



**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PLAGUICIDAS EN *Mytella strigata* DEL
ESTERO DE URÍAS, MAZATLÁN, SINALOA: EXPOSICIÓN *in situ*.”**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

M a e s t r a e n C i e n c i a s

(Biología Marina)

p r e s e n t a

BIOL. SUSANA ALEJANDRE GRIMALDO

Director de Tesis: DRA. CECILIA VANEGAS PÉREZ

Comité Tutorial: DRA. LUZ MARÍA GARCÍA DE LA PARRA

DR. GILBERTO DÍAZ GONZÁLEZ

DR. MIGUEL BETANCOURT LOZANO

DR. RENÉ CARDENAS VÁZQUEZ

México D. F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección de la Dra. Cecilia Vanegas Pérez y con apoyo del Proyecto PAPIIT IN238704, 2004; IN 206305, 2005-2006. UNAM.

¡Este es el fruto del esfuerzo de varias personas importantes en mi vida a quien quiero dedicárselo!

Mi esposo Víctor, con quien comparto mis alegrías, anhelos, dudas, e incluso mis temores....a ti corazón por ser mi apoyo en todo momento, por sufrir y gozar conmigo las maravillas de vivir.

A mis padres por seguir siendo mis guías en el andar de la vida, por sus consejos y apoyo incondicional en todo momento.

A mis hermanos y sus familias, por compartir conmigo los gratos momentos y por contar con ustedes en todo momento.

La vida es un continuo aprender y siempre está llena de retos por alcanzar, que hay que disfrutar al máximo cuando se logran las metas que uno desea.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez por haber confiado en mí, por brindarme su apoyo y consejo en todo momento. Por sus palabras de aliento en los momentos en los que los necesite y sobre todo por su amistad. ¡Muchas gracias!

A los miembros de mi comité tutorial y del sínodo:

A la Dra. Luz María García de la Parra, por sus atinadas observaciones para el desarrollo de ésta tesis; al Dr. Gilberto Díaz González, por sus comentarios y sugerencias a lo largo de la maestría; al Dr. Miguel Betancourt Lozano, por sus sugerencias en la parte del análisis estadísticos, así como por sus valiosos comentarios que me permitieron enriquecer el presente trabajo; y al Dr. René Cárdenas Vázquez, por sus sugerencias en los cálculos de la parte bioquímica y sus comentarios en el trabajo final.

A CONACYT y DGEP (UNAM), por la beca brindada para realizar mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD), por brindarnos la infraestructura necesaria para la realización del trabajo *in situ*, en especial al laboratorio de Ecotoxicología por ayudarnos en la toma de datos, en el montaje de los experimentos, por desvelarse con nosotros durante los experimentos y por hacernos grata la estancia en Mazatlán. ¡Muchas gracias!

A los laboratorios abc, por el análisis de los plaguicidas organofosforados, así como a la M. en C. Guadalupe Ponce Vélez, por la determinación de los plaguicidas organoclorados.

A Sebastián y Luz por todo su apoyo durante las jornadas de trabajo en Mazatlán, así como las realizadas en el laboratorio, desde el montaje y estandarización de las técnicas, hasta el intercambio de literatura para discutir los problemas o resultados obtenidos. A Lindsay y Cesar, por su ayuda durante la colecta, toma de datos merísticos y disección de los mejillones.

Al señor Polo por ser nuestro guía en la selección de los sitios de muestreo y por acompañarnos durante las colectas de los organismos.

A la Dra. Cecilia Robles Mendoza, por sus porras, comentarios y sugerencias en la parte final de mi trabajo. Así como a Araceli, Xerezada y Karla por los ratos gratos en el laboratorio.

A la Unidad de Análisis Ambiental, por permitirme utilizar sus instalaciones para el almacenamiento y la preparación de las muestras para la determinación de plaguicidas. En particular a Manuel por mostrar siempre interés en ofrecernos las mejores condiciones laborales.

A los coordinadores del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, al Dr. Martín Merino y la Dra. Gloria Villaclara, por su apoyo brindado durante mi estancia como alumna. Así como al personal administrativo, Gaby, Chantal, Lupita y Diana, muchas gracias por todo su apoyo en los trámites.

INDICE

| | Pág. |
|--|------|
| Resumen | |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Biomarcadores | 3 |
| 1.1.1. Biomarcadores de Exposición | 5 |
| A. Esterasas | 5 |
| B. EROD | 9 |
| 1.1.2. Biomarcadores de Efecto | 11 |
| 1.1.2.1. Nivel sub-organismo | 11 |
| A. FRAP | 11 |
| B. Estabilidad lisosomal | 13 |
| C. Proteínas | 14 |
| 1.1.2.2. Nivel organismo | 16 |
| A. Consumo de oxígeno | 16 |
| B. Excreción nitrogenada | 18 |
| C. Razón atómica O:N | 19 |
| 2. Sitio de estudio | 21 |
| 3. Especie de estudio | 23 |
| 4. Antecedentes | 26 |
| 5. Hipótesis | 31 |
| 6. Objetivos | 31 |
| 7. Materiales y métodos | 33 |
| 7.1. Selección de los sitios de estudio en el Estero de Urías | 33 |
| 7.2. Registro de parámetros fisicoquímicos y colecta de muestras | 34 |
| 7.3. Evaluación de biomarcadores | 35 |
| 7.3.1. Biomarcadores de Exposición | 35 |
| A. Esterasas | 35 |
| B. EROD | 37 |
| 7.3.2. Biomarcadores de Efecto | 39 |
| 7.3.2.1. Nivel sub-organismo | 39 |
| A. FRAP | 39 |
| B. Estabilidad lisosomal | 39 |
| C. Proteínas | 40 |
| 7.3.2.2. Nivel organismo | 41 |
| A. Consumo de oxígeno | 41 |
| B. Excreción nitrogenada | 42 |
| C. Razón atómica O:N | 43 |
| 7.4. Cuantificación de tóxicos | 44 |
| 7.5. Análisis estadístico | 44 |
| 8. Resultados | 46 |
| 8.1. Parámetros fisicoquímicos | 46 |
| 8.2. Evaluación de biomarcadores | 46 |
| 8.2.1. Biomarcadores de Exposición | 46 |
| A. Esterasas | 46 |
| B. EROD | 50 |
| 8.2.2. Biomarcadores de Efecto | 51 |
| 8.2.2.1. Nivel sub-organismo | 51 |
| A. FRAP | 52 |
| B. Estabilidad lisosomal | 52 |
| C. Proteínas | 53 |

| | |
|------------------------------------|------|
| | Pág. |
| 8.2.2.2. Nivel organismo | 55 |
| A. Consumo de oxígeno | 55 |
| B. Excreción nitrogenada | 57 |
| C. Razón atómica O:N | 57 |
| 8.3. Cuantificación de tóxicos | 57 |
| 8.3.1. Organoclorados | 57 |
| 8.3.2. Organofosforados | 60 |
| 8.4. Relaciones de causalidad | 62 |
| 9. Discusión | 66 |
| 9.1. Cuantificación de tóxicos | 66 |
| 9.2. Respuestas biológicas | 71 |
| 9.2.1. Biomarcadores de Exposición | 72 |
| 9.2.2. Biomarcadores de Efecto | 77 |
| 10. Conclusiones | 87 |
| 11. Recomendaciones | 89 |
| 12. Literatura citada | 90 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Fig. 1. Esquema de la sinapsis colinérgica. | 5 |
| Fig. 2. Esquema que representa la hidrólisis de la acetilcolinesterasa. Izquierda: hidrólisis normal. Derecha: inhibición por la presencia de un organofosforado (paraoxón). | 7 |
| Fig. 3. Efecto de estrés en los lisosomas. | 14 |
| Fig. 4. Área de estudio. Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. Los círculos rojos señalan las estaciones de muestreo. | 33 |
| Fig. 5. Representación de la evaluación de la actividad EROD. | 38 |
| Fig. 6. Sistema respirométrico de flujo regulado y semi-continuo. | 42 |
| Fig. 7. Actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa en hemolinfa (A) y músculo (B) y Carboxilesterasa en hemolinfa (C) y músculo (D), (nmoles sustrato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) de <i>M. strigata</i> proveniente de los diferentes sitios de estudio y evaluada durante la época de lluvias y de secas. | 48 |
| Fig. 8. Actividad EROD (pmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) en la glándula digestiva de <i>M. strigata</i> de los diferentes sitios de captura y en la época de lluvias y secas. | 51 |
| Fig. 9. FRAP (A. Incremento relativo, %) y Estabilidad Lisosomal (B. DO, $\text{mg}^{-1} \text{ml}^{-1}$ prot.) en la hemolinfa de <i>M. strigata</i> provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados durante la época de lluvias y de secas. | 52 |
| Fig. 10. Concentración de proteína total soluble (mg ml^{-1}) en hemolinfa (A), en músculo (B) é Índice proteico (C) en <i>Mytella strigata</i> provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados en las épocas de lluvias y secas. | 54 |
| Fig. 11. Consumo de oxígeno (A), ($\text{mg O}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS), excreción nitrogenada (B), ($\text{mg N-AT h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS) y relación O:N (C) de <i>Mytella strigata</i> provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados durante la época de lluvias y secas. | 56 |
| Fig. 12. Niveles totales de organoclorados (ng g^{-1} PS) evaluados en sedimento ■ y en <i>M. strigata</i> □, en la época de lluvias y secas. | 60 |
| Fig. 13. Niveles totales de los organofosforados (ng g^{-1} PS) evaluados en <i>M. strigata</i> , en época de lluvias y secas. | 61 |
| Fig.14. Relaciones entre la bioacumulación de plaguicidas OFs y los biomarcadores de exposición evaluados en <i>M. strigata</i> en las dos épocas del año; AChE en Hemolinfa (A), CbE en Músculo, (B) y CbE en Hemolinfa (C). | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo en las dos épocas climáticas. | 46 |
| Tabla 2. Actividad enzimática específica (nmoles sustrato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) y actividad total ($\mu\text{moles sustrato min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ó g^{-1}) de esterasas (Acetilcolinesterasa y Carboxilesterasa) en la hemolinfa y el músculo de <i>Mytella strigata</i> proveniente de los diferentes sitios de captura y evaluados durante la época de lluvias y de secas. | 47 |
| Tabla 3. Actividad ERDO (pmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) en glándula digestiva de <i>M. strigata</i> provenientes de los diferentes sitios de captura durante la época de lluvias y de secas. | 50 |
| Tabla 4. Concentración de proteína total soluble en hemolinfa y en músculo (mg ml^{-1}), Índice proteico, FRAP (Incremento relativo %) y Estabilidad lisosomal ($\text{DO mg}^{-1} \text{ml}^{-1}$ prot) en <i>Mytella strigata</i> provenientes de los diferentes sitios de estudio. | 51 |
| Tabla 5. Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS; $\text{cal h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS); excreción nitrogenada ($\text{mg N-AT h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS; $\text{cal N-AT h}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS) y relación O:N de <i>Mytella strigata</i> provenientes de los diferentes sitios de estudio. | 55 |
| Tabla 6. Plaguicidas organoclorados (ng g^{-1} PS) en sedimentos superficiales de los sitios de muestreo en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, durante las épocas de lluvias y de secas. | 58 |
| Tabla 7. Plaguicidas organoclorados (ng g^{-1} PS) de <i>Mytella strigata</i> en los sitios de muestreo en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, correspondiente a la época de lluvias y de secas. | 59 |
| Tabla 8. Plaguicidas organofosforados (ng g^{-1} PS) de <i>Mytella strigata</i> en los sitios de muestreo en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, correspondiente a la época de lluvias y de secas. | 62 |
| Tabla 9. Matriz de correlación de Pearson, entre los plaguicidas organoclorados en sedimento y los plaguicidas bioacumulados en <i>M. strigata</i> . | 63 |
| Tabla 10. Matriz de correlación de Pearson, entre la bioacumulación de plaguicidas OFs en <i>M. strigata</i> y los biomarcadores evaluados. | 65 |
| Tabla 11. Matriz de correlación de Pearson, entre la bioacumulación de plaguicidas OCs en <i>M. strigata</i> y los biomarcadores evaluados. | 65 |
| Tabla 12. Criterios de calidad en sedimentos marinos y toxicidad en la biota acuática, de plaguicidas organoclorados. | 68 |
| Tabla 13. Actividad de la AChE reportada en diversas especies de bivalvos expuestos a plaguicidas. | 74 |
| Tabla 14. Actividad de la CbE reportada en diversas especies de bivalvos expuestos a plaguicidas. | 75 |
| Tabla 15. Actividad enzimática de EROD, en bivalvos expuestos a plaguicidas. | 77 |

RESUMEN

El Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, recibe el aporte de diversos contaminantes de origen antropogénico entre ellos los plaguicidas organoclorados (OCs) y organofosforados (OFs). La evaluación *in situ* del efecto tóxico de estos contaminantes sobre la biota del sistema, aunado al análisis químico de la bioacumulación de los contaminantes, aporta información valiosa sobre los escenarios reales de exposición de los organismos. En el presente trabajo se evaluaron en dos periodos climáticos (secas y lluvias) el posible efecto de la exposición *in situ* a los plaguicidas organofosforados y organoclorados (OFs y OCs) en el mejillón *Mytella strigata* (bivalvo residente y de amplia distribución) en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, mediante la utilización de múltiples biomarcadores de exposición y de efecto. Se valoraron como biomarcadores de exposición a los plaguicidas OFs y OCs, la actividad enzimática de las esterasas (Acetilcolinesterasa y Carboxilesterasa) en el músculo y la hemolinfa, así como la actividad EROD en la glándula digestiva de los mejillones, respectivamente. Como biomarcadores del efecto tóxico de los plaguicidas, se evaluaron diversas respuestas biológicas a nivel sub-organismo (Potencial antioxidante reductor del Fe; FRAP, por sus siglas en inglés), Estabilidad lisosomal, Proteínas e Índice proteico) y a nivel organismo (consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y razón atómica O:N). Adicionalmente se cuantificaron las concentraciones de los plaguicidas OFs en agua, sedimento y organismo y de OCs en sedimento y organismo. No se detectaron OFs en agua, ni en sedimento. La bioacumulación de los plaguicidas presentó un comportamiento diferencial, estacional; la mayor acumulación corporal de OCs fue en la época de lluvias mientras que para los OFs fue en la época de secas y cuyos niveles fueron de dos órdenes de magnitud mayores que los OCs. No se observaron relaciones de causalidad entre los plaguicidas OCs y OFs bioacumulados y los cuantificados en sedimentos. Las elevadas concentraciones de los plaguicidas OFs y OCs detectadas en sedimentos y organismos sugiere que éstos xenobióticos representan un riesgo para las poblaciones de *Mytella strigata* y para la biota del sistema.

Los resultados obtenidos denotan que durante la época de secas los organismos están sujetos a un mayor estrés ambiental siendo los mejillones provenientes de Castillo los que presentan un mayor deterioro tanto a nivel bioquímico como fisiológico. De acuerdo a lo esperado, los resultados obtenidos de las respuestas biológicas evaluadas permiten afirmar que las esterasas son un biomarcador adecuado para valorar la exposición *in situ* de plaguicidas organofosforados en los mejillones; en contraste, la actividad EROD no representa un biomarcador de exposición adecuado a los OCs. Las alteraciones observadas en los biomarcadores de efecto, tanto a nivel sub-organismo como organismo, no se correlacionaron

con la bioacumulación de los plaguicidas y por lo tanto, de manera individual, no son indicadores biológicos adecuados del efecto tóxico de los plaguicidas OCs y OFs. Sin embargo, la integración de los resultados obtenidos sugiere una marcada diferenciación entre las épocas, así como entre estaciones, que pueden estar relacionados con la variación espacio-temporal en un escenario de contaminación tan complejo como es el Estero de Urías. Se concluye que el enfoque de la evaluación de biomarcadores múltiples en conjunción con el análisis químico de los contaminantes es fundamental para establecer el riesgo potencial por efecto de los contaminantes en la biota de los sistemas lagunares-estuarinos.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes lagunares-estuarinos se han constituido en sitios de depósito de contaminantes de origen antropogénico, los cuales ingresan por descargas directas de los ríos, efluentes urbanos e industriales, escurrimientos agrícolas y precipitación atmosférica, entre otros. Los aportes que reciben estos sistemas incluyen metales pesados y diversos compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), plaguicidas organoclorados (OCs) y organofosforados (OFs), bifenilos policlorados (PCBs) y carbamatos (CBs) (Méndez *et al.*, 1990; Kennish, 1992; Galindo *et al.*, 1999; Ruelas-Insunza y Páez-Osuna, 2000). Estos ecosistemas costeros están sujetos gradualmente y de manera crónica a impactos significativos y a la degradación de los mismos.

Dentro de los contaminantes orgánicos destacan los plaguicidas organoclorados, carbamatos y organofosforados. Los dos últimos son actualmente los de mayor utilización en todo el mundo y prácticamente han sustituido a los plaguicidas organoclorados. La ventaja de los OFs sobre los OCS es que los primeros son menos persistentes en el ambiente (Catalogo oficial de plaguicidas, 2004). No obstante, numerosos OFs presentan una toxicidad aguda y crónica elevada en peces e invertebrados acuáticos; algunos de ellos son más persistentes de lo esperado y en algunas ocasiones los productos de degradación son más tóxicos que el compuesto original (Detra y Collins, 1991).

El aporte y el depósito de los contaminantes en las zonas costeras pueden variar estacional y temporalmente y depende de diversos factores ambientales como las corrientes de agua, la topografía, los cambios en la temperatura y la salinidad, la tasa de sedimentación, las características de los sedimentos y las partículas en suspensión, entre otros, lo que a su vez determina la biodisponibilidad de los contaminantes para los organismos. Una vez que la biota ha asimilado estos contaminantes, entra en juego su capacidad para biotransformarlos, acumularlos en formas no tóxicas en los tejidos, desintoxicarlos y/o eliminarlos (Kennish, 1992).

Los efectos de los tóxicos ambientales pueden manifestarse biológicamente a diferentes niveles de organización, desde los niveles subcelulares, hasta el nivel de población, comunidad y ecosistema, cambios que pueden ser cruciales a largo tiempo en la estabilidad de las poblaciones así como en la dinámica de los ecosistemas. Cuando los ecosistemas costeros, por la afectación en la biota, llegan a presentar modificaciones en su dinámica, las evaluaciones de

las alteraciones bioquímicas, fisiológicas y conductuales en los organismos, pueden ser útiles en el monitoreo del efecto de los contaminantes (Kennish, 1992).

La evaluación del efecto tóxico de los contaminantes sobre los organismos permite evaluar y valorar el grado de afectación así como las probables repercusiones en un ambiente, y proponer posibles soluciones, estos estudios se han llevado a cabo tanto en laboratorio como en el campo. No obstante, la mayoría de las evaluaciones en el campo e *in situ* se han efectuado en sistemas templados cuyo comportamiento no es aplicable a los sistemas tropicales costeros de México (Bourdeau *et al.*, 1989; Lacher y Goldstein, 1997). En nuestros sistemas costeros es amplio el desconocimiento del efecto tóxico de los contaminantes sobre los organismos, su alteración biológica y la implicación de las perturbaciones sobre las poblaciones y los ecosistemas, así como el impacto que podría causar al hombre.

En los sistemas acuáticos, los mejillones se han utilizado mundialmente como organismos centinelas para evaluar el estado de perturbación del ambiente (Villanueva *et al.*, 1999; Galloway *et al.*, 2002a). Fue Goldberg en 1975, quien propuso establecer un programa de monitoreo llamado "Mussel watch" (mejillón centinela) para evaluar las direcciones espaciales y temporales de contaminantes químicos en estuarios y áreas costeras del Norte de América, utilizando a los mejillones como monitores ambientales. Actualmente este programa se ha extendido a nivel mundial evaluándose, en conjunción con los organismos, las matrices ambientales relacionadas a su hábitat tales como la columna de agua y los sedimentos.

Los mejillones presentan diversas ventajas que han sustentado su utilidad para evaluar el impacto de los contaminantes en los ambientes acuáticos y particularmente en los costeros:

- Son especies dominantes en sistemas costeros y estuarinos y tienen una amplia distribución geográfica, lo que proporciona ventajas al efectuar comparaciones (Koehn, 1991; Widdows y Donkin, 1992).
- Son sedentarios, por lo que incorporan los contaminantes del área donde se ubican, en contraste con las especies móviles en donde no es posible asegurar que la incorporación de contaminantes sea de una zona específica. Particularmente, los bivalvos se han definido como especies que acumulan contaminantes traza en sus tejidos revelando esencialmente la fracción que existe en el ambiente, lo cual puede ser de relevancia ecotoxicológica (Blackmore *et al.*, 1998).

- Son tolerantes a un intervalo amplio de condiciones ambientales y de contaminantes (Widdows y Donkin, 1992).
- Son organismos filtradores con bajas tasas de biotransformación, lo cual implica que acumulen contaminantes inorgánicos y orgánicos. Lo anterior determina que sean bioindicadores ideales de la presencia de tóxicos persistentes como los plaguicidas (Galloway *et al.*, 2002a).
- Son longevos; en ambientes templados llegan a vivir hasta 20 años, sin la presencia de disturbios, lo que permite la realización de estudios a largo plazo (Thompson, 1980).
- Son especies de importancia económica y son de interés para la salud pública (Widdows y Donkin, 1992).

El presente proyecto de investigación se enfoca a la evaluación de los efectos biológicos adversos de tóxicos ambientales, particularmente de plaguicidas organofosforados y organoclorados, de amplia utilización en la zona costera en estudio. Para ello se abordó el estudio en el mejillón *Mytella strigata*, bivalvo residente y de amplia distribución en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, y se evaluaron los efectos biológicos a través de un enfoque que integra biomarcadores de la exposición y del efecto de los plaguicidas.

1.1. BIOMARCADORES

Los biomarcadores son respuestas biológicas tempranas que permiten la evaluación a nivel sub-organismo (molecular, celular, bioquímico), organismo (fisiológico, conductual, histológico) y supraorganismo (población, comunidad) del efecto adverso de estresores ambientales incluidos los contaminantes (Adams, 1990; Depledge, 1994; Jamil, 2001; Beliaeff y Burgeot, 2002; Forbes *et al.*, 2006). De manera ideal, los biomarcadores deben de establecer la relación entre la concentración de los contaminantes (causa) y sus efectos nocivos; de esta manera dan una respuesta temprana del efecto del(os) contaminante(s) sobre la biota, lo que permitiría predecir los cambios y/o alteraciones en niveles mayores de organización biológica (Forbes *et al.*, 2006). De tal manera, los biomarcadores pueden ser herramientas de gran utilidad en el biomonitoreo y en la evaluación del riesgo ecológico a fin de detectar, explicar y/o predecir impactos químicos adversos sobre las poblaciones, las comunidades y los ecosistemas (Forbes *et al.*, 2006).

Acorde a Jamil (2001), los biomarcadores han sido clasificados en tres categorías:

- A) *Biomarcadores de exposición*: Indican la presencia y el efecto de uno o varios contaminantes en el organismo a través de respuestas que incorporan propiedades farmacodinámicas en los individuos y propiedades fisicoquímicas del tóxico. De tal manera, aportan información de los mecanismos de toxicidad involucrados y presentan una cierta especificidad relacionada con los mecanismos de acción particulares de los tóxicos (Lagadic *et al.*, 2000; Jamil, 2001; Forbes *et al.*, 2006). Así la actividad enzimática de las esterasas (ej. acetilcolinesterasa y carboxilesterasa) se utilizan ampliamente como biomarcadores de exposición a los plaguicidas organofosforados (OFs) y carbamatos (CBs); la actividad EROD (etoxiresorufin-o-desetilasa) se utiliza ampliamente como biomarcador de exposición a los bifenilos policlorados (PCBs) y a los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs); las metalotioneínas a la exposición a los metales pesados y; los aductos de DNA a la exposición a agentes alcalinos (Hyne y Maher, 2003).
- B) *Biomarcadores de efecto*: Son respuestas biológicas a nivel sub-organismo, organismo y supra-organismo, que revelan el riesgo del efecto tóxico a largo plazo y dan cuenta de las alteraciones en las respuestas medidas a diferentes niveles de organización biológica, si bien no son específicos de la presencia y/o exposición de tóxicos particulares (Lagadic *et al.*, 2000; Jamil, 2001). Algunos ejemplos de estos biomarcadores incluyen la evaluación a nivel celular de la estabilidad lisosomal y del estrés oxidativo así como de diversas tasas fisiológicas como el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada, la tasa cardíaca y el campo de crecimiento (Adams, 2005; Shiedek *et al.*, 2006).
- C) *Biomarcadores de sensibilidad individual*. Son respuestas que indican la existencia de una diferente sensibilidad a un tóxico en una parte de la población, como el marcador de resistencia genética a los tóxicos (Jamil, 2001). Este último tipo de biomarcador frecuentemente se asocia a la prevención de las enfermedades específicamente en humanos (Nacional Research Council, 1987; citado en Schlenk, 1999).

En las evaluaciones del impacto por contaminantes en los ecosistemas, es importante integrar una batería de diferentes tipos de biomarcadores que aporten información a diferentes niveles de organización biológica a fin de identificar la "salud" de un ecosistema (Roy *et al.*, 1996). Según Lafontaine *et al.* (2000), la acumulación de pruebas en la evaluación de impactos por contaminación incrementa la confianza en la interpretación de los resultados y las posibles

relaciones de causalidad. Baršienė *et al.* (2006) afirman que la evaluación de biomarcadores múltiples son una herramienta valiosa para la identificación del potencial riesgo de contaminación ambiental. Es importante que en este tipo de evaluaciones se cuantifique la bioacumulación de los contaminantes en los organismos, así como los niveles en agua y sedimento para obtener una información más completa del ecosistema y su nivel de contaminación.

En el presente estudio, la evaluación de los efectos biológicos de la contaminación en campo e *in situ* en el bivalvo *Mytella strigata* se abordó a través de una propuesta de biomarcadores múltiples, tanto de exposición como de efecto, los cuales se detallan a continuación. Cabe destacar que en este estudio, la evaluación *in situ* se refiere al análisis de las matrices ambientales del agua, del sedimento y de los organismos indígenas en su sitio de distribución natural.

1.1.1. Biomarcadores de Exposición:

A. Esterasas

En vertebrados, la acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor y un mediador químico responsable de la transmisión del impulso nervioso desde las neuronas preganglionares hasta las postganglionares del sistema nervioso simpático y parasimpático, desde las fibras parasimpáticas postganglionares hasta los órganos efectores, así como de nervios motores de músculos esqueléticos (Carlock *et al.*, 1999).

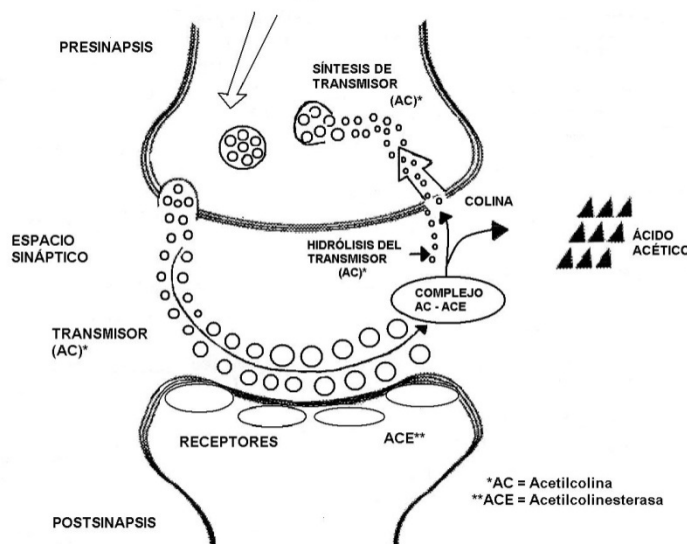


Fig. 1. Esquema de la sinapsis colinérgica (tomado de Tejedor, 2006).

Las neuronas colinérgicas sintetizan acetilcolina, la cual es empaquetada en vesículas sinápticas. Sobre la terminal de despolarización, las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana plasmática y liberan la acetilcolina dentro de la fisura sináptica, para facilitar la generación y propagación del impulso nervioso (Fig. 1) (Jamil, 2001; Pope *et al.*, 2005).

La Acetilcolinesterasa (AChE) en vertebrados, esta presente en la superficie de las células post-sinápticas e inactiva muy rápidamente e hidroliza a la acetilcolina (ACh) generando ácido acético -el cual se va al torrente sanguíneo- y colina, que regresa a la célula presináptica (Landis y Yu, 1999; Jamil, 2001; Pope *et al.*, 2005). La acetilcolinesterasa tiene un sitio activo con diferentes regiones, una región aniónica donde tiene un grupo glutamilo y una región estérica donde se encuentra la serina. Normalmente la acetilcolina es degradada por el enlace inicial de la acetilcolina a la región serina, la cual dona un protón y se libera la parte colina. Con la adición de una molécula de agua, la serina recupera su protón, por lo que es reactivada, y se libera el grupo acetil del sitio activo (Fig. 2) (Landis y Yu, 1999).

La inhibición de la acetilcolinesterasa por presencia de los plaguicidas organofosforados ha sido utilizada como un biomarcador de neurotoxicidad. El organofosforado es capaz de entrar al sitio activo y unirse a la serina (Fig. 2) proceso que involucra dos pasos (Landis y Yu, 1999):

- 1.- Formación de un enlace fosfoéster entre la serina y el fosfato y pérdida de un nitrofenol, fluoruro u otro grupo, reacción que es reversible.
- 2.- Formación de un enlace irreversible entre el carboxilo de un residuo glutamilo de la acetilcolinesterasa y el fosfato del organofosforado que está interactuando con la serina. La enzima fosforilada producida no tiene actividad, por lo que no puede hidrolizar el sustrato natural, acetilcolina.

La inhibición de la AChE induce la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis y aumenta la estimulación de los receptores colinérgicos postsinápticos, alterando el sistema nervioso y muscular. Los plaguicidas organofosforados inhiben la AChE irreversiblemente, mientras que los carbamatos la inhiben reversiblemente (Pope *et al.*, 2005).

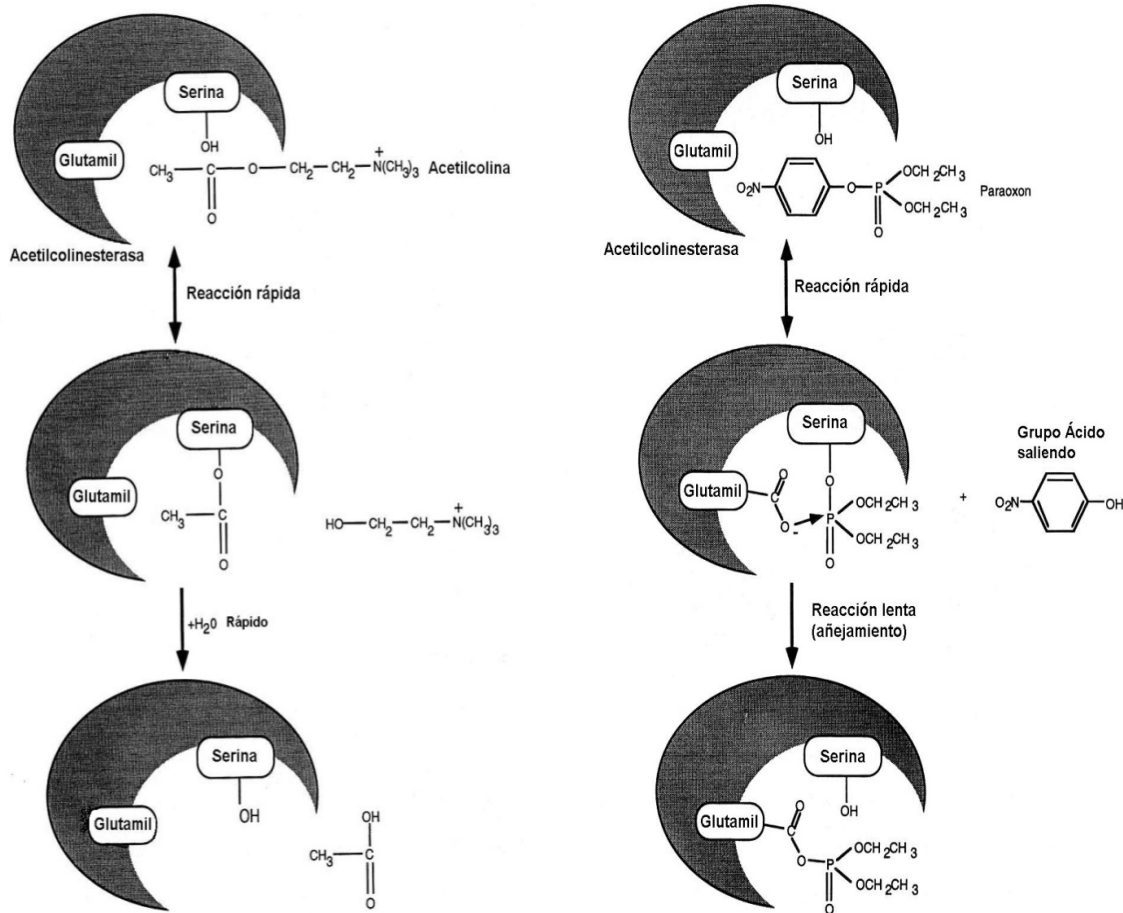


Fig. 2. Esquema que representa la hidrólisis de la acetilcolinesterasa. Izquierda: hidrólisis normal. Derecha: inhibición por la presencia de un organofosforado (paraoxon) (tomado de Landis y Yu, 1999).

En muchos invertebrados, se han reportado esterasas solubles en la hemolinfa las cuales son capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos de alcoholes, alcoholes amino y fenoles (Bocquene *et al.*, 1990, Canty *et al.*, 2007). Según Canty *et al.* (2007) la acetilcolinesterasa que se encuentra en la hemolinfa de *Mytilus edulis*, es una proteína globular hexamérica muy similar en los patrones de sustrato y especificidad inhibitoria de las acetilcolinesterasas purificadas de sistemas nerviosos de invertebrados y vertebrados, la cual no parece estar relacionada con funciones neurológicas y parece desempeñar un papel de protección, quizás controlando la elaboración de acetilcolina en los fluidos del cuerpo, ó como lo sugiere Soreq y Seidman (2001), puede funcionar como un factor de crecimiento. La inhibición de estas enzimas periféricas por organofosforados provee sin embargo un método conveniente, no destructivo, de monitoreo de

exposición a plaguicidas en bivalvos y ha sido ampliamente implementado por agencias regulatorias (Rickwood y Galloway, 2004).

En el mejillón *Mytilus galloprovincialis* la mayor actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se reporta en la hemolinfa, comparada con la evaluada en branquia, glándula digestiva y el complejo del manto y la gónada (Dailianis *et al.*, 2003). De manera similar, en *Mytilus edulis*, la mayor actividad se reporta también en la hemolinfa (Galloway *et al.*, 2002b; Canty *et al.*, 2007). Para el caso de la actividad de la carboxilesterasa (CbE) su actividad es más elevada en el organismo completo (tejido homogeneizado) tanto en *Mytilus edulis*, (Galloway *et al.*, 2002b) como en el bivalvo *Corbicula fluminea* (Basack *et al.*, 1998).

