

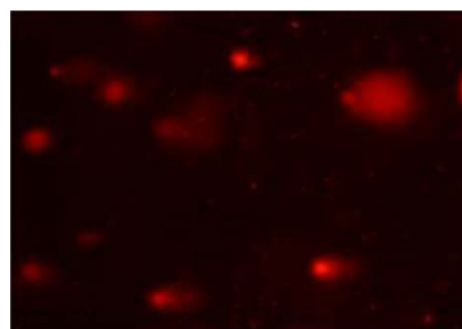
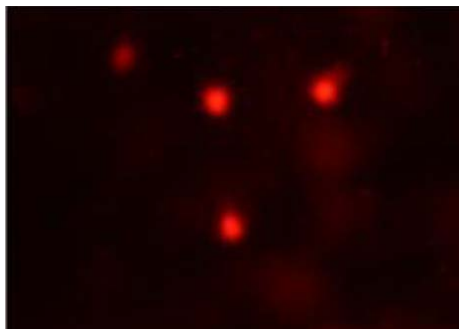
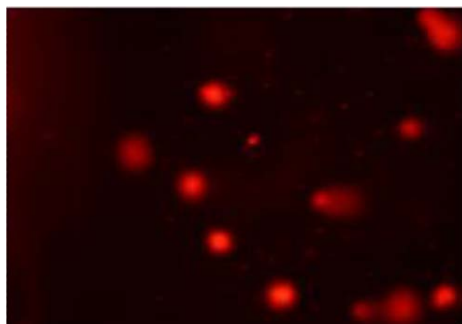
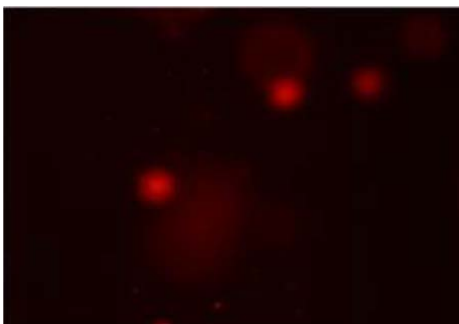
ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA BASE ECOTOXICOLÓGICA DE LA ZONA COSTERA DEL GOLFO DE MÉXICO. FASE I

Informe Final



2011

Coordinación General de Adaptación al cambio climático



Coordinado por:

Coordinación General de Adaptación al
Cambio Climático

Elaborado por:

Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa

Responsable:

Dra. Patricia Ramírez Romero

Boulevard Adolfo Ruiz Cortines 4209, 2° piso. Col. Jardines
en la Montaña, Del. Tlalpan C.p. 4210 Ciudad de México
Tel. +52 (55) 54246400.

www.inecc.gob.mx

INFORME FINAL

ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA BASE ECOTOXICOLÓGICA DE LA ZONA COSTERA DEL GOLFO DE MÉXICO

Dra. Patricia Ramírez Romero

Profesora Investigadora

Noviembre, 2011

PARTICIPANTES

Dra. Patricia Ramírez Romero, UAMI
Dra. Xóchitl Guzmán García, UAMI
Dra. María del Carmen Guzmán Martínez, UAMI/CENICA
Biol. Irma Hernández Calderas, UAMI
Hidrobiol. José Guillermo Trejo Ramírez, UAMI
P. Hidrobiol. Emilio Torres Padilla, UAMI
P. Ing. Amb. Laura Elizabeth Elizalde, TESOEM
P. Hidrobiol. Ana Laura Espejel Piña, UAMI
P. Ing. Amb. Isidro Arellano López, UAMI
Biol. Ramírez Trejo. Verónica, UAMI
Evelyn Sierra Hernández, Estudiante UAMI
Mirelle Dávila G., Estudiante UAMI
Pedro Román, Zepeda, Estudiante UAMI
Saúl López, Vite, Estudiante UAMI
Roberto Juárez Jerónimo, Estudiante UAMI
Meztli Matadamas Guzmán, Estudiante UAMI
Felipe. Muñoz Gutiérrez, Estudiante UAMI.

ASESORES

Dr. Miguel Betancourt Rule
Dr. José Luis Gómez Olivares
M. en C. Ángeles Aguilar Santamaría
Biól. Exp. Guillermina Palomec Sánchez

CONTENIDO

- I. Resumen ejecutivo
- II. Executive Summary
 1. Introducción
 2. Antecedentes
 3. Objetivos
 4. Metodología
 5. Descripción de los sitios de muestreo
 6. Resultados y Discusión
 7. Conclusiones
 8. Recomendaciones
 9. Referencias
 10. Anexos

RESUMEN EJECUTIVO.

El petróleo es uno de los recursos más importantes de nuestro país debido a que se trata de un producto indispensable para la dinámica económica, sin embargo las actividades asociadas a este recurso tienen el riesgo inherente de provocar derrames y con ellos una serie de impactos económicos y ecológicos de gran importancia. México no ha sido ajeno a estos accidentes y recientemente enfrentó la amenaza del peor accidente ocurrido a la fecha, el derrame de la plataforma petrolera Horizon de la compañía British Petroleum, ubicada en el Golfo de México frente a las Costas de Luisiana. Este evento duró aproximadamente tres meses durante los cuales se liberaron al ambiente 4.9 millones de barriles de petróleo y 4,200,000 litros de dispersantes químicos, los cuales fueron aplicados a una profundidad de 1500 m. Ante este escenario, los recursos marinos y costeros del Golfo de México fueron puestos en riesgo, así fue evidente para el gobierno Mexicano que es necesario contar con una línea base de información, química y biológica que le permita ante estas situaciones tomar las medidas necesarias para proteger sus recursos y para evaluar los daños debidos en caso de otro accidente. Por lo anterior el objetivo de este proyecto fue desarrollar una línea base ecotoxicológica para la zona costera del Golfo de México, para ello se seleccionó un grupo de sitios de muestreo en los que se midieron los parámetros fisicoquímicos del agua y se tomaron muestras de agua y sedimentos para evaluar su toxicidad por medio del sistema Microtox®. Asimismo, en cinco lagunas costeras se tomaron muestras del ostión *Crassostrea virginica* para evaluar por medio de biomarcadores (estabilidad lisosomal, actividad de la enzima Acetilcolinesterasa, ensayo cometa y evaluaciones histopatológicas) la salud de las poblaciones de estos organismos. Los parámetros físico-químicos del agua mostraron el carácter eutrófico de las lagunas con valores de fósforo total, nitratos, amonio por encima de los criterios de calidad para aguas marinas y salobres. Un porcentaje bajo de las muestras de agua y sedimentos presentaron toxicidad por Microtox®, lo que demostró que en el momento del muestreo la presencia de agentes tóxicos en las lagunas no fue suficientemente alta para causar toxicidad aguda. Sin embargo, los biomarcadores indicaron la presencia de efectos subletales. De acuerdo con los resultados de la estabilidad lisosomal, y aunque las diferencias no son significativas estadísticamente, la laguna Carmen Machona fue el ecosistema más deteriorado, seguido de Tamiahua y Pueblo Viejo, La evaluación de la acetil-colinesterasa (AChE) fue aún más sensible, al permitir la observación de la mejora en la condición de los organismos luego de pasar por un período de depuración, ya que en todos los casos los ostiones del grupo control tuvieron niveles más altos de AChE; aún más, las proteínas fuertemente unidas a la membrana demostraron este efecto con mayor precisión. Las pruebas con el ensayo cometa mostraron que todos los organismos tienen un daño basal y que este puede disminuir con la depuración. Así también, que los organismos de Laguna de Términos fueron los que presentaron más rupturas en su ADN y los de Alvarado y Carmen Machona menos. En cuanto a las evaluaciones histopatológicas, se pudo observar que en todas las lagunas muestreadas hay organismos en diversas condiciones de salud. Cuando se observó deterioro, este

se presentó en el canal alimentario con prevalencia a la fase de desintegración, absorción y regeneración. Las respuestas tisulares más relevantes fueron: secreciones, activación de células cafés y procesos inflamatorios. Los organismos de la laguna Carmen Machona presentaron el porcentaje más bajo de anormalidades (1%) como ausencia de epitelio o deformidades. Todos los biomarcadores demostraron ser útiles para la evaluación de la salud de los ostiones, sin embargo es necesario evaluarlos en épocas climáticas complementaria, es decir para aquellos que fueron muestreados en secas, hace falta la evaluación en lluvias y viceversa. De esta manera se contará con un perfil más completo de su variabilidad y esta información será útil en caso de ocurrir un derrame de petróleo para poder evaluar el daño que este pudiera causar. Asimismo, se recomienda establecer un programa de monitoreo para el Golfo de México en el que se incluyan los biomarcadores utilizados y algunos otros que se ocupan en otros sistemas de monitoreo a nivel internacional en zonas de producción y transporte de petróleo.

