the Southwestern Gulf of Mexico. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 83:713-719.



Saier B. 2001. Direct and indirect effects of seastars *Asterias rubens* on mussel beds (*Mytilus edulis*) in the Wadden Sea. *Journal of Sea Research* 46:29-42.

Samek O., Beddows D. C. S., Telle H. H. Kaiser J., Liska M., Caceres J. O. Gonzáles Urena A. 2001. Quantitative laser-induced break-down spectroscopy analysis of calcified tissue samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56:865-875.

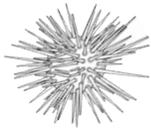
Samyappan K, Kumar P. S. y Sarojini N. 2007. Effect of heavy metal copper on the nutritive value in a freshwater field crab, *Spiralothelphusa hydrodroma*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3:775–781.

Sánchez–Pérez, L. 1994. Determinación de metales pesados en el coral pétreo *Madracis decactis* (Cnidaria: Scleractinia) en el arrecife el Verde, Veracruz. Tesis Profesional Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Schweitzer L. E., Bay S. M., Suffet I. H. 2000. Dietary assimilation of a polychlorinated biphenyl in adult sea urchins (*Lytechinus pictus*) and maternal transfer to their offspring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:1919-1924.

Segar D. A., Collins J. D., Riley J. 1971. The distribution of major and major some minor elements in marine animals. II Molluscs. *Journal Marine Biology Association U.K* 51:131-136.

Stebbing, A. R. D., Dethlefsen V., Thurberg F. 1992. Report on the ICES North Sea seagoing workshop. *Water Science & Technology* 24:21-23.



Stephan, C. E. 1977. Methods for Calculating an LC50. *In: American Society for Testing and Materials (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* pp. 65-84, F.L. Mayerand J.L. Hamelink, Editors. ASTM STP 534, Philadelphia, Pennsylvania.

Temara A., Ledent G., Warnau M., Paucot H., Jangoux M. y Dubois P. 1996. Experimental cadmium contamination of *Asterias rubens* (Echinodermata). *Marine Ecology Progress Series* 140:83-90.

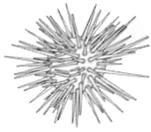
Temara A., Skei J. M., Gillan D., Warnau M., Jangoux M., Dubois P. 1998. Validation of the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) as a bioindicator of spatial and temporal trends of Pb, Cd and Zn contamination in the field. *Marine Environmental Research* 45:341-356.

Thebault H. 2005. The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5, The Mediterranean Sea, 345-359 pp.

Tovar, E., G. Horta-Puga y G. Agosta. 2000. Metales pesados en *Aplysia dactilomela* en dos arrecifes de Veracruz. *I Congreso Nacional de Arrecifes de Coral*. Veracruz, Veracruz, México. Del 28 de junio al 1° de julio. 63 p.

United Nations and United Nations Environment Programme. Regional Seas. 1985. GESAMP: Cadmium, lead and tin in the marine environment. UNEP Regional Seas Report and Studies No. 56. GESAMP Report and Studies No. 22, pp. 1-62.

US EPA. 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effects assessment and analysis. EPA, Washington (Report No EPA/630/R-96/012).



Vázquez, F.G., Sánchez, M., Alexander, H. y Delgado, D. 1991. Distribution of Ni and V and Petroleum hydrocarbons in recent sediments from the Veracruz coast, Mexico. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 46: 774-781.

Vázquez–Botello, A., Villanueva-Fragoso S. y Rosales-Hoz L., 2004. Distribución y contaminación de metales en el Golfo de México. Pp. 681-702. *En: Diagnóstico ambiental del Golfo de México*. M. Caso, I. Pisanty y E. Ezcurra (compiladores). Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), México. 1112 p.

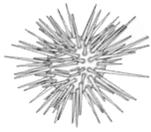
Villanueva F. S., Botello A. V., Páez-Osuna F. 1988. Evaluación de algunos metales pesados en organismos del río Coatzacoalcos y de la Laguna del Ostión, Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 4:19-31.

Villanueva, S y A.V. Botello. 1992. Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 8:47.61.

Villanueva-Estrada R.E. 2000. Evaluación de metales pesados en el área de las plataformas petroleras de la Bahía de Campeche. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar. ICMYL-UNAM.

Warnau M., Ledent G., Temara A., Bouquegneau J. M., Jangouxat M., Dubois F. 1995a. Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *Science of the Total Environment* 171:95-99.

Warnau M., Teyssie J. L., Fowler S. C. 1995b. Effect of feeding on cadmium bioaccumulation in the ehinoid *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Marine Ecology Progress Series* 126:305-309.



Warnau M., Teysse J. L. y Fowler S. W. 1997. Cadmium bioconcentration in the echinoid *Paracentrotus lividus*: Influence of the cadmium concentration in seawater. *Marine Environmental Research* 43:303-314.

Warnau M., Biondo R., Temara A., Bouquegneau J. M., Jangoux M., Dubois Ph. 1998. Distribution of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus* from the Mediterranean *Posidonia oceanica* ecosystem: Seasonal and geographical variations. *Journal of Sea Research* 39:267-280.