Diversos estudios han utilizado la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) como un biomarcador de exposición a organofosforados en bivalvos (Escartin y Porte, 1997; Basack *et al.*, 1998; Canty *et al.*, 2007). Binelli *et al.* (2005) reportan inhibiciones del 66% en ésta enzima en el tejido suave del mejillón cebra, *Dreissena polymorpha*, en una evaluación *in situ* en los grandes lagos Italianos en los que se registraron altas concentraciones de plaguicidas organofosforados, clorpirifos y clorpirifos oxon. En la hemolinfa de *Mytilus edulis* se reporta la inhibición enzimática del 18% por la exposición tanto al malatión (Lehtonen y Leiniö, 2003) como a 1 mM de paraoxón (Galloway *et al.*, 2002b). En la misma especie, Canty *et al.* (2007) registran una reducción en la AChE en hemolinfa del 80% a las 24 h de exposición a $100\mu\text{g l}^{-1}$ de azametifos. De manera similar, se han registrado inhibiciones hasta del 50% en la AChE tanto en la branquia como en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* por la exposición a 10^{-6} M de eserina (Escartín y Porte, 1997).

Otras esterasas frecuentemente afectadas por inhibidores de la colinesterasa, son la butirilcolinesterasa y la carboxilcolinesterasa, funcionalmente importantes en la desintoxicación hidrolítica de algunos OFs, al desempeñar un rol adicional de protección como sitios alternativos de enlace con OFs y su fosforilación (Jokanovic *et al.*, 1996, citado en Rickwood y Galloway, 2004). Si bien la inhibición de las esterasas frecuentemente se ha asociado con el efecto adverso de los plaguicidas organofosforados, estudios recientes han demostrado que su actividad puede ser alterada por numerosos contaminantes como metales pesados en evaluaciones *in vivo* e *in vitro* (Herbert *et al.*, 1995), detergentes determinados *in vitro* (Guilhermino *et al.*, 1998), así como por componentes de mezclas complejas de contaminantes evaluadas en campo (Payne *et al.*, 1996).

B. Actividad EROD (Etoxiresorufin-o-desetilasa)

La biotransformación de xenobióticos se realiza básicamente en 2 fases (Orellana y Guajardo, 2004) en las cuales se incrementa la solubilidad de los compuestos en el agua facilitando así su excreción y/o eliminación del organismo (Winters, 1993):

1. Una primera fase catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo p450.
2. Una segunda fase en la cual participan transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena y polar.

El sistema de las monooxigenasas, que forma parte de la primera fase de biotransformación de xenobióticos, es un complejo multienzimático cuya oxidasa final es una hemoproteína denominada citocromo p450. Esta se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico liso del hígado o glándula digestiva de los organismos (Goeptar *et al.*, 1995) y participa en el metabolismo de sustratos endógenos como el colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos (Capdevila *et al.*, 2002). A la vez, participa en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, plaguicidas, PAHs, dioxinas, PCBs, procarcinógenos y anestésicos, entre otros (Goeptar *et al.*, 1995; Jamil, 2001). Esta hemoproteína en su forma reducida y unida a monóxido de carbono, presenta un máximo de absorbancia a los 450 nm (Omura y Sato, 1964).

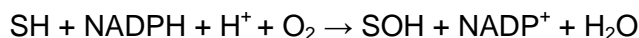
En la segunda fase de la biotransformación de xenobióticos, los compuestos hidroxilados y otros producidos en la fase uno, se convierten por acción de enzimas específicas en varios metabolitos polares, por conjugación con ácido glucorónico, sulfato, acetato, glutatión o ciertos aminoácidos o por metilación; éstas reacciones están catalizadas por enzimas presentes en la fracción del citosol celular; existen por lo menos cinco tipos de reacciones en ésta fase (Murray *et al.*, 1992):

1. Glucoronidación: donación de un radical glucorónico que se adhiere al oxígeno, nitrógeno o grupo sulfuro de los sustratos.
2. Sulfatación: se dona un grupo sulfato a alcoholes, arilaminas, fenoles, entre otros.
3. Conjugación con glutatión: las enzimas que catalizan estas reacciones son la glutatión-S-transferasas.
4. Acetilación: el Acetil-CoA dona el grupo acetilo al xenobiótico.
5. Metilación: donde la S-adenosilmetionina sirve como donadora de metilos al xenobiótico.

La mayoría de las reacciones catalizadas por las monooxigenasas dependientes del citocromo p450 (que forma parte de la fase uno de la biotransformación de xenobióticos), involucran varias posibilidades químicas (Josephy *et al.*, 1997):

1. Hidroxilación: reemplazo del hidrógeno por un hidroxilo.
2. Epoxidación: adición de un oxígeno a un enlace π carbono-carbono.
3. Oxidación hetero-átomo: adición de un oxígeno a un sólo par de electrones en un nitrógeno, azufre u otro heteroátomo.
4. Reducción: generalmente observada solamente cuando el suministro de oxígeno molecular es limitado y cuando un aceptor de electrones está disponible.

El ciclo catalítico del citocromo p450 comienza por la incorporación del xenobiótico al centro catalítico de la enzima que en ese momento tiene el átomo de Fe^{+3} oxidado, del grupo prostético hemo. La catálisis por p450 con la intervención de la citocromo p450 reductasa dependiente de NADPH, suministra el electrón necesario para la reducción a Fe^{+2} . Al entrar el oxígeno molecular al centro catalítico de la enzima asociándose al grupo hemo, el electrón del Fe^{+2} es transferido a la molécula de oxígeno. Un segundo electrón, canalizado a través del citocromo b_5 , permite reducir parcialmente a la molécula de oxígeno unida, que junto con un H^+ , libera uno de sus átomos en forma de H_2O . El otro átomo de oxígeno, todavía unido al centro catalítico, oxida al xenobiótico que allí se encuentra (Castell, 2005). La reacción general catalizada por las monooxigenasas es (Josephy *et al.*, 1997; Orellana y Guajardo, 2004):



Donde:

SH = Sustrato que experimenta la hidroxilación.

NADPH_2 = Donador de electrones.

SOH = Sustrato hidroxilado

NADP^+ = Dador de electrones oxidado

La exposición a un xenobiótico de carácter orgánico, puede aumentar la capacidad para metabolizar el mismo compuesto y otros compuestos. Algunas de estas enzimas del citocromo p450, son inducidas por una gran variedad de contaminantes industriales (PAHs, moléculas organoclorinadas, como PCBs y dioxinas). Ésta inducción es fácilmente revelada por un aumento en la actividad enzimática, tal como la actividad EROD, (etoxiresorufin -o-desetilasa; Josephy *et al.*, 1997; Jamil, 2001) enzima que forma parte del grupo de las monooxigenasas. Ésta inducción enzimática alcanza su máximo en horas o días y puede ser de dos o tres órdenes de magnitud sobre el nivel basal debido a la exposición a xenobióticos; sí el agente

inductor desaparece, la actividad enzimática retorna lentamente a la línea base debido a la degradación normal de proteínas (Josephy *et al.*, 1997).

En bivalvos, la inducción de la actividad EROD se ha relacionado con la exposición a PCBs y organoclorados (Livingstone *et al.*, 1997; Ricciardi *et al.*, 2006), numerosos hidrocarburos policíclicos aromáticos y metales (Lafontaine *et al.*, 2000), si bien puede ser inhibida por compuestos organoestánicos (Sole y Livingstone, 2005).

De manera particular se ha reportado en el bivalvo *Dreissenia polymorpha* la inducción de la actividad EROD relacionada con altos niveles de DDT 945 ng g⁻¹ lípidos, bioacumulados en organismos provenientes del lago de Maggiore, Italia (Ricciardi *et al.*, 2006) así como inducciones tres veces mayores, en bivalvos de esta misma especie colectados en los grandes lagos subalpinos de Italia, donde se registró la presencia de DDTs y PCBs, respecto a los organismos depurados (Binelli *et al.*, 2005). En ésta misma especie Binelli *et al.* (2006), reportó, por un lado la inhibición del 41% de la actividad EROD en mejillones expuestos por 96 horas a 100 ng l⁻¹ de pp'DDT y por otro, una inducción al ser expuestos a 100 ng l⁻¹ de una mezcla de PCBs.

1.1.2. Biomarcadores de Efecto:

1.1.2.1. Nivel suborganismo.

A. FRAP (Potencial antioxidante reductor del Fe)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) si bien son producto del metabolismo aerobio normal de los organismos, son potencialmente dañinas (Gutteridge, 1994; Halliwell, 1994). Para contrarrestar los efectos nocivos de éstas especies reactivas, los organismos vivos han desarrollado una compleja red antioxidante que involucra la participación de la albúmina, catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, GSH (glutatión), β caroteno, ácido ascórbico, α-tocoferol, ácido úrico, bilirrubina y flavo-proteínas, entre otras (Halliwell y Gutteridge, 1990; Gutteridge, 1994; Halliwell, 1994). Un antioxidante biológico, ha sido definido como “una sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones en relación al sustrato oxidable, demora o previene la oxidación del sustrato” (Benzie y Strain, 1996).

Los múltiples antioxidantes presentes en el plasma y demás tejidos de los organismos, hacen difícil la evaluación de cada antioxidante por separado; de ahí la ventaja de utilizar métodos globales que puedan dar cuenta de la capacidad antioxidativa de un organismo, como es el

caso de la evaluación del Potencial Antioxidante Reductor del Fe (FRAP, por sus siglas en inglés) (Prior y Cao, 1999).

La mayoría de los métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidativa involucran la determinación de una especie reactiva del oxígeno, usualmente un radical libre y un sustrato oxidable, donde la especie reactiva induce daño oxidativo al sustrato, el cual es inhibido en presencia del antioxidante. En contraste, la evaluación de FRAP no involucra ni a un prooxidante ni a un sustrato oxidable; éste es un método indirecto que proporciona un índice potencial de la capacidad de una muestra biológica de tolerar daño oxidativo si bien no evalúa el GSH (glutación), un antioxidante importante en los organismos (Cao y Prior, 1998; Prior y Cao, 1999). La prueba de FRAP evalúa la habilidad de una muestra o compuesto de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , éste último una especie reactiva que puede reaccionar con H_2O_2 para producir OH^\bullet , el radical libre más dañino encontrado en los animales (Benzie y Stain, 1996; Prior y Cao, 1999). Así, la reducción a pH bajo del complejo de trifiridiltriazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) produce la trifiridiltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), la cual, por su intenso color azul puede ser monitoreada a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).

Algunos antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido úrico pueden reducir el Fe^{3+} , lo que refleja su habilidad en la reducción de especies reactivas, habilidad que puede indirectamente reflejar el poder total antioxidante de una muestra biológica (Prior y Cao, 1999). No obstante, un incremento en la capacidad antioxidante en el plasma o suero puede no necesariamente ser una condición deseable si ésta refleja una respuesta al incremento del estrés oxidativo (Prior y Cao, 1999).

La evaluación del efecto adverso del estrés oxidativo por la exposición a plaguicidas ha sido ampliamente documentado en peces. Se ha reportado la acción oxidante de organofosforados en carpas y en peces gato (Hai *et al.*, 1997) y de organoclorados (endosulfán) en la trucha arcoíris (Dorval y Hontela, 2003). En mejillones el estrés oxidativo ocasionado por organofosforados y otros contaminantes, ha sido abordado en estudios de laboratorio y de campo. Al respecto, Peña-Llopis *et al.* (2002) reportan en los bivalvos *M. galloprovincialis* y *Flexopecten flexuosus* una disminución de GSH y GSSG en la glándula digestiva, el músculo y las branquias de los mejillones por la exposición de 96 h a 4.7 mg l^{-1} de fenitrotión. Cheung *et al.* (2002) realizaron trasplantes del mejillón *Perna viridis* en sitios contaminados alrededor de Hong Kong y reportan una correlación positiva entre la concentración de PCBs en tejidos y los

niveles de glutatión-S-transferasa y glutatión en las branquias y el hepatopáncreas, mientras que no hubo correlación entre la concentración de plaguicidas organoclorados y las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa). Otro estudio de trasplante en la Bahía Nice y Canne del noreste del mar Mediterráneo reporta, altos niveles de catalasa en el organismo completo de *M. galloprovincialis* relacionados con elevadas concentraciones de ácidos tiobarbitúricos GST asociados con elevadas concentraciones de cobre en el medio (Roméo *et al.*, 2003).

B. Estabilidad lisosomal.

Los lisosomas son vesículas de membrana sencilla (0.25-0.50 μm de diámetro), presentes en todos los organismos y en todos los tejidos excepto en las células de la sangre (Holtzman, 1989; Lehninger, 1990). La actividad de los lisosomas está relacionada con los procesos de digestión intracelular como la autofagia, heterofagia y otros procesos relacionados que ocurren en el citoplasma de la célula (Pellerin-Massicotte y Tremblay, 2000). Las enzimas hidrolíticas de los lisosomas, alrededor de treinta diferentes, están implicadas en la digestión, conservación, resorción, proliferación celular y mecanismos inmunes; estas enzimas tienen un periodo de vida que está relacionado con la impermeabilidad natural de la membrana de los lisosomas a ciertas sustancias y por la unión de las enzimas con la membrana interna de los lisosomas, lo que las inactiva (Pellerin-Massicotte y Tremblay, 2000).

La membrana de los lisosomas puede llegar a ser más frágil en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas, o por efecto de estresores ambientales como la salinidad y la temperatura, que pueden desestabilizar la matriz lipoproteica, la cual induce la liberación de las enzimas hidrolíticas en el citoplasma (Fig. 3; Moore *et al.*, 1980). De igual manera, diversos contaminantes incrementan la fragilidad de la membrana de los lisosomas, proceso que es explicado por el aumento en la actividad de enzimas de desintoxicación que inducen la bioactivación de éstos contaminantes y la sobreproducción de radicales libres los que ocasionan la alteración de las membranas de los lisosomas (Pellerin-Massicotte y Tremblay, 2000).

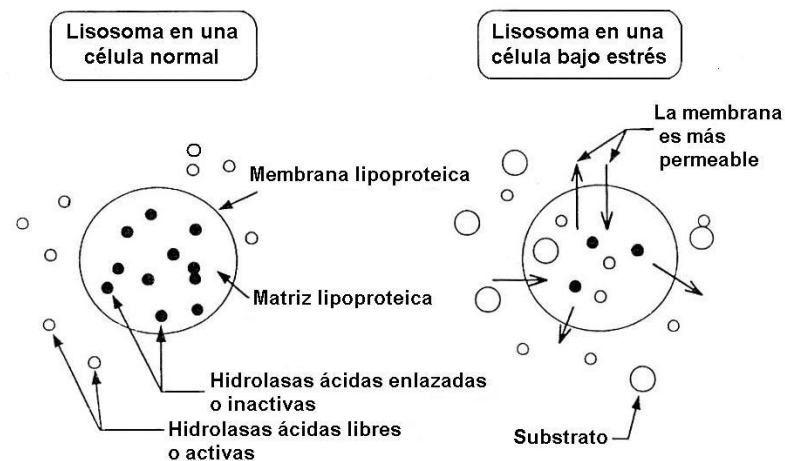


Fig. 3. Efecto de estrés en los lisosomas (tomado de Pellerin-Massicotte y Tremblay, 2000)

El mantenimiento de la estabilidad funcional y estructural de los lisosomas es fundamental en la homeostasis celular y la función tisular, por lo cual ésta evaluación ha sido utilizada exitosamente como un biomarcador de estrés celular y de citotoxicidad por la exposición a xenobióticos (Lowe *et al.*, 1992; Lowe y Pipe, 1994). En invertebrados, y particularmente en bivalvos, la estabilidad de la membrana lisosomal ha sido valorada a través del método de retención del colorante vital rojo neutro, método que evalúa la incorporación lisosomal del colorante, donde una mayor retención de éste se relaciona con una mejor condición celular (Pipe *et al.*, 1995).

En bivalvos, la documentación del efecto de los plaguicidas OCs y OFs sobre la estabilidad lisosomal es limitada si bien se tiene información de la acción adversa de otros contaminantes. Camus *et al.* (2003) reportan una desestabilización significativa en la membrana celular de los hemocitos de *Mya truncata* expuestos a hidrocarburos policíclicos aromáticos. En *Mytilus edulis*, la alteración de la estabilidad lisosomal ha sido reportada por efecto de la exposición al sulfato de cobre (Shepard y Bradley, 2000), al estireno (Mamaca *et al.*, 2005), al plaguicida organofosforado clorfenvifos (Rickwood y Galloway, 2004), a PCBs y DDTs (Schiedek *et al.*, 2006).

C. Proteínas.

Las proteínas ingeridas en el alimento y las celulares son hidrolizadas hasta formar un pool de amino-ácidos que puede ser usado para formar nuevas proteínas de crecimiento y renovar las

proteínas básicas; el exceso de aminoácidos, no utilizado en la síntesis proteica es catabolizado a amonio, el cual es excretado (Wright, 1995).

La contribución de la degradación de proteínas al pool de aminoácidos libres puede ser sustancial bajo ciertas condiciones (Somero y Bowlus, 1983). Los moluscos marinos y otros invertebrados marinos utilizan solutos de nitrógeno tales como aminoácidos libres como los mayores efectores osmóticos intracelulares. Los principales osmolitos nitrogenados son: alanina, glicina, prolina, taurina y glutamato, especies típicamente dominantes en moluscos marinos. El uso de productos terminales del metabolismo del nitrógeno representa una forma metabólicamente más barata, para mantener el contenido osmótico del citosol (Somero y Bowlus, 1983). Al respecto se sabe que muchas especies de invertebrados marinos acumulan aminoácidos en compartimientos intracelulares para contrarrestar la presión osmótica del agua de mar (Simpson *et al.*, 1959). Suresh y Mahandas (1993) proponen que los iones metales se enlazan con las proteínas solubles de la hemolinfa, resultando en su desnaturalización y su eventual remoción de la hemolinfa así como la degradación de éstas a aminoácidos para el mantenimiento del balance osmótico. A la vez, la concentración de proteína soluble tanto en hemolinfa como en músculo de los organismos, aporta información relevante sobre su condición fisiológica, dado que indica la cantidad de proteína que está siendo degradada y transportada a la hemolinfa para la formación posterior de sillares o de nuevas proteínas requeridas por el organismo (Wright, 1995).

En el bivalvo *Perna canaliculus*, Scotti *et al.* (2001), reportan como única proteína presente en altos niveles en el plasma (hemolinfa libre de células) a la proteína pernin, proteína rica en histidina y ácido aspártico y sugieren que ésta proteína realiza importantes funciones en el mejillón, donde la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal, de ésta proteína posiblemente funciona como protección contra proteasas de serina; los autores sugieren que la principal función de ésta proteína podría ser de transporte y de almacenamiento de oxígeno.

Según Sreedevi *et al.* (1992) la reducción de la fracción de las proteínas solubles en el hígado de *Cyprinus carpio* expuesto a concentraciones subletales y letales de níquel, sugieren una disminución de enzimas necesarias requeridas para la desintoxicación y eliminación de los metales. En invertebrados, normalmente la exposición a plaguicidas ocasiona una reducción en la síntesis proteica debido al estrés tóxico, el cual ocasiona a su vez un incremento en el metabolismo energético (Galindo *et al.*, 2002); dicha reducción también ha sido documentada por la exposición a metales. Así, Rickwood y Galloway (2004) reportan en el mejillón azul

Mytilus edulis una disminución en el contenido total de proteínas solubles en la hemolinfa, después de 48 y 96 h de exposición a 0.007 mg l^{-1} del plaguicida organofosforado clorfenvifos, grado comercial. Galindo *et al.* (1996) reportan que la concentración de proteína total soluble en músculo de *Penaeus vannamei* expuesto a clordano, DDT, lorsban y lindano, decreció un 28.5, 41.8, 36.9 y 37.6% respectivamente, con relación a los grupos controles. En larvas de *Litopenaeus stylirostris* la exposición a concentraciones subletales de DDT, paratión, clorpirifos, malatión endosulfán y azinfosmetil, reduce las concentraciones de proteína soluble respecto a las larvas del grupo control (Galindo *et al.*, 2002). A la vez, la exposición subletal a cobre también afecta los niveles de proteína en la hemolinfa de los cangrejos *S. scripta* y *V. cyprinoides*, los cuales disminuyen respecto a los controles (Suresh y Mahandas, 1993).

1.1.2.2. Nivel organismo.

A. Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno es una medida indirecta del metabolismo aerobio y refleja las reacciones que producen energía para cubrir las funciones globales del organismo; además se considera una medida de integración simple que da cuenta de la condición fisiológica de los organismos (Fry, 1971). La determinación de la tasa metabólica a partir del consumo de oxígeno se basa en dos postulados (Eckert, 1988):

1. Se asume que las reacciones químicas relevantes son aeróbicas.
2. La cantidad de calor producido (energía liberada) cuando se consume un volumen determinado de oxígeno varía de 0.7 a 1 dependiendo del sustrato metabólico. Así, cuando se utilizan carbohidratos como sustrato, el cociente respiratorio es 1, cuando se ocupan grasas es 0.73 y en el caso de proteínas es 0.8 (Eckert, 1988).

En invertebrados acuáticos las alteraciones respiratorias han sido ampliamente utilizadas como indicadores del estrés a los tóxicos ambientales (Toro *et al.*, 2003). Al respecto, se han reportado trabajos que registran incrementos, disminuciones, e incluso no modificaciones en el consumo de oxígeno de los organismos, por efecto de exposición a diferentes contaminantes.

El consumo de oxígeno en el mejillón *Arca zebra* trasplantado en un gradiente de contaminación, presentó un incremento gradual del 35% en dos sitios del Puerto de Hamilton, siendo en éstos sitios donde se registraron elevadas concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos, de plomo, TBT y PCBs, en muestras de sedimento y agua (Widdows *et al.*, 1990). En un estudio *in situ* realizado con *Choromytilus chorus*, Toro *et al.* (2003) reportaron

altos valores del consumo de oxígeno relacionados con concentraciones elevadas de organoclorados en el tejido de los bivalvos. A su vez Axiak y George (1987) reportaron incrementos en el consumo de oxígeno del bivalvo *Venus verrucosa*, comparado con el grupo control, expuestos a bajos niveles ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) de agua contaminada por el derrame del petróleo crudo en Kuwait.

No obstante, en un estudio *in situ* con mejillones de la especie *Perna viridis*, Shuhong *et al.* (2005) reportan que el consumo de oxígeno de los organismos no se modifica a pesar de que en uno de los 4 sitios de muestreo, se registraron altos niveles de organoclorados en agua y sedimento. En un estudio realizado por Martín *et al.* (1984), no se registraron variaciones en el consumo de oxígeno de *M. edulis* trasplantado en 5 sitios de la Bahía de San Francisco, con respecto a los mejillones del sitio de referencia, aun cuando en los mejillones trasplantados se registraron concentraciones de Dieldrín, 5 y 10 veces mayores que las de los mejillones del sitio de referencia así como concentraciones muy elevadas de PCBs. Asimismo, no se registraron variaciones en la tasa respiratoria de *M. edulis*, en un gradiente de contaminación en Langesundfjord, Noruega, con respecto a los organismos del sitio de referencia; en estos sitios de muestreo se registró la presencia de metales pesados, hidrocarburos policíclicos aromáticos y PCBs (Widdows y Johnson, 1988). De igual manera el consumo de oxígeno evaluado en *M. galloprovincialis* no se modificó al ser expuesto a sedimentos contaminados con LAS (sulfonato alquilbenzeno lineal), durante 7 días (Marin *et al.*, 1994).

En estudios controlados de laboratorio se han demostrado efectos significativos en el consumo de oxígeno por la exposición a contaminantes. Por ejemplo, en *P. viridis* el consumo de oxígeno disminuyó durante los primeros 6 días al ser expuesto a 0.6, 1.29, 2.79 y 6 ppm de Zn y 0.15, 0.32, 0.7 y 1.5 ppm de Cd (Cheung y Cheung, 1995). En esta misma especie se reportó una disminución de la respiración conforme se incrementaron las concentraciones de cloro (0.12, 0.29, 0.39 y 0.53 mg l^{-1}) (Masilamoni *et al.*, 2002). La exposición en *M. edulis* y *M. leucophaeata* a éste mismo contaminante ocasionó una disminución del 10 y 49% en el consumo de oxígeno de los mejillones expuestos a 0.1 y 0.5 mg l^{-1} respectivamente (Rajagopal *et al.*, 2005). En *Mya truncata*, la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos redujo la tasa metabólica de los bivalvos (Camus *et al.*, 2003).

B. Excreción nitrogenada

En los invertebrados acuáticos amoniotélicos, incluidos los bivalvos, el nitrógeno producido en el catabolismo de los aminoácidos y las proteínas es excretado en forma de compuestos nitrogenados principalmente como amonio, incluyendo las dos formas químicas, ión amonio (NH_4^+) y amoniaco (NH_3), ésta última excretada en mayor proporción (Wright, 1995). En los organismos amoniotélicos, los grupos amino derivados de α -aminoácidos se transaminan para formar glutamato, el cual experimenta después una desaminación oxidativa, mediante la glutamato-deshidrogenasa, formando amonio (NH_4^+) y α -cetoglutarato; el amonio así formado se convierte después en el nitrógeno amídico de la glutamina, que es la principal forma de transporte del amonio en el medio interno de los organismos para su subsecuente excreción branquial (Lehninger, 1990).

En los moluscos acuáticos la excreción del nitrógeno tiene varios aspectos funcionales:

1. La eliminación de compuestos nitrogenados producto del catabolismo de proteínas (Wright, 1995).
2. El control del volumen celular. Bajo condiciones hiperosmóticas, características del periodo de emersión en bivalvos intermareales, el amonio sirve como grupo funcional para la síntesis de betaina (Deaton, 2001) y de la glutamina (Hiong *et al.*, 2004), los cuales actúan como osmolitos y participan de manera central en el control del volumen celular.

En bivalvos se ha documentado que la excreción nitrogenada es alterada (se incrementa, disminuye o no presenta cambios) por diversos estresores ambientales como la temperatura (Bayne, 1973b, Cockcroft, 1990), la salinidad (Masilamoni *et al.*, 2001) y el alimento (Cockcroft, 1990) así como por contaminantes (Widdows *et al.*, 1980-1981; Martín *et al.*, 1984; Axiak y George, 1987; Widdows y Johnson, 1988; Cheung y Cheung, 1995). Al respecto, Martín *et al.* (1984) registraron aumentos hasta de 6 veces en los niveles de excreción de amonio de *M. edulis* trasplantados en la Bahía de San Francisco en comparación con los mejillones del sitio de referencia, incrementos asociados con elevadas concentraciones corporales de Dieldrín y PCBs. En una evaluación *in situ* en la Bahía de Narraganset, en la Isla Rode, *M. edulis* presentó incrementos en la excreción nitrogenada en uno de los sitios evaluados en el cual se registraron altas concentraciones de metales (Widdows *et al.*, 1980-1981). En el bivalvo *Venus verrucosa*, la excreción de amonio se incrementó al ser expuesto durante 140 días a bajas concentraciones ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) de agua contaminada por el derrame del petróleo crudo en Kuwait

(Axiak y George, 1987). Cheung y Cheung (1995) reportan a su vez el incremento de la excreción de amonio en *P. viridis* por la exposición a diferentes concentraciones subletales de Zn y Cd, desde el día 2 al 14^{avo}.; posteriormente se registró una disminución en la producción de amonio al ser expuestos a 0.6, 1.29, 2.79 y 6 ppm de Zn y 0.15, 0.32, 0.7 y 1.5 ppm de Cd. En contraste, Widdows y Jonson (1988) reportan la reducción en la excreción nitrogenada de *M. edulis* transplantados en un gradiente de contaminación en Langesundfjord, Noruega, respecto a los mejillones del sitio de referencia, reducción relacionada con la bioacumulación de metales pesados, hidrocarburos policíclicos aromáticos y PCBs. Por otro lado, Ustach (1979) no reportó ningún efecto sobre la excreción de *Nitrocra affinis* por contaminación de petróleo. De igual manera, la excreción nitrogenada de *M. galloprovincialis* expuestos a sedimentos contaminados con LAS (sulfonato alquilbenzeno lineal) durante 7 días no se vió alterada (Marin *et al.*, 1994).

C. Razón atómica O:N.

Una respuesta general del organismo al estrés ambiental es la utilización de sus reservas energéticas para satisfacer los requerimientos metabólicos (Widdows, 1985). En organismos acuáticos, amoniotélicos, la relación atómica O:N es una integración simple de los procesos fisiológicos del consumo de oxígeno y de la excreción nitrogenada de los organismos, y puede ser usada como un indicador del catabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos, dando cuenta del sustrato energético utilizado por los individuos (Bayne *et al.*, 1976). La proporción entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada, es calculada en equivalentes atómicos de acuerdo con la siguiente formula (Bayne *et al.*, 1985):

$$\text{O:N} = (\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}/16) / (\text{mg N-NH}_4^+ \text{ h}^{-1}/14)$$

Si los aminoácidos son desaminados y el amonio es excretado, y los componentes de carbón de los aminoácidos son completamente oxidados, el mínimo teórico de la proporción O:N será 3, señalando un catabolismo exclusivo de proteínas. De manera general valores entre 3 y 16 se relacionan con un catabolismo dominado por proteínas; valores entre 50 y 60 reflejan un catabolismo de lípidos y proteínas en igual proporción, mientras que valores mayores se relacionan con el catabolismo de lípidos y carbohidratos principalmente (Mayzaud y Conover, 1988). Valores muy bajos de proteínas o muy altos, generalmente denotan una condición de estrés nutricional para los bivalvos marinos, donde los animales estarían consumiendo su proteína corporal (Bayne *et al.*, 1976; Bayne y Scullard, 1977; Widdows, 1978; Bayne *et al.*, 1985; Tedengren y Kautsky, 1986; 1987).

La relación atómica O:N puede estar influenciada por un lado por requerimientos energéticos internos del organismo y por el otro por las variables externas, como estacionalidad, disponibilidad y tipo de alimento y ciclo reproductivo. Los adultos de los mejillones en condición reproductiva, frecuentemente reflejan un cambio en el arreglo metabólico por la demanda de nutrientes necesario para sustentar la gametogénesis, por lo que presentan un marcado ciclo estacional (Widdows, 1978; Hawkins y Bayne, 1985; Kreeger, 1993).

En un estudio realizado por Axiak y George (1987) en *Venus verrucosa*, la relación O:N fue menor en los bivalvos expuestos a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de agua contaminada por el derrame del petróleo crudo en Kuwait, que los bivalvos del grupo control; la mayor disminución fue del 37% a los 27 días de exposición. Resultados similares son reportados por Widdows (1978) en *M. edulis* por efecto de la temperatura; el autor menciona que los niveles bajos en la relación O:N (<30) se presentan a finales de la primavera, lo cual puede estar asociado con el periodo de post-desove, cuando el manto está delgado y sin tejido graso y probablemente en los tejidos ocurra una regeneración y reorganización. En la misma especie, Widdows *et al.* (1980-1981) reportan una disminución de la relación O:N de 75 a 30, relacionado con el incremento en la contaminación por hidrocarburos y níquel. Mao *et al.* (2006) documentan en *C. gigas* valores en la relación O:N mayores de 20 en Mayo y Julio, lo cual indica utilización de carbohidratos y lípidos como sustrato energético; en Agosto la relación es menor a 15, sugiriendo una utilización mayoritaria de proteínas, en el periodo posterior al desove.

2. SITIO DE ESTUDIO.

El Estero de Urías es un sistema lagunar tropical que se localiza entre los 23°09' y 23°13' latitud norte y 106°18' y 106°25' longitud oeste, adyacente a la ciudad de Mazatlán y muy cercano a la entrada del Golfo de California. El cuerpo lagunar tiene forma de "L", con el eje mayor paralelo a la costa y separado del mar por la "Isla de la Piedra"; la superficie de agua que ocupa es de aproximadamente 12 Km². La profundidad del sistema varía de 1 a 4 metros. El estero está conformado por varios esteros tributarios entre ellos el estero del Infiernillo, de Confites y la Sirena (Álvarez-León 1977; Peraza-Vizcarra, 2005).

Los sedimentos del sistema son arenosos en la parte de la boca y en el canal de navegación; en los canales naturales predominan las arenas limosas. El sedimento es más fino a medida que la profundidad disminuye, predominando las arcillas limosas en el Estero del Infiernillo y en los esteros ubicados en la cabeza lagunar. En las áreas más someras del resto de la laguna abundan las arenas arcillosas.

Los aportes naturales de agua que se vierten sólo en época de lluvias descargan a través del Arroyo Jabalines, el cual desemboca en el Estero del Infiernillo, y por una serie de arroyos pequeños localizados en la cabecera del sistema (Álvarez-León, 1977). En época de lluvias, se ha calculado un gasto de máxima avenida del Arroyo Jabalines entre 110 y 316 m³seg⁻¹ (Garay-Velázquez, 1986). La precipitación promedio anual es de 752 mm, siendo los meses de mayor precipitación Julio, Agosto y Septiembre (Observatorio Meteorológico de Mazatlán, 1941-1995).

La temperatura del agua oscila de 19 a 23°C de febrero a mayo y de 29 a 32°C de junio a noviembre. La temperatura del agua aumenta por lo general de la boca al final del estero, con un gradiente térmico de entre 0.3 a 5°C. Cabe destacar que actualmente debido a la pluma de descarga de la Termoeléctrica "José Aceves Pozos", la dinámica térmica del Estero de Urías puede verse modificada sustancialmente registrándose en la zona de contacto con el sistema temperaturas de 50°C (obs. pers.). El sistema se caracteriza por tener un cuerpo de agua bien mezclado, con salinidad más alta que la del mar durante la mayor parte del año. En años de precipitación normal la salinidad en la boca varía de 32 a 37 ups en Septiembre y Junio, respectivamente; al final del sistema, en los meses de secas se pueden alcanzar salinidades mayores de 38 ups ocasionadas por la baja profundidad y la evaporación, y salinidades menores de 30 ups en la época de lluvias debido a los aportes de agua dulce de los pequeños arroyos. Por lo general en el sistema existe un gradiente de salinidad, positivo de la boca al final

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

En el Estero de Urías, dos especies de manglares son predominantes, *Rhisophora mangle* y *Avicinia germinans*, este último en menor grado. La productividad primaria en el sistema es elevada, estimada en $2.36 \text{ g C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Robles, 1985) la cual se atribuye al exceso de material orgánico antropogénico que recibe el sistema y conduce a niveles elevados de nutrimentos durante la remineralización de la materia orgánica (Álvarez-León, 1977; Peraza-Vizcarra, 2005).

3. ESPECIE DE ESTUDIO.

En el presente estudio se decidió trabajar con *Mytella strigata*, ya que presenta varias ventajas para ser utilizada en evaluaciones de impacto de contaminantes en ambientes costeros. Es una especie abundante en el Estero de Urías y está presente en otras lagunas de nuestro país (Estévez, 1975; Stuardo y Villarroel, 1976; Villarroel, 1978; Baqueiro y Aldana, 2000) lo que permite hacer comparaciones; es una especie que vive varios años por lo que se pueden hacer seguimientos de los estudios en el tiempo (Thompson, 1980). A la vez, es una especie sedentaria y filtradora, que presenta tasas bajas de biotransformación e incorpora y acumula los contaminantes del lugar donde se encuentra, aportando información de la fracción disponible de éstos (Blackmore *et al.*, 1998). Todo ello determina que los organismos de la especie sean bioindicadores ideales de la presencia de tóxicos persistentes como son los plaguicidas (Galloway *et al.*, 2002a).