EXECUTIVE SUMMARY.

One of the most economically important natural resources of Mexico is crude oil; however the activities associated to its exploitation have the inherent risk of spills and with them of serious economic and ecological impacts. Recently Mexico faced the threat of the worst accident occurred until today, the Horizon Platform oil spill, located in the Gulf of Mexico in front of the coasts of Louisiana. This event lasted approximately three months, 4.9 million barrels of oil and 4,200,000 liters of dispersants entered the environment. In view of this scenario, the marine and coastal resources of the Gulf of Mexico were at risk, which made evident to the Mexican Government the need to have base line chemical and biological information, that allow in case of these situations to protect our resources and to evaluate damage in case of accidents like this. Because of all these the objective of this project was to develop an ecotoxicological baseline for the coastal zone of the Gulf of Mexico. A group of sites was selected to sample water and sediments to measure physical-chemical parameters and toxicity with Microtox®. Furthermore, oysters (*Crassostrea virginica*) from five coastal lagoons were sampled to evaluate through biomarkers (lysosomal stability, acetyl-cholinesterase activity, comet assay and histopathological evaluations) the health of their populations. The physico-chemical parameters showed the eutrophic character of the lagoons with values of total phosphorus, nitrates and ammonia above the water quality criteria for marine and brackish waters. A low percentage of water and sediment samples presented toxicity with Microtox®, which demonstrated that at the moment of the sampling the presence of toxic agents in the lagoons was not enough to cause acute toxicity. However, the biomarkers used indicated the presence of sublethal effects. Lysosomal stability results showed that the Carmen Machona Lagoon was the most deteriorated ecosystem followed by Tamiahua and Pueblo Viejo, however their differences were not statically significant. The evaluations of acetyl-cholinesterase activity (AChE) were even more sensitive, allowing the observation of the improvement of the organisms condition after a depuration period, since in every case the oysters in the control group presented higher AChE activity levels; moreover, the proteins tightly bind to the membrane showed this effect even with more precision. The comet assay showed that all organisms have basal damage and that this can decrease with depuration. The oyster of Terminos Lagoon presented the highest number of DNA breaks, and those from Alvarado and Carmen Machona the least. With respect to the histopathological evaluations, these showed that in all the lagoons there are organisms in different health conditions. When deterioration was observed, this occurred in the food channel with prevalence to the disintegration phase, absorption and regeneration. The most relevant tissue responses were: secretions, brown cells activation and inflammatory processes. Carmen Machona organisms presented the lowest percentage of abnormalities (1%) like absence of epithelium and deformities. All the biomarkers were useful to evaluate the health status of the oysters, however it is necessary to evaluate them in climatic complementary periods that is, for those organisms sampled in the dry season, there should be a sampling in the rainy season and viceversa. In this way the variability profile will be

better known and this information will be useful in case of an oil spill to evaluate the damage that this event could cause. Also, it is recommended to establish a monitoring program for the Gulf of Mexico that includes the biomarkers used and others used by other monitoring systems at international level.

1. INTRODUCCION

El petróleo es un producto indispensable para la dinámica económica y el desarrollo de la industria en todo el mundo; de él se obtienen una infinidad de productos, pero aún más importante, la energía necesaria para fabricar y mover bienes y servicios, así como personas. Debido a lo anterior, el petróleo es uno de los recursos más importantes de nuestro país, de él se generan ingresos que han ayudado a mantener a la federación desde la nacionalización de la industria petrolera.

Las actividades asociadas a la explotación, transformación y transporte de productos del petróleo tienen el riesgo inherente de provocar derrames y con ellos una serie de impactos económicos y ecológicos de gran importancia. México no ha sido ajeno a estos accidentes y en el 1977 tuvo que enfrentar el derrame del Pozo Ixtoc, el cual liberó al ambiente 3.3 millones de barriles de petróleo, en un período de 280 días, frente a las costas de Ciudad del Carmen. Desde entonces Petróleos Mexicanos cuenta con planes de contingencia para este tipo de eventos. Sin embargo, recientemente México se ha enfrentado a la posibilidad de sufrir impactos ecológicos y económicos derivados de un derrame de petróleo ocurrido fuera de su territorio.

El 20 de Abril del 2010 estalló la plataforma petrolera Horizon de la compañía British Petroleum, ubicada en el Golfo de México frente a las Costas de Luisiana; en ella que se extraía petróleo a 1500 m de profundidad por lo que controlar el derrame de crudo fue muy difícil. De hecho los esfuerzos para controlar el derrame no tuvieron éxito sino hasta después de 3 meses (15 de Julio), durante este largo tiempo entraron al ambiente acuático 4.9 millones de barriles de petróleo o 780 mil m³, cantidad que convierte a este derrame en el peor que hasta ahora ha ocurrido.

Entre las estrategias seguidas para tratar de evitar al máximo los efectos ecológicos del derrame, se decidió aplicar 4,200,000 litros de dispersantes químicos directamente en la salida del derrame a una profundidad de 1500 m, los

cuales dispersaron aproximadamente 409,000 barriles de petróleo. Esta medida no tiene precedentes por lo que sus efectos son muy inciertos, ya que las partículas formadas al dispersarse el petróleo se ubicarán a distintas profundidades, desde donde se dispersaran dependiendo de sus características físicas (tamaño y densidad) y de las corrientes. Su degradación es incierta, aunque favorecida por el tamaño de las partículas que se espera se hayan formado.

Ante este escenario, los recursos marinos y costeros del Golfo de México fueron puestos en riesgo, así fue evidente para el gobierno Mexicano que es necesario contar con una línea base de información, química y biológica que le permita ante estas situaciones tomar las medidas necesarias para proteger sus recursos o para, en el caso más extremo, demostrar que han ocurrido cambios y daños debidos a el derrame de petróleo.

2. ANTECEDENTES

Después que ocurre un derrame de petróleo, el monitoreo y evaluación de su impacto comúnmente se basa en medir químicamente los distintos hidrocarburos en los diferentes compartimentos ambientales (agua, sedimentos), incluyendo los organismos. Sin embargo, estas mediciones no pueden dar información de los efectos, la biodisponibilidad y la bioactividad de los compuestos, por lo que se hace necesario utilizar métodos ecotoxicológicos como complemento de los análisis químicos. Así, la incorporación de un grupo de bioensayos y biomarcadores de exposición y efecto pueden proporcionar una visión de la causalidad de los efectos adversos que se pudieran observar (Martínez-Gómez, 2010).

En los últimos años, diversos estudios de derrames de petróleo, en especial en Europa, han demostrado claramente el potencial y la utilidad de técnicas para la evaluación de los efectos biológicos, en la evaluación del impacto de estos sucesos, particularmente para efectos a largo plazo y crónicos, en niveles de

organización biológica bajos en organismos y para monitorear la efectividad de procesos de biorremediación (Laubiart, 2004).

De la experiencia obtenida de derrames de petróleo previos, es claro que la evaluación del impacto producido por estos eventos, a través de técnicas ecotoxicológicas, ha sido más exitosa en aquellas áreas donde se contaba con información química y biológica previa al evento. Por ello un punto crítico en el proceso de análisis del riesgo y los impactos de un derrame de petróleo, es la existencia de información ecotoxicológica del área de estudio antes de un derrame.

MICROTOX.

El analizador Microtox® (SDIX) utiliza la bacteria marina fosforescente *Vibrio fischeri* para evaluar la toxicidad de muestras ambientales, sustancias puras y mezclas de estas. Una vez que la bacteria liofilizada es rehidratada, ésta emite luz que puede ser medida con un fotómetro. Cuando un tóxico potencial es agregado a la bacteria rehidratada, el nivel de luminiscencia, con respecto a un blanco, disminuye en proporción directa a la concentración del tóxico. Durante el desarrollo de la prueba, la bacteria es expuesta a cuatro concentraciones del tóxico, el cual ha sido ajustado osmóticamente a 2% Cloruro de Sodio. Después de un período de exposición se mide la producción de luz de cada dilución y se comprara con la del blanco. Con esta información se calcula el porcentaje de concentración de la muestra que produce un porcentaje determinado de disminución de la luz, usualmente el 50%. Esta concentración es conocida como Concentración Efectiva o CE_{50} (Eisman, *et al.*, 1991; Onoratti *et al.*, 2004).