Whitfield M., Turner D. R. y Dickison A. G. 1981. Speciation of dissolved constituents in estuaries. *En: River inputs to ocean systems. Proceedings of UNESCO/IOC/UNEP Review Workshop, 16-19 March, 1979. Nueva York, United Nations, pp. 132-188.*

Wittman, G. 1979. Toxic metals, p. 3-70. *En: U. Förstner, y Wittman, G. J. W. (Eds.) Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.*

Wright D. A. y Welbourn P. 2001. *Environmental toxicology.* Cambridge University Press, New York.

Wu, J. P. y Cheng H. C. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*L. vannamei*). *Chemosphere*, 57:1591-1598.



## 11. ANEXOS

### 11.1 Anexo I. Resultados CL<sub>50</sub> de las pruebas Probit para la especie *E. lucunter*.

#### 11.1.1 Prueba de CL<sub>50</sub> para Cd.

Results calculated using the Probit Method.

Concentration ( MG/L )	Number Exposed	Number Dead	Percent Dead
6.9	8	8	100.0
2.5	8	7	87.5
2.3	8	7	87.5
2.2	8	7	87.5
2.1	8	6	75.0
2.0	8	6	75.0
1.9	8	6	75.0
1.8	8	0	0.0
1.7	8	0	0.0
Control	8	0	0.0

Iterations	G	H	Chi-Square	Probability
5	0.180	1.00	10.274	0.17
95% confidence limits				
	Slope =	20.73	11.93	29.53
	LC50 =	2.00	1.90	2.08
	LC1 =	1.54	1.25	1.69

#### 11.1.2 Prueba de CL<sub>50</sub> para Ni.

Results calculated using the Probit Method.

Concentration ( MG/L )	Number Exposed	Number Dead	Percent Dead
32.4	8	8	100.0
30.2	8	8	100.0
28.2	8	6	75.0
26.3	8	4	50.0
24.5	8	4	50.0
22.9	8	0	0.0
22.4	8	0	0.0
15.8	8	0	0.0
Control	8	0	0.0

Iterations	G	H	Chi-Square	Probability
5	0.180	1.00	4.570	0.60
95% confidence limits				
	Slope =	28.58	16.46	40.70
	LC50 =	25.93	24.90	27.06
	LC1 =	21.50	18.64	22.89



### 11.1.3 Prueba de CL<sub>50</sub> para Zn.

Results calculated using the Probit Method.

Concentration ( MG/L )	Number Exposed	Number Dead	Percent Dead
7.9	8	8	100.0
7.1	8	8	100.0
4.5	8	8	100.0
3.7	8	6	75.0
2.8	8	6	75.0
2.5	8	4	50.0
2.1	8	0	0.0
1.8	8	0	0.0
1.4	8	0	0.0
Control	8	0	0.0

Iterations	G	H	Chi-Square	Probability
5	0.209	1.00	6.302	0.51

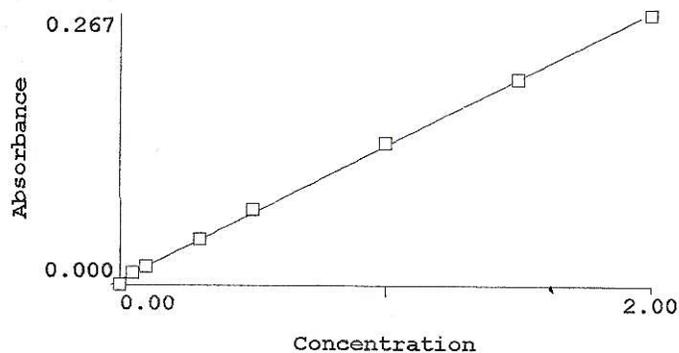
95% confidence limits

Slope =	10.27	5.57	14.97
LC50 =	2.75	2.46	3.12
LC1 =	1.63	1.05	1.95

## 11.2 Anexo II. Curvas de calibración de cada uno de los metales.

### 11.2.1 Curva de calibración para el Cd.

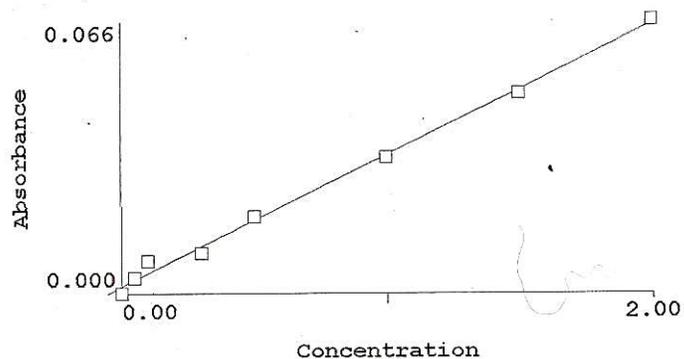
Correlation Coef.: 0.999656    Slope: 0.13215    Intercept: 0.00472





### 11.2.2 Curva de calibración para el Ni.

Correlation Coef.: 0.997958    Slope: 0.03169    Intercept: 0.00170



### 11.2.3 Curva de calibración para el Zn.

Correlation Coef.: 0.999897    Slope: 0.20828    Intercept: -0.00105