De acuerdo con Keen (1971) la clasificación de *Mytella strigata* es la siguiente:

Phylum: Mollusca
Clase: Bivalvia
Subclase: Pteriomorphia ó Lamellibranchia
Orden: Mytiloidea
Superfamilia: Mytilacae
Familia: Mitilidae
Subfamilia: Mytilinae
Género: *Mytella*
Especie: *Mytella strigata* (Hanley, 1843)
Sinónimos: *Mytilus falcatus*, *Mytilus charruanus*.

Los organismos de la clase Bivalvia a la que pertenece *Mytella strigata*, son comprimidos lateralmente y poseen una concha con dos valvas articuladas dorsalmente por medio de un gozne, que encierran el cuerpo por completo; tienen un pie que también está comprimido lateralmente. Presentan branquias lamelibranquias del tipo filiformes, donde se lleva a cabo el intercambio de gases a medida que el agua se mueve dorsalmente en las branquias; la superficie interna del manto también contribuye al intercambio de gases. Se alimentan de plancton pequeño y en gran parte de fitoplancton. Tienen un sistema circulatorio abierto cuyo flujo va del seno cardiaco a los senos tisulares, los nefridios y las branquias y regresa al seno cardiaco. La excreción se realiza a través de

dos nefridios que se encuentran debajo de la cavidad pericárdica. Su sistema nervioso es bilateral y sencillo; la mayoría de los órganos de los sentidos se localiza en el borde del manto, como ocelos y estatocistos (Barnes, 1977).

Los mejillones son excelentes filtradores; sólo se alimentan cuando están sumergidos y remueven partículas por abajo de 2-3 μm con una eficiencia del 80-100%. Estas partículas incluyen bacterias, fitoplancton, detrito fino orgánico y materiales de origen inorgánico (Rodhouse *et al.*, 1984).

La mayor parte de los bivalvos son dioicos y liberan sus gametos al ambiente donde se efectúa la fecundación; se desarrolla primero una larva trocófora de nado libre y después una larva veliger, después de la cual se lleva a cabo la metamorfosis. El asentamiento de los organismos puede ser al azar o puede incluir una exploración considerable del substrato (Barnes, 1977). La mayoría de los bivalvos son iteróparos, por lo que hay superposición de individuos de varias generaciones (Mackie, 1984; citado en Barnes, 1977). Los mejillones no presentan dimorfismo sexual y se diferencian visualmente por el color del tejido reproductivo, de color anaranjado en las hembras y crema claro en los machos (Gosling, 1992). Los registros de los mejillones más longevos de ésta especie son de 12 a 20 años (Thompson, 1980).

El bivalvo *Mytella strigata* se distribuye en las costas del océano Pacífico desde Guaymas, Sonora, hasta el sur de El Salvador e islas Galápagos. En el océano Atlántico se ubica desde Venezuela hasta Argentina. Particularmente, este bivalvo se ha registrado en abundancia en la costa del Golfo de California en México, en los sistemas lagunares-estuarinos de Sinaloa, (Topolobampo y Huizache-Caímanero) y de Sonora (Agiabampo y Yavaros) (García-Cubas y Reguero, 1987, citado en Villarroel y Stuardo, 1995.). En la costa Pacífica, se ha registrado en las lagunas de Nuxco y Chautengo (Gro.) (Estévez, 1975; Stuardo y Villarroel, 1976; Villarroel, 1978; Baqueiro y Aldana, 2000), en la Bahía de Manzanillo (Colima) y en la costa de Oaxaca (Holguin y González, 1989; citado en Villarroel y Stuardo, 1995).

Mytella strigata forma nidos bísales que se adhieren a las raíces del mangle o a las rocas del sitio. Los adultos de ésta especie tienen una longitud de 5 a 7 cm; su concha es delgada de forma variable, angosta y alargada en forma de hacha, con el borde post-

dorsal arqueado y el ventral, recto a ligeramente cóncavo. Su superficie externa tiene marcas concéntricas de crecimiento. La cicatriz del músculo aductor anterior es redondeada y está situada por detrás del umbo. El color de la concha por la parte externa en la región antero-ventral, es variable tendiendo a ser café-oliva, pasando a café-amarillento con la edad y verde en la zona dorsal. La superficie interna es de color púrpura iridiscente (Villarroel y Stuardo, 1995).

En un estudio realizado sobre la biología de *Mytella strigata* en las lagunas de Chautengo y Nuxco, Guerrero, Estévez (1975) registra que para Chautengo, las hembras desovan en el mes de agosto y se encuentran en etapa de maduración en mayo; mientras, en los mejillones de la laguna de Nuxco, el desove ocurre desde agosto hasta octubre, y la etapa de maduración en mayo. Otro estudio realizado en las mismas lagunas por Baqueiro y Aldana (2000) sobre el ciclo reproductivo de *Mytella strigata*, señala un periodo bien definido de desove que va de julio a septiembre en la laguna de Chautengo y de julio a octubre en la laguna de Nuxco, con periodos de post-desove de septiembre a diciembre y de febrero a junio, donde los patrones de desove, están relacionados con las condiciones microambientales de su hábitat.

4. ANTECEDENTES.

En el estado de Sinaloa, los principales plaguicidas aplicados en los campos agrícolas son organofosforados, carbamatos y piretroides, donde una importante fracción alcanza la zona costera a través de drenes agrícolas (Readman *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 1999; González-Farías *et al.*, 2002).

Algunos estudios en lugares cercanos al Estero de Urías han abordado la cuantificación de los aportes de contaminantes orgánicos como plaguicidas organoclorados (OCs) y bifenilos policlorinados (PCBs) así como compuestos organofosforados (OFs) y carbamatos (CBs) (Rosales y Escalona, 1983; Méndez *et al.*, 1990; Readman *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 1999; González-Farías *et al.*, 2002). Readman *et al.* (1992) registran en el sistema lagunar el Pabellón Altata-Ensenada (Sinaloa) a los organofosforados clorpirifos, malatión, paratión y monocrotofos, detectando que el clorpirifos y el paratión son suficientemente persistentes como contaminantes de sedimentos marinos tropicales; el primero está relacionado con el control de plagas de horticultura y de plantaciones de plátano y algodón, en tanto el segundo está asociado a plantaciones de caña de azúcar. Galindo *et al.* (1999) reportan como plaguicidas organoclorados frecuentes en agua, sedimento y organismos de la bahía de Santa María y de la Ensenada del Pabellón, al BHC α , aldrín, endosulfán, DDT y sus metabolitos (DDE y DDD) así como a los plaguicidas organofosforados malatión y paratión. A la vez, en la bahía de Ohuira se han registrado al aldrín, endrín, DDT, lindano, y metil paratión en agua, sedimento y camarones (Galindo *et al.*, 1999). En el sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón, se detectan diversos plaguicidas organoclorados (DDT y sus metabolitos, endosulfán, endrín, dieldrín, lindano) y organofosforados (clorpirifos) en agua, sedimento y organismos (Carvalho *et al.*, 2002). Por otro lado González-Farías *et al.* (2002) registran en sedimento, α -HCH, β -HCH, aldrín, p-p'-DDD, α endosulfán, heptacloro y epóxido de heptacloro en los sistemas lagunares Agiabampo-Bacoreuis y la bahía de Jitzamuri de Sinaloa. Cabe destacar que el empleo de aldrín está prohibido en México y el uso del DDT está restringido (CICOPLAFEST, 2004).

El Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa es una zona de crianza, alimentación y desarrollo de diversas especies entre ellas el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y la lisa *Mugil cephalus*, las cuales sustentan importantes pesquerías; así mismo, se reporta la amplia distribución y abundancia del mejillón *Mytella strigata*, especie residente que forma nidos bísales en las raíces del mangle rojo *Rizophora mangle* (Villarreal y Stuardo, 1995). Sin embargo, la ubicación

adyacente de la ciudad de Mazatlán ha convertido a éste sistema en un receptor de importantes descargas, entre las que destacan las siguientes:

1. El estero recibe de 1500 a 2000 l s⁻¹ de aguas negras y residuales, generadas por 400,000 habitantes y solamente el 40 % de éstas descargas reciben tratamiento primario por la Planta de Tratamiento; éstas descargas vierten grandes volúmenes de sólidos, desperdicios industriales y materia fecal (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2000). Se estima que cerca de 37 800 m³ d⁻¹ de efluentes domésticos no tratados son vertidos en el Estero del Infiernillo (Soto-Jiménez y Páez-Osuna, 2001).
2. La actividad turística ocasiona el incremento considerable de volúmenes de agua residuales y otros residuos sólidos vertidos al Estero de Urías.
3. La presencia de astilleros, cuyos residuos son descargados directamente al estero; entre sus desechos más importantes resaltan numerosos hidrocarburos así como las pinturas las cuales contienen grandes cantidades de metales pesados.
4. La presencia de la termoeléctrica “José Aceves Pozos” que emite agua a altas temperaturas con probables aportes de biocidas (compuestos clorados) y metales.
5. Las procesadoras de alimentos pesqueros asentadas en sus márgenes desechan directamente sus residuos ricos en materia orgánica, aceites y grasas.
6. Las granjas camarónicas que en sus descargas al final de los ciclos de producción, vierten gran cantidad de compuestos nitrogenados (producto de la acumulación de materia orgánica) y fertilizantes así como compuestos químicos para el control de enfermedades (Soto-Jiménez y Páez-Osuna, 2001).
7. El canal de PEMEX y los embarcaderos que albergan las flotas pesqueras (atún, camarón y escama) y comerciales, los cuales están asociados a contaminación por hidrocarburos.
8. Las aportaciones de plaguicidas procedentes de las zonas agrícolas cercanas cuyos escurrimientos inciden directamente en la época de lluvias (Galindo *et al.*, 1992; Soto-Jiménez y Páez-Osuna, 2001).
9. Finalmente el proceso de sedimentación se ha acelerado en el área, debido al crecimiento de la población en la rivera del sistema y al incremento de la infraestructura industrial y portuaria aunado al desarrollo de granjas camarónicas, ya que en la mayoría de éstos casos, se destruyen las zonas de manglar, las cuales naturalmente retienen el sedimento en las orillas del sistema (Osuna-López *et al.*, 1986).

Las aguas del estuario se renuevan en un tiempo relativamente corto, se estima un tiempo de recambio hidrodinámico de 2 a 7.5 días, para el cuerpo principal del sistema (Villalba, 1986; Páez-Osuna *et al.*, 1990; Peraza-Vizcarra, 2001) lo que permite que la mayoría de las aguas negras, los desechos industriales y las aguas sobrecalentadas, sean reemplazadas en un período corto. Sin embargo, en las áreas tranquilas como canales meándricos, marismas, zonas de manglares y muelles, se acumula una cantidad apreciable de materiales y contaminantes vertidos al Estero de Urías, representando potencialmente un peligro para la dinámica ecológica del sistema.

La problemática de la contaminación del Estero de Urías ha sido abordada en numerosos estudios previos, la mayoría de ellos enfocados a determinar las concentraciones de metales en agua y sedimentos (Osuna-López *et al.*, 1986; Soto-Jiménez y Páez-Osuna, 2001) y organismos (Páez-Osuna *et al.*, 1995; Szefer *et al.*, 1998; Páez-Osuna *et al.*, 1999; Ruelas-Insunza y Páez-Osuna, 2000; Ruelas, 2001; Soto-Jiménez *et al.*, 2001; Páez-Osuna *et al.*, 2002). En el sistema, se ha detectado la presencia de plaguicidas organoclorados en agua y organismos (Rosales y Escalona, 1983; Martín y Gutiérrez-Galindo, 1989; Méndez *et al.*, 1990), de clordano en agua y sedimento (Galindo *et al.*, 1992; 1997), así como de diversos plaguicidas, carbamatos y fungicidas (Páez-Osuna *et al.*, 1993). Martín y Gutiérrez-Galindo (1989) reportaron la presencia de pp' DDE, DDD, PCB 101 y 153 en *Crassostrea corteziensis* del Estero de Urías. A la vez, en el puerto de Mazatlán se ha detectado la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos, PCBs y metales pesados en *Crassostrea corteziensis* (Páez-Osuna *et al.*, 2002).

Según informes directos del Ingeniero P. M. Ureña-Trujillo (com. pers.) los productos de venta en Mazatlán que contienen plaguicidas organofosforados son los siguientes:

| Nombre común | Sustancia activa |
|---------------------------------|--|
| 1. Folidol M 500 | Paratión metil (500 g/l) |
| 2. Gusatión 200 gc | Azimofos-metil(200 g/l) |
| 3. Acefate, Tamarón | Metamidofos |
| 4. Folimat | Ometoato |
| 5. Dimetoato, Agrodín | dimetoato O,O-dimetilS-(N-metilcarbamoilometilo) fosforoditioato |
| 6. Diazinon (Basudín, Diazitol) | O,O-dietil, O-2 isopropil-6 metil pirimidin-4-yl fosforotiate |
| 7. Malatión | Malatión |
| 8. Metasystox | Oxidemeton metil |
| 9. Rally lorsban 480 | Clorpirifos |

Estos plaguicidas organofosforados son utilizados para erradicar las plagas de diferentes cultivos en la zona de Mazatlán, destacando los siguientes cultivos (SIAP, 2006):

| Tipo de cultivo | |
|-----------------|-----------------|
| Cíclicos | Perennes |
| Maíz | Mango |
| Sorgo grano | Cocotero |
| Frijol | Pastos |
| Sorgo forrajero | |

Los organofosforados de mayor presencia en la zona de estudio son paratión, clorpirifos, malatión, metamidofos, omeotato, dimetoato (Readman *et al.*, 1992; P. M. Ureña-Trujillo (com. pers.).

No obstante que se cuentan con registros relativamente actuales de las concentraciones de diversos contaminantes orgánicos en algunos sistemas costeros del Golfo de California, es amplio el desconocimiento de los efectos adversos de tales tóxicos sobre la biota del sistema, siendo limitados los estudios que relacionen el efecto tóxico por plaguicidas sobre los organismos acuáticos.

Los efectos biológicos adversos de los plaguicidas en los ambientes acuáticos costeros de la región han sido abordados fundamentalmente en invertebrados. Se ha reportado que la exposición a plaguicidas OCs y OFs ocasiona numerosos desórdenes bioquímicos y fisiológicos. Niveles subletales de organofosforados (Diazinón, Folidol y Gusatión) reducen significativamente el consumo de oxígeno del camarón *L. vannamei* provenientes de la laguna de Escuinapa de Hidalgo (Galindo *et al.*, 2002). A su vez, la exposición a Folidol, Diazinón y Gusatión ocasiona una disminución importante en la actividad de la acetilcolinesterasa y modificaciones en la osmorregulación en *Litopenaeus vannamei*, en tanto que la exposición a DDT, Lindano y Clorpirifos reducen el crecimiento de los organismos (Galindo *et al.*, 2000). La disminución del 95% en la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) también se ha reportado en *L. vannamei* expuestos a concentraciones subletales de malatión de 0.0038 mg ml⁻¹ (Bautista, 2001). La exposición de postlarvas de *L. vannamei* a 0.75 mg L⁻¹ de metamidofos, 32°C y 40 ups, por 96 horas, genera una disminución de la actividad de la AChE, de la tasa respiratoria y del consumo de alimento (Haro, 2004). Por otro lado, la exposición subcrónica al metamidofos (0.008-0.26 mg g⁻¹) inhibe el crecimiento y la producción de heces en el poliqueto *Capitella* sp del Estero del Yugo, Mazatlán (Anguas, 2004). En camarón blanco *L. vannamei*, la exposición a éste mismo plaguicida en concentraciones subletales, ocasiona la inhibición de la actividad de la AChE en músculo y ojo del camarón (García-de la Parra *et al.*, 2005).

Cabe señalar que estos trabajos han sido realizados en condiciones controladas de laboratorio. De tal manera el presente trabajo de investigación es pionero tanto respecto al escenario de exposición *in situ* como a la especie evaluada, el mejillón *Mytella strigata*, especie que debido a su hábitat, su comportamiento alimentario y su probable baja transformación de contaminantes dadas sus características metabólicas, se propone como un biomonitor de la contaminación en los sistemas lagunares-estuarinos. A la vez, el presente trabajo representa un enfoque novedoso de análisis al evaluar a diferentes niveles de organización biológica el efecto tóxico de la exposición *in situ* a plaguicidas OCs y OFs a través de una estrategia de múltiples biomarcadores, aunado a la cuantificación de los compuestos orgánicos en las matrices ambientales (agua, sedimento y organismos), a fin de detectar causalidades y validar la relevancia de la especie como bioindicadora del impacto de la contaminación en el Estero de Urías, Mazatlán.

5. HIPÓTESIS.

1. *Mytella strigata* es un organismo filtrador, con una capacidad baja de biotransformación de compuestos orgánicos, lo que ocasiona que los acumule. De tal manera se espera una relación directa entre la concentración de plaguicidas organofosforados y organoclorados presentes en el sitio de estudio con la cuantificada en los organismos, reflejando un probable aporte diferencial.
2. Al realizar el estudio en dos épocas climáticas contrastantes (lluvias y secas) se espera que haya una mayor presencia de plaguicidas en la época de lluvias debido al lavado de las tierras de cultivo y fumigación en la zona urbana de Mazatlán para controlar vectores de enfermedades (mosquitos) que eventualmente inciden sobre el Estero de Urías. Se espera que este incremento de plaguicidas se vea reflejado en un aumento en la bioacumulación de los tóxicos así como en los biomarcadores de exposición y efecto evaluados en los mejillones provenientes de las diferentes estaciones de muestreo.

6. OBJETIVOS.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de la exposición *in situ* en *Mytella strigata* a plaguicidas organofosforados y organoclorados mediante la utilización de biomarcadores biológicos de exposición y de efecto.

Objetivos particulares:

1. Evaluar en *Mytella strigata* los biomarcadores de exposición (actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, la carboxilesterasa y de la etoxiresorufin-o-desetilasa) a organofosforados y organoclorados.
2. Evaluar en *M. strigata* a diferentes niveles de organización biológica, diversos biomarcadores del efecto de los plaguicidas organofosforados y organoclorados (Potencial antioxidante reductor del Fe, estabilidad lisosomal, proteínas solubles totales en hemolinfa y músculo, consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y razón atómica O: N).

3. Establecer relaciones de causalidad entre los biomarcadores evaluados y la concentración de los plaguicidas organofosforados y organoclorados en los organismos, el agua y los sedimentos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Selección de los sitios de estudio en el Estero de Urías.

En el Estero de Urías, Mazatlán, se seleccionaron tres sitios de muestreo, considerando diferentes aportes de contaminantes (plaguicidas, aguas residuales, hidrocarburos policíclicos aromáticos, metales pesados, compuestos nitrogenados, materia orgánica, etc.) así como diversos aportes puntuales: drenaje de granjas camaroneras que vierten sus aguas al sistema al termino de cada ciclo de cultivo (Marzo-Mayo y Julio-Octubre); drenaje de aguas negras en el estero del Infiernillo durante la época de lluvias; salida del agua a altas temperaturas y probables aportes de biocidas de la termoeléctrica "José Aceves Pozos"; escurrentía de las zonas aledañas de cultivos agrícolas; actividades portuarias e industriales (procesadoras de alimentos). Los sitios seleccionados fueron (Fig. 4):

- Puerto Juárez, sitio que recibe aportes de efluentes urbanos.
- El Astillero, sitio de elevada actividad portuaria.
- El Castillo, sitio de bajo impacto urbano e industrial pero que recibe aporte de descargas de granjas camaroneras y cultivos cercanos.



Fig. 4. Área de estudio. Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. Los círculos rojos señalan las estaciones de muestreo.

Con la finalidad de evaluar el probable efecto estacional, los muestreos abarcaron dos épocas climáticas: Octubre del 2004 y Mayo del 2005; el primero correspondió a la época de lluvias (julio a octubre) y el segundo a la época de secas, (noviembre a junio) (García, 1988). Cabe destacar que en la época de lluvias, la entrada de plaguicidas a los sistemas costeros de la región se incrementa por el lavado de las tierras de cultivo aledañas (Galindo *et al.*, 1996; 1997).

7.2. Registro de parámetros fisicoquímicos y colecta de muestras.

En cada época climática y sitio de muestreo se tomó una muestra de agua superficial (1/3 de la profundidad de la columna de agua) con una botella tipo Van Dornh, y se registraron los parámetros fisicoquímicos de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto del agua; la salinidad se registró con un salinómetro (YSI ± 0.05 ups); el pH, con un potenciómetro digital (Trans Instrument; ± 0.005) y la temperatura y el oxígeno disuelto con un oxímetro (YSI 51B; $\pm 0.5^\circ\text{C}$; $0.05 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$).

En estos mismos sitios se tomaron muestras independientes de agua, sedimento y organismos para la cuantificación posterior tanto de plaguicidas organofosforados (OFs) como de organoclorados (OCs). Las muestras de agua superficial se colectaron en frascos ámbar de 2.5 L. El sedimento superficial se colectó con una draga de caja tipo Eckman de acero inoxidable; se tomó la parte media del sedimento colectado y se almacenó en frascos de vidrio (1L) envueltos en papel aluminio. Las muestras de agua y sedimento se transportaron en frío al laboratorio de Ecotoxicología del CIAD, Mazatlán y posteriormente se transportaron congelados al Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde se mantuvieron en estas condiciones hasta su análisis.

La captura de los mejillones se realizó en marea baja en los siguientes sustratos por cada sitio de estudio:

1. Puente Juárez: captura de los individuos en los pilares del puente.
2. Astillero: captura de los individuos sobre cascos de embarcaciones hundidas.
3. El Castillo: captura de los individuos en las raíces del mangle rojo (*Rizophora mangle*) en las cuales los organismos forman “nidos” bisales.

Tanto los organismos individuales, como los nidos bisales, se colocaron en contenedores de plástico de 100 L y se transportaron con agua del medio al laboratorio de Ecotoxicología del CIAD, Mazatlán. Una vez en el laboratorio los mejillones de los nidos bisales fueron separados a mano cuidadosamente procurando mantener al máximo la integridad del biso de los ejemplares. Una vez separados los mejillones, se seleccionaron aquellos que presentaran una longitud de valvas entre 4 y 5.7 cm y se limpiaron de la presencia de balanos y esponjas. En una submuestra de los organismos seleccionados se cuantificó la concentración de los plaguicidas en estudio y en otra submuestra, se evaluaron los biomarcadores de exposición y de efecto propuestos en este estudio (ver acápite 8.3).

Para la determinación de los plaguicidas OFs y OCs, los mejillones se drenaron, desconcharon y enjuagaron con solución fisiológica para bivalvos, se colocaron en papel aluminio (100 g peso húmedo, PH, para OFs y 40 g para OCs) y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

7.3. Evaluación de biomarcadores.

La evaluación de los biomarcadores de efecto y de la exposición *in situ* de los mejillones a los plaguicidas OFs y OCs se realizó tanto en el laboratorio de Ecotoxicología del CIAD, Mazatlán, como en el de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se utilizaron submuestras de los organismos provenientes de cada uno de los sitios de estudio seleccionados.

7.3.1. Biomarcadores de exposición.

La actividad enzimática de las esterasas (acetilcolinesterasa, AChE y carboxilesterasa, CbE) y la actividad enzimática de la etoxiresorufin-o-desetilasa (EROD) se evaluaron como biomarcadores de exposición a OFs y OCs, respectivamente. Para los análisis se utilizó una submuestra de 10 organismos provenientes de cada sitio de estudio.

A. Esterasas

Se evaluó la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa y carboxilesterasa tanto en la hemolinfa como en el músculo abductor de los organismos, tejidos seleccionados por presentar una mayor actividad enzimática (Galloway *et al.*, 2002b).

Las muestras de hemolinfa (0.5-1 ml) se obtuvieron por punción del músculo abductor con una jeringa de tuberculina de 1 ml, previamente enjuagada en solución fisiológica para bivalvos. Las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 10 000g (9600 rpm) por 10 minutos a 4°C, a fin de separar los hemocitos; el sobrenadante se separó y se congeló para su posterior análisis. En los mismos organismos se disectó el músculo abductor y la glándula digestiva, los cuales se almacenaron, al igual que la hemolinfa, a -80°C, para su posterior análisis.

Se pesó 0.15 g PH del músculo abductor anterior (previamente disectado) y se homogenizó en una relación 1:5 con buffer de homogenización (Tris-HCl 0.1 M, Sacarosa, 0.25M, pH 7.2) con un homogenizador Polytron PT1200; el homogeneizado resultante se llevó a una relación final 1:10; se centrifugó a 10 000g (9600 rpm) por 10 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante, el cual se mantuvo en frío hasta su análisis. En una submuestra (10 µl) de cada uno de los sobrenadantes (músculo abductor y hemolinfa) se determinó la concentración de proteínas solubles totales de acuerdo al procedimiento de Bradford (1976), adaptado para microplaca (BioRad 550) (Galgani y Bocquene, 1991) (ver acápite 7.3.2.1.C).

Actividad enzimática

La evaluación de la AChE y CbE se realizó de acuerdo al método de Ellman *et al.*, (1961), adaptado a microplaca (Galgani y Bocquené, 1991). Para la medición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se utilizó la acetiltiocolina como sustrato, que al entrar en contacto con la AChE se hidrolizó a tiocolina misma que reaccionó con el DTNB (5,5'-Ditiobis [2-ácido nitrobenzoico]) y formó el anión del ácido tionitrobenzoico, compuesto que dio un color amarillo, cuyo mayor pico de absorbancia es a 405nm. Este mismo principio se utilizó para la medición de la actividad de la carboxilesterasa (CbE) utilizando feniltioacetato como sustrato.

Para evaluar las actividades enzimáticas de las esterasas tanto de la hemolinfa como del músculo de los mejillones, se colocaron 25 µl de cada sobrenadante en los pozos de una microplaca, se adicionó 150 µl de 5,5'-Ditiobis [2-ácido nitrobenzoico] 270µM (DTNB) y posteriormente se adicionaron 50 µl de Yoduro de acetiltiocolina 3mM o de s-feniltioacetato 3mM (para AChE y CbE, respectivamente); se agitó inmediatamente y se efectuaron las lecturas a 405 nm durante 5' (registro para cinética enzimática). La actividad enzimática específica se expresó como nmoles min⁻¹ mg⁻¹ prot, de acuerdo con la formula:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{ Abs min}^{-1} \times \text{Fd} \times \text{nmol cm}^{-1}}{0.0136 \text{ ml} \times \text{Pp cm} \times \text{mg ml}^{-1} \text{ prot.}}$$

Donde:

Δ Abs = Pendiente de la absorbancia por minuto, V_0 (mOD min^{-1}); registro por cinética enzimática.

Fd = Volumen total ensayado (0.225 ml) / volumen de muestra analizado (0.025 ml) = 9

Pp = Profundidad del volumen total trabajado en la celda de microplaca (0.802 cm).

0.136 ml = coeficiente de extinción molar (ϵ), para el ácido nitrobenzoico a 405 nm.

Las unidades de ϵ para el ácido nitrobenzoico son $13\ 600\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ efectuándose la siguiente conversión de unidades:

$$\frac{13600}{\text{M cm}} = \frac{13600\ \text{ml}}{\text{mmol cm}} = \frac{13600\ \text{ml}}{10^6\ \text{nmol cm}} = \frac{0.0136\ \text{ml}}{\text{nmol cm}}$$

La actividad enzimática se estandarizó por ml de hemolinfa y gramo de tejido y se expresó como: $\mu\text{moles sustrato min}^{-1}\ \text{ml}^{-1}$ de hemolinfa y $\mu\text{moles sustrato min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$ de músculo.

B. Actividad EROD

La cuantificación de la actividad EROD se efectuó a través de la medición fluorométrica de la reacción de (O)-desalquilación de la 7-etoxiresorufin-O-desetilasa (EROD), componente más sensible a los tóxicos orgánicos dentro de las monooxigenasas dependientes del citocromo p450 (Adams, 1990). En ésta reacción el sustrato etoxiresorufin es hidrolizado a resorufin, un compuesto estable y fluorescente con una absorbancia máxima de excitación a 560 nm y mayor emisión a 586 nm (Pohl y Fouts, 1980). La actividad EROD se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Burker y Mayer (1974), modificado por Burgeot *et al.* (1994).

Preparación de tejidos

La actividad de la enzima 7-etoxiresorufin-O-desetilasa (EROD) se efectuó en la fracción S9 de la glándula digestiva de una submuestra de 10 mejillones por sitio de estudio. Las glándulas digestivas (grupos de 3) se homogenizaron en una relación 1:4 con el Buffer Tris HCl 10 mM, KCl 150mM, ditioneitol (DTT) 0.5 mM, Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 100 μM y sacarosa 0.5M, utilizando un pistilo de teflón (Glas-col). El homogeneizado se centrifugó a 10 000g (9600 rpm) por 20 minutos a 4°C, dos veces (Centrífuga Eppendorf 5417 R). Se separó el sobrenadante y se mantuvo en frío hasta su análisis.

Actividad enzimática

De cada muestra, se colocaron 50 μl del sobrenadante en las microplacas y se adicionó 50 μl de 7-etoxiresorufin 2.2 μM ; inmediatamente se agitó y se registró la absorbancia cada minuto por 15 minutos a fin de valorar probables reacciones endógenas. Posteriormente se adicionó 10 μl de NADPH (24 mM) y se efectuaron las lecturas cada minuto por 60 minutos. Para obtener la actividad específica se tomó en cuenta el comportamiento de las muestras con adición y sin adición de NADPH. Cabe destacar que se visualizó una disminución en la fluorescencia de cada muestra a lo largo del tiempo enmascarando la actividad EROD, por lo que para calcular esta actividad enzimática se obtuvo la diferencia de la concentración de resorufin de la muestra con adición de NADPH y de la muestra sin adición de NADPH (Fig. 5); la concentración de resorufin formado se calculó a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de resorufin. Con los resultados obtenidos se efectuó una regresión lineal donde la pendiente resultante (m) expresó la cantidad de resorufin formado por minuto (pmoles de resorufin). La actividad específica ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$) se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Act. específica} = \frac{m \text{ (pmoles de resorufin)}}{(\text{mg ml}^{-1} \text{ proteína.} \times \text{vol, ml})}$$

donde, el volumen (vol) se refiere a la cantidad de muestra analizada (0.05 ml).

Las lecturas de la fluorescencia de las muestras se efectuaron a una longitud de onda de 544 nm emisión y 590 nm excitación, utilizando un espectrofluorómetro Fluosorkan Ascent (F.L, Labsystem). La concentración de proteínas solubles totales en cada homogeneizado se determinó como se señaló previamente para el caso de esterazas.

Cabe destacar que de manera paralela a la evaluación de la actividad de la glándula digestiva de los mejillones se evaluó un testigo positivo, utilizando peces de la especie *Xiphoforus montezumae* (hembras) expuestos a 1.5 μM de β Nafto-flavona, por 24 horas.

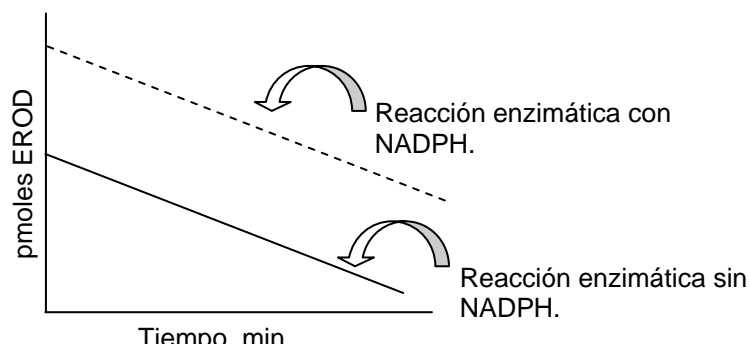


Fig. 5. Representación de la evaluación de la actividad EROD.

7.3.2. Biomarcadores de efecto

Se evaluaron diversos biomarcadores del efecto de la contaminación *in situ* en *Mytella strigata*, proveniente de los diferentes sitios de estudio del Estero de Urías. En cada caso se analizó un mínimo de 10 organismos. Los biomarcadores se evaluaron a nivel sub-organismo y organismo en sub-muestras independientes de organismos.

7.3.2.1. Nivel sub-organismo.

A. Prueba de FRAP (Potencial antioxidante reductor del Fe)

En éste estudio, se midió el potencial antioxidativo de la hemolinfa de los mejillones a través de la prueba de FRAP la cual mide la habilidad de los antioxidantes de un tejido biológico (en éste caso la hemolinfa de los mejillones) de reducir un complejo de trifiridiltriazina férrica (Fe^{3+} -TPTZ) a trifiridiltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), por un agente reductor, a pH bajo. La Fe^{2+} -TPTZ tiene un intenso color azul y puede ser monitoreado a 593 nm (Benzie y Stain, 1996; Prior y Cao, 1999).

La hemolinfa, obtenida por punción del músculo abductor anterior como se mencionó anteriormente, se centrifugó a 10,000 g (9,600 rpm) por 10 minutos a 4°C, con el objetivo de eliminar los hemocitos. Se colocaron en las microplacas 50 μl del sobrenadante de la hemolinfa y se adicionó 200 μl de reactivo FRAP [Buffer acetato 300mM, pH 3.6; 2, 4,6-Tri (2-piridil)-s-tiazina (TBTZ) 10mM en HCl 40 mM; FeCl_3 20 mM, relación 10:1:1 respectivamente]. Se leyó la absorbancia en un lector de microplaca (BioRad mod 550) a 593 nm, al minuto 0 y al minuto 10 de la adición del reactivo FRAP. Los resultados se expresaron como el incremento relativo en % de la cantidad de sulfato ferroso formado a los 10 minutos, respecto a la cantidad inicial formada al minuto 0, utilizando una curva patrón de concentraciones conocidas de sulfato ferroso 1mM.

B. Citotoxicidad. Estabilidad lisosomal.

La estabilidad de la membrana lisosomal se evaluó en los hemocitos de la hemolinfa de los bivalvos, a través del método de tinción de rojo neutro adaptado a microplaca, de acuerdo a los protocolos establecidos para bivalvos (Lowe *et al.*, 1992; Lowe y Pipe, 1994; Pipe *et al.*, 1995).

La hemolinfa se obtuvo por punción del músculo abductor anterior, como se mencionó anteriormente y se diluyó 1:1 con solución salina fisiológica (HEPES 0.018M, NaCl 0.43M, MgSO₄ 0.11M, KCl 0.01M, CaCl₂ 0.013M, pH 7.3). Se colocaron 200 µl de la hemolinfa diluida en los pozos de una microplaca (fondo plano; poly D lisina) y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 1h 30 min, para asegurar la adhesión de los hemocitos a la placa. Después de la incubación, se eliminó la hemolinfa de la placa, se adicionó 200 µl de solución de Rojo Neutro al 0.004% y se incubó en oscuridad por 3 horas, a 25°C. Después del periodo de incubación, se desechó el remanente de rojo neutro de cada pozo y se lavó con solución salina fisiológica para bivalvos, a fin de remover los residuos del colorante. Posteriormente se adicionó 200 µl de ácido acético/etanol 1%/50% (solución de lisis) y se mantuvo en oscuridad por 10 min a 25°C. Transcurrido éste periodo se leyeron las muestras en un lector de microplaca a 540 nm. De cada pozo, se tomaron 10 µl del medio resultante y se determinó la concentración de proteínas solubles totales como se mencionó anteriormente. Los resultados se expresaron como densidad óptica por unidad de proteína de la hemolinfa (DO mg⁻¹ ml⁻¹ prot).