BIOMARCADORES.

El término “biomarcador” se utiliza generalmente en un sentido amplio para incluir a casi cualquier medición que refleja la interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, que puede ser químico, físico o biológico. Un biomarcador es definido como un cambio en una respuesta biológica (cambios a nivel molecular, celular y/o fisiológico) la cual se puede relacionar con exposición a sustancias

tóxicas. Wijngaarden *et al.*, (1996) redefinieron los términos “biomarcador”, “bioindicador”, e “indicador ecológico” al vincularlos con los diferentes niveles de organización biológica. Ellos consideran un biomarcador como cualquier respuesta biológica en un nivel subindividual, medido en un organismo o en sus productos (orina, heces, pelo, plumas, entre otros) que puede indicar una desviación de su estado normal y que no puede ser detectada en un organismo intacto.

Un bioindicador es definido como un organismo que da información de las condiciones ambientales de su hábitat por presencia o ausencia de algún agente tóxico y por su comportamiento. Un indicador ecológico es un parámetro de los ecosistemas, que describe la estructura y funcionamiento de los ecosistemas.

De acuerdo con la NRC (National Research Council, 1993) y Varona, (1998), los biomarcadores pueden ser divididos en tres clases:

- a) Biomarcadores de exposición: estos abarcan la detección y la medida de sustancias exógenas o sus metabolitos o los productos de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula blanco que es medida con el comportamiento de un organismo.
- b) Biomarcadores de efecto: incluye medidas bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones con tejidos o cuerpos fluidos de un organismo que puede ser reconocido o asociado con una salud estable, discapacidad o enfermedad.
- c) Biomarcadores de susceptibilidad: indica la habilidad inherente o adquirida de un organismo para responder a los cambios de exposición a un xenobiótico específico, incluyendo factores y cambios genéticos en receptores, los cuales alteran la susceptibilidad de un organismo que está expuesto.

Los biomarcadores de exposición pueden ser usados para confirmar y evaluar la exposición individual o de una población a una sustancia en particular. Los biomarcadores de efecto pueden ser usados para documentar alteraciones preclínicas o efectos adversos a la salud debido a una exposición externa y a la absorción de un químico. Los biomarcadores de susceptibilidad ayudan a

identificar variaciones en el grado de respuesta a la exposición de un toxico observada entre diferentes individuos.

Estabilidad lisosomal. La función principal de los lisosomas es la digestión intracelular o extracelular, se distinguen de otros orgánulos por su morfología y por las funciones que desempeñan ya que digieren alimentos y otros materiales incorporados por endocitosis, digieren partes de la célula (autofagia) y además digieren material extracelular por medio de enzimas; también tienen un papel importante en el sistema de defensa contra muchos agentes ambientales (químicos y biológicos), por ejemplo, intervienen en la reproducción de células de reparación y la respuesta inmune al estrés ambiental (Camus et al, 2000;. Hauton *et al*, 1998), producido por agentes químicos (Fernley *et.al*, 2000;. Nasci *et.al*, 1998; Lowe *et.al*, 1995a) y metales (Shepard y Bradley, 2000). Domouhtsidou y Dimitriadis (2001) demostraron que la alteración lisosomal en la hemolinfa de los mejillones, *Mytilus galloprovincialis* podría ser utilizado como biomarcador de estrés ambiental. Además, Hauton *et al.*, (1998) demostraron que el tiempo de retención del colorante rojo neutro (NRR) de los lisosomas en los hemocitos de *Ostrea edulis* era afectada por la variaciones en la salinidad y la temperatura del agua, estas variaciones pueden provocar cambios estructurales en la membrana lisosomal que posteriormente causan la muerte del organismo (Schneider *et.al*, 1984).

Durante la respuesta lisosomal al estrés se pueden observar cambios en los componentes lisosomales, así como en los fenómenos de fusión, y finalmente en la permeabilidad de la membrana (Hawkins, 1980). Para evaluar el efecto de la exposición a contaminantes sobre los lisosomas se ha empleado la técnica llamada Retención de Rojo Neutro (NRR) (Lowe y Pipe, 1994;. Lowe *et al*, 1995a, b), de temporada y los cambios ambientales asociados con la reproducción ciclo, temperatura, exposición al aire y la disponibilidad de alimentos (Harding *et al.*, 2004b), y perturbaciones mecánicas relacionados con las actividades de procesamiento post-cosecha y condiciones de almacenamiento (Smith *et al.*, 2004a). NRR aplicaciones de ensayo en las ostras han revelado que la estabilidad

de la membrana lisosomal se asocia con los cambios de temperatura del agua (Hauton et al, 1998;.. Zhang et al, 2006), exposición al aire (Zhang *et al.*, 2006), hiposalinidad (Hauton *et al.*, 1998), desove (Cho y Jeong, 2005), la inoculación de bacterias (Hauton *et al.*, 2001), y los contaminantes ambientales (Butler y Roesijadi, 2001; Ringwood et al, 1999, 2002).

Acetilcolinesterasa (AChE). La acetilcolinesterasa es una esterasa que hidroliza a la acetilcolina, neurotransmisor en muchas sinapsis, especialmente en las placas neuromotoras. Está situada en las hendiduras sinápticas e hidroliza a la acetilcolina después de que ésta realice su función de neurotransmisión (Soreq, 2001), permitiendo así que las sinapsis colinérgicas transmitan los impulsos nerviosos una vez más. La reacción catalizada es la hidrólisis de la acetilcolina en dos productos que son; colina y acetato (Sancho, 2008).

La AChE es una esterasa tipo B y tiene un resto de SERín-proteasa (SER) en el centro activo y tiene un mecanismo de acción catalítica del tipo "catálisis covalente", con la generación de un intermediario covalente. Las colinesterasas, pueden ser de dos tipos; la colinesterasa verdadera, colinesterasa eritrocitaria, específica o de tipo e, que se encuentra unida a las membranas de las neuronas, en las sinapsis ganglionares y la pseudocolinesterasa o colinesterasa inespecífica, también denominada butirilcolinesterasa, colinesterasa plasmática o de tipo s. (Sancho, 2008). Ambos compuestos catalizan la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina sobrante en el espacio sináptico en colina y ácido acético, reacción necesaria para permitir que la neurona colinérgica retorne a su estado de reposo luego de la activación, evitando así una transmisión excesiva de acetilcolina, que produciría una sobre estimulación del músculo y, como consecuencia, debilidad y cansancio. La diferencia entre los dos tipos de colinesterasa está en sus respectivas preferencias por substratos: la primera hidroliza acetilcolina más rápido; la segunda hidroliza butirilcolina. (Sancho, 2008).

La AChE es un importante biomarcador para la detección de exposición a contaminantes o agentes tóxicos cuyo modo de acción es la neurotoxicidad. Este biomarcador ha sido empleado ampliamente para evaluar la exposición y medir los

efectos de plaguicidas organofosforados y carbamatos (Levi, 1987), así como también de hidrocarburos del petróleo (Bocquené *et al.*, 2004). Es un biomarcador recomendado para ser evaluado en bivalvos (Bocquené y Galgani (1998), como los ostiones, expuestos a las diferentes sustancias químicas que componen el petróleo y otras sustancias (Payne *et al.* 1996; Stien *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999).

Ensayo Cometa. La electroforesis unicelular o ensayo cometa es una técnica segura, sensible y rápida para medir el daño en la cadena de ADN inducida en las células por agentes físicos y químicos (Kim *et al.*, 2002), esta ha sido ampliamente empleada en estudios con mamíferos incluyendo el hombre. El ensayo cometa en la versión alcalina propuesta por Singh *et al.*, (1988) y Olive *et al.*, (1990), es una técnica usada en diversos trabajos para detectar una gran variedad de daños en la cadena de ADN como son: rompimientos de la cadena de ADN, sitios alcalilábiles y sitios de reparación entre otros.

El ensayo cometa es un método de los más sensibles para detectar daño en el ADN y se distingue por ser simple, rápido y efectivo para muestras pequeñas y se aplica a cualquier tipo de célula eucariota. Esta técnica se ha empleado en organismos acuáticos, principalmente en moluscos como ostras, mejillones, ostiones y en crustáceos; por ejemplo se ha evaluado el daño en embriones del cangrejo azul *Callinectes sapidus*, y del camarón de pastos *Palaemonetes pugio* (Steinert *et al.*, 1998; Mitchelmore *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Lee y Kim, 2002; Pruski y Dixon 2002; Hook y Lee 2004, Lee y Steinert, 2003).

Evaluaciones histopatológicas. La histopatología es una ciencia descriptiva que valora las lesiones, siendo un método muy útil y rápido para detectar los efectos de los contaminantes, especialmente las exposiciones crónicas en varios tejidos y órganos (Bernet *et al.*, 1999). Algunos órganos y tejidos que pueden ser más sensibles a ciertos contaminantes, así en el ostión *Crasostrea virginica* se ha reportado que la composición de la glándula digestiva puede indicar el estado fisiológico de los organismos, por lo que es muy recomendable su análisis para evaluar el estado de salud de un ambiente. (Guzmán-García *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar una línea base ecotoxicológica para la zona costera del Golfo de México, que permita la evaluación del impacto ecológico de la entrada accidental de petróleo.

Objetivos Específicos

Seleccionar una serie de sitios para el muestreo de agua, sedimentos y organismos con base en su importancia ecológica, económica y su vulnerabilidad a los derrames de petróleo.

Evaluar la toxicidad de las muestras de agua y sedimento utilizando la prueba de Microtox (*Vibrio fischeri*)

Evaluar una serie de biomarcadores en peces y/o moluscos colectados en los sitios seleccionados (estabilidad de la membrana lisosomal, inhibición de la acetilcolinesterasa, daño al ADN, etc.).

Llevar a cabo un análisis histopatológico, con énfasis en el hígado o glándula digestiva, de los mismos organismos evaluados para biomarcadores.

Determinar la relación entre la presencia de HAPs y los diferentes parámetros biológicos obtenidos.

4. METODOLOGÍA

Selección de sitios de muestreo

Se llevó a cabo un análisis de los sitios de muestreo propuestos por el grupo de Ecosistemas Costeros de la UAMI, el Instituto Mexicano del Petróleo y la CONAGUA, para seleccionar aquellos que por sus características fueran adecuados para la toma de muestras de agua, sedimentos y organismos.

Muestreo de agua y sedimentos

En cada punto de muestreo se observaron las características del sitio y se anotaron en la hoja de campo la fecha, hora, la ubicación geográfica obtenida de un GPS Garmin Colorado, así como las condiciones climatológicas presentes. Adicionalmente se midieron la profundidad, la temperatura, la salinidad, la conductividad, el pH y el oxígeno disuelto del agua con un medidor portátil de parámetros múltiples Hach sensION 1566 .

Se tomaron muestras de sedimentos con una draga Ekman de 6"x6" Wildco®, observando el color y la textura de los sedimentos, así como su viscosidad y olor. Luego con la ayuda de una pala de jardinería, se separó una muestra de aproximadamente 300 g que se colocó en frasco de vidrio ámbar, con una etiqueta especificando el punto de muestreo. Asimismo, se tomó una muestra de agua de un litro, también en frasco de vidrio ámbar. Todas las muestras se guardaron en una hielera y se transportaron en frío hasta el laboratorio de la UAMI, donde se analizaron.

Análisis de la calidad del agua.

Antes de procesar las muestras estas se filtraron para eliminar los materiales suspendidos y evitar su interferencia en los análisis, posteriormente se permitió que la temperatura de las muestras alcanzara la temperatura ambiente y se ajustó el pH de las mismas. Se analizó la concentración de orto-fosfatos, fosforo total, amonio, nitratos y nitritos con técnicas espectrofotométricas y la dureza y la alcalinidad por titulación. En todos los casos se utilizaron las técnicas descritas en el manual del laboratorio portátil HACH (HACH, 1992).

Muestreo de organismos para estudios histológicos y para la determinación de biomarcadores.

Se tomaron muestras de peces y/o moluscos procurando que los organismos se estresaran lo menos posible, e inmediatamente se procedió a su sedación, fijación y conservación, de acuerdo a lo recomendado en Guzmán-García et al (2010), respetándose las consideraciones éticas para el uso de organismos acuáticos (UAM, 2010).

Evaluación de la toxicidad de las muestras con la prueba de Microtox.

La evaluación de la toxicidad de las muestras de agua y sedimentos se hicieron siguiendo el método descrito en el manual del Analizador Microtox® Modelo 500 de la compañía SDIX, el cual ya ha servido para observar la toxicidad del petróleo derramado del pozo Horizon, en sedimentos marinos del Cañón DeSoto (Chachere, 2010).

Para el caso de los sedimentos, se pesaron dos gramos de muestra y se les agregaron 8 ml de diluyente, enseguida esta mezcla se agitó con un vortex por aproximadamente un minuto. Luego la mezcla fue centrifugada a 150 rpm por 5 min, para posteriormente separar la fase líquida, la cual se trató como cualquier muestra de agua, es decir se le agregaron 10 µL de bacteria reconstituida, y siguiendo las instrucciones del software del Microtox® se evaluó la toxicidad de la muestra a 5 y 15 min. Cuando las muestras manifestaron toxicidad, se llevaron a cabo una serie de diluciones (12.5, 25, 50 y 100%) para calcular la CE₅₀. El cálculo de la CE₅₀ se obtuvo directamente del software que acompaña al instrumento.

BIOMARCADORES.

Aclimatación de los ostiones en el laboratorio.

Preparación de agua marina artificial a 35 ‰. Se disolvió sal marina (Instant Ocean) en agua destilada en un contenedor con capacidad de 300 L. Posteriormente se acondicionó el agua usando un recirculador (Atlas world standard 800), un espumador (WG-308), una bomba de aire (Ecopet 1688) y un termostato (Aquarium SGH-180), a una temperatura de 38 °C.

El agua marina se preparó con siete días de anticipación a la llegada de los organismos, lo que permitió que el agua madurara lo suficiente para no causar un

choque osmótico en los animales. Esta agua fue utilizada para preparar los acuarios en los que se aclimataron los organismos de las diferentes localidades.

Preparación de los acuarios. Se prepararon dos o tres acuarios de 50 L por localidad, colocándoles una cascada (Dolphin H-100), una bomba de aire (Ecopet 1688) y un costal preparado con carbón activado y gasa. En cada acuario se colocaron un máximo de seis organismos con un tamaño promedio de 5.6 cm. Cada tercer día se realizó el mantenimiento de los acuarios así como la alimentación de los ostiones con alga y nitríver (Sera, México).

Los ostiones permanecieron en aclimatación por un mínimo de una semana o un máximo de tres meses, antes de la medición de los diferentes biomarcadores.

Evaluación de medidas Morfométricas de los ostiones. Antes de proceder a procesar los organismos, se tomaron medidas morfométricas de cada uno de ellos: largo, ancho, peso con concha y volumen de líquido intervalvas. Los resultados de estas evaluaciones se pueden observar en el Anexo I.

Estabilidad de la membrana lisosomal. El colorante rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) es un colorante catódico débil que atraviesa la membrana celular pasivamente por difusión y se une a la matriz intracelular de los lisosomas. Las células con daño no pueden retener el colorante después de los procesos de lavado y fijación.

Preparación solución fisiológica salina. Se preparó una solución fisiológica salina que contiene Hepes (20 mM), NaCl (436 mM), MgSO₄ (53 mM), KCl (10 mM) y CaCl₂ (10 mM, J. T Baker, México) todos los reactivos se disolvieron en agua destilada en un volumen final de un litro, se ajustó el pH a 7.36, se conservó en refrigeración, hasta su uso por un periodo no mayor de tres meses.

Solución de trabajo rojo neutral (colorante). La solución de tinción se preparó antes de cada experimento, esta se puede preparar hasta dos semanas antes de realizar el experimento, se pesaron 20 mg del colorante rojo neutral (NR) se

disolvió en 1 mL de Di-metil-sulfoxido (DMSO) se filtró la solución con papel filtro (0.45 μm) se guardó en una vial color ámbar en oscuridad a 4°C.