C. Proteínas solubles totales

Este método se basa en el cambio diferencial de color de un colorante ácido (azul brillante de Coomassie) en respuesta a varias concentraciones de proteína. Este colorante presenta un cambio de color de café-rojizo a azul indicando la unión de la proteína al colorante; la intensidad del color es proporcional a la concentración de proteína, cuya absorbancia es leída a 595 nm (Bradford, 1976).

Como se mencionó anteriormente (ver acápite 7.3.1A) las proteínas solubles totales se evaluaron en las muestras de hemolinfa, músculo abductor y glándula digestiva de *M. strigata*. Para ello, se tomó una submuestra de la hemolinfa y del sobrenadante del músculo abductor de las pruebas que se hicieron para esterases, así como del sobrenadante de la glándula digestiva de las pruebas que se realizaron para la actividad EROD. La concentración de proteínas solubles totales se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976), adaptado para microplaca (Galgani y Bocquene, 1991). Se colocaron 10 µl de muestra en las microplacas y se les adicionó 200 µl de reactivo BioRad (diluido 1:4 con agua desionizada); se agitó y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente para luego hacer las lecturas en un lector de microplaca (BioRad mod 550) a 595 nm. La concentración de proteínas se expresó como mg ml⁻¹ de proteína total soluble a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de

albúmina sérica bovina (concentración máxima 1.44 mg ml^{-1}). La determinación del Índice Proteico, se calculó a partir del cociente de la concentración de la proteína total soluble de hemolinfa y del músculo.

7.3.2.2. Nivel organismo.

A. Metabolismo de rutina. Consumo de oxígeno.

El metabolismo de rutina en *M. strigata* se determinó por medio de la evaluación del consumo de oxígeno utilizando un sistema respirométrico de flujo regulado y semi-continuo, adecuado para determinaciones *in situ* (Fig. 6). Se utilizaron 10 cámaras respirométricas (circulares de acrílico y 410 ml de capacidad) en cada una de las cuales se colocó un organismo, exceptuando la cámara testigo, sin organismo.

El agua utilizada en el sistema respirométrico para cada grupo de organismos correspondió al agua colectada en el sitio de muestreo, la cual fue filtrada previamente con malla de fitoplancton ($100 \mu\text{m}$) para eliminar el fitoplancton y el material orgánico del medio y garantizar una condición post-absortiva de los mejillones durante las evaluaciones. Todas las mediciones se efectuaron durante las horas correspondientes al periodo de marea alta en el medio lagunar (CICESE, 2004, 2005) para mantener la actividad normal de los organismos. Los ejemplares utilizados se aclimataron a las cámaras respirométricas dos horas antes de iniciar las evaluaciones periodo durante el cual se mantuvo un flujo de agua en las cámaras de 4.55 Lh^{-1} . Posterior al periodo de aclimatación, se midió la concentración de oxígeno disuelto en las muestras de agua de salida de cada cámara respirométrica (O_{2i}) e inmediatamente se suspendió el flujo de agua a las cámaras por 45 min. Transcurrido este periodo se determinó la concentración del oxígeno disuelto en las muestras de agua de cada cámara (O_{2f}), se restableció el flujo durante una hora y se repitió el procedimiento anterior. La concentración de oxígeno disuelto de las muestras de agua se registró con un oxímetro de sensor polarográfico (YSI 5000; $\pm 0.005 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$).

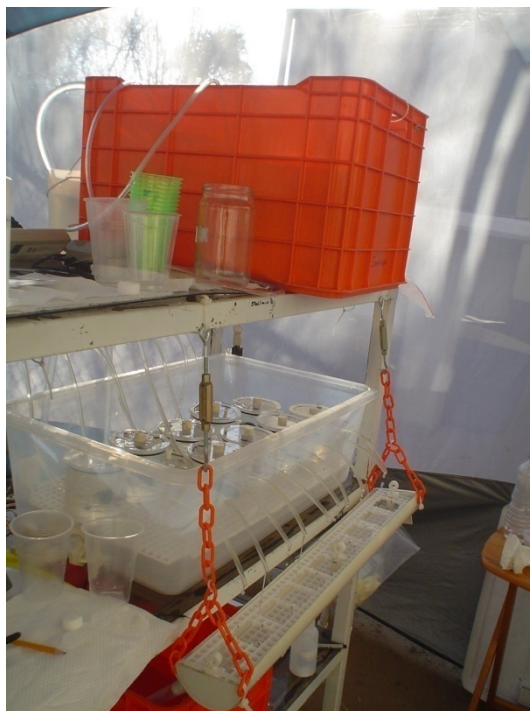


Fig.6. Sistema respirométrico de flujo regulado y semi-continuo.

El consumo de oxígeno individual ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}$) se calculó por la diferencia de la concentración de oxígeno disuelto al inicio (O_{2i}) y al final (O_{2f}) del cierre de las cámaras, considerando el volumen de las cámaras (V , L) y el tiempo de cerrado (T , h) de éstas (Cech, 1990). Los resultados se corrigieron por el valor obtenido de la cámara testigo.

$$\text{VO}_2 = \frac{[(\text{O}_{2i}) - (\text{O}_{2f})] V}{T}$$

Una vez terminada la prueba, se registró el peso húmedo de los organismos (g, PH) en una balanza analítica (Sartorius BP105; $\pm 0.0005\text{g}$). Posteriormente se colocaron en una estufa a 60°C por tres días y se pesaron nuevamente para determinar el peso seco (g, PS). La tasa respiratoria se expresó en $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$. Los resultados se transformaron en unidades de energía ($\text{cal h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$) utilizando el coeficiente oxalórico de $3.32 \text{ cal mg}^{-1} \text{ O}_2$ (Elliot y Davinson, 1975).

B. Excreción nitrogenada

Se consideró al amonio como el principal producto de excreción nitrogenada de los mejillones (Wright, 1995). La excreción nitrogenada se evaluó en los mismos organismos y en el mismo

dispositivo descrito anteriormente. Se tomó una muestra de agua de 1 ml al inicio y al término del cierre de cada cámara respirométrica. La concentración de nitrógeno de amonio total (mg N-AT L⁻¹) de cada muestra de agua se determinó mediante la técnica de Azul de Indofenol (Rodier, 1981) adaptada para microplaca (Zúñiga, 2005). El principio del método sustenta que en un medio alcalino y en presencia del nitroprusiato, que actúa como catalizador, los iones de amonio presentes reaccionan con el fenol y el hipoclorito de sodio formando el color azul de indofenol, el cual puede evaluarse con un espectrofotómetro a 640nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de amonio presente (Díaz *et al.*, 2006).

La determinación del N-AT se efectuó en 200 µl de cada muestra de agua, volumen al que se adicionó fenol 0.534M (16 µl), nitroprusiato 8.47 mM (16 µl) y solución oxidante [1ml solución de citrato (citrato de sodio 0.8M en NaOH 0.5M) y 0.25 ml de hipoclorito de sodio 5%] (24 µl); posteriormente se agitó y dejó reposar durante 30 minutos y posteriormente se leyó en un lector de microplaca (BioRad mod 550) a 655 nm. La concentración de amonio se estableció a partir de una curva patrón de cloruro de amonio de concentraciones conocidas.

La excreción nitrogenada de los organismos se calculó por la diferencia del nitrógeno de amonio total al inicio (N-ATi), y al final (N-ATf) del cierre de las cámaras, considerando el volumen de las cámaras (V, L) y el tiempo de cerrado (T, h) de las mismas. Los resultados se corrigieron por el valor obtenido de la cámara testigo.

$$N-AT = \frac{[(N-ATi) - (N-ATf)] V}{T}$$

Una vez terminada la prueba, se registró el peso húmedo de los organismos (g, PH) utilizando una balanza analítica (Sartorius BP105 ± 0.0005g). Posteriormente se colocaron en una estufa a 60°C por tres días y se pesaron nuevamente, para conocer su peso seco (g, PS). La tasa de excreción nitrogenada de los mejillones se expresó en mg N-AT h⁻¹ g⁻¹ PS. Los resultados se transformaron a valores calóricos (cal h⁻¹ g⁻¹ PS) utilizando el coeficiente nitrocalórico de 5.49 cal mg⁻¹ N-NH₄⁺ (Elliot y Davinson, 1975.)

C. Relación atómica O:N

A partir de la integración de la tasa respiratoria y la excreción nitrogenada de los organismos provenientes de cada sitio de estudio, se calculó la razón atómica O:N, la cual es empleada para describir la naturaleza del sustrato metabolizado como fuente energética. Valores entre 3 y 16 se relacionan con el catabolismo estricto de proteínas; valores de entre 50 y 60 con el

catabolismo similar de lípidos y proteínas y valores mayores de 60 se relacionan con el catabolismo de lípidos y carbohidratos (Mayzaud y Conover, 1988).

La proporción entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada, es calculada en equivalentes atómicos de acuerdo con la siguiente fórmula (Bayne *et al.*, 1985):

$$\text{O:N} = (\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}/16) / (\text{mg N-NH}_4^+ \text{ h}^{-1}/14)$$

7.4. Cuantificación de tóxicos.

El tratamiento de las muestras de agua de cada sitio de muestreo para el análisis de plaguicidas organofosforados (OFs) se efectuó de acuerdo con los métodos estandarizados de UNEP/IAEA (1982). La extracción de los plaguicidas se efectuó en el laboratorio de cromatografía del CIAD, Mazatlán. Se agregaron 50 ml de diclorometano a un volumen de muestra de 2 litros, se mezcló vigorosamente por 5 minutos, tres veces, y se retiró la fase orgánica la cual se colocó en un frasco ámbar; esta operación se repitió una vez más y se unificaron las dos fases orgánicas. Las fracciones obtenidas fueron congeladas para su posterior análisis (a -20°C).

La determinación de los OFs en agua, sedimento y tejido blando de los organismos se realizó en los Laboratorios abc conforme al método de la EPA 8141-1B (1998). Se realizó la extracción de los plaguicidas por el método Soxhlet, para las muestras de sedimentos y organismos y se cuantificaron los OFs con un cromatógrafo de gases con detector de Nitrógeno-Fósforo. La determinación de los OCs se efectuó en el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM (por la M. en C. Guadalupe Ponce Vélez) acorde al método UNEP/IAEA (1982; para sedimento) y UNEP-FAO/IOC/IAEA, (1986; para organismos marinos). La extracción de los plaguicidas se realizó por el método de Soxhlet y la muestra final se analizó en un cromatógrafo de gases con un detector de captura de electrones (Agilent 6890N).

7.5. Análisis estadístico.

Para el caso particular del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada se realizó una prueba de *t* para determinar similitud significativa entre los dos tiempos de medición de las respuestas y, en caso de no encontrar diferencias significativas, agrupar los datos. Para

establecer las relaciones de causalidad entre los diferentes biomarcadores evaluados, los plaguicidas bioacumulados y la concentración de éstos en las matrices ambientales evaluadas, se realizaron pruebas de correlación (Zar, 1999). Para determinar diferencias significativas del efecto espacial (sitios de muestreo) y temporal (época del año) sobre cada respuesta biológica evaluada se realizaron ANOVAS, acoplada con la prueba de *Tukey* para la comparación entre grupos (Zar, 1999).

8. RESULTADOS

8.1. Parámetros fisicoquímicos.

La temperatura registrada en los diferentes sitios de muestreo y en las dos épocas del año Octubre (Lluvias) y Mayo (secas) fueron muy similares con excepción de Puente Juárez, sitio en el que se registró una temperatura menor (25.1°C) en la época de secas. En la época de secas, la salinidad registrada en los tres sitios de muestreo fue mayor que en la época de lluvias, con incrementos de 2.8, 4.7 y 4.9 ups para Puente Juárez, Astillero y Castillo, respectivamente. El pH en agua y sedimento fue muy homogéneo en los sitios de muestreo en ambas épocas climáticas. El oxígeno disuelto en el agua presentó las menores concentraciones en Puente Juárez tanto en lluvias como en secas; no obstante, las mayores variaciones entre las dos épocas climáticas se registraron en Castillo, con diferencias de 4.6 mg O₂ l⁻¹ de entre la época de lluvias y la de secas (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo en las dos épocas climáticas. ne: no evaluado.

| Fecha | Sitio de muestreo | Ubicación GPS | Temperatura °C (Hora) | Salinidad ups | pH | | mg O ₂ l ⁻¹ |
|----------|-------------------|---------------------------|-----------------------|---------------|------|-------|-----------------------------------|
| | | | | | Agua | Suelo | |
| Lluvias | | | | | | | |
| 24/10/04 | Pte. Juárez | 23°12'33"N 106°24'27"W | 30.6 (13:30) | 31.6 | 7.65 | ne | 2.7 |
| 26/10/04 | Astillero | 23°11'23"N 106°21'40"W | 29.5 (13:40) | 30.3 | ne | ne | 5.3 |
| 27/10/04 | Castillo | 23°10'13"N 106°20'34"W | 29.5 (13:21) | 31.5 | ne | ne | 3.7 |
| Secas | | | | | | | |
| 6/05/05 | Pte. Juárez | 23°12'33"N 106°24'27"W | 25.1 (12:25) | 34.4 | 7.69 | 7 | 4.8 |
| 7/05/05 | Astillero | 23°11'23"N 106°21'40"W | 28.9 (12:16) | 35 | 7.6 | 6.9 | 5.8 |
| 8/05/05 | Castillo | 23°10'13"N 106°20'34"W | 28.3 (12:16) | 36.4 | 7.77 | 6.9 | 8.3 |

8.2. Evaluación de biomarcadores.

8.2.1. Biomarcadores de Exposición

A. Esterasas

La actividad enzimática (nmoles sustrato min⁻¹ mg⁻¹ proteína) de la acetilcolinesterasa (AChE) y la carboxilesterasa (CbE) se evaluó tanto en el músculo como en la hemolinfa de los mejillones de los tres sitios de muestreo y para las dos épocas climáticas, resultados que se presentan en la Tabla 2 y en la Figura 6.

Tabla 2. Actividad enzimática específica (nmoles sustrato min⁻¹ mg⁻¹ proteína) y actividad total (µmoles sustrato min⁻¹ ml⁻¹ ó g⁻¹) de esterasas (Acetilcolinesterasa y Carboxilesterasa) en la hemolinfa y el músculo de *Mytella strigata* proveniente de los diferentes sitios de captura y evaluados durante la época de lluvias y de secas. Se señalan valores promedio y error estándar ($\bar{X} \pm ES$). Letras diferentes denotan para cada temporada del año diferencias significativas entre los sitios de captura (p<0.05). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas (p<0.05). Se incluye el número de organismos analizados por sitio (n).

A. Acetilcolinesterasa

| Época | Sitio | Actividad específica nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | Actividad total | | | |
|---------|-------------|--|---|--|----|---|---|--|----|
| | | Hemolinfa | | Músculo | | Hemolinfa | | Músculo | |
| | | µmoles min ⁻¹ ml ⁻¹ | n | µmoles min ⁻¹ g ⁻¹ | n | µmoles min ⁻¹ ml ⁻¹ | n | µmoles min ⁻¹ g ⁻¹ | n |
| Lluvias | Pte. Juárez | 1201 ± 172 ^{a1} | 4 | 17.5 ± 1.2 ^{a1} | 10 | 91.9 ± 3.5 ^{a1} | 4 | 13.8 ± 1.3 ^{a1} | 10 |
| | Astillero | 603 ± 113 ^{b1} | 7 | 10.5 ± 2.3 ^{b1} | 10 | 109.4 ± 5.5 ^{a1} | 7 | 6.1 ± 1.2 ^{b1} | 10 |
| | Castillo | 1266 ± 197 ^{a1} | 8 | 5.9 ± 0.5 ^{b1} | 8 | 105.6 ± 3.0 ^{a1} | 7 | 4.6 ± 0.5 ^{b1} | 10 |
| Secas | Pte. Juárez | 387 ± 41 ^{a2} | 8 | 7.1 ± 0.7 ^{a2} | 11 | 111.6 ± 3.9 ^{a1} | 8 | 9.5 ± 0.5 ^{a2} | 10 |
| | Astillero | 529 ± 35 ^{b1} | 9 | 9.9 ± 1.0 ^{a1} | 10 | 107 ± 5.4 ^{a1} | 9 | 11.3 ± 0.8 ^{a2} | 10 |
| | Castillo | 374 ± 18 ^{a2} | 7 | 9.3 ± 1.1 ^{a1} | 11 | 114.5 ± 6.8 ^{a1} | 9 | 10.1 ± 0.8 ^{a2} | 11 |

B. Carboxilesterasa

| Época | Sitio | Actividad específica nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | | | Actividad total | | | |
|---------|-------------|--|----|--|----|---|----|--|----|
| | | Hemolinfa | | Músculo | | Hemolinfa | | Músculo | |
| | | µmoles min ⁻¹ ml ⁻¹ | n | µmoles min ⁻¹ g ⁻¹ | n | µmoles min ⁻¹ ml ⁻¹ | n | µmoles min ⁻¹ g ⁻¹ | n |
| Lluvias | Pte. Juárez | 445 ± 55 ^{a1} | 4 | 46.3 ± 3.4 ^{a1} | 9 | 34.2 ± 0.9 ^{a1} | 4 | 35.1 ± 2.8 ^{a1} | 9 |
| | Astillero | 257 ± 58 ^{a1} | 6 | 35.8 ± 3.3 ^{a1} | 9 | 42.7 ± 2.6 ^{a1} | 6 | 23.1 ± 3.5 ^{b1} | 9 |
| | Castillo | 441 ± 60 ^{a1} | 8 | 36.2 ± 2.8 ^{a1} | 8 | 39.7 ± 3.0 ^{a1} | 8 | 24.4 ± 1.9 ^{b1} | 8 |
| Secas | Pte. Juárez | 134 ± 12 ^{a1} | 8 | 19.6 ± 2.4 ^{a2} | 10 | 43.6 ± 2.7 ^{a1} | 9 | 31.9 ± 4.1 ^{a1} | 11 |
| | Astillero | 189 ± 11 ^{b1} | 10 | 21.4 ± 0.8 ^{a2} | 8 | 39.7 ± 2.8 ^{a1} | 10 | 26.6 ± 2.1 ^{a1} | 10 |
| | Castillo | 157 ± 14 ^{a,b2} | 8 | 21.0 ± 1.5 ^{a2} | 11 | 45.4 ± 4.1 ^{a1} | 9 | 23.8 ± 1.8 ^{a1} | 11 |

De acuerdo a la literatura, se esperaba una mayor actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en la hemolinfa, y una mayor actividad de la carboxilesterasa en el homogeneizado del organismo completo de los bivalvos (Galloway *et al.*, 2002b; Basack *et al.*, 1998). Sin embargo los resultados obtenidos denotan que la actividad enzimática de ambas esterasas fue, de manera general, más elevada en la hemolinfa de los mejillones (Fig. 7; Tabla 2).

Actividad enzimática de AChE

De manera global se observó un efecto espacio-temporal en la actividad enzimática de las esterasas AChE evaluadas en *M. strigata* (p< 0.05) (Fig. 7; Tabla 2). En la época de lluvias, los niveles de la AChE en hemolinfa presentaron diferencias significativas entre los organismos provenientes de Astillero con respecto a los provenientes de Puente Juárez y El Castillo, con actividades menores en 1.99 y 2.1 veces respectivamente (p<0.05). En el caso del músculo, la actividad enzimática de AChE de los organismos provenientes de Puente Juárez fue 1.67 y

2.99 veces mayores a los organismos provenientes de Astillero y El Castillo respectivamente ($p < 0.05$).

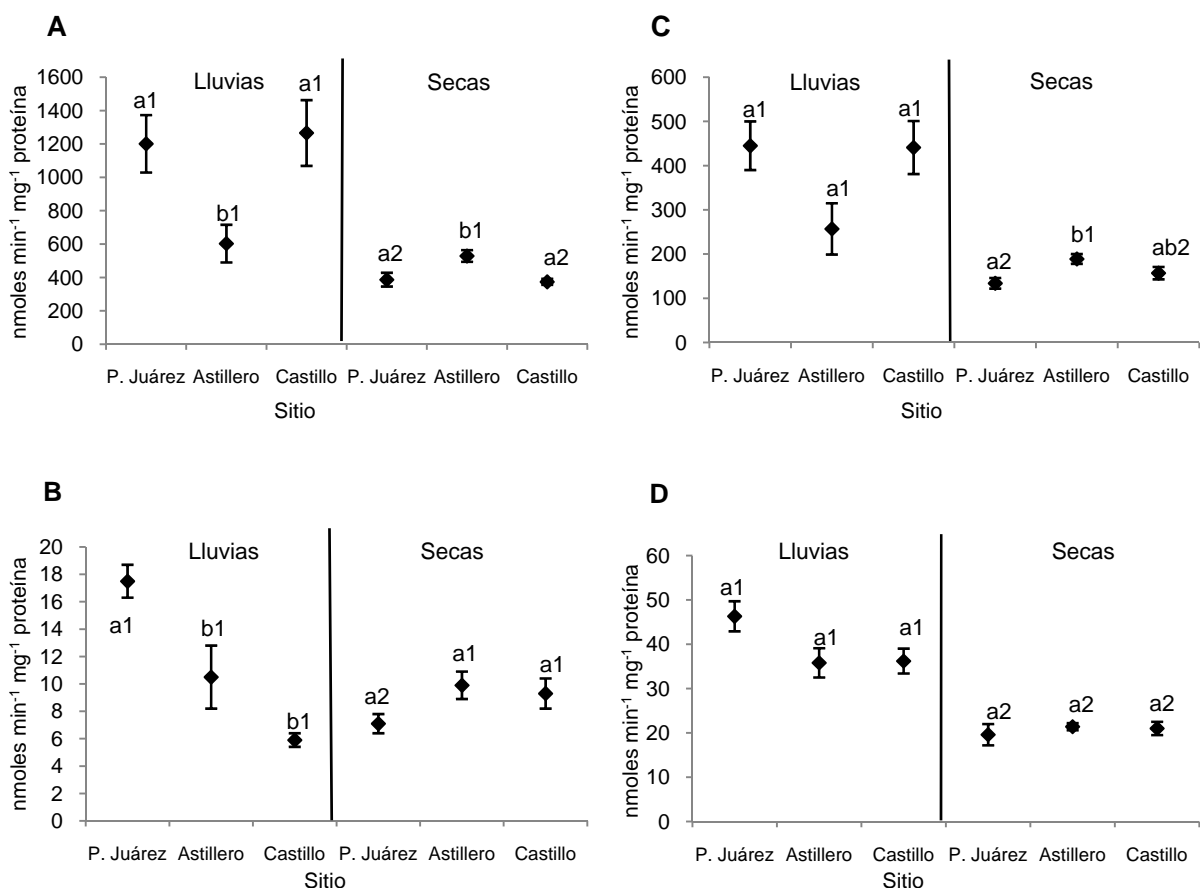


Fig. 7. Actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa en hemolinfa (A) y músculo (B) y Carboxilesterasa en hemolinfa (C) y músculo (D), (nmoles sustrato min⁻¹ mg⁻¹ proteína), de *M. strigata* provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados durante la época de lluvias y de secas. Se grafican $\bar{X} \pm ES$. Letras diferentes denotan para cada temporada del año, diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$).

En la época de secas, la AChE en hemolinfa presentó la mayor actividad en los organismos de Astillero con actividades 1.36 y 1.41 veces más elevadas que los organismos procedentes de Puente Juárez y El Castillo, respectivamente ($p < 0.05$); en el músculo, no se observaron diferencias significativas de la actividad enzimática entre los organismos de los diferentes sitios de captura ($p > 0.05$).

La época del muestreo ejerció un efecto significativo en la AChE. La actividad enzimática en la hemolinfa de los organismos provenientes de Puente Juárez y El Castillo fue menor durante

secas (3.1 y 3.38 veces, respectivamente); en músculo, ésta disminución (2.4 veces) se observó solamente en los organismos de Puente Juárez ($p < 0.05$; Fig. 7; Tabla 2).

Actividad enzimática de CbE

Durante la época de lluvias, la actividad de la Carboxilesterasa en hemolinfa fue similar en los organismos provenientes de los tres sitios de muestreo ($p > 0.05$). En la época de secas la actividad de la CbE en hemolinfa de los mejillones de Astillero fue 1.41 veces mayor que la actividad registrada en los organismos de Puente Juárez, ($p < 0.05$), en tanto que la actividad enzimática de los organismos de El Castillo fue similar a la de los otros sitios de estudio ($p > 0.05$). En cada época climática, la actividad enzimática en músculo fue similar en los organismos de los tres sitios de muestreo ($p > 0.05$).

La época de muestreo, ejerció un efecto significativo en la concentración de la enzima tanto en la hemolinfa como en el músculo observándose una inhibición significativa en la época de secas ($p < 0.05$). En la hemolinfa la inhibición (de 2.8 veces) se observó sólo en los organismos de El Castillo, mientras que en el músculo, la actividad fue 2.36, 1.67 y 1.72 veces menor en los mejillones de Puente Juárez, Astillero y El Castillo, respectivamente ($p < 0.05$) (Tabla 2; Fig. 7).

En la actividad total de las esterasas (Tabla 2), no se observaron diferencias significativas entre los sitios ni entre las dos épocas de muestreo en la actividad enzimática de las dos esterasas en hemolinfa ($p > 0.05$). Para el caso de la actividad total de la Acetilcolinesterasa en músculo durante la época de lluvias, la actividad enzimática de los organismos procedentes de Puente Juárez fue 2.27 y 3.0 mayor que los organismos de Astillero y Castillo, respectivamente ($p < 0.05$); en contraste, la actividad enzimática fue similar en los organismos de los tres sitios de muestreo durante la época de secas ($p > 0.05$). Se observó un efecto significativo de la estacionalidad en la actividad de la Acetilcolinesterasa en músculo ($p < 0.05$), siendo 1.45 veces mayor en Puente Juárez y 1.85 y 2.20 veces menor en Astillero y Castillo, respectivamente, en la época de lluvias, respecto a la de secas.

En el caso de la actividad total de la Carboxilesterasa en músculo, durante la época de lluvias la actividad enzimática en los organismos procedentes de Puente Juárez fue 1.52 y 1.43 veces mayor que los de Astillero y Castillo, respectivamente ($p < 0.05$). En la época de secas no hubo diferencias significativas entre los sitios de muestreo ($p > 0.05$). Tampoco se observó un efecto significativo de la época de muestreo sobre la actividad de ésta enzima ($p > 0.05$) (Tabla 2). De

manera similar a lo observado en la actividad enzimática específica, la actividad total de la acetilcolinesterasa es mucho mayor en hemolinfa que en músculo ($p < 0.05$), comportamiento menos evidente en el caso de la carboxilesterasa cuya actividad enzimática fue 1.5 veces mayor en la hemolinfa que en el músculo (Tabla 2).

B. Actividad EROD.

La actividad enzimática EROD ($\text{pmoles min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$), se evaluó en la glándula digestiva de los mejillones de los tres sitios de muestreo y para las dos épocas climáticas, resultados que se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 7. De manera general los resultados obtenidos en *Mytella strigata*, son muchos más bajos que los reportados en otras especies de bivalvos como *Dreissena polymorpha* (Ricciardi *et al.*, 2006; Binelli *et al.*, 2006).

Para la época de lluvias, la actividad EROD en glándula digestiva fue similar entre los tres sitios de muestreo ($p > 0.05$). En contraste, en la época de secas los organismos procedentes de Astillero y El Castillo presentaron una actividad 15.25 y 15.5 veces mayor, respectivamente, que los de Puente Juárez ($p < 0.05$). La estacionalidad tuvo un efecto significativo en la actividad EROD en los mejillones provenientes de los sitios de Astillero y El Castillo siendo 7.6 y 4.1 veces mayor, respectivamente, en la época de secas que en la de lluvias ($p < 0.05$) (Tabla 3, Fig. 8).

Tabla 3. Actividad ERDO ($\text{pmoles min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$) en la glándula digestiva de *M. strigata* provenientes de los diferentes sitios de captura durante la época de lluvias y de secas. Se señalan valores promedio y error estándar ($\bar{X} \pm \text{ES}$). Letras diferentes denotan para cada temporada del año diferencias significativas entre los sitios de captura. Números diferentes denotan para cada sitio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$). Se incluye el número de organismos analizados por sitio (n).

| Época | Sitio | Actividad EROD | n |
|---------|---------------|-----------------------|---|
| Lluvias | Puente Juárez | 0.24 ± 0.23^{a1} | 2 |
| | Astillero | 0.080 ± 0.04^{a1} | 5 |
| | Castillo | 0.15 ± 0.06^{a1} | 2 |
| Secas | Puente Juárez | 0.040 ± 0.00^{a1} | 5 |
| | Astillero | 0.61 ± 0.08^{b2} | 5 |
| | Castillo | 0.62 ± 0.01^{b2} | 3 |

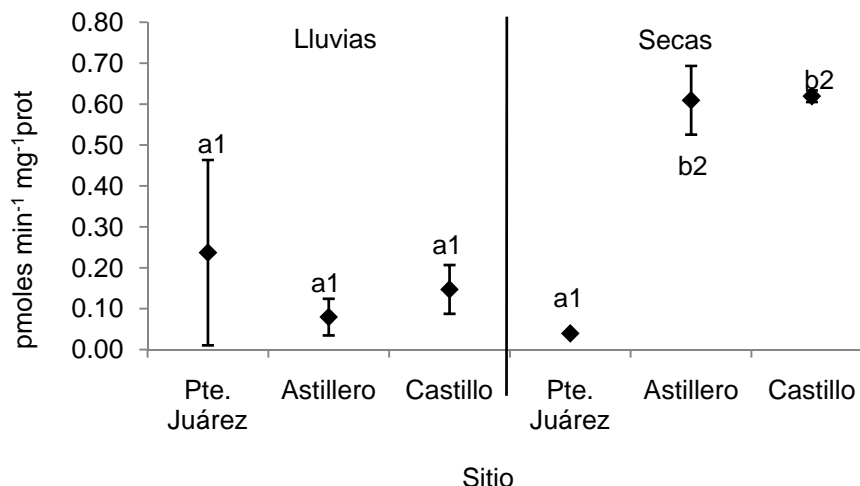


Fig. 8. Actividad EROD (pmoles min⁻¹ mg⁻¹ proteína) en la glándula digestiva de *M. strigata* de los diferentes sitios de captura y en la época de lluvias y secas. Se grafica $\bar{X} \pm ES$. Letras diferentes denotan para cada temporada del año diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$).

8.2.2. Biomarcadores de Efecto

8.2.2.1. Nivel sub-organismo

Los biomarcadores de efecto evaluados a nivel sub-organismo incluyen los niveles de FRAP en hemolinfa, la estabilidad lisosomal en los hemocitos de la hemolinfa, las concentraciones de proteína soluble total en hemolinfa y en extracto de músculo y el índice proteico, resultados que se señalan en la Tabla 4 y en las Figuras 8 y 9.

Tabla 4. Concentración de proteína total soluble en hemolinfa y en músculo (mg ml⁻¹), Índice proteico, FRAP (Incremento relativo %) y Estabilidad lisosomal (DO mg⁻¹ ml⁻¹ prot) en *Mytella strigata* provenientes de los diferentes sitios de estudio. Se incluyen valores promedio y de error estándar ($\bar{X} \pm ES$). * Valores promedios estimados. Letras diferentes denotan para cada temporada del año diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$). ne: no evaluado. Se incluye el número de organismos analizados por sitio (n).

| Época | Sitio | Proteína Total Soluble (mg ml ⁻¹) | | | | Índice proteico | FRAP | Estabilidad Lisosomal | | |
|---------|-----------|---|----|---------------------------|----|----------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|----|
| | | Hemolinfa | n | Músculo | n | | | | | |
| Lluvias | P. Juárez | 0.11 ± 0.03 ^{a1} | 9 | 1.98 ± 0.13 ^{a1} | 10 | 0.05 ± 0.01 ^{a1} | 0.38 ± 0.03 ^{a1} | 10 | ne | |
| | Astillero | 0.42 ± 0.08 ^{b1} | 10 | 1.88 ± 0.32 ^{a1} | 10 | 0.18 ± 0.03 ^{b1} | 0.29 ± 0.03 ^{b1} | 8 | ne | |
| | Castillo | 0.35 ± 0.08 ^{ab1} | 9 | 1.82 ± 0.14 ^{a1} | 10 | 0.19 ± 0.03 ^{b1} | 0.33 ± 0.01 ^{ab1} | 10 | ne | |
| Secas | P. Juárez | 0.79 ± 0.07 ^{a2} | 9 | 3.68 ± 0.14 ^{a2} | 11 | *0.21 ± 0.02 ^{a2} | 0.32 ± 0.02 ^{a1} | 10 | 65.89 ± 14.08 ^a | 7 |
| | Astillero | 0.53 ± 0.03 ^{a1} | 10 | 2.98 ± 0.16 ^{a2} | 10 | *0.18 ± 0.01 ^{a1} | 0.25 ± 0.02 ^{b1} | 9 | 14.17 ± 3.16 ^b | 10 |
| | Castillo | 0.72 ± 0.08 ^{a2} | 10 | 2.72 ± 0.16 ^{a2} | 10 | *0.24 ± 0.03 ^{a1} | 0.23 ± 0.01 ^{b2} | 8 | 66.47 ± 22.49 ^a | 4 |

A. FRAP (Potencial antioxidante reductor del Fe).

Los resultados de FRAP se expresaron como incremento relativo % de la cantidad de sulfato ferroso formado a los 10 minutos, respecto a la cantidad formada al minuto 0, utilizando una curva patrón de concentraciones conocidas de sulfato ferroso 1mM (Tabla 4, Fig. 9). Para la época de lluvias sólo los organismos de Puente Juárez presentaron un aumento significativo de 1.31 veces con respecto a los de Astillero ($p < 0.05$). De manera similar y en la época de secas, los valores de FRAP en la hemolinfa de los organismos de Puente Juárez fueron 1.28 y 1.4 veces mayor que los de Astillero y El Castillo ($p < 0.05$; Fig. 9). No obstante, el efecto estacional se observó sólo en los organismos provenientes de El Castillo con niveles 1.43 veces mayores en la época de lluvias respecto a la de secas.

B. Estabilidad lisosomal.

Debido a problemas en la adhesión de los hemocitos de los bivalvos en las microplacas utilizadas en la primera época (lluvias), no se contaron con datos veraces de la estabilidad lisosomal para hacer el análisis, por lo que sólo se presenta el comportamiento de ésta respuesta en la época de secas (Tabla 4, Fig. 9). Los hemocitos de la hemolinfa de los mejillones que incorporaron mayor cantidad del colorante rojo neutro corresponden a los sitios de Puente Juárez y El Castillo, con valores similares ($p > 0.05$); los hemocitos con menor capacidad de incorporación del colorante por los lisosomas correspondieron a los organismos de Astillero, siendo 4.65 y 4.69 veces menores significativamente que los bivalvos de Puente Juárez y El Castillo, respectivamente ($p < 0.05$).