Preparación de la solución de tinción. La solución se preparó minutos antes de usarla, se transfirieron 5 μL de la solución stock rojo neutro (NR) en 995 μL de solución fisiológica salina y se mezclaron con un agitador eléctrico (Fisher Scientific). Esta solución se guardó en un vial 2 mL de color ámbar (Fig. 1).



Figura 1. Homogenización de la solución de trabajo

Extracción de hemolinfa. Cada ostión utilizado para las evaluaciones se abrió con un cuchillo y se escurrió el exceso del agua de mar. Previo a la extracción de la hemolinfa, se añadieron 500 μL de solución fisiológica salina a una jeringa de 1 mL. Enseguida se procedió a extraer 500 μL de hemolinfa, insertando la jeringa en la cavidad pericárdica (Fig. 2 y 3). Una vez obtenida la hemolinfa se mezclaron suavemente.



Figura 2. Ostión abierto y preparado para la toma de muestra



Figura 3. Extracción de hemolinfa

Se transfirieron 40 μL de la mezcla hemolinfa-solución salina a un portaobjetos tratado previamente con poli-L-lisina, cuya función es la adherencia de las células al portaobjetos (20 μL en 100 μL agua destilada, Merck). Las muestras se incubaron en una cámara húmeda durante 30 minutos para permitir que las células se unan, retirando el exceso de agua. A continuación se agregaron 40 μL de la solución de tinción o rojo neutro a cada portaobjetos y se incubaron por 15 minutos para que el colorante tiñera las células.

Las preparaciones se observaron al microscopio (DIAPLAN Leitz) con el objetivo 10X40 con baja intensidad de luz. Durante los primeros 60 minutos se examinaron cada 15 minutos las celular y posteriormente cada 30 minutos. El ensayo se dio por terminado cuando se observó que el 50% de la tinción se había perdido, (Fig. 4).

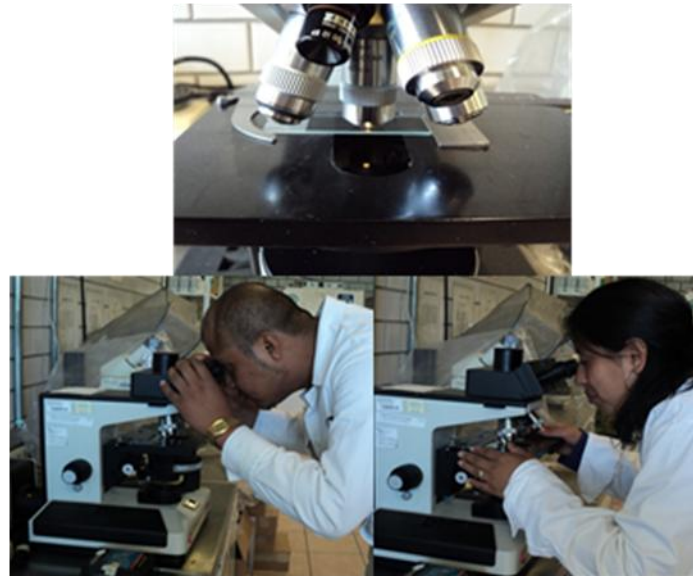
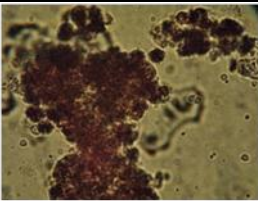
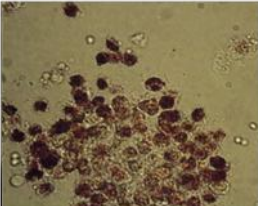
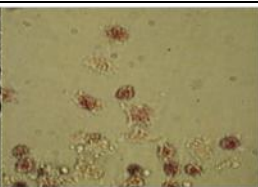


Figura 4. Observación al microscopio de células de hemolinfa para la evaluación de la estabilidad lisosomal

Se registró el tiempo de retención del colorante rojo neutro y se tomaron fotografías que se clasificaron de acuerdo con la cantidad de colorante que se observó dentro de las células. La evaluación duró un máximo de 180 minutos y se

detuvo cuando el 50 % o más de las células perdieron el colorante o se detectaron anomalías o alargamiento de los lisosomas (tabla 1).

Tabla 1. Estadíos en la retención de rojo neutro en células de ostión (*Crassostrea virginica*).

Categoría de daño	Estadío
+	
+/-	
-	

Inhibición de la acetilcolinesterasa.

Para obtener la glándula digestiva se realizó una disección en los ostiones, posteriormente estos tejidos se congelaron a -20 °C hasta su análisis.

Se cuantificó la actividad de la AChE en glándula digestiva mediante el método colorimétrico descrito por Ellman, et. al. (1961), con algunas modificaciones.

Algunos organismos se mantuvieron en acuarios para su depuración, para su posterior análisis como grupo control.

Preparación de los extractos enzimáticos. Los organismos se descongelaron y se colocaron en tubos con fondo cónico (Corning, México) para posteriormente pesar en una balanza (OHAUS) de 0.6 a 0.8 g de glándula digestiva.

Obtención de la proteína unida débilmente a membrana (S1, hidrofóbica). Las muestras de glándula se homogenizaron en amortiguador de extracción salina HEPES pH 7-7.5 y 50 µL de antiproteasa en un baño de hielo con un

homogeinizador de tejidos mecánico (POLYTRON PT10-35GT) (Fig. 5). Las suspensiones se mantuvieron a - 4°C durante todo el proceso para evitar la desactivación de la enzima.



Figura 5. Homogenización del tejido de ostión.

El homogeneizado se centrifugó por 1 hr, una temperatura de 4°C a 35,000 RPM (Beckman GS-15R). El sobrenadante se puso en alícuotas y se almacenó a -20 °C, para su posterior análisis.

Obtención de la proteína unida fuertemente a membrana (S2, hidrofílica). Al botón que quedó en el tubo de la ultracentrífuga se agregó 8 mL de buffer de extracción Triton X-100, para su homogenización.

Los botones que fueron homogeneizados llevaron el mismo fin que se utilizó para la obtención de S1. Pasada una hora se sacaron las muestras de la ultracentrífuga y se extrajo el sobrenadante para su posterior análisis (Fig. 6).

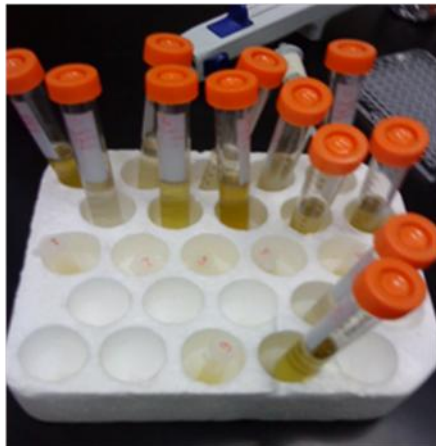


Figura 6. Tubos Corning con sobrenadante para su análisis.

Preparación de la muestra en el lector de Elisa. En una microplaca se agregaron 25 μL de agua desionizada para el blanco y 25 μL de muestra para S1, S2 y S1+S2 respectivamente. Se agregaron 225 μL de ISO-OMPA, se cubrió con papel aluminio y se dejó incubar durante 15 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 25 μL de AChT y se leyó de inmediato la placa en el lector de Elisa (ELx808, BioTek) a 405 nm (Fig. 7).

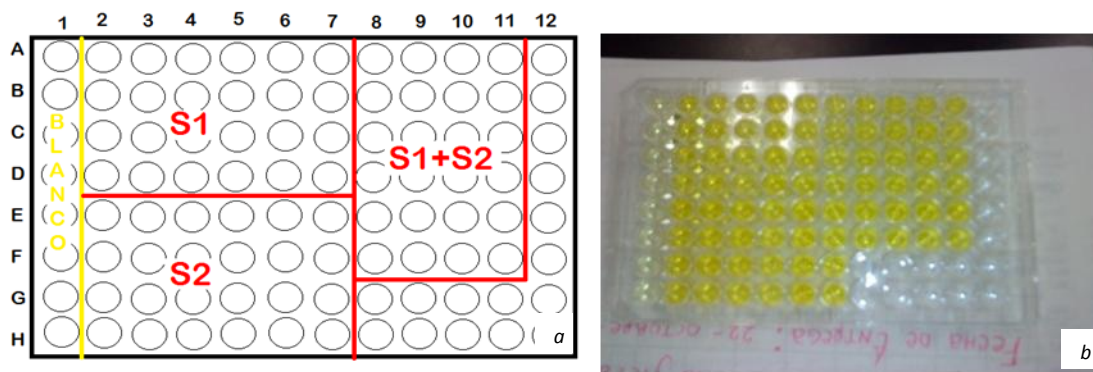


Figura 7. a disposición de las diferentes soluciones que se evalúan en la microplaca.
b: coloración de las soluciones en la microplaca para la determinación de AChE.

Determinación de proteínas. Se utilizó el método de Bradford (1976) para la determinación de proteínas, adaptado a microplaca (Herbert *et al.*, 1995). Se empleó el reactivo Bio-Rad como solución de reacción en una proporción 1:4 con

agua destilada y albumina de bovino como estándar (BSA), las lecturas se realizaron a 630 nm. (Fig. 8).

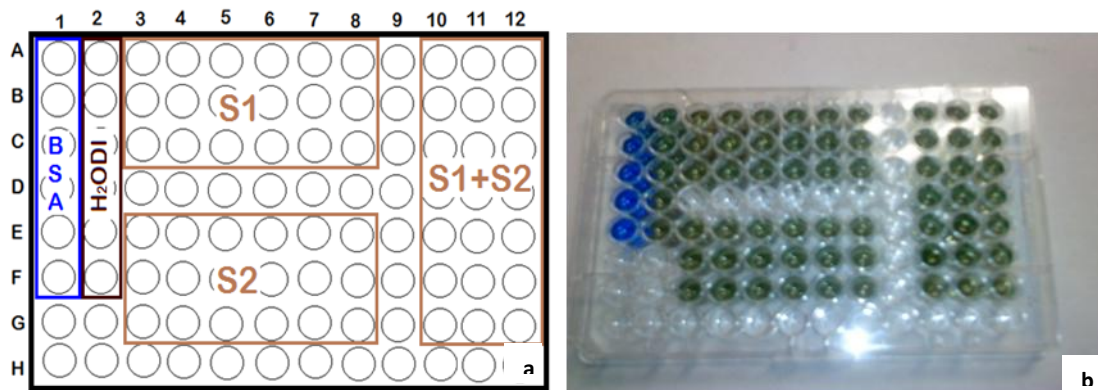


Figura 8. a: disposición de las diferentes soluciones que se evalúan en la microplaca. b: coloración de las soluciones en la microplaca para la determinación de proteínas.

Se realizó una dilución 1:10 para el grupo control, las muestras de campo se utilizaron sin dilución, se emplearon 10 µL por cada muestra por cuadruplicado, 200 µL de colorante de Bio-rad y se procedió a leer en lector de Elisa (BioTek ELx808) a una longitud de onda de 630 nm. (Fig. 9).



Figura 9. Lector de Elisa para la determinación de AChE y Proteína.

Análisis estadístico. Con los datos obtenidos de actividad enzimática, se procedió a capturar cada uno de los datos para poder sacar sus promedios. Los valores

promedios fueron analizados para su comparación la cual fue necesaria para buscar diferencias significativas entre las zonas de muestreo y entre los valores promedios con los del grupo control para la determinación de AChE y proteína. Los resultados fueron expresados en gráficos de caja y bigote para su comparación.

Ensayo cometa.

En el presente trabajo se empleó el método de Singh (1988) con algunas modificaciones adaptadas para la obtención de células de ostión *Crassostrea virginica*. (Fig. 10).

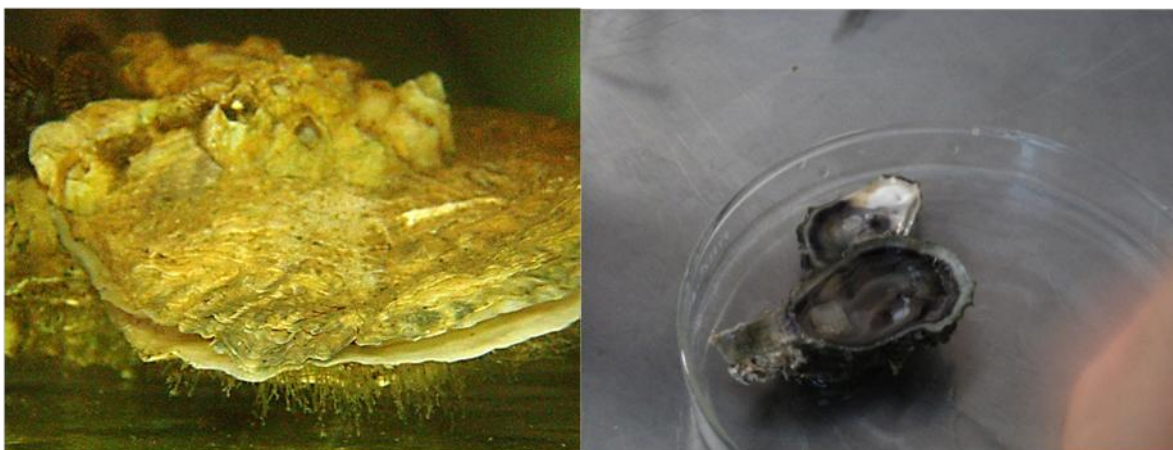


Figura 10. Ejemplares de *Crassostrea virginica* utilizados para la obtención de la suspensión celular.

Obtención de la suspensión celular.

Todos los organismos se maceraron con agua marina (4 mL) para lo que se empleó un mortero de cerámica. La suspensión celular se transfirió a tubos Corning de 15 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante. El lavado con agua marina se repitió tres veces y el paquete celular se resuspendió en 0.5 mL de agua marina.

Preparación de los geles.

Se colocaron 110 μ L de agarosa de punto de fusión normal 0.5 % (Sigma) a 37 °C en un portaobjeto de superficie totalmente esmerilada (Fisher) previamente etiquetados. Una vez que se solidificó la capa de agarosa se mezclaron 50 μ L de

la suspensión celular de cada una de las muestras con 150 μL de agarosa de bajo punto de fusión y se distribuyó en dos de los portaobjetos previamente preparados. Se colocó un cubreobjetos para extender la mezcla de manera uniforme y se dejaron solidificar sobre bloques de hielo. Una vez que se solidificó la segunda capa se retiró el cubreobjetos y finalmente, a cada preparación se le añadió una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión y se cubrió con un cubreobjetos de 30 X 24 mm y se dejó solidificar. (Fig. 11).



Figura 11. Geles de agarosa para la realización del ensayo cometa.

Lisis.

La solución de lisis se preparó al inicio del experimento en un frasco coplin (Fig. 12) para ocho muestras cuya composición era: 2.5 M de NaCl (J.T.Baker) 100 μM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y 10 μM de tris (Hycl de México), tritón-X100 al 1 % (J.T.Baker) y dimetilsulfoxido (DMSO) al 10 % (J.T.Baker) a pH 10 en un volumen total de 50 mL. Se retiraron los cubreobjetos de los geles solidificados y se incubaron en la solución de lisis, por al menos una hora, a 4 °C.



Figura 12. Solución de lisis en el frasco coplin, donde se incuban las muestras.

Electroforesis.

Después de la lisis, las muestras se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (BioRad), se les agregó el amortiguador que contenía NaOH 10 N (J.T. Baker) y 200 μ M de EDTA (J.T. Baker), a pH 10 y se dejaron reposar en la cámara por 20 minutos para permitir el desenrollamiento de la cadena de ADN. En seguida se aplicó una corriente de 25 V y 300 mA por 20 minutos. (Fig. 13).

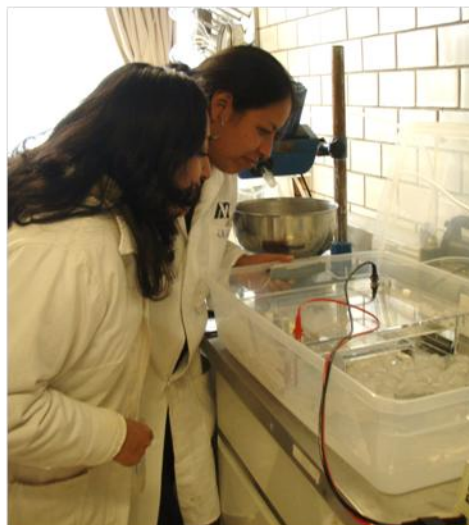


Figura 13. Electroforesis de las muestras.