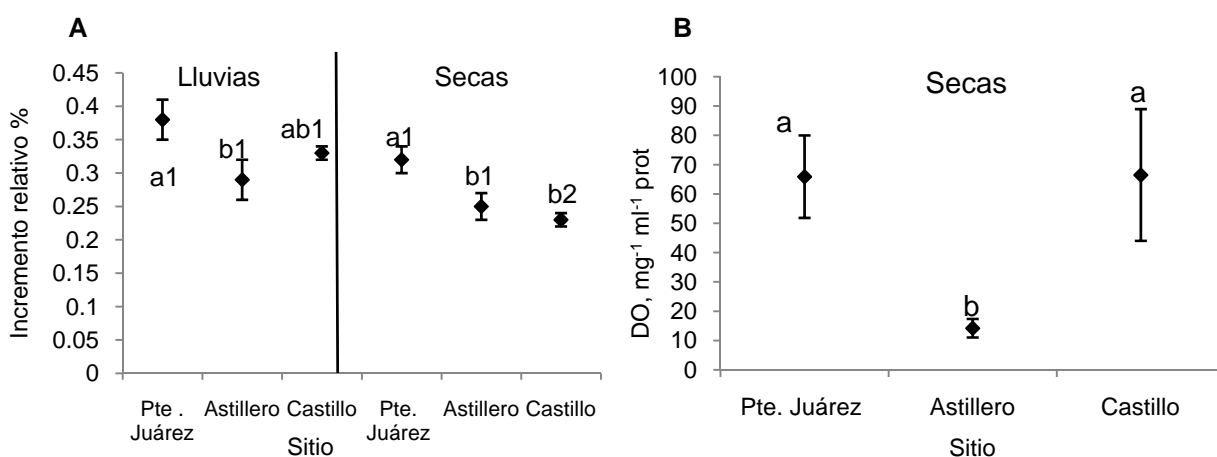


Fig. 9. FRAP (A. Incremento relativo, %) y Estabilidad Lisosomal (B. DO, mg⁻¹ ml⁻¹ prot.) en la hemolinfa de *M. strigata* provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados durante la época de lluvias y de secas. Se grafica $\bar{X} \pm ES$. Para cada actividad enzimática, letras diferentes denotan para cada temporada del año, diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$).

C. Proteínas.

En *M. strigata*, la concentración de proteína soluble total se evaluó en muestras de hemolinfa y de músculo de los organismos provenientes de los tres sitios de muestreo y en las dos épocas del año, muestras en las cuales también se evaluó la actividad enzimática de las esterasas. En todos los casos los niveles de proteína en músculo fueron mayor que los de hemolinfa ($p < 0.05$; Tabla 4, Fig. 10).

En la temporada de lluvias, la concentración de proteína en la hemolinfa de los mejillones difirió entre los sitios de colecta ($p < 0.05$); en los organismos de Astillero los niveles de proteína fueron 3.81 veces mayor que los provenientes de Puente Juárez ($p < 0.05$), mientras que las concentraciones de proteína en los organismos de Castillo fueron similares a los otros sitios de muestreo ($p > 0.05$). En la época de secas, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de proteína en la hemolinfa de los mejillones, entre los sitios de muestreo ($p > 0.05$). El nivel de proteína soluble en el músculo de los bivalvos de los diferentes sitios de muestreo en cada época climática, fue similar ($p > 0.05$).

El efecto de la temporalidad fue significativo en la proteína total soluble de la hemolinfa de los organismos provenientes de Puente Juárez y El Castillo los cuales presentaron niveles 7.18 y 2.05 veces mayores en la época de secas respecto a la de lluvias; de igual manera, la concentración de proteína total soluble del músculo de los organismos provenientes de Puente Juárez, Castillo y Astillero presentó incrementos significativos en la época de secas de 1.85, 1.58 y 1.49 veces respectivamente, respecto a la época de lluvias ($p < 0.05$).

Con respecto al Índice proteico, para la época de lluvias, los organismos provenientes de Puente Juárez presentaron niveles 3.6 y 3.8 veces menores que los bivalvos de Astillero y Castillo, respectivamente ($p < 0.05$). Para el caso de la época de secas (datos estimados), no se observaron diferencias significativas entre los tres sitios de muestreo. El efecto de la temporalidad sólo fue significativo para los mejillones provenientes de Puente Juárez, siendo 4.2 veces mayor para la época de secas (Tabla 4; Fig.10).

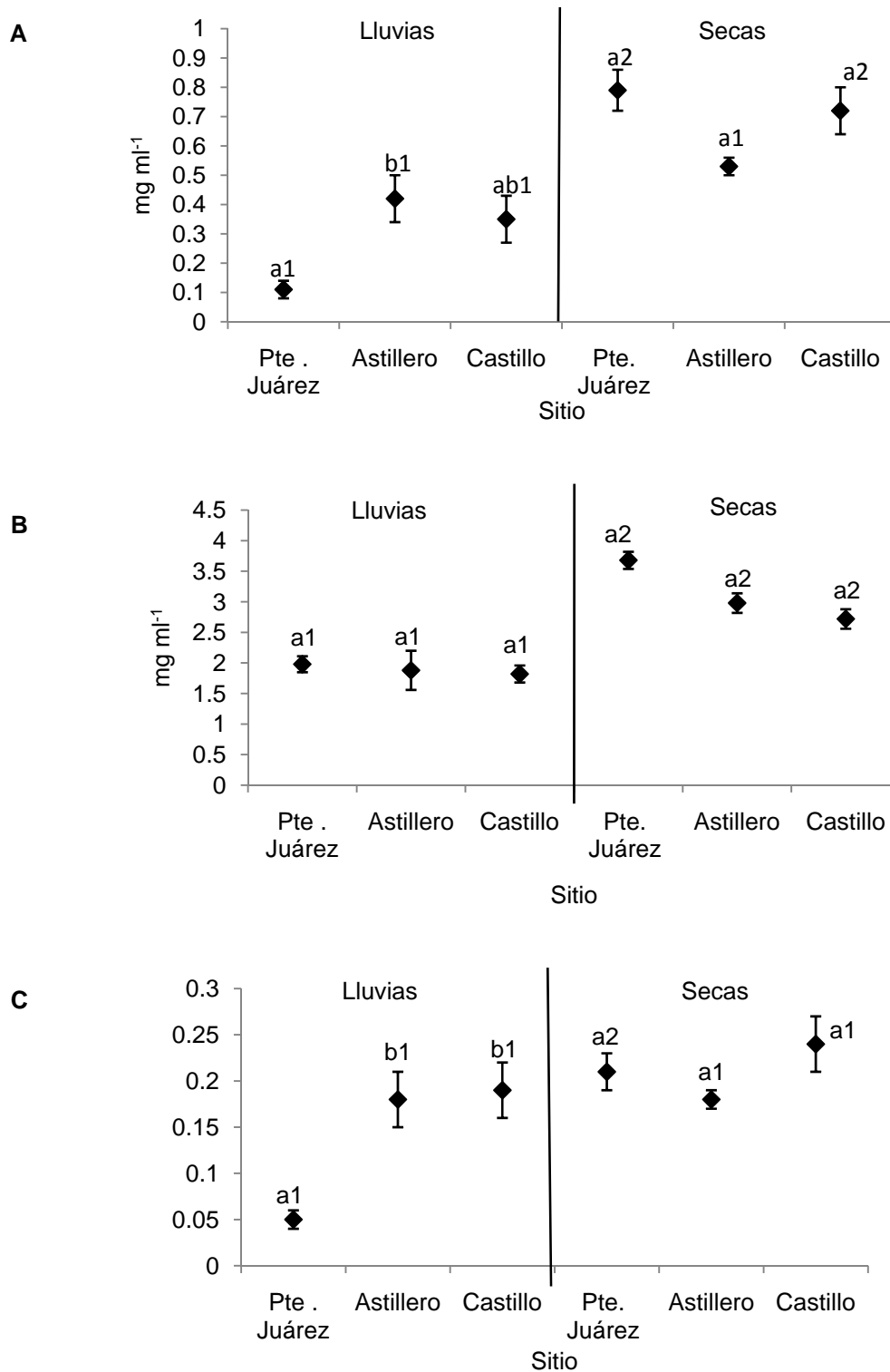


Fig. 10. Concentración de proteína total soluble (mg ml⁻¹) en hemolinfa (A), en músculo (B) e Índice proteico (C) en *Mytella strigata* provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados en las épocas de lluvias y secas. Se grafica $\bar{X} \pm ES$. Letras diferentes denotan para cada temporada del año, diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$).

8.2.2.2. Nivel Organismo.

A. Consumo de Oxígeno.

Los resultados del análisis de la prueba de *t student*, entre los registros de ambos periodos de medición del consumo de oxígeno, indicaron diferencias significativas en al menos un grupo de organismos tanto en la época de lluvias como de secas (época de lluvias: Castillo $p = 0.013$; época de secas: Astillero $p = 0.003$) por lo cual se decidió efectuar el análisis sólo con el segundo tiempo de medición, considerando que los animales tuvieron un mayor periodo de aclimatación en las cámaras respirométricas.

Tabla 5. Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$; $\text{cal h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$); excreción nitrogenada ($\text{mg N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$; $\text{cal N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$) y relación O:N de *Mytella strigata* provenientes de los diferentes sitios de estudio. Se incluyen valores promedio y de error estándar ($\bar{X} \pm \text{ES}$). Letras diferentes denotan para cada temporada del año, diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$). Se incluye el número de organismos analizados por sitio (n).

| Época | Sitio | | Puente Juárez | n | Astillero | n | Castillo | n |
|---------|---|--|--|---|---|---|--|---|
| | Respuesta | | | | | | | |
| Lluvias | Consumo de oxígeno | | 1.36 ± 0.28^{a1} 4.52 ± 0.93^{a1} | 9 | 1.70 ± 0.13^{a1} 5.64 ± 0.43^{a1} | 8 | 1.87 ± 0.08^{a1} 6.21 ± 0.27^{a1} | 8 |
| | $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ $\text{cal h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ | | | | | | | |
| Secas | Consumo de oxígeno | | 1.41 ± 0.09^{a1} 4.68 ± 0.30^{a1} | 9 | 1.48 ± 0.04^{a1} 4.95 ± 0.14^{a1} | 8 | 1.02 ± 0.04^{b2} 3.37 ± 0.15^{b2} | 7 |
| | $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ $\text{cal h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ | | | | | | | |
| Lluvias | Excreción Nitrogenada | | 0.06 ± 0.01^{a1} 0.33 ± 0.05^{a1} | 8 | 0.15 ± 0.05^{a1} 0.82 ± 0.27^{a1} | 6 | 0.09 ± 0.03^{a1} 0.49 ± 0.16^{a1} | 6 |
| | $\text{mg N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ $\text{cal N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ | | | | | | | |
| Secas | Excreción Nitrogenada | | 0.08 ± 0.01^{a1} 0.42 ± 0.05^{a1} | 9 | 0.084 ± 0.01^{a1} 0.46 ± 0.05^{a1} | 8 | 0.03 ± 0.01^{a1} 0.16 ± 0.05^{a1} | 8 |
| | $\text{mg N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ $\text{cal N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$ | | | | | | | |
| Lluvias | Relación O:N | | 17.19 ± 3.61^{a1} | | 19.95 ± 13.14^{a1} | | 31.08 ± 12.55^{a1} | |
| Secas | Relación O:N | | 16.34 ± 2.22^{a1} | | 15.34 ± 2.79^{a1} | | 37.47 ± 9.87^{a1} | |

En la época de lluvias los resultados obtenidos denotan que el consumo de oxígeno fue similar en los tres sitios de muestreo ($p > 0.05$). En contraste, en la época de secas la tasa metabólica de los organismos de El Castillo fue 1.38 y 1.45 veces menor que los de Puente Juárez y Astillero ($p < 0.05$); los organismos de éstos dos últimos sitios presentaron tasas respiratorias similares ($p > 0.05$). La estacionalidad modificó el consumo de oxígeno sólo en los organismos del sitio de El Castillo, quienes mostraron una reducción de 1.83 veces en la época de secas respecto a la de lluvias ($p < 0.05$) (Tabla 5; Figura 10).

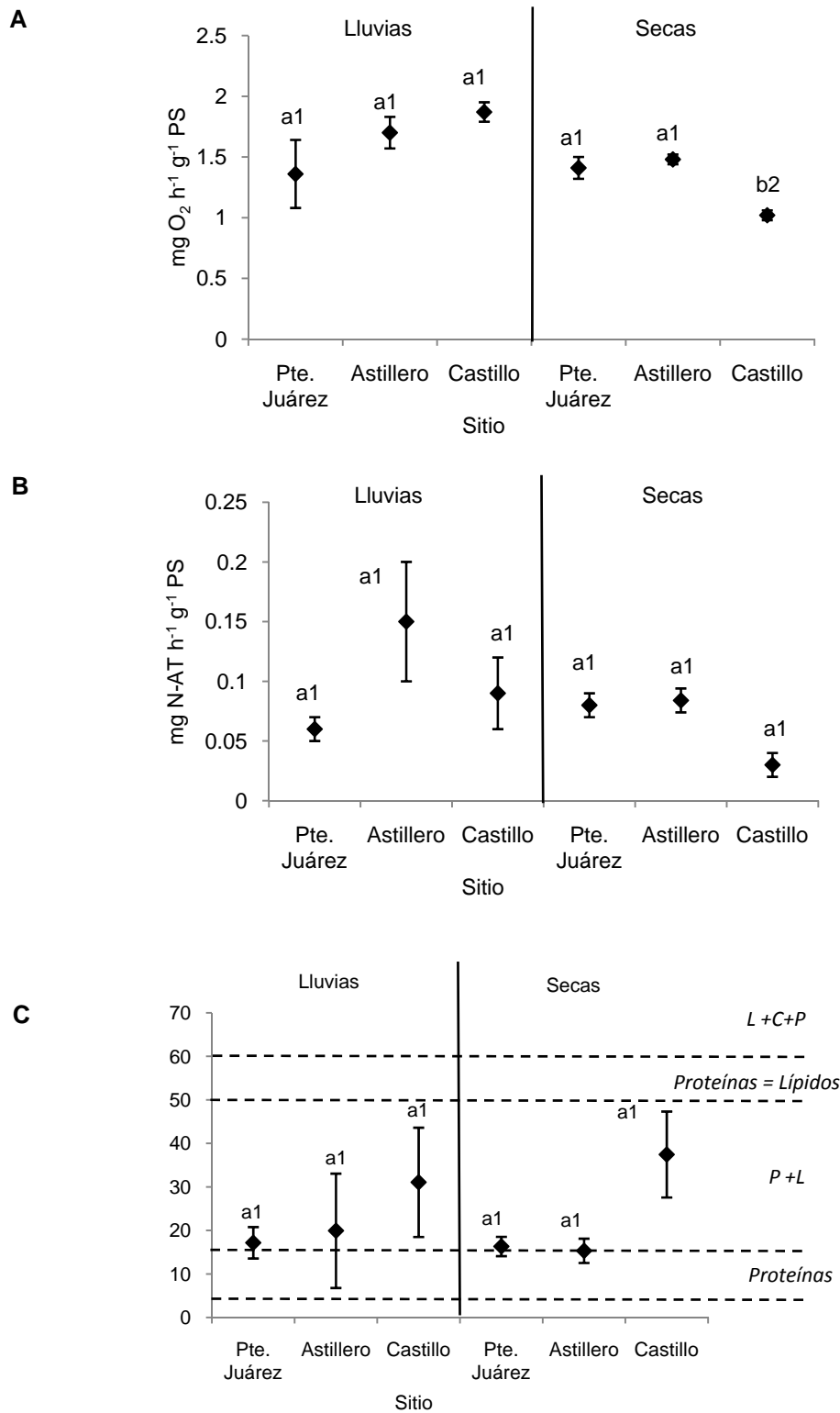


Fig. 11. Consumo de oxígeno (A), ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$), excreción nitrogenada (B), ($\text{mg N-AT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$) y relación O:N (C) de *Mytella strigata* provenientes de los diferentes sitios de estudio y evaluados durante la época de lluvias y secas. Se grafican $\bar{X} \pm \text{ES}$. Letras diferentes denotan para cada temporada del año, diferencias significativas entre los sitios de captura ($p < 0.05$). Números diferentes denotan para cada sitio de estudio diferencias significativas entre épocas climáticas ($p < 0.05$).

B. Excreción nitrogenada.

De manera similar al consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada se evaluó en dos periodos consecutivos y se presentaron diferencias significativas entre los registros, en ambas épocas climáticas: (época de lluvias: Puente Juárez $p = 0.01$; época de secas: Puente Juárez $p = 0.007$). Así, se tomó la misma estrategia mencionada con el consumo de oxígeno.

La excreción nitrogenada tanto en la época de lluvias como en la de secas no presentó diferencias significativas entre los organismos de los diferentes sitios de muestreo; tampoco hubo efecto de la estacionalidad en ésta respuesta ($p > 0.05$) (Tabla 5; Figura 10).

C. Relación O:N

El tipo de sustrato energético metabolizado por los bivalvos en los diferentes sitios de captura y en las dos épocas climáticas se visualiza en la figura 10. En los organismos de cada sitio de estudio se observó un comportamiento similar en ambas épocas climáticas. Los organismos de Puente Juárez y Astillero emplearon principalmente proteínas como sustrato energético y en menor proporción lípidos, mientras que los mejillones provenientes de El Castillo utilizaron como fuente energética una mezcla de proteínas, lípidos y carbohidratos.

8.3. Cuantificación de tóxicos.

8.3.1. Organoclorados

Sedimentos.

En ambas temporadas climáticas se detectaron diferentes compuestos alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos en los sedimentos, (Tabla 6). De estos compuestos, el epóxido de heptacloro es el único plaguicida que se detectó en todos los sitios de muestreo y en las dos épocas del año. De manera global, el sitio que presentó mayor número de registros de plaguicidas organoclorados fue Astillero (12) en la época de secas, sitio en el que se registraron las mayores concentraciones de plaguicidas ($180.46 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$), mientras que para la época de lluvias el sitio con mayor concentración de plaguicidas fue El Castillo ($37.18 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$) (Fig. 12).

Para el caso de los plaguicidas alicíclicos, el sitio que presentó sólo un registro fue Puente Juárez en lluvias, mientras que en Astillero se detectaron todos los plaguicidas de éste grupo

en la temporada de secas. Los sitios que presentan los valores más elevados de la concentración de plaguicidas alicíclicos fueron Astillero y Castillo en la época de secas. Del grupo de los aromáticos (DDT y derivados) la mayor concentración de compuestos se detectó en Puente Juárez durante la época de lluvias; en secas, la mayor concentración se registró en Astillero en concentraciones mayores a las registradas durante la época de lluvias.

Del grupo de los ciclodiénicos, en la época de lluvias la mayor concentración se registró en Castillo y en secas fue en Astillero donde se registraron las mayores concentraciones. Destaca el comportamiento del epóxido de heptacloro, el cual durante la época de lluvias, presentó las mayores concentraciones en Castillo y Puente Juárez. El Dieldrín sólo se presentó en Castillo en la época de lluvias. El endrín, el endrín aldehído y el sulfato de endosulfán presentaron los mayores registros en Astillero en la época de secas.

Tabla 6. Plaguicidas organoclorados (ng g^{-1} PS) en sedimentos superficiales de los sitios de muestreo en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, durante las épocas de lluvias y de secas. N.D. $<0.01 \text{ ng g}^{-1}$ PS.

| Compuesto | | Lluvias | | | Secas | | |
|---------------|-----------------------|-------------|-----------|--------------|-------------|---------------|----------|
| | | Pte. Juárez | Astillero | Castillo | Pte. Juárez | Astillero | Castillo |
| Alicíclicos | Alfa-HCH | N. D. | 0.05 | 0.05 | 3.13 | 9.07 | 10.95 |
| | Beta -HCH | N. D. | 0.06 | 0.33 | 0.00 | 9.19 | 6.21 |
| | Gamma- HCH | N. D. | N. D. | 0.3 | 1.93 | 6.98 | N.D. |
| | Delta HCH | 1.68 | 0.18 | N. D. | 1.12 | 6.46 | 2.44 |
| Aromáticos | p,p'-DDT | 1.99 | 0.85 | N. D. | N.D. | 5.27 | N.D. |
| | p,p'-DDD | N. D. | 0.13 | 0.64 | N.D. | 9.26 | N.D. |
| | p,p'-DDE | 1.24 | N. D. | N. D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| Ciclodiénicos | Heptacloro | 1.23 | 0.40 | 0.02 | N.D. | 1.31 | 0.80 |
| | Epóxido de heptacloro | 16.99 | 5.71 | 34.40 | 2.27 | 0.81 | 1.74 |
| | Aldrín | 0.78 | N. D. | N. D. | 1.33 | 3.24 | 5.01 |
| | Dieldrín | N. D. | N. D. | 0.35 | N.D. | N.D. | N.D. |
| | Endrín | N. D. | 0.02 | N. D. | N.D. | 102.18 | 36.44 |
| | Endrín aldehído | N. D. | N. D. | N. D. | N.D. | 8.44 | N.D. |
| | Endosulfán I | N. D. | N. D. | 0.57 | N.D. | N.D. | N.D. |
| | Endosulfán II | N. D. | N. D. | 0.09 | N.D. | N.D. | 2.48 |
| | Sulfato de endosulfán | 4.34 | 0.43 | 0.43 | N.D. | 18.25 | N.D. |
| | Concentración total | 28.25 | 7.83 | 37.18 | 9.78 | 180.46 | 66.07 |

Organismos

En los bivalvos de ambas temporadas climáticas también se detectaron diferentes compuestos alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos (Tabla 7). De manera similar que en los sedimentos, el epóxido de heptacloro es el único plaguicida que se detectó –bioacumulado- en los mejillones de todos los sitios de muestreo y en las dos épocas del año. La mayor bioacumulación de OCs se observó en el periodo de lluvias, detectándose las mayores concentraciones de todos los

grupos (alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos) en los organismos provenientes de Astillero en los cuales se registró el mayor número de plaguicidas (15), y la mayor bioacumulación 402.98 ng g⁻¹ PS; mientras, el menor número de OCs se detectó en los organismos provenientes de Puente Juárez (5) así como la menor bioacumulación, de 13.51 ng g⁻¹ PS (Tabla 7). En la época de secas, la mayor bioacumulación se registró en los organismos de Astillero 62.03 ng g⁻¹ PS (11 compuestos) y la menor en los bivalvos de El Castillo 10.9 ng g⁻¹ PS (8 compuestos) (Tabla 7; Fig. 12).

Para el caso de los plaguicidas alicíclicos, el sitio que no presentó bioacumulación en los bivalvos fue Puente Juárez en la época de lluvias; mientras, los bivalvos de Astillero presentaron los valores más elevados de la concentración de plaguicidas (57.86 ng g⁻¹ PS). Del grupo de los aromáticos (DDT y derivados) los mejillones de Puente Juárez en lluvias, no presentaron ningún registro, mientras que los de Astillero fueron los que bioacumularon la mayor concentración de compuestos 42.78 ng g⁻¹ PS en ésta misma época. Del grupo de los ciclodiénicos, en la época de lluvias la mayor concentración (295.56 ng g⁻¹ PS) se registró en Astillero al igual que en la época de en secas (41.85 ng g⁻¹ PS). Destaca el comportamiento del epóxido de heptacloro, el cual durante la época de lluvias, presentó las mayores concentraciones en Astillero y Castillo. El endrín, sólo se presentó en los mejillones de Astillero de la época de lluvias. (Tabla 7).

Tabla 7. Plaguicidas organoclorados (ng g⁻¹ PS) de *Mytella strigata* en los sitios de muestreo en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, correspondiente a la época de lluvias y de secas. N. D. <0.01 ng g⁻¹ PS.

| Compuesto | | Lluvias | | | Secas | | |
|---------------|-----------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|--------------|----------|
| | | Pte. Juárez | Astillero | Castillo | Pte. Juárez | Astillero | Castillo |
| Alicíclicos | Alfa-HCH | N. D. | N. D. | N.D. | 0.71 | 2.01 | 0.71 |
| | Beta -HCH | N. D. | 27.27 | 4.89 | 0.66 | 0.47 | 0.00 |
| | Gamma- HCH | N. D. | 2.43 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.45 |
| | Delta HCH | N. D. | 28.16 | 11.76 | 0.41 | 0.65 | 0.00 |
| Aromáticos | p,p'-DDT | N. D. | 10.99 | 6.67 | 5.43 | 12.53 | 3.24 |
| | p,p'-DDD | N. D. | 28.69 | N. D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | p,p'-DDE | N. D. | 3.10 | 0.67 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Ciclodiénicos | Heptacloro | 1.45 | 6.78 | N. D. | 0.88 | 4.52 | 0.00 |
| | Epóxido de heptacloro | 8.02 | 21.92 | 25.78 | 0.89 | 2.87 | 1.39 |
| | Aldrín | N. D. | 5.51 | 1.36 | 1.21 | 3.82 | N.D. |
| | Dieldrín | 0.92 | 8.88 | N. D. | 23.14 | 23.83 | 5.11 |
| | Endrín | N. D. | 17.61 | N. D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| | Endrín aldehído | 2.02 | 13.69 | 7.60 | 1.47 | 2.79 | N.D. |
| | Endosulfán I | 1.10 | 10.75 | 1.31 | 1.31 | 1.49 | N.D. |
| | Endosulfán II | N. D. | 6.37 | N. D. | 0.90 | N.D. | N.D. |
| | Sulfato de endosulfán | N. D. | 210.83 | 67.65 | N.D. | 7.05 | N.D. |
| | Concentración total | 13.51 | 402.98 | 127.69 | 37.01 | 62.03 | 10.90 |

En la figura 11 se visualiza el comportamiento de la concentración total de los plaguicidas organoclorados en sedimento y lo acumulado en mejillones. Es importante resaltar que en los niveles de plaguicidas biacumulados en *M. strigata* no se ve reflejada las concentraciones registradas en los sedimentos.

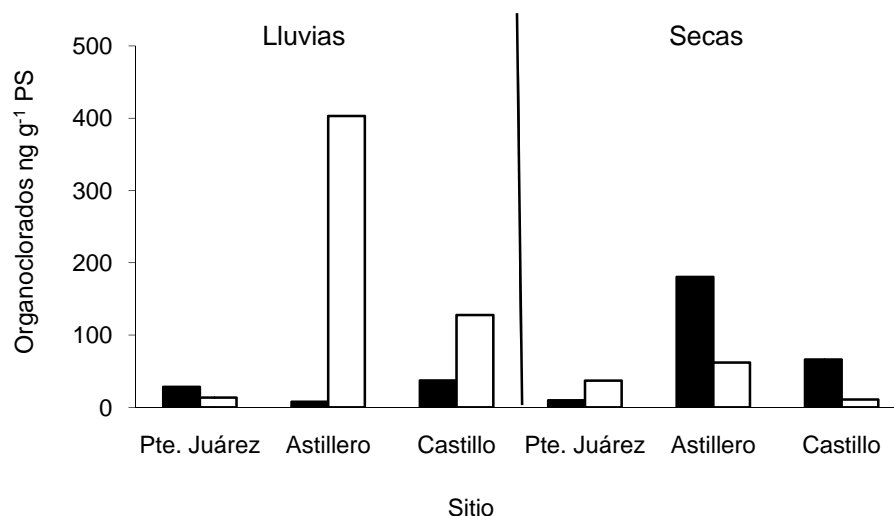


Fig. 12. Niveles totales de organoclorados (ng g^{-1} PS) evaluados en sedimento ■ y en *M. strigata* □, en la época de lluvias y secas.

8.3.2. Organofosforados.

Agua - sedimento

No hubo registro de plaguicidas organofosforados en las muestras de agua, ni en las de sedimento, a excepción del sedimento en Puente Juárez durante la época de secas en el cual sólo se registró la presencia de Tukotion (99 ng g^{-1} PS).

Organismos

En los mejillones se detectó la bioacumulación de diferentes plaguicidas organofosforados (Tabla 8). En la época de lluvias se detectaron 6 compuestos en Puente Juárez y Astillero, respectivamente y no se detectaron OFs en Castillo; los niveles corporales fueron similares en los bivalvos de éstos dos sitios de estudio (1220 y 1560 ng g^{-1} PS). En la época de secas se registró la mayor bioacumulación de OFs en los mejillones y se detectaron 8 compuestos en cada sitio de muestreo; la bioacumulación total de organofosforados en los mejillones de Puente Juárez, Astillero y El Castillo fue similar (3730 , 3800 y 3370 ng g^{-1} PS respectivamente)

(Tabla 8; Fig. 13). Cabe destacar que los niveles de OFs bioacumulados fueron hasta tres órdenes de magnitud mayores que los OCs.

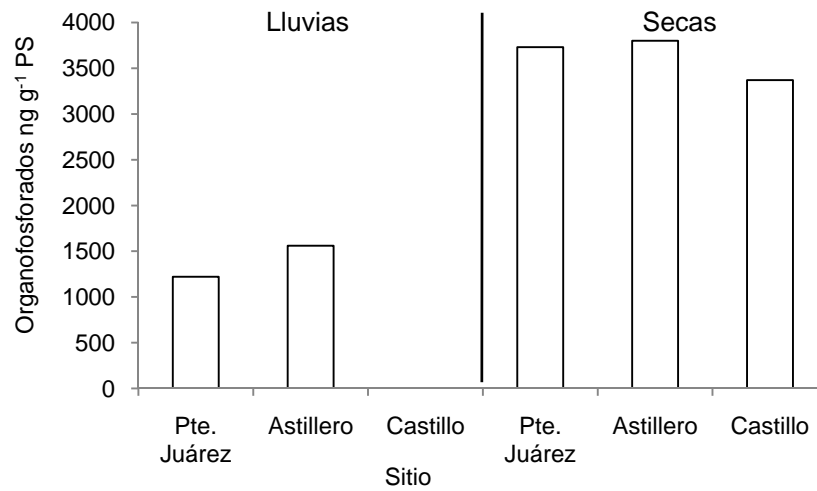


Fig. 13. Niveles totales de los organofosforados (ng g⁻¹ PS) evaluados en *M. strigata*, en época de lluvias y secas.

Tabla 8. Plaguicidas organofosforados (ng g^{-1} PS) de *Mytella strigata* en los sitios de muestreo en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, correspondiente a la época de lluvias y de secas. Obs. 1. En éstas muestras se detecta Tricloronato pero podría corresponder a clorpirifos, ya que estos dos compuestos tienen el mismo tiempo de retención. Nota: N. D. $<0.01 \text{ ng g}^{-1}$ PS.

| Compuesto | Lluvias | | | Secas | | |
|---------------------|-------------|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | Pte. Juárez | Astillero | Castillo | Pte. Juárez | Astillero | Castillo |
| Bolstar | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Clorpirifos | Obs1 | ND | ND | ND | Obs1 | Obs1 |
| Cuamafos | ND | 230 | ND | ND | ND | ND |
| Diazinon | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Diclorvos | ND | ND | ND | 410 | ND | 470 |
| Dimetoato | 300 | 320 | ND | 680 | 780 | 390 |
| Demeton | 170 | 180 | ND | 410 | 470 | ND |
| EPN | ND | ND | ND | ND | ND | 400 |
| Etoprop | 190 | 200 | ND | 170 | 160 | ND |
| Fensulfotion | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Fention | 380 | 360 | ND | ND | ND | ND |
| Forato | ND | ND | ND | 260 | 270 | 660 |
| Malatión | ND | ND | ND | 910 | 1000 | 790 |
| Metamidofos | 120 | 260 | ND | 420 | 440 | 380 |
| Mevinfos | ND | ND | ND | 460 | 520 | 140 |
| Paratión | ND | ND | ND | ND | DN | ND |
| Tricloronato | 70 | ND | ND | ND | 150 | 140 |
| Tukotion | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Total | 1230 | 1550 | 0 | 3720 | 3800 | 3370 |

8.4. Relaciones de causalidad.

Las correlaciones entre los plaguicidas organoclorados totales en sedimento y los bioacumulados no fueron significativas. Tampoco se presentó relación entre los OCs, Alicíclicos Aromáticos y Ciclodiénicos en sedimento, con los plaguicidas bioacumulados respectivamente (Tabla 9). No se realizaron correlaciones entre los plaguicidas organofosforados en sedimento y los bioacumulados, dado que sólo hay un registro de OFs en sedimento.

Tabla 9. Matriz de correlación de Pearson, entre los plaguicidas organoclorados en sedimento y los plaguicidas bioacumulados en *M. strigata*.

| Correlación | r | r² | t | P | n |
|--|----------|----------------------|----------|----------|----------|
| Sedimento Totales vs bioacumulados | -0.3144 | 0.099 | -0.662 | 0.544 | 6 |
| Sedimento Alicíclicos vs bioacumulados Alicíclicos | -0.4443 | 0.197 | -0.992 | 0.377 | 6 |
| Sedimento Aromáticos vs bioacumulados Aromáticos | -0.0038 | 0.000 | -0.008 | 0.994 | 6 |
| Sedimento Ciclodiénicos vs bioacumulados Ciclodiénicos | -0.3048 | 0.093 | -0.640 | 0.557 | 6 |

Las correlaciones de los biomarcadores de exposición y de efecto con los plaguicidas OFs acumulados en *M. strigata*, se presentan en la Figura 13 y la Tabla 10. Se obtuvo una correlación negativa y significativa ($p = 0.001$) entre la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en hemolinfa (AChE) y los organofosforados (OFs) bioacumulados, si bien el coeficiente de regresión ($r^2 = 0.502$) explica la correlación del 50% de los resultados obtenidos. De igual manera las correlaciones entre la carboxilesterasa (CbE) en hemolinfa y en músculo con los OFs acumulados en los mejillones fueron significativas ($p = 0.001$; $r^2 = 0.56$ y 0.49 , respectivamente) y negativas. Esto es, conforme se incrementó la acumulación de los OFs en los bivalvos se inhibió la actividad enzimática de las esterasas (AChE y CbE). Cabe resaltar que se observó una clara diferenciación en el comportamiento por temporada, observándose la mayor inhibición enzimática en la época de secas. En contraste no se observó una correlación significativa entre la acetilcolinesterasa (AChE) en músculo, ni entre la actividad EROD y los organofosforados bioacumulados ($p > 0.05$). Para el caso de los biomarcadores de exposición la correlación entre FRAP, consumo de oxígeno y proteínas con la bioacumulación de OFs fueron significativas, sin embargo los valores de r^2 son muy bajos (0.14, 0.12, 0.48 y 0.35, respectivamente). Los demás biomarcadores no presentaron correlación significativa (Tabla 10).

Las correlaciones entre los plaguicidas OCs bioacumulados en *M. strigata* y los biomarcadores de exposición no fueron significativas. Mientras, para los biomarcadores de efecto estas correlaciones fueron significativas para la Estabilidad Lisosomal, el Consumo de Oxígeno, la Excreción Nitrogenada, y las Proteínas totales solubles en el músculo abductor; sin embargo, el valor de r^2 es bajo (0.379, 0.109, 0.235, 0.147, respectivamente) (Tabla 11).