Lavado de las muestras.

Las preparaciones se sacaron de la cámara de electroforesis y se lavaron tres veces con amortiguador de neutralización (Tris, Hyclon de México) 0.4 M, pH 7.5, con intervalos de cinco minutos para retirar el álcali.

Tinción de las Muestras.

A cada uno de los geles se les agregó 50 μ L de red gel (Sigma) (20 μ g/mL) y se les colocó un cubreobjetos. Los geles se almacenaron en una cámara húmeda a 4 $^{\circ}$ C en oscuridad hasta su revisión.

Análisis de las preparaciones.

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico (MARCA) equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se tomaron fotografías con una cámara fotográfica (Canon EOS) de todas las células de cada localidad. (Fig. 14).

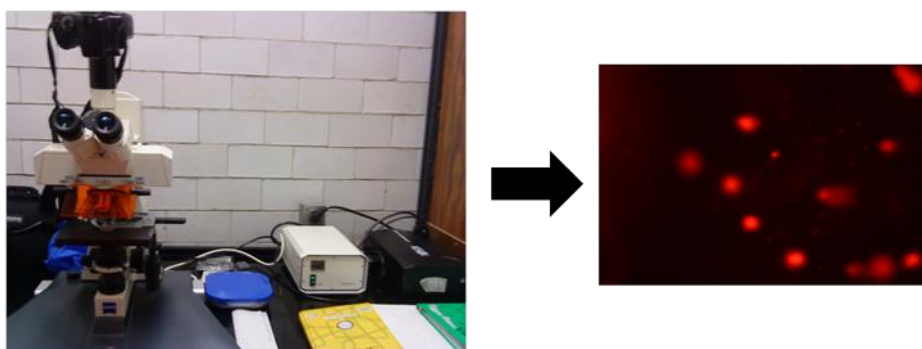


Figura 14. Microscopio de epifluorescencia para tomar fotografías de las células de ostión (*C. virginica*) para identificar la categoría del daño.

Análisis estadístico.

Las mediciones se expresaron como longitud en micras y se reportó la media de la población \pm el error estándar para cada tratamiento experimental. Se aplicó la

prueba no paramétrica de rango múltiple de Kruskal-Wallis, la cual se aplica para datos que tienen una distribución normal, donde los tamaños muestrales no son iguales y sea n_i , $i = 1, \dots, k$, el tamaño de la muestra de la i -ésima población. Con la hipótesis nula (H_0): todas las distribuciones poblacionales son idénticas y como hipótesis alternativa (H_a): al menos dos de las distribuciones poblacionales son diferentes respecto al control de manipulación para así detectar si había diferencias significativas entre los lotes experimentales. Se utilizó el programa STATISTICA 6.0.

Análisis histológicos

Los organismos fueron lavados y desinfectados y se realizó el registro de fauna asociada y número de lesiones aparentes. Posteriormente se evaluaron los parámetros morfométricos y el índice de estado con el sacrificio de 10 bivalvos.

La glándula digestiva de 15 ostiones fue analizada histopatológicamente mediante 3 cortes seriados en parafina cortados a 5 micras y teñidos con H-E, de acuerdo con lo descrito por Guzmán García (2010). Se realizó el análisis tisular utilizando una escala semicuantitativa, también se evaluaron los cambios tisulares más relevantes de acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2. Evaluación en túbulos de la glándula digestiva de ostión *Crassostrea virginica*.

Escala	Diagnóstico	Observaciones
1	Preparación	Epitelios de revestimientos completos.
2	Absorción	Se observan partículas de alimento en el túbulos. Presencia de células basofílicas.
3	Absorción-desintegración	Algunas células están desintegrando
4	Desintegración	Heterogeneidad sin luz en los túbulos
5	Reconstrucción	Presencia de luz definida en los túbulos

5. DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO

Laguna de Pueblo Viejo

Localizada en el municipio de Villa Cuauhtémoc, al norte del estado de Veracruz, entre los paralelos 22° 05' y 22°13' de latitud norte y los meridianos 97°50' y 97°57' de longitud oeste. Al norte tiende a limitar con el río Pánuco, con el cual se comunica mediante un canal situado en su parte noroeste; al este limita con Ciudad Cuauhtémoc y Tampico Alto, la laguna es pequeña, aproximadamente 93.7 km² su superficie (9,100 ha), a lo largo mide 15 km y a lo ancho 9.5 km. En su interior existen varias islas de tamaño pequeño, en donde sobresale la Isleta Grande, con 1 km de largo y 0.2 km de ancho. A la laguna de Pueblo Viejo desembocan los ríos La Tapada, Pedernales, La Cuásima, La Puerca y Tamacuil; este último es el más importante por su longitud, los demás únicamente conducen gastos significativos. El sistema estuario-lagunar es somero; su profundidad es de 1.5 m en la parte central, en tanto en la parte norte-sur disminuye ligeramente a 1m. Con lo que respecta a los parámetros fisicoquímicos alcanza en una temperatura máxima de 30.4 °C, y una mínima de 26.6 °C, la salinidad presenta una mínima de 11.9 y una máxima de 27.3‰, su pH tiene una máxima de 8.7 y una mínima de 7.4.

Uno de los principales problemas de este cuerpo de agua, es la contaminación por bacterias coliformes provenientes de las aguas negras de las ciudades de Tampico, Ciudad Madero y Villa Cuauhtémoc; esto ha puesto en desventaja al ostión de la laguna en el mercado nacional, Este sistema se ve influenciado en su mayoría por el gran aporte proveniente del río Pánuco (Contreras, 1985).

Laguna de Tamiahua

Esta laguna se ubica en la porción occidental de las costas del Golfo de México, entre las coordenadas 21°06' de latitud norte y los 97°23' y 97°46' de longitud oeste; la limitan al norte el río Pánuco y al sur el río Tuxpan. Posee una forma alargada en el eje mayor. Teniendo una longitud de 85 km y una anchura máxima

de 18 km; ocupa un área de 88,000 ha aproximadamente, y es por su extensión la tercera más grande del país.

La Laguna de Tamiahua recibe aportes de ríos pequeños entre los que destacan, Estero Laja, Estero Cucharas, Estero Carbajal, Estero Tancochín, Arroyo de Tempache y el Estero Malpas. Frente a la costa hay una cadena de arrecifes coralinos vivos, en el subsuelo de cabo rojo, a 12.5 m de profundidad.

Este tipo de sistema estuario-lagunar cuenta con una profundidad de 2 a 3m; es un poco más profundo cerca de la barra arenosa Cabo Rojo, este sistema cuenta con dos bocas; una al norte (la boca Tampachiche) de 200 m aprox. De ancho; otra al sur, (la Boca o Barra de Corazones). (Contreras, 1985)

Laguna de Alvarado

Esta laguna se encuentra ubicada en la planicie costera del área central del estado de Veracruz, entre los paralelos 18°46' y 18°42' de latitud norte y los meridianos 95°34' y 95°58' de longitud oeste. Este sistema estuarino-lagunar está conformado por laguna de Alvarado propiamente dicha, por Buen País y Camaronera, se extienden longitudinalmente en dirección este-oeste a lo largo de aproximadamente 17 km. Su comunicación con el mar tiene un ancho de 400m y está orientada ligeramente hacia el norte. Tiene una superficie de 6,200 ha. El principal río que desemboca, llega por el suroeste y es el Papaloapan; tiene la particularidad de aportar agua a la laguna, en un promedio diario aproximado de 40 millones de metros cúbicos.

Entre los crustáceos y moluscos se cuenta con *Crassostrea sp.*, *Penaeus sp.*, *P. Setiferus*, *Callinectes sapidus* y *Macrobrachium acanthurus*. En el sistema lagunar, el necton está constituido por una variedad de organismos para actividades pesqueras como: la almeja prieta, la gallo y la casco de burro, chucumite, lancha, mojarra blanca, corvina, bagre, jurel, lisa y entre otros; camarón blanco y camarón prieto; jaiba y por último el más importante ostión. Con lo que respecta a los parámetros fisicoquímicos presenta una salinidad mínima de 1.87 y una máxima de 13.85 ‰. Con una temperatura máxima de 31.0 °C y una mínima de 25.5 °C, un pH que va de 7.7 a 8.4 en la máxima. (Contreras, 1985)

Laguna Carmen Machona

Esta laguna pertenece al municipio de Cárdenas, Tabasco; está ubicada entre los 18°20' con 18°24' de latitud norte y los 93°45' y 93°55' de longitud oeste. El Carmen y La Machona forman el principal sistema estuarino-lagunar de esta zona, mismo al cual se integra El Pajonal que comunica a ambas lagunas.