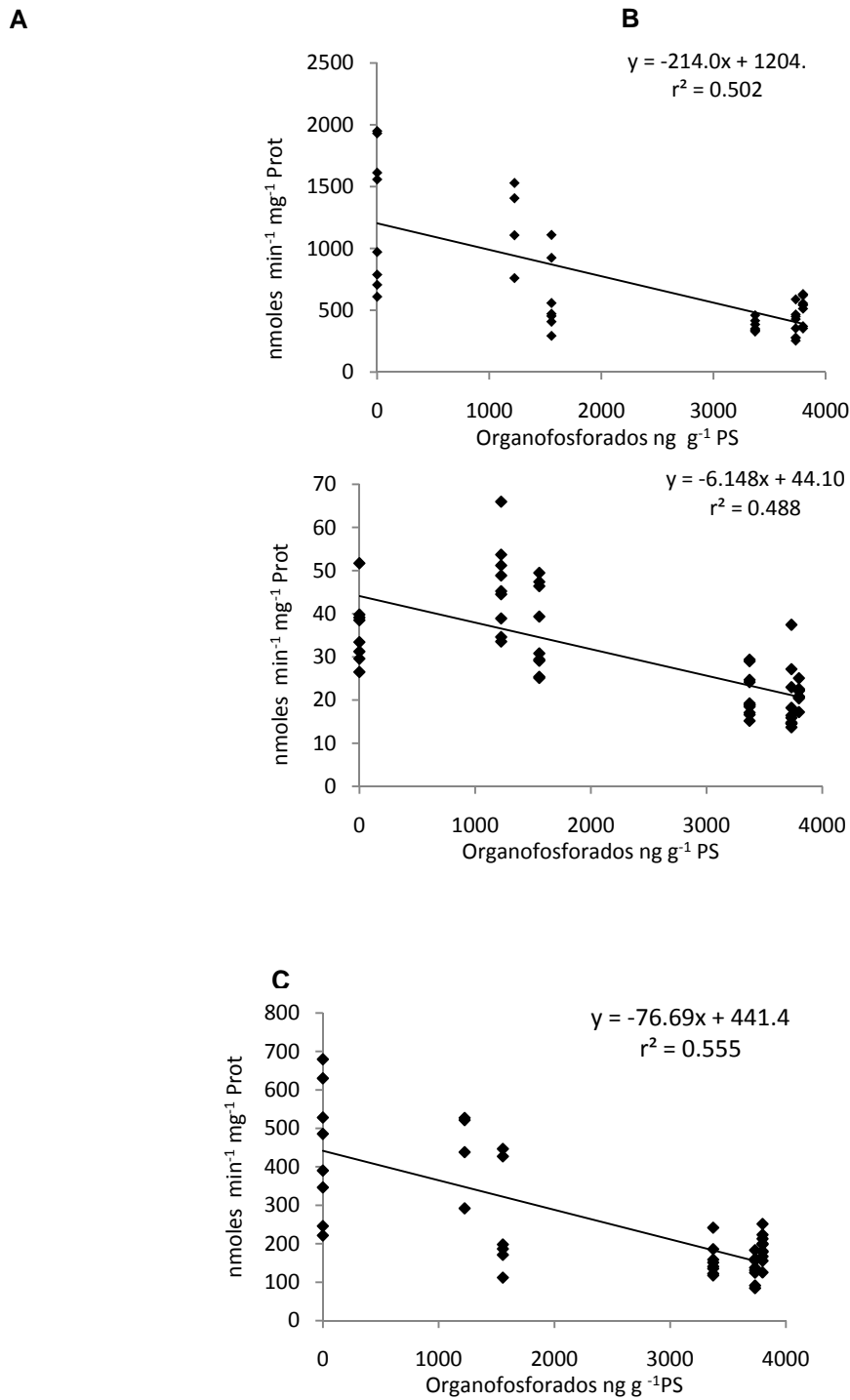


Fig.14. Relaciones entre la bioacumulación de plaguicidas OFs y los biomarcadores de exposición evaluados en *M. strigata* en las dos épocas del año; AChE en Hemolinfa (A), CbE en Músculo, (B) y CbE en Hemolinfa (C).

Tabla 10. Matriz de correlación de Pearson, entre la bioacumulación de plaguicidas OFs en *M. strigata* y los biomarcadores evaluados.

| Correlación | r | r ² | t | P | n |
|------------------------------------|--------|----------------|--------|--------------|----|
| Biomarcadores de exposición | | | | | |
| OFs vs AChE Hemolinfa | -0.709 | 0.502 | -6.44 | 0.001 | 43 |
| OFs vs AChE Músculo | -0.144 | 0.021 | -1.11 | 0.27 | 60 |
| OFs vs CbE Hemolinfa | -0.745 | 0.555 | -7.24 | 0.001 | 44 |
| OFs vs CbE Músculo | -0.699 | 0.489 | -7.12 | 0.001 | 55 |
| OFs vs EROD | 0.403 | 0.162 | 1.97 | 0.063 | 22 |
| Biomarcadores de efecto | | | | | |
| OFs vs FRAP | -0.378 | 0.143 | -3.002 | 0.004 | 56 |
| OFs vs RN | -0.430 | 0.185 | -2.077 | 0.052 | 21 |
| OFs vs Consumo de oxígeno | -0.347 | 0.120 | -2.534 | 0.015 | 49 |
| OFs vs Excreción nitrogenada | -0.153 | 0.023 | -1.012 | 0.317 | 45 |
| OFs vs Prot Músculo | 0.691 | 0.477 | 7.342 | 0.001 | 61 |
| OFs vs Prot Hemolinfa | 0.588 | 0.346 | 5.393 | 0.001 | 57 |

Tabla 11. Matriz de correlación de Pearson, entre la bioacumulación de plaguicidas OCs en *M. strigata* y los biomarcadores evaluados.

| Correlación | r | r ² | t | P | n |
|------------------------------------|--------|----------------|--------|--------------|----|
| Biomarcadores de exposición | | | | | |
| OCs vs AchE Hemolinfa | 0.066 | 0.004 | 0.424 | 0.674 | 43 |
| OCs vs AchE Músculo | -0.075 | 0.006 | -0.575 | 0.567 | 60 |
| OCs vs CbE Hemolinfa | 0.160 | 0.026 | 1.052 | 0.299 | 44 |
| OCs vs CbE Músculo | 0.243 | 0.059 | 1.822 | 0.074 | 55 |
| OCs vs EROD | -0.412 | 0.169 | -2.02 | 0.057 | 22 |
| Biomarcadores de efecto | | | | | |
| OCs vs FRAP | -0.053 | 0.003 | -0.388 | 0.700 | 56 |
| OCs vs RN | -0.615 | 0.379 | -3.403 | 0.003 | 21 |
| OCs vs Consumo de oxígeno | 0.330 | 0.109 | 2.396 | 0.021 | 49 |
| OCs vs Excreción nitrogenada | 0.485 | 0.235 | 3.634 | 0.001 | 45 |
| OC vs Prot Músculo | -0.383 | 0.147 | -3.187 | 0.002 | 61 |
| OCs vs Prot Hemolinfa | -0.144 | 0.021 | -1.081 | 0.284 | 57 |

9. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero que aborda, en ambientes costeros, la evaluación conjunta del análisis químico de la concentración de plaguicidas (organofosforados y organoclorados), y de biomarcadores de exposición y de efecto en el mejillón *Mytella strigata*, especie propuesta como organismo bio-indicador de contaminación en los ambientes lagunares estuarinos de México.

Dada la complejidad del sistema acuático en estudio (Estero de Urías) en cuanto al aporte de contaminantes, no fue posible contar con un "sitio de referencia" por lo cual se carecen de los "niveles base" o "normales" de las respuestas biológicas evaluadas. No obstante, fue posible detectar y valorar diferencias espacio-temporales en diversas respuestas a diferentes niveles de organización biológica al igual que en las concentraciones de los plaguicidas OCs y OFs evaluados en los sedimentos y en los mejillones.

9.1. Cuantificación de tóxicos:

En sistemas estuarinos los sedimentos y partículas suspendidas en la columna de agua desempeñan un importante rol como depósitos de muchos contaminantes entre ellos los plaguicidas organoclorados (Duursma *et al.*, 1986) y organofosforados (Galgani y Bocquené, 2000). Este comportamiento se corrobora en los sedimentos del sistema lagunar-estuarino de Urías donde la deposición de los plaguicidas obedece a la vez a la hidrodinámica del sistema. Así, Castillo y Astillero constituyen sitios de depósito de los plaguicidas organoclorados, sitios en los que se detectaron las concentraciones más elevadas en la época de secas; en contraste, las bajas concentraciones detectadas en los sedimentos de Pte. Juárez se pueden explicar por la fuerte dinámica de las mareas, característica de este sitio. La falta de registros de OFs en los sedimentos, a excepción de Tukotión en Puente Juárez, sugiere su rápida degradación aunado a la mayor inestabilidad de estos compuestos en comparación con los organoclorados, como ha sido ampliamente reportado en la literatura (Rand y Petrocelli, 1985; Galgani y Bocquené, 2000).

En los sedimentos, las concentraciones de OCs evaluados sobrepasan en muchos casos los criterios de calidad sedimentaria (Tabla 12). Particularmente del grupo de los aromáticos (DDT y derivados) se detectaron concentraciones que sobrepasan los límites de Intervalo de efectos bajos (ERL) (Buchman, 1999).

A la vez, el hecho de que las concentraciones de DDT sean más elevadas que sus metabolitos sugiere una aportación reciente de estos organoclorados aromáticos. Se ha documentado que una relación de DDT / (DDD+DDE) mayor a uno, refleja una aplicación reciente de DDT, en el transcurso de los últimos 5 años (Tavares *et al.*, 1999). Acorde a ello, los valores obtenidos en el presente trabajo en los sedimentos de Puente Juárez y Astillero durante la época de lluvias sugieren que la aplicación de DDT ha sido reciente lo cual coincide con lo señalado por González-Farías *et al.* (2002) en el distrito de riego el Carrizo, en Sinaloa. Sin embargo, se ha documentado que la última aplicación del DDT por parte del sector salud por motivos sanitarios, que pudiera tener influencia en el área de Mazatlán, fue hace 10 años en la región de la sierra (Fernández *et al.*, 2004). Aunado a ello, a partir de 1991 el empleo del DDT en México está restringido (Catálogo Oficial de Plaguicidas, 2004). De tal manera los niveles detectados de DDT y sus metabolitos en los sedimentos del Estero de Urías pueden ser reflejo de varios aspectos: su utilización no autorizada para el control de plagas a nivel agrícola y/o urbano; el reflejo de la resuspensión de sedimentos profundos ocasionado por tormentas, quedando disponibles los OCs en los sedimentos superficiales, explicación corroborada por Toro *et al.* (2003); ó bien, es consecuencia de la lenta degradación del DDT lo cual incrementa su persistencia en los sistemas acuáticos. Al respecto, se ha documentado que la vida media del DDT en sedimentos del lago Ørsjøen al sur de Noruega es de 5 a 7 años (Brevik *et al.*, 1996; Vogue *et al.*, 1994) si bien su permanencia puede ser hasta por 20 ó 30 años más, ya que su vida media puede verse modificada por factores ambientales como la temperatura, la luz, el oxígeno, la materia orgánica y la ausencia/presencia de microorganismos (Hoffman *et al.*, 2003).

El Dieldrín, plaguicida prohibido en México desde 1991 (Catálogo Oficial de Plaguicidas, 2004), sólo se presentó en Castillo durante la época de lluvias, si bien su registro también fue superior al Intervalo de efectos bajos (ERL) (Buchman, 1999). A pesar de que las concentraciones de OCs se expresaron en ng g^{-1} PS, los niveles detectados de Endrín en la época de lluvias y del Epóxido de Heptacloro en ambas épocas climáticas (lluvias y secas) sugieren que son mayores a los reportados (en $\mu\text{g g}^{-1}$ de carbono orgánico) como de toxicidad crónica a la vida acuática bentónica (Tabla 12). Si bien se carece de información precisa sobre las fuentes y el origen de los plaguicidas organoclorados, es posible suponer que las mayores concentraciones registradas en la época de lluvias particularmente en Astillero y en Castillo obedezcan a la resuspensión de sedimentos profundos ocasionado por tormentas, quedando disponibles los OCs que estaban “atrapados” en éstos. Lo anterior ha sido corroborado por Toro *et al.* (2003) en el mejillón *Choromytilus chorus* de la zona costera de Chile donde desde hace 20 años está prohibido el

uso de la mayoría de los plaguicidas organoclorados; los autores señalan que la presencia de plaguicidas organoclorados en los organismos es originada por la resuspensión de sedimentos profundos que contienen estos compuestos lipofílicos adsorbidos en la materia orgánica y permanecen en el fondo de los sedimentos por muchos años.

Tabla 12 Criterios de calidad en sedimentos marinos y toxicidad a la biota acuática, de plaguicidas organoclorados. TEL: Nivel de efecto umbral. ERL: Intervalo de efectos bajos. ERM: Intervalo de efectos medios. PEL: Probable nivel de efecto. AET: Umbral aparente de efectos. B: Bivalvos. E: Larvas de Equinodermos. I: Impactos en la comunidad de Infauna. A.-Buchman, 1999. C.-Pataki y Cahill, 1999. D.-EPA, 1991

| Contaminante | Toxicidad Aguda Vida Acuática Béntica C | | Toxicidad Crónica Vida Acuática Béntica C | | TEL | ERL | ERM | PEL | AET |
|-----------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|-------|------|-----|-------|--------|
| | H ₂ O µg l ⁻¹ | Sedimento µg g ⁻¹ CO | H ₂ O µg l ⁻¹ | Sedimento µg g ⁻¹ CO | | | | | |
| Aldrín | | | | | | | | | 9.5 AE |
| DDD | 0.13 | 130 | 0.001 | 1.0 | 1.22 | 2 | 20 | 7.81 | 16 I |
| DDE | 0.13 | 130 | 0.001 | 1.0 | 2.07 | 2.2 | 27 | 374.2 | 9 I |
| DDT | 0.13 D | 130 | 0.001 D | 1.0 | 1.19 | 1 | 7 | 4.77 | 12 E |
| Dieldrín | | | | | 0.715 | 0.02 | 8 | 4.3 | 1.9 E |
| Endosulfán | 0.034 | 0.12 | 0.001 | 0.004 | | | | | |
| Endrín | | | | 0.73 D | | | | | |
| Epóxido de heptacloro | 0.053 D | 1.3 | 0.0036 D | 0.09 | | | | | |
| Heptacloro | | | | | | | | | 0.3 |

En los bivalvos, diversos estudios reportan una correlación significativa entre las concentraciones de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el medio externo y su bioacumulación. Así, Carvalho *et al.* (2002) mencionan que la concentración de los compuestos clorinados en *Mytella strigata* se correlacionaron significativamente con las concentraciones en sedimento ($r^2 = 0.95$) del Sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón. De la misma manera, Fang (2004) reporta la significativa correlación entre la acumulación de PCBs en el mejillón *Perna viridis* de la costa del Delta de Pearl, China, con las concentraciones en sedimento, siendo varias veces más altos los niveles en los mejillones que en el sedimento. Resultados similares son presentados por Förlin *et al.* (1996) quienes registraron concentraciones de plaguicidas OCs bioacumuladas en *M. edulis* mucho más elevadas que las registradas en los sedimentos. Así mismo, en un estudio realizado en las costas del pacífico de Estados Unidos; las correlaciones registradas entre la concentración de plaguicidas (DDTs, clordanos y dieldrin) en sedimentos y en el hígado de 6 especies de peces fueron significativas (Brown *et al.*, 1998).

En el presente estudio y a diferencia de lo reportado en otros bivalvos, la bioacumulación de los OCs y OFs en *M. strigata* no refleja el comportamiento de éstos compuestos en los sedimentos del Estero de Urías. Resultados similares son presentados por Gustavson y Jonsson (1999) quienes no encontraron una correlación entre los patrones de distribución de los contaminantes (compuestos orgánicos halogenados) entre los sedimentos y el mejillón *Mytilus edulis*, en el mar Nórdico. La falta de correlación entre las concentraciones detectadas en los sedimentos y las bioacumuladas por los bivalvos, sugiere por un lado diferencias en la biodisponibilidad, la persistencia y la degradación de los plaguicidas en el ambiente, procesos que pueden ser afectados por factores abióticos y bióticos, aspectos de relevancia que merecen ser abordados en futuros estudios en *Mytella strigata*.

Acorde a Marcus y Scott (1990), la bioacumulación de los tóxicos en la biota puede ser considerada una medida indirecta de la biodisponibilidad de éstos en el medio externo. De tal manera la mayor bioacumulación de OCs y OFs en *M. strigata* observada en Astillero en lluvias y secas, respectivamente, sugiere la mayor biodisponibilidad de éstos compuestos en este sitio, la cual en el caso de los OCs es independiente de la concentración detectada en los sedimentos en el periodo de secas.

Generalmente los organofosforados que tienen una baja solubilidad en agua muestran un comportamiento lipofílico que explica su bioacumulación en los tejidos grasos y hepáticos de animales acuáticos (Rand y Petrocelli, 1985; Galgani y Bocquené, 2000). A la vez, se ha documentado la acumulación de los organoclorados fundamentalmente en el tejido adiposo de los organismos vivos (Rand y Petrocelli, 1985; Förlin *et al.*, 1996). De tal manera es posible suponer una mayor acumulación de éstos compuestos lipofílicos en periodos de mayor contenido de lípidos en los mejillones. Al respecto, Marchand *et al.* (1976) reportan una variación significativa en el contenido de hidrocarburos clorinados en mejillones relacionado con el contenido de lípidos, lo cual se relaciona a su vez con el ciclo sexual de los organismos.

El ciclo anual reproductivo de los mejillones se caracteriza por grandes fluctuaciones en el contenido de lípidos del organismo (Marchand *et al.*, 1976). Estudios de Bourcart *et al.* (1964) y Bourcart y Lubet (1965; citados en Marchand *et al.*, 1976), en *Mytilus edulis* del noroeste del mar Mediterráneo indican que las reservas de lípidos generalmente tienen su máximo a mediados de verano durante la madurez gonádica y comienzan a disminuir cuando los mejillones liberan los gametos ricos en lípidos. Marchand *et al.* (1976), reportan que las máximas concentraciones de

PCBs y DDTs en los mejillones ocurren en Junio durante el periodo de madurez gonádica asociada a la acumulación activa de lípidos.

Mytella strigata, tiene un comportamiento reproductivo particular. De acuerdo a Baqueiro y Aldana (2000), el periodo de madurez gonádica para la laguna de Chautengo y de Nuxco en el Estado de Guerrero, México, ocurre en la época de secas, (de Abril a Junio y de Enero a Mayo, respectivamente). En contraste, Leal (2007) reporta la constante reproducción a lo largo del año en *Mytella strigata* en el Estero de Urías. Sin embargo, los mejillones de *M. strigata* utilizados en el presente trabajo y provenientes de la misma área de estudio presentaron un comportamiento reproductivo diferente; durante la época de secas (mayo) los organismos presentaron tejido gonádico maduro e incluso hubo liberación de gametos en las pruebas, mientras que, por el contrario, no se visualizó tejido gonádico en los mejillones analizados en la época de lluvias (octubre). De tal manera, en *Mytella strigata* podría esperarse en el periodo de secas, de mayor reserva lipídica, la mayor bioacumulación de los plaguicidas lipofílicos. Éste comportamiento se confirma en el presente estudio y explicaría la mayor bioacumulación de organofosforados de *M. strigata* durante la época de secas. No obstante los organoclorados presentaron la mayor bioacumulación en el periodo de lluvias, lo cual se explicaría por el probable efecto de los huracanes y las fuertes tormentas que resuspenden los plaguicidas organoclorados depositados en el sedimento profundo durante esta época climática, quedando disponibles para los mejillones, como ya fue señalado previamente. A la vez, es posible suponer aportes diferenciados a lo largo del año de los dos tipos de plaguicidas, lo cual no es posible corroborar ya que se carece de registros precisos del tipo, cantidad y frecuencia de aplicación de los plaguicidas. Por otro lado, acorde a Marchand *et al.* (1976) la acumulación y eliminación de PCBs y OCs, particularmente DDT, en los mejillones es un proceso relativamente lento comparado con las variaciones en los niveles de estos compuestos en el medio externo. Así, las concentraciones de OCs registradas en *M. strigata* pueden no reflejar exactamente las concentraciones en el medio externo al momento del muestreo.

Se ha documentado ampliamente que la persistencia de los plaguicidas organofosforados en el ambiente es significativamente menor que la de los organoclorados (Rand y Petrocelli, 1985; Lagadic *et al.*, 2000), persistencia a la vez altamente variable y cuya vida media depende de varios parámetros ambientales, entre los cuales el pH, la temperatura y la exposición a la luz, son los más importantes (Lagadic *et al.*, 2000). Así, en el presente estudio, la falta de registros en agua y sedimentos de los organofosforados, pero su elevada bioacumulación en los

mejillones del Estero de Urías, sugiere su degradación rápida, como ha sido reportado por diversos autores (Rand y Petrocelli, 1985; Hoffman *et al.*, 2003); aunado a ello, la elevada concentración de los organofosforados en los mejillones sugiere un aporte constante y considerable al sistema lagunar, particularmente en la época de secas.

En *M. strigata*, la acumulación de organofosforados fue 4 a 300 veces mayor que de organoclorados. Si bien se detectaron 13 OFs, no se cuenta con registros de intervalos de efectos crónicos biológicos para invertebrados marinos (Buchman, 1999). Sin embargo las concentraciones corporales máximas de diversos organofosforados (Fention: $0.38 \mu\text{g g}^{-1}$ PS; Metamidofos: $0.12\text{-}0.44 \mu\text{g g}^{-1}$ PS y Malatión: $0.910 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) fueron mayores que las reportadas para invertebrados en ambientes impactados por OFs. Así, después de la aplicación de OFs en el delta del Río Ebro, se registraron concentraciones de fention por arriba de $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ PS y de $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ PS en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* y en el cangrejo *Tapes semidecussatus*, respectivamente (Barcelo *et al.*, 1991), mucho menores a las registradas en *Mytella strigata* en el presente estudio.

En contraste, los niveles bioacumulados en *M. strigata* de OCs, como el DDT y sus derivados fueron mucho menores a los reportados en *M. galloprovincialis* (50 a 10 000 ppb) en ambientes contaminados al noroeste de las costas del mar Mediterráneo (Marchand *et al.*, 1976). No obstante, los niveles bioacumulados en *Mytella strigata* sobrepasan en muchos casos los niveles propuestos de efectos adversos a la biota acuática bentónica (Buchman, 1999; EPA, 1991). De tal manera, las concentraciones de los OCs mencionados pueden representar un riesgo para la biota bentónica del Estero de Urías, incluido el mejillón *M. strigata*.

9.2 Respuestas Biológicas

En ambientes lagunares estuarinos el efecto estacional, principalmente las variaciones en la temperatura y salinidad, modifican las respuestas biológicas de los organismos (Bodin *et al.*, 2004; Pfeifer *et al.*, 2005). En nuestro estudio, dada la baja variabilidad de la salinidad y la temperatura superficial, es posible afirmar que no ejercieron un efecto significativo sobre las respuestas biológicas evaluadas; las variaciones estacionales detectadas fueron en promedio de $2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 3.9 ups. La baja variabilidad estacional de éstos parámetros probablemente se deba al efecto de la pluma de descarga de la Termoeléctrica "José Aceves Pozos" a la laguna, en cuya zona de "contacto" durante la época de lluvias se registraron valores hasta de 40°C ejerciendo probablemente un efecto "homogenizador" estacional en el Estero de Urías.

9.2.1 Biomarcadores de exposición

De las respuestas biológicas evaluadas en *M. strigata*, los biomarcadores de exposición particularmente las esterasas (AChE y CbE) evaluadas en la hemolinfa, y la actividad EROD evaluada en la glándula digestiva, presentaron una mayor variación y sensibilidad que las demás respuestas biológicas evaluadas, aportando una mayor información para discriminar entre sitios, épocas climáticas y tipos de plaguicidas. De manera particular, las diferencias encontradas entre épocas climáticas en éstas respuestas fueron de 2.4 a 2.6 veces, en contraste con los demás biomarcadores de efecto, cuya variación máxima fue de 1.9 veces. Nuestros resultados son similares a lo reportado para el mejillón *Dreissena polymorpha* en un estudio *in situ* efectuado en el Río St. Lawrence, Canadá, en donde los biomarcadores de exposición evaluados (metalotioneínas y actividad EROD; denominados en el estudio como biomarcadores de defensa) tuvieron un mayor poder de discriminación, mayor variación y sensibilidad para la separación de sitios contaminados, que los biomarcadores de efecto (denominados en el estudio como biomarcadores de daño) (Lafontaine *et al.*, 2000).

En bivalvos, al igual que en otros invertebrados acuáticos, se han encontrado esterasas presentes en diversos tejidos en moluscos. Bocquené *et al.* (1990), mencionan que las esterasas son capaces de hidrolizar esteres carboxílicos de alcoholes, alcoholes amino y fenoles. De manera particular, Canty *et al.* (2007), opinan que la acetilcolinesterasa no parece estar involucrada en funciones neurológicas, sino que parece jugar un papel de protección, quizás controlando la elaboración de acetilcolina en los fluidos del cuerpo, ó como lo sugiere Soreq y Seidman (2001), puede funcionar como un factor de crecimiento. A pesar de esta variedad de sugerencias, respecto a su función, lo que sí se sabe, es que hay una inhibición de éstas enzimas en la hemolinfa de los bivalvos (Galloway *et al.*, 2002; Dailianis *et al.*, 2003; Rickwood y Galloway, 2004; Canty *et al.*, 2007), en branquia (Escartin y Porte, 1997; Mora *et al.*, 1999; Lehtonen y Leiniö, 2003; Dailianis *et al.*, 2003; Canty *et al.*, 2007), en organismo completo (Basack *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 1999b; Galloway *et al.*, 2002) y en tejido suave de los mejillones (Binelli *et al.*, 2005; Ricciardi *et al.*, 2005), por la presencia de organofosforados y carbamatos. Particularmente la evaluación en hemolinfa se ha propuesto como un método no destructivo, para el monitoreo de exposición a plaguicidas (Rickwood y Galloway, 2004).

La variación en los resultados obtenidos de la actividad enzimática de las esterasas en *Mytella strigata* sugieren una mayor sensibilidad en la actividad de la acetilcolinesterasa en la hemolinfa, mientras que para el caso de la carboxilesterasa el tejido más sensible fue el músculo. No

obstante, la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa fue mayor en la hemolinfa que en el músculo abductor de los mejillones. Los resultados obtenidos coinciden con los trabajos de Herbert *et al.* (1995,1996), Srivatsan (1999), Galloway *et al.* (2002), Dailianis *et al.* (2003) y Canty *et al.*, (2007), quienes reportan la mayor actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en la hemolinfa de bivalvos.

Varios autores afirman que la inhibición en la actividad de la AChE es considerada como un indicador de efectos neurotóxicos, particularmente debido a la exposición de organofosforados y carbamatos (Payne *et al.*, 1996; Galgani y Bocquené, 2000). Este comportamiento se confirma en el presente estudio (Fig. 14) donde la mayor inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa en la hemolinfa, y carboxilesterasa en el músculo y en la hemolinfa de *M. strigata*, se correlacionó significativamente con las concentraciones de plaguicidas organofosforados acumulados en los mejillones, registrándose la mayor inhibición en la actividad de las esterasas durante la época de secas, asociado a una mayor bioacumulación de OFs. Por el contrario no se observó una correlación entre la actividad de las esterasas evaluadas y la acumulación de los plaguicidas organoclorados en *M. strigata*. De tal manera los resultados obtenidos confirman que la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en hemolinfa y la carboxilesterasa en el músculo abductor y la hemolinfa, son un biomarcador adecuado de la exposición en el medio natural a los plaguicidas OFs en *Mytella strigata*.

La relación entre la ocurrencia de compuestos neurotóxicos (vía entrada de agricultura y urbanización) y la inhibición de la AChE en bivalvos ha sido demostrada en campo por Escartin y Porte (1997) y Fulton y Key (2001). La variación en la actividad de la AChE ha sido también observada en otros mejillones marinos (Escartín y Porte, 1997; Dailianis *et al.*, 2003), en los que la inhibición de la AChE ha sido relacionada a gradientes de contaminación general. Así, la AChE no solamente responde específicamente a compuestos neurotóxicos sino también a otros contaminantes como metales (Payne *et al.*, 1996; Labrot *et al.*, 1996), detergentes y metales (Guilhermino *et al.*, 1998), evidencias obtenidas en estudios *in vitro*.

A la vez, se ha reportado que la actividad de la AChE en hemolinfa puede ser modulada por variables nutricionales y estacionales (Escartin y Porte, 1997; Pfeifer *et al.*, 2005; Leiniö y Lehtonen, 2005). Al respecto se ha reportado un efecto significativo de la temperatura y la salinidad sobre la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei* expuestos a metamidofos (Haro, 2004) y en el mejillón *Mytilus* sp (Pfeifer *et al.*, 2005). Si bien en el presente estudio es posible descartar la acción significativa de estos

factores dada la baja variabilidad estacional registrada como ya se mencionó con anterioridad, se requieren realizar más estudios para evaluar en *Mytella strigata*, la interacción de variables bióticas (ej. condición nutricional) y abióticas (ej. temperatura y salinidad) con la exposición de organofosforados.

En el presente estudio, los niveles registrados de la actividad enzimática de la AChE en la hemolinfa de *M. strigata*, son al menos 5 veces más elevados que lo reportado en otras especies de mejillones, bajo condiciones controladas de laboratorio (Tabla 13) (Galloway *et al.*, 2002; Rickwood y Galloway, 2004; Canty *et al.*, 2007); sin embargo, son comparables a los reportados en *Mytilus galloprovincialis* (Dailianis *et al.*, 2003). Por otro lado la actividad enzimática en el músculo abductor de *M. strigata* es comparable al reportado en branquias de *Mytilus galloprovincialis* (Escartín y Porte, 1997) y de *Adamussium colbecki* (Bonacci *et al.*, 2004), pero ligeramente mayor al reportado en tejido suave de *Dreissena polymorpha* (Binelli *et al.*, 2005a) (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad de la AChE reportada en diversas especies de bivalvos expuestos a plaguicidas. Se incluye la temperatura del ensayo (°C) y el tiempo de exposición (h).

| Especie | Compuesto | Tejido | t, h | T, °C | AChE, nmoles sustrato min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | Referencia |
|----------------------------------|--|--------------------------|----------------|--------------|--|-------------------|-----------------------------------|
| | | | | | Organismos expuestos | Niveles basales | |
| <i>Mytilus edulis</i> | Paraoxón 0.1 1 mM | Hemolinfa | 24 | 25 | 73.6 28.3 | | Galloway <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>M. edulis</i> | Clorfenvin- fos 0.015 mg l ⁻¹ | Hemolinfa | 24 48 96 | 25 | 210 120 215 | 150 140 340 | Rickwood y Galloway, 2004 |
| <i>M. edulis</i> | Azametifos 100 µg l ⁻¹ | Hemolinfa | 1 24 | 25 | 140 12.5 | 190 100 | Canty <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | Metil Paratión | Branquias | 24 | 20 | 25.3 | | Mora <i>et al.</i> , 1999a |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | | Branquia | <i>in situ</i> | | 13-54 | | Escartín y Porte, 1997 |
| <i>Adamussium colbecki</i> | | Branquias | <i>in situ</i> | | 17.4 | | Bonacci <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Dreissena polymorpha</i> | Clorpirifos | Tejido suave | <i>in situ</i> | 23 | 1-6 | 2.9 | Binelli <i>et al.</i> , 2005a |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | | Hemolinfa | <i>in situ</i> | | 112-750 (Jun) 0-2100 (Oct) | | Dailianis <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Mytella strigata</i> | | Hemolinfa Músculo | <i>in situ</i> | 25 25 | 603-1266 (Oct) 529-374 (May) 17.5-6 (Oct) 7-9.9 (May) | | Este trabajo |

Son relativamente pocos los estudios en los que se ha estimado la actividad enzimática de la Carboxilesterasa en la hemolinfa de bivalvos, actividad que se ha evaluado principalmente en el organismo completo o en las branquias (Tabla 14). En el presente estudio la actividad de la CbE en la hemolinfa de *M. strigata* para la época de secas es similar a la reportada por Fossi *et al.* (2000) en la hemolinfa del cangrejo *C. maenas*, no así para el caso de la época de lluvias, cuyos valores en *M. strigata* son 2 ó 3 veces más elevadas. Por otro lado, la actividad de la CbE en el músculo de los mejillones es similar a la reportada en *C. fluminea* y *M. edulis* (en el organismo completo), expuestos a paratión y paraoxón respectivamente (Basack *et al.*, 1998; Galloway *et al.*, 2002) (Tabla 14).

Tabla 14. Actividad de la CbE reportada en diversas especies de bivalvos expuestos a plaguicidas. Se incluye la temperatura del ensayo (°C) y el tiempo de exposición (h).

| Especie | Compuesto | Tejido | t, h | T, °C | CbE, nmoles sustrato min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | Referencia |
|----------------------------------|--|----------------------|----------------|----------|--|-----------------|-------------------------------|
| | | | | | Organismos expuestos | Niveles basales | |
| <i>Carcinus aestuarii</i> | benzo(a)pireno 10ppb 1ppm | Hemolinfa | | | 150 130 | 220 | Fossi <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Corbicula fluminea</i> | Paratión 40 µg l ⁻¹ Paraoxón 20 µg l ⁻¹ | Organismo completo | 24 | | 30 24 | 48 | Basack <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Mytilus edulis</i> | Paraoxón 0.1 1 mM | Organismo completo | 24 | | 45.45 24.24 | | Galloway <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | | Branquia | <i>in situ</i> | | 43-94 | | Escartín y Porte, 1997 |
| <i>Adamussium colbecki</i> | | Branquias | <i>in situ</i> | | 81.8 | | Bonacci <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Mytella strigata</i> | | Hemolinfa Músculo | <i>in situ</i> | 25 25 | 257-445 (Oct) 134-189 (May) 36-46 (Oct) 20-21 (May) | | Este trabajo |

Al igual que la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, los niveles de actividad de la carboxilesterasa varían dependiendo de la especie en estudio, del tejido en análisis, del estadio reproductivo, de la época de evaluación y del método de ensayo, así como de las concentraciones de organofosforados o carbamatos a los que hayan sido expuestos los organismos (Escartín y Porte, 1997; Thompson, 1999; Galloway *et al.*, 2002).

En bivalvos, se ha documentado ampliamente que la actividad de la etoxiresorufin-o-desetilasa (EROD) es un biomarcador adecuado de exposición a los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Lafontaine *et al.*, 2000) y a los bifenilos policlorinados (Livingstone *et al.*, 1997; Ricciardi *et al.*, 2006; Binelli *et al.*, 2005b). No obstante, su actividad enzimática puede ser inducida por la

exposición a organoclorados (Ricciardi *et al.*, 2006; Binelli *et al.*, 2005b), y a metales (Lafontaine *et al.*, 2000); mientras que también se reporta que puede ser inhibida por organoclorados (Binelli *et al.*, 2005a) y organoestánicos (Sole y Livingstone 2005).

En *Dreissena polymorpha* se ha reportado una inhibición del 41% de la actividad EROD en organismos expuestos por 96 horas a 100 ng l⁻¹ de pp'DDT (Binelli *et al.*, 2005a). En contraste, en esta misma especie se reportan inducciones de hasta 100% en bivalvos colectados en los grandes lagos subalpinos de Italia, cuyas concentraciones de pp'DDT en los mejillones alcanzaron hasta 1417.3 ng g⁻¹ lípidos (Binelli *et al.*, 2005b). A la vez Ricciardi *et al.* (2005) en la misma especie proveniente del lago de Maggiore, Italia, registra la inducción de la actividad EROD, la cual se relaciona con altos niveles bioacumulados de DDT (945 ng g⁻¹ lípidos).

En contraste, en el presente estudio los plaguicidas organoclorados bioacumulados en *M. strigata* no explican el comportamiento de la actividad EROD evaluada en la glándula digestiva de los mejillones. Cabe destacar que esta actividad enzimática se induce a la vez por la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos, los cuales se registraron también en el sistema (Piña, com. pers.) y de metales, también registrados en el sistema (Szefer *et al.*, 1998; Ruelas-Insunza y Páez-Osuna, 2000; Soto-Jiménez *et al.*, 2001; Páez-Osuna *et al.*, 2002; Vanegas com. pers.) o bien puede ser inhibida por organoestánicos (Sole y Livingstone 2005), compuestos no evaluados en el estudio pero que muy probablemente se encuentren presentes en nuestro sitio de estudio. De tal manera, es probable suponer que las interacciones de todos estos contaminantes presentes en el Estero de Urías, ejercen efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos, interfiriendo en consecuencia con la respuesta bioquímica evaluada (Binelli *et al.*, 2005).

En *M. strigata* del Estero de Urías, la actividad EROD (0.08 a 0.24 pmoles min⁻¹ mg⁻¹ proteína para la época de lluvias; y 0.04 a 0.62 pmoles min⁻¹ mg⁻¹ proteína para secas) es menor a la reportada para *Dreissena polymorpha*, evaluada *in situ* (Ricciardi *et al.*, 2006; Binelli *et al.*, 2005a) así como a los niveles base reportados para ésta especie (1.5 pmoles min⁻¹mg⁻¹ prot; Binelli *et al.*, 2005a), evaluaciones que se efectuaron en tejido suave de los mejillones. La evaluación de la actividad EROD en el presente trabajo se realizó en la glándula digestiva de *M. strigata*, tejido en el que se reporta la mayor actividad de ésta enzima (Livingstone *et al.*, 1989). Por otro lado se desconocen los niveles base de la actividad EROD en *M. strigata*, por lo que no podemos establecer que los bajos valores sean relacionados a un comportamiento específico.

Otros factores que pueden estar afectando el comportamiento de este biomarcador son: la acción de los múltiples contaminantes que se aportan al sistema lagunar-estuarino Estero de Urías, como se menciono anteriormente. Los resultados obtenidos denotan, de manera global, que la actividad EROD en glándula digestiva de *Mytella strigata* no es un biomarcador adecuado de la exposición *in situ* a OCs.

Tabla 15. Actividad enzimática de EROD, en bivalvos expuestos a plaguicidas. Se incluye la temperatura de los sitios de muestreo (°C) y el tiempo de exposición (h).

| Especie | Compuesto | Tejido | T exp, h | T °C | EROD, pmoles min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | | Referencia |
|-----------------------------|--|--------------|----------------|----------------|--|-----------------|---------------------------------|
| | | | | | Organismos expuestos | Niveles basales | |
| <i>Dreissena polymorpha</i> | DDT (ng g ⁻¹ lip) 532 1386.2 945.3 | | <i>in situ</i> | 18 17 15 | 2.85 | | Ricciardi <i>et al.</i> , 2005 |
| | | | | | 1.45 | | |
| | | | | | 0.53 | | |
| <i>Dreissena polymorpha</i> | Contaminación orgánica y por metales Desechos urbano/industrial | | <i>in situ</i> | | 38.81 | | Lafontaine <i>et al.</i> , 2000 |
| | | | | | 34.38 | | |
| | | | | | 2.44 | | |
| <i>Dreissena polymorpha</i> | DDT 100 ng l ⁻¹ | Tejido suave | 24 48 96 | | 0.85 0.7 0.6 | 1 | Binelli <i>et al.</i> , 2005a |
| <i>Dreissena polymorpha</i> | | Tejido suave | <i>in situ</i> | | -0.5-3.93 | 1.5 | Binelli <i>et al.</i> , 2005b |
| <i>Mytella strigata</i> | Lluvias | | <i>in situ</i> | | (0.08-0.24) | | Este trabajo |
| | Secas | | | | (0.04-0.62) | | |

9.2.2. Biomarcadores de Efecto.

En *Mytella strigata*, no se detectaron correlaciones significativas entre las respuestas biológicas evaluadas y los plaguicidas OCs y los OFs bioacumulados; asimismo no se observaron correlaciones entre las respuestas evaluadas a nivel sub-organismo y organismo. La falta de correlación entre diversas respuestas bioquímicas y fisiológicas ha sido reportada en *M. edulis* en diversos estudios (Martín *et al.*, 1984; Widdows *et al.*, 1980-1981; Bayne, 1973a). No obstante, a diferencia de lo observado en *M. strigata*, diversos autores reportan una relación causa-efecto entre las alteraciones fisiológicas observadas y la acumulación de los probables contaminantes acumulados en *M. edulis* (Bayne, 1973a; Widdows *et al.*, 1980-1981; Widdows y Johnson, 1988; Martín *et al.*, 1984; Widdows *et al.*, 1990).

Esta discrepancia puede obedecer, entre otros aspectos, a los procedimientos de evaluación y a los tiempos de exposición. En contraste con el presente estudio, donde la evaluación se realizó con *M. strigata* bajo condiciones de sitio, otros estudios han sido efectuados en organismos trasplantados (Widdows *et al.*, 1980-1981; Widdows y Jhonson, 1988; Widdows *et al.*, 1990), o bien bajo condiciones de laboratorio (Widdows y Jhonson, 1988; Martín *et al.*, 1984). En éste trabajo, las respuestas biológicas de *M. strigata* reflejan los efectos de una exposición crónica prolongada, no sólo a los plaguicidas sino a otros numerosos contaminantes (PAHs, metales traza, PCBs, etc.), aunado a otras variables ambientales (ej. temperatura, alimento, condición reproductiva) que modifican las respuestas biológicas como ha sido señalado para *M. edulis* (Widdows *et al.*, 1980-1981).

En los bivalvos, las proteínas solubles en plasma han sido utilizadas como indicadoras de estrés de la condición fisiológica global de los organismos (Marinovich *et al.*, 1994). En éste sentido, Rickwood y Galloway (2004), reportan en el mejillón azul *Mytilus edulis*, una disminución en el contenido total de proteínas en hemolinfa, por la exposición de $7 \mu\text{g l}^{-1}$ del organofosforado clorfenvifos (grado comercial), afectando el estatus de salud general de los organismos y la integridad de las barreras fisiológicas en contra de infecciones (Marinovich *et al.*, 1994).

La reducción en los niveles de proteína soluble en hemolinfa por efecto de diversos contaminantes ha sido documentado en otros invertebrados. Así, Galindo *et al.* (1996), reportaron la disminución en la concentración de proteína total soluble en el músculo de *Penaeus vannamei* por la exposición a los plaguicidas organoclorados, clordano, DDT, lorsban y lindano. De la misma manera, la exposición subletal a cobre, reduce los niveles de proteína en la hemolinfa de los cangrejos *S. scripta* y *V. cyprinoides* (Suresh y Mohandas, 1993). Los autores proponen que los iones metálicos se enlazan con las proteínas solubles de la hemolinfa, resultando en una desnaturalización y su eventual remoción desde la hemolinfa, así como la degradación de éstas a amino ácidos para el mantenimiento del balance osmótico de los organismos.

En *Mytella strigata*, el comportamiento de la concentración de proteína soluble en hemolinfa no obedece a lo descrito previamente. De acuerdo a los resultados obtenidos de los biomarcadores de exposición (inhibición de esterasas) y la bioacumulación de OFs, se esperaría que durante el periodo de secas, los organismos presentaran un mayor deterioro fisiológico que se viera reflejado en una disminución de la concentración de proteínas solubles totales tanto en

hemolinfa como en músculo. No obstante, es en esta época donde hay una mayor concentración de proteína soluble, época en la cual ocurre la maduración gonádica de la especie, lo que nos pudiera estar reflejando una movilización de proteínas con fines energéticos para el proceso de gametogénesis, enmascarando los probables efectos adversos de los contaminantes. Éstos resultados coinciden con Ojea *et al.* (2004), quienes reportan que las proteínas registran su máxima concentración en el bivalvo *Ruditapes decussatus* en el mes de Junio, mes en el que la gametogénesis está en su fase terminal y comienza el desove. Según Mithieu y Lubet, (1993; citado en Ojea *et al.*, 2004), el desarrollo de la gónada implica un incremento en el contenido de lípidos y proteínas ya que suministran energía durante la gametogénesis.

Por otra parte, se ha reportado que la exposición prolongada a los plaguicidas OFs ocasionan daño oxidativo en las membranas de las células, en las proteínas y el DNA (Handy *et al.*, 2003). Este comportamiento se observó en los mejillones provenientes de Astillero y Castillo durante la época de secas, en los que la reducción significativa de la capacidad antioxidativa podría obedecer a las elevadas concentraciones bioacumuladas de OFs; estos resultados contrastan con los obtenidos en los mejillones provenientes de Puente Juárez, en los que a pesar de que la bioacumulación es similar a los de Astillero y Castillo, los niveles de FRAP son elevados y similares a los organismos evaluados durante la época de lluvias, donde los niveles de OFs fueron mucho menores (Puente Juárez y Astillero) o no detectados (Castillo). Por otro lado, a pesar de la elevada dispersión de los resultados obtenidos en los mejillones durante la época de lluvias, los bajos niveles de FRAP en los mejillones provenientes de Astillero podrían obedecer a la mayor bioacumulación registrada en OCs.

La falta de correlación entre los niveles de FRAP y los plaguicidas bioacumulados podría obedecer a dos aspectos. Por un lado, es posible suponer que la respuesta antioxidativa de los mejillones es consecuencia de la interacción de múltiples estresores de acción oxidante. Por otro lado, los niveles similares espacio-temporales de la actividad FRAP podrían ser consecuencia de adaptaciones bioquímicas en los mecanismos involucrados, por la exposición crónica *in situ* a la interacción de contaminantes, como ha sido sugerido por Loinetto *et al.* (2003). Al respecto, los autores observaron que la actividad de CAT (catalasa) en mejillones de la península de Salento (Italia) provenientes de sitios con diferente grado de contaminación (por industrias, puertos, termoeléctricas y urbanización) fue similar. De igual manera Bresler *et al.* (1999), no observaron diferencias en la actividad de GST (Glutación-s-transferasa) en mejillones evaluados en sitios limpios y contaminados del Mar del Norte de Inglaterra. En contraste, en el mejillón *P. perna*

después de 150 días de ser trasplantado a sitios contaminados, presenta, un incremento significativo en la actividad de la GST (Glutación-s-transferasa) (Alves *et al.*, 2007). A la vez mejillones de *M. guayanensis* colectados en mangles de áreas contaminadas mostraron cambios sustanciales en el nivel antioxidante, presentando incrementos en la actividad de GPx (Glutatióna peroxidasa), GR (Glutación reductasa), CAT (Catalasa), GST (Glutación-s-transferasa) y en los niveles de GSSG (Glutación oxidado) pero una disminución en la GSH (Glutación reducido) (Torres *et al.*, 2002).

Cabe acotar que la técnica de FRAP, integra la capacidad antioxidativa celular de los organismos, pero excluye en su evaluación a la GSH (glutación reducido) un importante antioxidante en los organismos, lo cual pudiera estar modificando la interpretación de los resultados obtenidos en *Mytella strigata*.

La reducción en la estabilidad lisosomal es considerada como un biomarcador de efecto sensible que refleja el efecto tóxico global de varios contaminantes en peces y moluscos (Lowe y Pipe, 1994; Moore *et al.*, 2004), sensibilidad que ha sido probada en varios estudios en campo (Krishnakumar *et al.*, 1994; Petrovic *et al.*, 2001). Así, en el mejillón azul *Mytilus edulis*, la viabilidad de los hemocitos ocasionada por la desestabilización de la membrana de los lisosomas fue significativamente afectada por la exposición al plaguicida organofosforado clorfenvifos (Rickwood y Galloway, 2004) y al estireno, un compuesto aromático, presente en plásticos y resinas (Mamaca *et al.*, 2005). A la vez, el deterioro de la estabilidad lisosomal de los hemocitos en *M. edulis* se ha relacionado con la bioacumulación de altas concentraciones de organoclorados (PCB, HCH) y a éteres difenilos polibrominados (PBDEs) (Baršienė *et al.*, 2006), mientras que la reducción en la estabilidad de la membrana lisosomal en la glándula digestiva se relaciona con la bioacumulación de concentraciones elevadas de PCB así como de Σ DDT (Schiedek *et al.*, 2006).

En el presente estudio, la significativa menor estabilidad lisosomal de la membrana de los hemocitos de los mejillones de Astillero sugiere que estos mejillones se encuentran sometidos a un mayor estrés ambiental que los de Pte. Juárez y Castillo. Los resultados indican que los plaguicidas determinados en este estudio no tienen relación con las posibles alteraciones en la estabilidad lisosomal. Al igual que para FRAP, la estabilidad lisosomal de los hemocitos de los mejillones, no fue evaluada en el periodo de lluvias, lo cual dificulta su interpretación y no permite relacionarla con otras respuestas biológicas, al menos en la época de secas.

Las alteraciones biológicas a nivel sub-organismo por estresores ambientales usualmente se reflejan a nivel organismo en un incremento en el metabolismo aerobio, producto de un mayor requerimiento energético canalizado a reducir los efectos adversos de tales estresores. Así, el consumo de oxígeno, medida indirecta del metabolismo aerobio, refleja las reacciones que producen energía para cubrir las funciones globales del organismo y se considera una medida de integración sencilla que da cuenta de la condición fisiológica de los organismos (Fry, 1971).

No obstante, en el presente estudio, las alteraciones biológicas observadas en *M. strigata* a nivel suborganismo no se reflejaron en la tasa respiratoria de los mejillones, con excepción de los organismos procedentes de El Castillo durante la época de secas, en los que la tasa respiratoria fue significativamente menor, si bien la reducción en el consumo de oxígeno no se correlacionó con la bioacumulación de los plaguicidas OCs y OFs. Nuestros resultados son similares a lo reportado en el mejillón *Perna viridis* en los que el consumo de oxígeno de los organismos no se modificó a pesar de los altos niveles de organoclorados y PCBs bioacumulados por los mejillones (Shuhong *et al.*, 2005). De manera similar, Martín *et al.* (1984), no registraron variaciones en el consumo de oxígeno de *M. edulis*, trasplantado en 5 sitios de la Bahía de San Francisco con respecto a los mejillones del sitio de referencia, a pesar de que en los mejillones trasplantados se registraron concentraciones de Dieldrín, 5 y 10 veces mayores que las de los mejillones del sitio de referencia así como concentraciones muy elevadas de PCBs. Resultados similares se reportan en la misma especie trasplantada en gradientes de contaminación donde la tasa metabólica no se modifica a pesar de las diferentes concentraciones de metales, hidrocarburos y PCBs bioacumulados (Widdows y Johnson, 1988). Así mismo, el consumo de oxígeno en *M. galloprovincialis* no se modifica por la exposición de 7 días, a sedimentos contaminados con LAS (sulfonato alquilbenzeno lineal), (Marin *et al.*, 1994).

En contraste, Toro *et al.* (2003), reportan una correlación positiva y significativa entre el consumo de oxígeno del mitílido *Choromytilus chorus* y los organoclorados bioacumulados en tejido suave. Los autores mencionan que el aumento en la tasa metabólica puede obedecer al incremento en el gasto de energía metabólica producido por las elevadas concentraciones de los contaminantes en los tejidos de los bivalvos.

Estudios en laboratorio también han demostrado la reducción significativa en el consumo de oxígeno por la exposición a contaminantes. Así, en *P. viridis* el consumo de oxígeno disminuye

por la exposición de 6 días al Zn y al Cd (Cheung y Cheung, 1995). En la misma especie se reporta una disminución de la tasa respiratoria conforme se incrementan las concentraciones externas de cloro (Masilamoni *et al.*, 2002), comportamiento similar descrito en *M. edulis* y *M. leucophaeata* por la exposición al mismo contaminante (Rajagopal *et al.*, 2005).

Las discrepancias en los cambios en la tasa respiratoria de los bivalvos por efecto de los contaminantes pueden obedecer, por un lado a la diferencia especie-específica, o por el otro, al curso de la intoxicación como ha sido descrito para crustáceos por efecto del cadmio (Gaudy, 1991). El autor propone dos fases de respuestas fisiológicas. En la primera fase, hay una demanda del incremento de ATP, relacionada con el incremento de la fosforilación oxidativa; éste incremento respiratorio puede ser considerado una respuesta de adaptación fisiológica a la contaminación (Relexans *et al.*, 1988). La segunda fase es caracterizada por una reducción en la respiración debido a la incapacidad del organismo para responder a un incremento en la demanda de ATP; ello obedece al daño oxidativo en las membranas respiratorias, daño en el epitelio de las branquias durante la exposición a contaminantes o bien por inhibición enzimática (Bryan, 1971; citado en Gaudy, *et al.*, 1991).

Adicionalmente, la reducción en el consumo de oxígeno puede ser consecuencia de la disminución de la actividad en los organismos, relacionado con una reducción de la ingestión y la asimilación del alimento por la acción de los contaminantes o bien de la cantidad y calidad de alimento disponible (Gaudy *et al.*, 1991). Esta reducción en los procesos alimentarios podría explicar la reducción en la tasa respiratoria de los mejillones provenientes del Castillo en el Estero de Urías. Acorde a los resultados de Piña (2007, com. pers), los mejillones que presentaron el menor campo de crecimiento, relacionado con las menores tasas de absorción del alimento ingerido y de eficiencia de asimilación del alimento ingerido, fueron precisamente los provenientes de Castillo (en un estudio conducido simultáneo al del presente trabajo). Esta reducción en la tasa de absorción del alimento y en la eficiencia de asimilación (Piña, 2007, com. pers.) podría a la vez explicar el comportamiento de la excreción nitrogenada de los mejillones provenientes de Castillo durante la época de secas, los cuales presentaron la menor tasa de excreción nitrogenada, aunque estos valores no difirieron significativamente de los mejillones de los demás sitios de estudio y época climática.

De manera similar a nuestros resultados, se ha documentado que la disminución en la excreción nitrogenada en el crustáceo *Leptomysis lingvura* por efecto de 0.1 mg l⁻¹ de Cd puede obedecer

a la reducción de la ingestión y la asimilación del alimento en condiciones de contaminación o incluso a la disminución en cantidad y calidad del alimento disponible para los organismos (Gaudy *et al.*, 1991). La reducción en la excreción nitrogenada por efecto de la disminución en la tasa de absorción del alimento y asimilación del alimento ha sido también documentado en *Mytilus edulis*, relacionada con un incremento corporal de hidrocarburos y cobre (Widdows y Johnson, 1988) ó con una mayor bioacumulación de hidrocarburos poliaromáticos, PCBs, Pb, Tri y Di-butilin (Widdows *et al.*, 1990). No obstante, en el presente estudio la excreción nitrogenada de *Mytella strigata* no se relaciona con la bioacumulación de los plaguicidas OFs y OCs.

El efecto de los contaminantes sobre la excreción nitrogenada en los bivalvos es variable. A diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la excreción nitrogenada en *Mytilus edulis* se incrementa, aumento relacionado con una mayor bioacumulación de Dieldrín y de PCBs (Martín *et al.*, 1984). El incremento en la tasa de excreción amoniacal también ha sido reportada en *Venus verrucosa* expuesta a agua contaminada por el derrame del petróleo crudo en Kuwait (Axiak y George, 1987) y en *P. viridis* al ser expuestos a Zn y Cd (Cheung y Cheung, 1995). Por otra parte, se reportan trabajos en donde la excreción nitrogenada no se modifica por el efecto de contaminantes como en *Mytilus galloprovincialis* expuesto a sedimentos contaminados con LAS (sulfonato alquilbenzeno lineal) (Marin *et al.*, 1994) así como en el copépodo *Nitrocra affinis* por efecto de hidrocarburos de petróleo (Ustach, 1979) ó en los copépodos *Pseudocalanus* sp., y *Calanus* sp., por la exposición al cobre (Reeve *et al.*, 1977).

En los organismos amoniotélicos, incluidos los mejillones, la integración de la tasa respiratoria y la excreción nitrogenada en la razón atómica O:N es una medida de integración sencilla empleada para describir la naturaleza del sustrato metabolizado como fuente energética (Mayzaud y Conover, 1988). Ésta relación puede asociarse tanto con los requerimientos energéticos como con los efectos de las variables ambientales, incluidos los contaminantes, que modifican los procesos fisiológicos integrados en la razón, motivo por el cual ha sido considerado un indicador general de estrés (Widdows, 1978). En los bivalvos, el sustrato energético normal de los organismos se ha relacionado con el uso de carbohidratos, lípidos y proteínas, con valores de O:N usualmente mayores de 50 (Bayne, 1973a; Widdows y Johnson, 1988; Martín *et al.*, 1984; Widdows *et al.*, 1990; Widdows *et al.*, 1980-1981).

En el presente estudio, la razón atómica O:N no presentó variaciones estacionales tanto en la época de secas como en la de lluvias. Los valores obtenidos en los mejillones provenientes de

Castillo denotan una utilización de proteínas y lípidos (O:N entre 30 y 38) como sustrato energético en tanto que los valores de O:N obtenidos en Puente de Juárez y Astillero reflejan un cambio en el sustrato energético hacia el empleo estricto de proteínas (O:N < 20). El uso estricto de proteínas como sustrato energético en *Mytella strigata* proveniente de Pte. Juárez y Astillero, sugiere una condición de severo estrés nutricional como ha sido reportado para otros bivalvos marinos (Bayne *et al.*, 1976; Bayne y Scullard, 1977; Widdows, 1978; Bayne *et al.*, 1985; Tedengren y Kautsky, 1986; 1987). Cabe recordar que los mejillones procedentes de Castillo en la época de secas presentaron los niveles más bajos de excreción nitrogenada y de consumo de oxígeno, relacionados con una menor tasa de absorción y asimilación del alimento (Piña, com. pers.); ello sugiere que estos animales no cuentan con el sustrato energético del que normalmente disponen en el alimento, por lo que necesitan utilizar sus reservas lipídicas para obtener la energía necesaria para realizar sus funciones normales (acorde a los valores registrados de la relación O:N). Sin embargo ésta movilización de lípidos, podría a la vez dejar biodisponibles a los plaguicidas usualmente lipofílicos, ejerciendo su acción tóxica en los bivalvos. En consecuencia es probable que las funciones fisiológicas sean afectadas, resultando en un desbalance energético vinculado con las probables alteraciones fisiológicas que estén relacionadas con la incorporación y la eficiencia de asimilación del alimento suministrado por el ambiente. De acuerdo a Gaudy *et al.* (1991), éste desbalance es mayor cuando se incrementan las demandas metabólicas para reducir los efectos adversos de los contaminantes, acompañado de la reducción del suministro de la energía alimentaria o de la pérdida de capacidad de asimilación del alimento. Lo anterior se evidencia aún más al calcular la energía requerida para el mantenimiento de los mejillones provenientes de Castillo (sumatoria de la energía canalizada a la respiración y la pérdida en la excreción nitrogenada) (Lucas, 1996), los cuales presentaron la menor energía de mantenimiento ($3.55 \text{ cal h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$) en el periodo de secas, sugiriendo una severa limitación energética para su funcionamiento normal.

Se sabe también que las variaciones estacionales de la proporción O:N también reflejan el arreglo metabólico por la demanda de nutrientes necesaria para sustentar la gametogénesis, presentando un marcado ciclo estacional (Widdows, 1978; Hawkins y Bayne, 1985; Kreeger, 1993). En contraste, los valores de la relación atómica O:N registrados en el presente estudio en *Mytella strigata* no presentan variaciones estacionales, si bien en la época de secas ocurre la maduración gonádica de los organismos (obs. pers.; Estévez, 1975; Baqueiro y Aldana, 2000). Asimismo, sólo en los mejillones provenientes de Castillo la relación O:N da cuenta del empleo de proteínas y lípidos como sustrato energético, en contraste con el empleo estricto de proteínas

de los organismos provenientes de Puente Juárez y de Astillero. De tal manera la relación O:N no es un indicador de estrés adecuado durante la etapa de maduración gonádica de los mejillones periodo en el cual se pueden enmascarar los efectos de los contaminantes en los organismos. Resultados similares han sido descritos en *Mytilus edulis* por Bayne (1973a) y Widdows *et al.* (1980-1981).

La alteración en la relación O:N por efecto de contaminantes ha sido descrita en diversos bivalvos. Así, en *Perna viridis* la exposición prolongada a concentraciones subletales de Cd ocasiona cambios en el sustrato energético, de valores en la relación O:N de 120 a niveles de 10 en los organismos expuestos. (Cheung y Cheung, 1995). De manera similar, la exposición de *Mytilus edulis* a gradientes de concentración de contaminantes en la Bahía de San Francisco (Martín *et al.*, 1984) y en la Bahía de Narragansett, Rhode Island (Widdows *et al.*, 1980-1981) ocasionó cambios en el sustrato energético de los organismos, de valores normales de O:N relacionados con el empleo mayoritario de carbohidratos y menor de proteínas y lípidos, a valores relacionados con el uso estrictamente proteico para cubrir las demandas energéticas; éstas alteraciones en los sustratos energéticos se relacionaron con la acumulación de dieldrin y PCBs y de Ni e hidrocarburos poliaromáticos, respectivamente. En contraste, en el presente estudio el comportamiento de la relación O:N y los cambios en los sustratos energéticos no se correlacionaron con la bioacumulación de los plaguicidas OCs ni de los organofosforados en *M. strigata* reafirmando que la razón atómica O:N no es un índice adecuado en la evaluación del impacto por la contaminación de plaguicidas en los mejillones, al menos no bajo las condiciones en que se realizó este estudio.

Si bien la evaluación en campo del efecto de los contaminantes en la biota acuática conlleva una elevada complejidad debido a la multiplicidad de variables involucradas, es el escenario real de la acción tóxica de los xenobióticos sobre los organismos (Galgani y Bocquené, 2000; Lagadic *et al.*, 2000) aunque se dificulta el establecimiento de las causalidades entre los tóxicos y los efectos adversos producidos debido a los numerosos factores actuando sobre las respuestas biológicas (Widdows *et al.*, 1980-1981). A pesar de ello, el presente trabajo confirma la valía de efectuar estudios en los que se considere la evaluación de múltiples biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica relacionados con la cuantificación de los contaminantes en estudio. En el presente trabajo, los resultados obtenidos denotan que de los biomarcadores de exposición evaluados, las esterases dan cuenta del impacto de la exposición *in situ* a los plaguicidas OFs en *Mytella strigata*. En contraste, la evaluación de los biomarcadores de efecto

de manera aislada no da cuenta clara del efecto de la exposición *in situ* a plaguicidas, lo que no descarta la posible influencia ejercida por otros contaminantes y/o estresores presentes en el sistema. Sin embargo la integración de las respuestas biológicas evaluadas a nivel de individuo reflejan la condición fisiológica global de los organismos aportando herramientas para analizar el estado de salud de los mismos. En éste sentido la integración de las respuestas fisiológicas (tasa respiratoria y de excreción nitrogenada) a través de los cambios en la energía de mantenimiento puede ser un indicador adecuado de la condición de salud de los mejillones, sobre todo si es posible relacionarla con funciones biológicas relevantes como reproducción y crecimiento.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten sugerir que el mejillón *Mytella strigata* podría ser considerado un bioindicador adecuado de la contaminación en sistemas costeros por plaguicidas organofosforados. En ambientes fuertemente impactados por contaminantes, como es el caso del Estero de Urías, los estudios de ésta naturaleza deben de contemplar la periodicidad de los aportes (en éste caso anual) ya que en escalas de tiempo menores (ej. estacional) no se visualizan a nivel espacial los efectos biológicos de los xenobióticos. A la vez, los resultados sugieren que en el Estero de Urías, el mejillón *Mytella strigata* se encuentra sujeto a fuertes presiones ambientales entre ellas los plaguicidas, que pueden comprometer la estabilidad de las poblaciones y representar un riesgo potencial para el ecosistema. No obstante se requiere profundizar en los efectos de otros contaminantes presentes en el sistema como los metales pesados y los hidrocarburos poliaromáticos sobre *Mytella strigata*, así como en la validez de las relaciones de causalidad que sustenten la valoración del riesgo de la contaminación en las poblaciones de los mejillones y su probable impacto, en el ecosistema.

10. CONCLUSIONES.

1. De acuerdo a los criterios de calidad sedimentaria y de toxicidad crónica para la biota béntica, el análisis químico de los plaguicidas OFs y OCs en los sedimentos y en los organismos, sugiere que estos xenobióticos representan un riesgo para las poblaciones de *Mytella strigata* y para la biota del sistema.
2. Se observó un comportamiento estacional en la concentración de los plaguicidas en el Estero de Urías; los plaguicidas OCs fueron más abundantes en la época de lluvias, mientras que los OFs predominaron en la época de secas. No se registraron concentraciones de OFs en agua y sedimento, lo cual sugiere su rápida degradación; sin embargo, su acumulación en los mejillones sugiere un aporte constante al sistema lagunar, particularmente en la época de secas.
3. No se observaron correlaciones entre las concentraciones de los plaguicidas en los sedimentos y los acumulados en los mejillones. No obstante los resultados sugieren que los mejillones actúan como integradores y reflejan la biodisponibilidad de los contaminantes en el medio externo.
4. En *Mytella strigata*, a excepción de la actividad enzimática de las esterasas, no se detectaron correlaciones significativas entre las demás respuestas biológicas evaluadas y los plaguicidas OCs y OFs bioacumulados.
5. Se comprueba que la actividad enzimática de las esterasas AChE y CbE son biomarcadores adecuados de la exposición *in situ* a organofosforados en los mejillones. La actividad enzimática disminuye conforme aumentan las concentraciones de los plaguicidas OFs bioacumulados en los organismos. En contraste a lo esperado, la actividad EROD en la glándula digestiva de *M. strigata*, no es un biomarcador adecuado de la exposición *in situ* a los plaguicidas OCs. Así mismo, no se detectaron relaciones de causalidad entre las respuestas biológicas a nivel sub-organismo y las evaluadas a nivel organismo.
6. La evaluación individual de los biomarcadores de efecto tanto a nivel sub-organismo (concentración de proteína soluble en hemolinfa y músculo, estabilidad lisosomal y FRAP) como organismo (el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada y la relación O:N), no dan cuenta del efecto adverso en *Mytella strigata* de la exposición *in situ* a los plaguicidas. Sin

embargo, la integración de los resultados obtenidos sugiere que durante la época de secas los organismos están sujetos a un mayor estrés ambiental, siendo los mejillones provenientes de Castillo los que presentan un mayor deterioro tanto a nivel bioquímico como fisiológico.

7. Los resultados sugieren que el mejillón *Mytella strigata* es un bioindicador adecuado de la contaminación en sistemas costeros por plaguicidas organofosforados.

8. El enfoque de la evaluación de biomarcadores múltiples en conjunción con el análisis químico de los contaminantes es una herramienta necesaria para establecer el riesgo potencial por efecto de los contaminantes en la biota de los sistemas lagunares-estuarinos.

11. RECOMENDACIONES.

Los estudios de la evaluación en campo del efecto de contaminantes en ambientes impactados es de una elevada complejidad, ya que usualmente no es factible contar con sitios de referencia que permitan establecer tanto los “niveles base” de los xenobióticos en las matrices ambientales como los “valores normales” de las respuestas biológicas evaluadas en los organismos y discernir su grado de alteración por la exposición a los contaminantes. Una alternativa es efectuar estudios de depuración bajo condiciones controladas de laboratorio, considerando las condiciones óptimas para los organismos en estudio, que aporten información sobre los “niveles normales” de las respuestas biológicas bajo análisis, información que debe ser analizada con precaución, ya que no contempla la multiplicidad de variables ambientales que actúan en concierto en el medio natural. Asimismo, otra alternativa es utilizar organismos depurados, bien en el laboratorio o en el medio natural, y realizar estudios de transplante *in situ* para valorar el efecto de los tóxicos ambientales, para lo cual también es fundamental profundizar en el conocimiento biológico de la especie y de la dinámica del ecosistema en estudio.

Es importante que para la evaluación de los biomarcadores de la exposición y del efecto de los tóxicos ambientales evaluados en el presente estudio así como de otros biomarcadores, se utilicen en futuros estudios organismos inmaduros o en su defecto, se realicen estudios sobre la influencia del estadio reproductivo de los mejillones sin la presencia de contaminantes a fin de evaluar las variaciones estacionales “naturales” de estas respuestas biológicas y su interacción con los tóxicos ambientales y discriminar los posibles efectos de la condición reproductiva de los organismos.

12. LITERATURA CITADA.

- Adams, M. (Ed.).1990. Biological Indicators of Stress *In: Fish. American Fisheries Symposium* 8. Bethesda, Maryland. 191 pp.
- Adams, S. M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Marine Pollution Bulletin*, 51:649-657.
- Alonso-Rodríguez, R., F. Páez-Osuna and R. Cortés-Altamirano. 2000. Trophic conditions and stoichiometric nutrient balance in subtropical waters influenced by municipal sewage effluents in Mazatlán Bay. *Marine Pollution Bulletin*, 40:331-339.
- Álvarez-León, 1977. Estudio hidrológico de los esteros del Astillero, Urías y la Sirena adyacentes a Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. UACP Y CCH. 131 pp.
- Alves, E., A. C. Dias, A. P. de Melo, G. Regina, S. Miyamoto, J. Onuki, L. Fujita, C. Carrião, F. Manso, G. E. Ronsein, C. Alexandre, C. Barbosa, A. M. Gracioso, M. H. Gennari and P. Di. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 146:588-600.
- Anguas, C. D. N. 2004. *Evaluación de la toxicidad del plaguicida organofosforado metamidofos sobre crecimiento y egestión de Capitella sp. Procedente del estero del Yugo, Mazatlán.* Tesis Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Mazatlán. México. 70 pp.
- Axiak, V. and J. J. George. 1987. Bioenergetic responses of the marine bivalve *Venus verrucosa* on long-term exposure to petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 23:33-47.
- Baqueiro, C. E. and D. Aldana. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from México. *Bulletin of Marine Science*, 66 (1):13-27p.
- Barcelo, D., M Sole, G. Durand and J. Albaiges. 1991. Analysis and behaviour of organophosphorous pesticides in a rice crop field. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 339:676-683.
- Barnes, R. D. 1977. *Invertebrate Zoology*. Phyladelphia, P. A. W. B. Saunders. 1114 pp.
- Baršienė, J., K. K. Lehtonen, A. Koehler, K. Broeg, P. J. Vuorinen, T. Lang, J Pempkowiak, J Šyvokienė, V. Dedonyte, A. Rybakovas, R. Repečka, H. Vuontisjärvi and J. Kopeka. 2006. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 53:422-436.
- Basack, S. B., M. L. Oneto, J. S. Fuchs, E. J. Wood and E. M. Kestn. 1998. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61:569-576.
- Bautista, C. J. C. 2001. Inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa (AchE). Como efecto de toxicidad por insecticidas organofosforados sobre camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Mazatlán, Sinaloa. México.

- Bayne, B. L. 1973a. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Netherlands Journal of Sea Research*, 7:399-410.
- Bayne, B. L. and C. Scullard. 1977. Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). *Journal Marine Biology Ass. UK*, 57:355-369.
- Bayne, B. L., C. J. Bayne, T.C. Carefoot, R.J. Thompson. 1976. The physiological ecology of *Mytilus californianus*: Conrad 1. Metabolism and energy balance. *Oecologia Berl*, 22:211-228.
- Bayne, B.L. 1973b. Physiological changes in *Mytilus edulis* L. induced by temperature and nutritive stress. *Journal Marine Biology UK*, 53:39-58.
- Bayne, B.L., D. A. Brown, K. Burns, D.R. Dixon, A. Ivanovici, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, M.N. Moore, A.R.D. Stebbin and J. Widdows. 1985. *The effects of stress and pollution on marine animals*. Preager Publishers CBS Educational and Professional Publishing. New York, 384pp.
- Beliaeff, B. and T. Burgeot. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6):1316-1322.
- Benzie, I. F. F. and J. J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power". The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Binelli, A., F. Ricciardi, C. Riva and A. Provini. 2006. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, 62 (4):510-519.
- Binelli, A., F. Ricciardi, C. Riva and A. Provini. 2005. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere*, 61(8):1074-1082.
- Blackmore, G., B. Morton and Z. G. Huang. 1998. Heavy metals in *Balanus amphitrite* and *Tetraclita squamosa* (Crustacea: Cirripedia) collected from the coastal water of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 34:32-40.
- Bocquene, G. F., F. Galgani and P. Truquet. 1990. Characterisation and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 30:75-89.
- Bodin, N., T. Burgeot, J. Y. Stanisière, G. Bocquéné, D. Menard, C. Minier, I. Boutet, A. Amat, Y. Cherel and H. Budzinski. 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 138:411-427.
- Bonacci, S., M. A. Browne, A. Dissanayake, J. A. Hagger, I. Coris, S. Focardi and T. S. Galloway. 2004. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 49:445-455.
- Bourdeau, P., J. A. Haines, W. Klein and C. R. Krishna Murti (eds). 1989. *Ecotoxicology and climate with special reference to hot and cold climates*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

- Bradford, 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Bresler, V., V. Brissinger, A. Abelson, H. Dizer, A. Sturm, R. Kratke, L. Fischelson and L. Hansen. 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research*, 53(3-4):219-243.
- Brevik, E. M., M. Grande, J. Knutzen, A. Polder and J. U. Skaare. 1996. DDT contamination of fish and sediments from Lake Ørsjøen, Southern Norway: Comparison of data from 1975 and 1994. *Chemosphere*, 33 (11):2189-2200.
- Brown, D.W., B. B. McCain, B. H. Horness, C. A. Sloan, K.L. Tilbury, S.M. Pierce, D. G. Burrows, S-L- Chan, J. T. Landhehl and M. M. Krahn. 1998. Status, correlations and temporal trends of chemical contaminants in fish and sediment from selected sites on the pacific coast of the USA: *Marine Pollution Bulletin*, 37(1-2):67-85.
- Buchman, M. F. 1999. NOAA. *Screening Quick Reference Tables*, NOAA HAZMAT Report 99-1, Seattle WA, Coastal Protection and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 12 pp.
- Burgeot, T., G. Bocquené, G. Pingray, D. Godefroy, J. Legrand, J. Dimeet, F. Marco, F. Vincent, Y. Henocque, H. O. Jeanneret and F. Galgani. 1994. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along french coasts by measurement of Ethoxyresorufin-O-deethylase Activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29:131-147.
- Burker, M. D. and R. Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 2 (6):583-588.
- Camus, L., S. R. Birkely, M. B. Jones, J. F. Børseth, B. E. Grøsvik, B. Gulliksen, O.J. Lønne, F. Regoli and M. H. Depledge. 2003. Biomarker responses and PAH uptake in *Mya truncata* following exposure to oil-contaminated sediment in an Artic fjord (Svalbard). *The Science of the Total Environment*, 308:221-234.
- Canty, M.N., J.A. Hagger, R. T.B. Moore, L. Cooper and T. S. Galloway. 2007. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 54 (4):396-402.
- Cao, G. and R. Prior. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 44 (6):1309-1315.
- Capdevila, J., R. C.Harris and J. R. Falck. 2002. Microsomal cytochrome p450 and eicosanoid metabolites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59:780-789.
- Carlock, L.L., W. L. Chen, E. T. Gordon, J. C. Killeen, A. Manley, L. S. Meyer, L. S. Mullin, K. J. Pendino, A. Percy, D. E. Sargent and L. R. Seaman. 1999. Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, 2:105-160
- Carvalho, F. P., F. Gonzalez-Farias, J. P. Villeneuve, C. Cattini, M. Hernandez-Garza, L. D. Mee and S. W. Fowler. 2002. Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of Northwestern Mexico. *Environmental Technology*, 23:1257-1270.

- Castell, J. V. 2005. *El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos*. http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf
- Cech, J. 1990. *Respirometry*. In: Schreck, B. C. and P. B. Moyle. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Bethesda. USA. 684pp.
- Cheung, S. G. and R.Y.H. Cheung. 1995. Effects of heavy metals on oxygen consumption and ammonia excretion in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12):381-386.
- Cheung, C.C.C., G.J. Zheng, P.K.S. Lam and B. J. Richardson. 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 45:181-191.
- CICESE *cartas de marea*, 2004,2005.
- CICLOPLAFEST, 2004. *Catálogo Oficial de Plaguicidas*. Comisión Intersecretarial Para El Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas, Secretaría de Agricultura y Ganadería y Desarrollo Rural; Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; Secretaría de Salubridad y Asistencia; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México, D. F.
- Cockcroft, A.C. 1990. Nitrogen excretion by the surf zone bivalves *Donax serra* and *D. sordidus*. *Marine Ecology Progress Series*, 60:57-65.
- Dailianis, S., G. P. Domouhtsidou, E. Raftopoulou, M. Kaloyianni and V. K. Dimitriadis. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56:443-470.
- Deaton, L. E., 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of the betaine and alanine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 260: 185-197.
- Depledge, M. H. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: M C Fossi and C Leonzio (eds). *Nondestructive biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton. FL. pp 271-295.
- Detra, R. I. and W. J. Collins. 1991. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:1089-1095.
- Díaz, F., G. Escalante, A. Denisse, E. Sierra. 2006. Fisiología energética de *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) alimentado con dos dietas expuestos a un régimen constante y fluctuante de temperatura. *Hidrobiológica*, 16 (1):35-44.
- Dorval, J. and A. Hontela. 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cell of rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology Applied Pharmacology*, 192:191-200.
- Duursma, E. K., J. Nieuwenhuize, J.M. Van Liere and M. T. J. Hillebrand. 1986. Partitioning of organochlorines between water, particulate matter and some organisms in estuarine and

- marine systems of the netherlands. *Netherlands Journal of Sea Research*, 20(2/3):239-251.
- Eckert, R. 1988. *Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones*. Interamericana. McGraw_Hill. México, 683pp.
- Elliot, J. M. and W. Davinson. 1975. Equivalent of oxygen consumption in animal energetic. *Oecología*, 19:195-201.
- Ellman, G. L., K. O. Courtney, V. Anders, Jr and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*, 7:88-95.
- EPA, 1998. *Organophosphorus compounds by gas chromatography*. 8141B.
- EPA, 1991. Proposed Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic Chemical Using Equilibrium Partition. US: Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division, Washington, D. C. 20460.
- Escartín, E. and C. Porte, 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus Galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (10):2090-2095.
- Estévez, J., 1975. Aspectos generales de la biología y ecología del mejillón *Mytella strigata* (Hanley, 1843) en dos lagunas costeras del estado de Guerrero. Tesis Licenciatura. Fac. Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 63 pp.
- Fang, Z. Q. 2004. Organochlorines in sediments and mussels collected from coastal sites along the Pearl River Delta, South China. *Journal of Environmental Sciences*, 16(2):321-327.
- Fernández B. A., M. Yarto y J. Castro. (Comp.). 2004. *Las sustancias tóxicas persistentes*. Instituto Nacional de Ecología, México, D.F. 257 pp.
- Forbes, V. E., A. Palmqvist and L. Bach. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1):272-280.
- Förlin, L., S. P. Baden, S. Eriksson, Å. Granmo, E. Lindesjö, K. Magnusson, R. Ekelund, A. Esselin and J. Sturve. 1996. Effects of contaminants in roundnose grenadier (*Coryphaenoides rupestris*) and norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) in the skagerrak and kattegat compared to the faroe islands. *Journal of Sea Research*, 35(1-3):209-222.
- Fossi, M. C., S. Casini, C. Savelli, C. Corbelli, E. Franchi, N. Mattei, J.C. Sanchez-Hernandez, I. Corsi, S. Bamber and M. H. Depledge. 2000. Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere*, 40:861-874.
- Fry, F.E.J. 1971. *The effects of environmental factors on the physiology of fish*. (1-98). In: Hoar, W. S. and D. J. Randall (Eds). *Fish physiology*, Vol 6. Academic Press. New York.

- Fulton, M. H. and P. B. Key. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1):37-45.
- Galgani, F. and G. Bocquene. 1991. Semi-automated colorimetric and enzymatic assays for aquatic organisms using microplate readers. *Water Research*, 25(2):147-150.
- Galgani, F. and G. Bocquené. 2000. *Molecular biomarkers of exposure of marine organisms to organophosphorus pesticides and carbamates*. In: Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard and F. Ramade. (Eds) *Use of biomarkers for environmental quality assessment*. Science Publishers, Plymouth UK. pp 113-137.
- Galindo, J., A. Medina and C. Villagrana. 1996. Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pesticides. *Marine Pollution Bulletin*, 32:872-875.
- Galindo, R. G., C. Villagrana L. and G. Lazcano A. 1999. Environmental conditions and pesticide pollution of two coastal ecosystems in the Gulf of California, Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44:280-286.
- Galindo, R. J. G., I. M. A. Guerrero, L. C. Villagrana, U. L. G. Quezada y E. S. Angulo. 1992. Contaminación por plaguicidas en agua, sedimentos, camarón y almeja de dos ecosistemas costeros de Sinaloa, México. *Tropical Ecology*, 33 (2):172-180.
- Galindo, R. J. G., J. A. Medina, L. C. Villagrana and C. L. Ibarra. 1997. Environmental and pollution condition of the Huizache-Caimanero lagoon in the north west of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 34:1072-1077.
- Galindo, R. J. G., L. Dalla-Venezia and Ma. G. Lazcano A. 2002. Effect of some organophosphorous pesticides on oxygen consumption of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52:134-136.
- Galindo-Reyes, J. G., L. Dalla-V, G. Lazcano-Alvarez and H. Rivas- Mendoza. 2000. Enzymatic and osmoregulative alteration in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Exposed to pesticides. *Chemosphere*, 40:233-237.
- Galloway, T. S., R. Sanger, K. Smith, G. Fillmann, J. Readman, T. Ford and M. Depledge. 2002a. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science & Technology*, 36:2219-2226.
- Galloway, T. S., N. Millward, M. A. Browne and M. H. Depledge. 2002b. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 61:169-180.
- Garay-Velázquez, J. D. 1986. Hacia la recuperación del Estero del Infiernillo para uso urbano. Universidad Autónoma de Sinaloa. *Ciencias del Mar*, 9:41-45.
- García, E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 69 pp.
- García-de la Parra, L. M., J. C. Bautista-Covarrobias, N. Rivera-de la Rosa, M. Betancourt-Lozano and L. Guilhermino. 2005. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase

- activity, behaviour, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65 (3):372-380.
- Gaudy, R., J.P. Guérin and P. Kerambrun. 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: mysidacea). *Marine Biology*, 109:493-501.
- Goeptar, A. R., H. Sheerens and N P E. Vermeulen. 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome p450. *Critical Reviews in Toxicology*, 25:25-65.
- Goldberg, E. D.1975. The mussel Watch. A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6:111.
- González-Farias, F., X. Cisneros E., C. Fuentes R., G. Díaz G. and A. V. Botello. 2002. Pesticides distribution in sediments of a tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in northwest Mexico. *Environmental Technology*, 23:1247-1256.
- Gosling, E. (Ed). 1992. *Developments in aquaculture and fisheries science. Vol. 25. The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier. Amsterdam.
- Guilhermino, L., P. Barros, M. C. Silva and A. M. V.M. Soares. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?. *Biomarkers*, 3 (2):157-163.
- Gustavson, K. and P. Jonsson. 1999. Some halogenated organic compounds in sediments and blue mussel (*Mytilus edulis*) in Nordic Seas. *Marine Pollution Bulletin*, 38(8):723-736.
- Gutteridge, J. M. C. 1994. *Chem. -Biol. Interact*, 91:133-140.
- Hai, D.Q., S.I. Varga and B. Matkovics. 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 117: 83-88.
- Halliwell, B. 1994. *Nutrition Reviews*, 53:253-265.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1990. *Arch. Biochem. Biophys*, 280:1-8.
- Handy, R., T. S. Galloway and M.H. Depledge. 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12:331-343.
- Haro, B. M. 2004. Evaluación de la influencia de la temperatura y la salinidad sobre la toxicidad de metamidofos en postlarvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis Mestria Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Mazatlan. Mexico. 65pp
- Hawkins, A.J.S. and B.L. Bayne. 1985. Seasonal variation in the relative utilization of carbon and nitrogen by the mussel *Mytilus edulis*: budgets, conversion efficiencies and maintenance requirements. *Marine Ecology Progress Series*, 25:181-188.
- Herbert, A., L. Guilhermino, C.H. Assis de Silvia and P. D. Hansen. 1995. Activity the acetilcholinesterase in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschaif fur Angewandte Zoologie*, 3:1-15.

- Hiong K. C., W. Y. X. Peh, A. M. Loong, W. P. Wong, S. F. Chew and Y. K. Ip. 2004. Exposure to air, but not seawater, increases the glutamina content and the glutamine synthetase activity in the marsh clam *Polymesoda expansa*. *The journal of Experimental Biology*, 207:4605-4614.
- Hochachka, P. W. and G. N. Somero. 1973. *Strategies of biochemical adaptation*. Philadelphia, Saunders. 358 pp
- Hoffman, D. J., B. A. Rather, G. A. Burton and J. Cairns. 2003. *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers. New York.
- Holtzman, E. 1989. *Lysosomes*. Plenum Press, New York.
- Hyne, R. V. and W. A. Maher. 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54:366-374.
- Jamil, K. 2001. *Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment*. Science Publishers, Enfield, USA. 204 pp.
- Josephy, P. D., B. Marnervik and P. Ortiz. 1997. *Molecular Toxicology*. Oxford University Press. New York. 368pp.
- Keen, M. 1971. *Sea shells of tropical west America: Marine molluscs from Baja California to Peru*. Stanford, C. A. Stanford University Press.
- Kennish, M. J. 1992. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. CRC Press. London.
- Koehn, K. R. 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*, 9:125-145.
- Kreeger, D. A. 1993. Seasonal patterns in utilization of dietary protein by the mussel *Mytilus trossulus*. *Marine Ecology Progress Series*, 95:215-232.
- Krishnakumar, P. K., E. Casillas and U. Varanasi. 1994. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 106:249-261.
- Labrot, F., D. Ribera, M. D. Saint and J. F. Narbonne. 1996. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in tree non-mammalian species. *Biomarkers*, 1:21-28.
- Lacher, T. E. Jr. and M. Goldstein. 1997. Tropical ecotoxicology: status and needs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (1):100-111.
- Lafontaine, Y., F. Gagné, Ch. Blaise, G. Costan, P. Gagnon and H. M. Chan. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*, 50:51-71.
- Lagadic, L., T. Caquet, J-C. Amiard and F. Ramade. 2000. *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*. Science Publishers. Inc. Enfield, New Hampshire, USA. 324 pp.

- Landis, W. G. and M-Ho Yu. 1999. *Introduction to environmental toxicology. Impacts of Chemicals upon Ecological Systems*. Lewis Publishers. New York. 390 pp.
- Leal, T.B.A., 2007. Análisis de la condición reproductiva del mejillón de mangle, *Mytella strigata*, en sistemas costeros de Sinaloa con diferentes escenarios de contaminación. Tesis Mestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Mazatlan. Mexico. 96pp
- Lehningers, A.1990. *Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. Omega, Barcelona. 1117pp.
- Lehtonen, K. K. and S. Leiniö. 2003. Effects of exposure to Copper and Malathion on Metallothionein Levels and Acetylcholinesterase Activity of the Mussel *Mytilus edulis* and the Clam *Macoma balthica* from the Northern Baltic Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71:489-496.
- Leiniö, S. and K.K. Lehtonen. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 140:408-421.
- Livingstone, D. R., C. Nasci, M. Solé, L. Da, S. C. M. O'Hara, L. D. Peters, V. Fossato, A. N. Wootton and P. S. Goldfarb. 1997. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. *Aquatic Toxicology*, 38:205-224.
- Livingstone, D. R., M.A. Kirchin and A.Wiseman. 1989. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in mollusc. *Xenobiotica*,19:1041-1062.
- Loinetto, M. G., R. Caricato, M. E. M. Giodano, M.F. Pascariello, L. Marinisci and T. Schettino. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46:324-330,
- Lowe, D. M. and R. K. Pipe. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cell: an *in vitro* study. *Aquatic Toxicology*, 30:357-365.
- Lowe, D. M., N. M. Moore and B. M. Evans. 1992. Contaminant impact of interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Marine Ecology Progress Series*, 91:135-140.
- Lucas, A. 1996. *Bioenergetics of aquatic animals*. Taylor & Francis. USA. 169p.
- Mamaca, E., R. K. Bechmann, S. Torgrimsen, E. Aas, A. Bjørnstad, T. Baussant and S. L. Floch. 2005. The neutral red lysosomal retention assay and comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, 75:191-201.
- Mansuy, D. 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 121:5-14.
- Mao, Y., Y. Zhou, H. Yang and R. Wang. 2006. Seasonal variation in metabolism of cultured pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture*, 253:322-333.

- Marchand, M., D. Vas and E. K. Duursma. 1976. Levels of PCBs and DDTs in mussels from the N. W. Mediterranean. *Marine Bulletin Pollution*, 7(4):65-69.
- Marcus, J. M. and G. I.Scott. 1990. The use of sediment heavy metal bioavailability as a method of environmental hazard assessment. *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, 30:110-112.
- Marin, M. G., L. Pivotti, G. Campesan, M. Turchetto, and L. Tallandini. 1994. Effects and fate of sediment-sorbed linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Water Research*, 28(1):85-90.
- Marinovich, M., M. Guizzetti and C. L. Galli. 1994. Mixtures of benomyl, pirimiphos-methyl, dimethoate, diazinon and azinphos-methyl affect protein synthesis in HL-60 cells differently. *Toxicology*, 94:173-185.
- Martín, M., and E. Gutierrez-Galindo. 1989. Pesticides and PCBs in Oysters from Mazatlán, Sinaloa, México. *Marine Pollution Bulletin*, 20:469-472.
- Martín, M., G. Ichikawa, J. Goetzi, M. de los Reyes and M. D. Stephenson. 1984. Relationships between physiological stress and trace toxic substances in the bay mussel, *Mytilus edulis*, from San Francisco Bay, California. *Marine Environmental Research*, 11:91-110.
- Masilamoni, G., K. S. Jesudoss, K. Nandakumar, K.K. Satapathy, J. Azariah and K. V.K. Nair. 2002. Lethal and sub-lethal effects of chlorination on green mussel *Perna viridis* in the context of biofouling control in a power plant cooling water system. *Marine Environmental Research*, 53:65-76.
- Masilamoni, J. G., J. Azariah, K. Nandakumar, K. S. Jesudoss, K.K. Satapathy and K.V.K. Nair. 2001. Excretory products of green mussel *Perna viridis* L. and their implications on power plant operation. *Turkish Journal of Zoology*, 25:117-125.
- Mayzaud, P. and R. J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology Progress Series*, 45:289-302.
- Méndez ,G. E., M. Mexia, J. R. Ruelas y V. I. Alvarez. 1990. Niveles de plaguicidas organoclorados en agua del estero de Teacapan, Bahías de Mazatlán, Atlanta, Oahuia, Santa María, Sinaloa. *Res. VIII Cong. Nal. Oceanog.* 42.
- Moore, M.N., D. Lowe and A. Koehler. 2004. Biological effects of contaminant: measurements of lysosomal membrane stability. ICES. *Techniques in Marine Environmental Sciences*. 36:31.
- Moore, M. N., R. K. Koehn and B. L. Bayne. 1980. Leucine aminopeptidase (Aminopeptidase I), N-Acetyl- β -hexosaminidase and lysosomes in the mussel, *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. *Journal of Experimental Biology*, 214:239-249.
- Mora, P., D. Fournier and J.F. Narbonne. 1999a. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 122:353-361.
- Mora, P., X. Michel and J-F. Narbonne. 1999b. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7:253-260.

- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes y V. W. Rodwell. 1992. *Bioquímica de Harper*. El Manual Moderno. México, D. F. 740pp.
- Observatorio Meteorológico de Mazatlán. Comisión Nacional del Agua. *Estadística Climatológica* 1941-1995.
- Ojea, J., A. J. Pazos, D. Martínez, S. Nova, J. L. Sánchez and M. Abad. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, 238:451-468.
- Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon-monoxide binding pigment by liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 239:2379-2385.
- Orellana, B. M., y V. Guajardo T. 2004. Actividad del citocromo p450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*, 132 (1):85-94.
- Osuna-López, J. I., P. Ortega-Romero y F. Páez-Osuna. 1986. Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en los sedimentos del Puerto y antepuerto de Mazatlán. *Ciencias Marinas*, 12:35-45.
- Páez-Osuna, F., A. C. Ruiz-Fernández, A. V. Botello, G. Ponce-Vélez, J. I. Osuna-López, M. G. Frías-Espiricueta, G. López-López and H. M. Zazueta-Padilla. 2002. Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. *Marine Pollution Bulletin*, 44(11):1303-1308.
- Páez-Osuna, F., H. Bojorquez-Leyva and J. Ruelas-Inzuza. 1999. Regional variations of heavy metal concentrations in tissues of barnacles from the subtropical Pacific coast of Mexico. *Environmental International*, 25:674-654.
- Páez-Osuna, F., H. M. Zazueta-Padilla and J. I. Osuna-López. 1993. Biochemical composition of the oysters *Crassostrea iridescens* Hanley and *Crassostrea corteziensis* Hertlein in the Northwest coast of Mexico: seasonal changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170:1-9.
- Páez-Osuna, F., J. Montañón-Ley y Bojorquez-Leyva. 1990. Intercambio de agua, fósforo y material suspendido entre el sistema lagunar del puerto de Mazatlán y las aguas costeras adyacentes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 6:19-32.
- Páez-Osuna, F., R. Perez-Gonzalez, H. Izagarre-Fierro, M. Zazueta-Pafilla and L. Flores-Campana. 1995. Trace metal concentrations and their distribution in the lobster *Panulirus inflatus* (Bouvier, 1985) from the Mexican Pacific coast. *Environmental Pollution*, 90(2):163-170.
- Pataki, G. and J.P. Cahill. 1999. New York State Department of Environmental Conservation. Division of Fish, Wildlife and Marine Resources. *Technical Guidance for Screening Contaminated Sediments*. 39pp.
- Payne, J. F., A. Mathieu, W. Melvin and L.L. Francey. 1996. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trails in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32(2):225-231.

- Pellerin-Massicotte and R. Tremblay. 2000. Lysosomal Fragility as Cytological Biomarker. *In: Lagadic, L., T. Caquet, J-C. Amiard and F. Ramade. Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment.* Science Publishers. Inc. Enfield, New Hampshire, USA. pp 229-246.
- Peña-Llopis, S., M. D. Ferrando and J. B. Peña. 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere*, 47:485-497.
- Pereza- Vizcarra, R., 2003. Aspectos hidrográficos del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. *Memoria del Décimo Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar.* 23-25 de octubre de 2003. Boca de Río, Veracruz. DECyTM-SEP.
- Pereza-Vizcarra, R., 2001. El tiempo de recambio de agua del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. *Memoria del Octavo Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar*, 14-16 de noviembre de 2001, Manzanillo, Colima. DECyTM-SEP.
- Pereza-Vizcarra, R., 2005. Espacios Oceánicos y Costeros de Sinaloa. Tópicos Oceanográficos. Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa, México.
- Petrovic, S., B. Ozretic, M. Krajnovic-Ozretic and D. Bobinac. 2001. Lysosomal membrane stability and metallothioneines in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* lam) as biomarkers in a field study. *Marine Pollution Bulletin*, 42:1373-1378.
- Pfeifer, S., D. Schiedek and J. W. Dippner. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320:93-103.
- Pipe, R. K., J. A. Coles and S. R. Farley. 1995. Assay for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. *Techniques in Fish Immunology*, 4:93-100.
- Pohl, J. R., and J. R. Fouts. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical Biochemistry*, 107:150-155.
- Pope, C., S. Karanth and J. Liu. 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology*, 19:433-446.
- Prior, R., and G. Cao. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology y Medicine*, 27 (11/12):1173-1181.
- Pritchard, D.W. 1952. Estuarine hidrography. *In: Landsberg, H.E. (Eds). Advances in Geophysics.* Academic Press, New York, Vol 1, pp 243-280.
- Racotta, I. S., J. L. Ramirez, S. Avila and A. M. Ibarra. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture*, 163:111-122.
- Rajagopal, S., G. Velde, M. Gaag and H. A. Jenner. 2005. Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. *Marine Pollution Bulletin*, 50:20-29.
- Rand, G. M., and S. R. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications.* Hemisphere publishing corporation. New York. 666pp

- Readman, J. W., L. L. Week K., L. D. Mee, J. Bartocci, G. Nilve, J. A. Rodriguez-Solano and F. Gonzalez-Farias. 1992. Persistent organophosphorus pesticides in tropical marine environments. *Marine Bulletin Pollution*, 24:398-402.
- Reeve, M. R., J.C. Gamble and M. A. Walte. 1977. Experimental observations on the effects of copper on copepods and other zooplankton: controlled ecosystem pollution experiments. *Bulletin of Marine Science*, 27:92-104.
- Relaxans, J. C., L. Lerat, H. Etcheber. 1988. Une stratégies d'étude des effets de quelques polluants (Cd, Zn, Ba,P) sur la respiration de communautés benthiques mainteneus *in vitro*. *Océanis Paris*, 14:411-421.
- Ricciardi, F., A. Binelli and A. Provini. 2006. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebre mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy) Ecotoxicology and Environmental Safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3):406-412.
- Rickwood, C. J. and T. S. Galloway. 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology*, 67:45-56.
- Robles, E. G. 1985. *Productividad primaria del fitoplancton y distribución tempo-espacial de pigmentos fotosintéticos (clorofila y feopigmentos) en el Estero de Urías, durante un ciclo anual (septiembre 1982-agosto 1983)*. Esc. Biología Universidad Autónoma de Guadalajara, 76pp.
- Rodier, J. 1981. *Análisis de las aguas*. Omega. Barcelona. 504pp.
- Roméo, M., P. Hoarau, G. Garello, M. Gnassia-Barelli and J. P. Girard. 2003. Mussel transplanted and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122:369-378.
- Rosales, M. T. L. and R. L. Escalona. 1983. Organochlorine residues in organisms of two different lagoon of Northwest Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 30:456-463.
- Roy, S., P. Lindström-Sepa and O. Hänninen. 1996. *Integrative approach to aquatic environment biomonitoring*. In: Richardson, M. (Ed). *Environmental Xenobiotics*. Taylor and Francis. London. pp123-142.
- Ruelas, J. 2001. *Cocentración y distribución de metales pesados en tejidos de organismos representativos de la flora y fauna del bajo Golfo de California y áreas adyacentes*. Tesis Doctorado en Ciencias del Mar y Limnología (Química Acuática). UNAM.
- Ruelas-Inzunza, J. R., and F. Páez-Osuna. 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder organisms in a subtropical coast environment (Southeast Gulf of California) *Environmental Pollution*, 107:437-444.
- Schiedek, D., K. Broeg, J. Baršienė, K. K. Lehtonen, J. Gercken, S. Pfeifer, H. Vuontisjärvi, P. J. Vuorinen, V. Dedonyte, A. Koehler, L. Balk and R. Schneider. 2006. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53:387-405.

- Schlenk, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 39 (1-12):48-53.
- Scotti, P. D., S. C. Dearing, D. R. Greenwood and R. D. Newcomb. 2001. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 128:767-779.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2006.
- Shepard, J. L. and B. P. Bradley. 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Marine Environmental Research*, 50:457-463.
- Shuhong, W., H. Huasheng and W. Xinhong. 2005. Bioenergetic responses in green lipped mussels (*Perna viridis*) as indicator of pollution stress in Xiamen coastal waters, China. *Marine Pollution Bulletin*, 51:738-743.
- SIAP. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. 2006.
- Simpson, J. W., K. Allen and J. Awapana. 1959. Free amino acids in some aquatic invertebrates. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 117:371-378.
- Snyder, M. 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*, 48:529-547.
- Solé, M., and D. R. Livingstone. 2005. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and "NADPH-independent benzo[α]pyrene hydroxylase" activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, 141:20-30.
- Somero, G. N. and R. D. Bowlus. 1983. Osmolytes and metabolic end products of molluscs: the design of compatible solute systems. In: Wilbur K.M. (Ed). *The mollusca*. Vol. 2. Academic Press. New York. pp 77-100.
- Soreq, H., and S. Seidman. 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Neuroscience*, 2:295-303.
- Soto-Jiménez, M. F., and F. Páez-Osuna. 2001. Distribution and normalization of heavy metal concentration in mangrove and lagoon sediments from Mazatlan Harbor (SE Gulf of California). *Est. Coast. Shelf Sci*, 53:259-274.
- Soto-Jiménez, M., F. Páez-Osuna and F. Morales-Hernández. 2001. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridescens*) and sediments from the discharge zone of the submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (southeast Gulf of California): chemical fractions and bioaccumulation factors. *Environmental Pollution*, 114:357-370.
- Sreedevi, P., B. Sivaramakrishna, A. Suresh and K. Radhakrishnaiah. 1992. Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* L. *Environmental Pollution*, 77:59-63.
- Srivatsan, M. 1999. Effects of organophosphates on cholinesterase activity and neurite regeneration in *Aplysia*. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120:371-378.

- Stuardo, J. y M. Villarreal. 1976. Aspectos ecológicos y distribución de los moluscos en las lagunas costeras de Guerrero. México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 3:65-92.
- Suresh, K., and A. Mohandas. 1993. Haemolymph protein levels in copper-stressed bivalves. *Science of the Total Environment*, 134 (1):631-639.
- Szefer, P., J. Geldon, A. A. Ali, F. Paéz-Osuna, A. C. Ruiz-Fernandez, and S. R. Galvan. 1998. Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytella strigata* and other benthic organisms from Mazatlan harbour, mangrove lagoon of the northwest coast of Mexico. *Environment International*, 24(3):359-374.
- Tavares, T. M., M. Beretta and M. C. Costa. 1999. Ratio of DDT/DDE in the all saints bay, Brazil and its use in environmental management. *Chemosphere*, 38(6):1445-1452
- Tedengren, M. and N. Kautsky. 1986. Comparative study of the physiology and its probable effects on size in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from the North Sea and the northern Baltic proper. *Ophelia*, 25:147-155.
- Tedengren, M. and N. Kautsky. 1987. Comparative stress response to diesel oil and salinity changes of *Mytilus edulis* from the North and Baltic Seas. *Ophelia*, 28:1-9.
- Tejedor, 2006. http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/Guion-EROD.pdf
- Thompson, M. H. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8:369-384.
- Thompson, G.B. 1980. Distribution and population dynamics of the limpet *Patella vulgata*. L. in Bantry Bay. *Journal of Experimental Biology and Ecology*. 45:173-127.
- Toro, B., J.M. Navarro and H. Palma-Fleming. 2003. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: Mytilidae). *Aquatic Toxicology*, 63:257-269.
- Torres, M. A., C. T. Pires, C. Gásoaru, M. B. Masutti, C. M. Neves, R. Curi-Pedrosa, E. Alves, P. Di and D. Wilhelm. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guayanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 44:923-932.
- UNEP/IAEA, 1982. Determination of DDT's, PCB's and other hydrocarbons in marine sediments by gas liquid chromatography. Reference methods for marine pollution studies, No 17.
- UNEP-FAO/IOC/IAEA, 1986. Determination of DDT's, PCB's in selected marine organisms by packed column gas chromatography. Reference Methods for Marine Pollution Studies, No 14.
- Ustach, J. F. 1979. Effects of sublethal concentration on the copepod *Nitocra affinis*. *Estuaries*, 2:273-276.
- Vander der Oost, R., A. Goksoyr, M. Celander, H. Heida and N.P.E. Vermeulen. 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel. (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*, 36:198-222.

- Villalba, L. A. 1986. Descripción general del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, Universidad Autónoma de Sinaloa. *Ciencias de Mar*, 8:32-37.
- Villanueva, J. P., F. P. Carvalho, S. W. Fowler and C. Cattini. 1999. Levels and trends of PCBs, chlorinated pesticides and petroleum hydrocarbons in mussels from the NW Mediterranean coast: comparison of concentrations in 1973/1974, and 1988/1989. *Science of the Total Environment*, 237:/238:57-65.
- Villarroel, M. M. 1978. Adaptaciones funcionales y relaciones ecológicas de los macroinvertebrados bentónicos, especialmente moluscos, en tres lagunas costeras de Guerrero, México. Tesis Doctorado. Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 189 pp.
- Villarroel, M., y J. Stuardo. 1995. Morfología del estomago y partes blandas en *Mytella strigata* (Hanley, 1843) (Bivalvia, Mytilidae). *Malacología*, 36(1-2):1-14.
- Vogue, P.A., E.A. Kerle and J.J. Jenkins. 1994. OSU. Extension Pesticide Properties Database. <http://npic.orst.edu/ppdmove.htm>.
- Weber. J.B., G. G. Wilkerson and C. F. Reinhardt. 2004. Calculation pesticide sorption coefficients (K_d) using selected soil properties. *Chemosphere*, 55:157-166.
- Widdows, J and P. Donkin. 1992. *Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects*. In: Gosling E. (Ed). *Developments in aquaculture and fisheries science. Vol. 25. The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier. Amsterdam
- Widdows J. 1978. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *Journal Marine Biology. Ass. UK*. 58: 125-142.
- Widdows J. 1985. Physiological responses to pollution. *Marine Pollution Bulletin*. 16(4):129-134.
- Widdows J. and D. Johnson. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*. 46:113-121.
- Widdows J., D. K. Phelps and W. Galloway. 1980-1981. Measurement of physiological condition of mussels transplanted along a pollution gradient in Narragansett Bay. *Marine Environmental Research*. 4:181-194.
- Widdows J., K. A. Burns, N. R. Menon, D. S. Page and S. Soria. 1990. Measurement of physiological energetics (scope for growth) and chemical contaminants in mussels (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. *Mar. Biol. Ecol.* 138:99-117
- Winters D K, Cederbaum AI. 1993. *Biochemistry of Cytochrome p450* (pp407-420). In: Tavaloni y P D Berk (Eds) *Hepatic and bile secretion: Physiology and pathophysiology*. Raven Press, New York.
- Wright P. A. 1995. Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. *The Journal of Experimental Biology*. 198: 273- 281.

Yañez-Arancibia, A. 1986. *Ecología de la Zona Costera.*, A. G. T., Editor, S. A. D.F. México. pp189

Young D. R. and T.C. Heesen 1974. Inputs of chlorinated hydrocarbons. Southern California coastal water research project. Chemistry programme. *Annual Report*, El Segundo, California, 97-99.

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

Zuñiga L. S. R. 2005. *Manual de protocolos de métodos bioquímicos y fisiológicos implementados en estudios ecotoxicológicos*. En prensa.