Esta laguna tiende a presentar una superficie aproximada de 6,500 ha, con una profundidad media de 2.50m. La comunicación del estuario con el Golfo de México se realiza a través de la artificial Boca de Panteones. La Machona tiene menor superficie que la del Carmen, tiene una forma redondeada. (Contreras, 1985).

La presencia de hidrocarburos en los sedimentos y en *Crassostrea virginica* de las lagunas del Carmen y la Machona, confirma la suposición que estos cuerpos de agua se ven afectados por la exploración y la explotación petrolera realizadas en las áreas adyacentes y cuyos desechos se descargan en la columna de agua. (Álvarez, *et al.*, 1982)

Laguna de Términos

Ubicada al sur del Golfo de México y al suroeste de la Península de Yucatán. Se localiza entre los meridianos 91°10' y 92°00' de longitud oeste y los paralelos 18°20' y 19°00' de latitud norte. Se encuentra delimitada al norte por la Isla del Carmen, de 37.5 km de largo y 3km de ancho. Cuenta con dos bocas en cada uno de sus extremos que la comunican permanentemente con el mar: la de Puerto Real y la del Carmen (Álvarez, *et al.*, 1982). Este cuerpo acuático se sitúa frente a una extensa franja de plataforma continental de una amplitud promedio de 120 km, desde el litoral hasta su margen interno. Esta zona, conocida como Sonda de Campeche, aporta una de las más grandes pesquerías marinas de México. Presenta una máxima en la temperatura de 31.6 °C y una mínima de 26.3 °C, la salinidad presenta una máxima de 38.21 y una mínima de 0.20 ‰, con un pH máximo de 8.4 y un mínimo de 7.9. (Vázquez-Botello, 1978).

La salinidad varía de acuerdo con la estación del año y en relación con la época de lluvias o secas. Usualmente los valores más altos se registran en las inmediaciones de la Boca de Puerto Real, ya que mediante ésta penetra agua marina del Golfo; tal ingreso decrece gradualmente a partir de la isla hacia tierra firme, de modo que aproximadamente al centro de la laguna existen valores intermedios. Con lo que respecta a las especies que se explotan en la laguna de Términos de manera organizada podemos contar con lo siguiente: *Crassostrea rhizopora* (Estero Pargo), *Crassostrea virginica* (Principalmente en boca de Atasta, Palizada Vieja, Balchacah y Boca de los Pargos), *Rangia Cuneata* (Pom), Tiburón (Boca del Carmen). (Álvarez, *et al.*, 1982).

Como dato importante cabe mencionar que en el año 1976, ocurrió un derrame petrolero, y Vázquez-Botello realizó un estudio donde concluye que aquél tuvo un impacto sobre aproximadamente el 8% del área total de la laguna. Debido a la corriente y la acción de las mareas, la mayor parte de los hidrocarburos se depositaron en la zona litoral de la Isla del Carmen.

Sistema Arrecifal Tuxpan

Tuxpan es una ciudad que cuenta con excelentes servicios turísticos, se ubica a 40 kilómetros de la laguna de Tamiahua. Otras playas de la zona son las que se encuentran cerca del puerto pesquero de cazones, donde se encuentra la barra que lleva su nombre y la barra de Tenixtepec a 32 kilómetros de Tecolutla. La playa en Tuxpan está situada a 11 kilómetros del centro de la ciudad, y está comunicada a este por el Boulevard Ribereño.

Su clima es tropical con una temperatura media anual de 24.9°C; con lluvias abundantes en el verano y a principios del otoño, con menor intensidad de mayo a noviembre, su precipitación media anual es de 1,241 milímetros.

Arrecife Tuxpan. Es el arrecife más sureño del sistema se ubica a 60° y 12.34 km de la desembocadura del Río Tuxpan. Se le asignan las coordenadas 21° 01' de latitud Norte y 97° 11' de longitud Oeste. Tiene 500 m de longitud en su eje norte - sur y 1200 m en su eje este - oeste. Tiene una forma elipsoide. El relieve del

arrecife muestra que se alcanza su mayor profundidad en el sector norte (27 m) y la menor en el sector ubicado en el oeste de la baliza de señalamiento, donde el anterrecife se localiza a 3 m de profundidad.

Arrecife Tanhuijo. Se localiza a 10° y a 18 km de la desembocadura del Río Tuxpan. La llanura arrecifal posee un canal de navegación que tiene sentido de oeste hacia el este. En la boca del canal tiene 11 m de profundidad y termina a corta distancia de la cresta interior de la sección este. En Sotavento se desarrolla una meseta a unos 9 metros de profundidad, el lado sur alcanza 15 metros de profundidad y presenta un relieve variado.

Arrecife en Medio. Se localiza a los 45° y 14 km de la desembocadura del Río Tuxpan. Es uno de los arrecifes más pequeños del sistema y con pendiente más abrupta, además la llanura arrecifal es la más profunda del sistema. Entre el arrecife y la costa se localiza la monoboya de abastecimiento de la Central Termoeléctrica Adolfo López Mateos. (Gutiérrez *et al.*, 1993).

Sistema Arrecifal Tamiahua

Tamiahua, municipio de Veracruz, ubicado al norte del estado, en el litoral del golfo de México. Cuenta con producción ganadera y agrícola, además de riqueza petrolífera. Cuenta con una laguna del mismo nombre. El sistema arrecifal se encuentra localizado en el Golfo de México, a 18 millas al noreste de Tamiahua y a 4 millas al sureste del Cabo Rojo.

La Isla de Lobos se localiza en el Golfo de México, a unas 30 millas náuticas al norte del Puerto de Tuxpan, en el estado de Veracruz. Entre esta isla y el Cabo Rojo se encuentra el sistema arrecifal más septentrional del continente, conocido como arrecifes de Lobos - Tuxpan, el cual contiene una importante variedad de comunidades coralinas y de especies de flora y fauna marinas.

En este sentido, la fauna marina que encuentra refugio en el sistema arrecifal Lobos - Tuxpan comprende varias especies de estrellas de mar, erizos, pepinos de mar y esponjas. Asimismo, se estima que es posible encontrar al menos 25

especies de moluscos, entre los que destacan los caracoles, pulpos y el casco gigante, y 60 especies de crustáceos, entre los que se encuentra la langosta espinosa.

Puerto de Veracruz

El Sistema Arrecifal Veracruzano está formado por 17 arrecifes de los cuales 11 se localizan frente a Antón Lizardo y el resto enfrente del Puerto de Veracruz. Enlaza al noroeste con el Sistema Arrecifal Veracruzano Norte, situado enfrente de la Laguna de Tamiahua y al este con el Sistema Arrecifal de Campeche y Yucatán (Gutiérrez *et al.*, 1993).

Las actividades del área protegida y su zona de influencia son complejas y variadas en el espacio y en el tiempo. Entre ellas destacan la actividad pesquera, la actividad de carga y descarga de embarcaciones de muy diversos tipos, sobre todo la generada por el Puerto de Veracruz, el turismo y otras actividades recreativas en el mar. En la tierra firme circundante los usos principales son los establecimientos urbanos y el turismo.

Este sistema es uno de los más importantes en México por su tamaño y el número de especies. El Sistema Arrecifal Veracruzano está formado por bajos, islas y arrecifes situados en la porción interna de la plataforma continental en el Golfo de México, los cuales se elevan desde profundidades cercanas a los 40 m. El sistema incluye dos áreas geográficamente separadas, la primera se localiza enfrente del Puerto de Veracruz e incluye a los arrecifes Gallega, Galleguilla, Anegada de Adentro, La Blanquilla, Isla Verde, Isla de Sacrificios, Pájaros, Hornos, Ingeniero y Punta Gorda, todos dentro de la isóbata de los 37 m. La segunda área se ubica frente a Punta Antón Lizardo, a unos 20 km al suroeste del Puerto de Veracruz, e incluye los siguientes arrecifes: Giotte, Polo, Blanca, Punta Coyol, Chopas, Enmedio, Cabezo, el Rizo, Santiaguillo, Anegada de Afuera, Anegadilla y Topetillo, todos ellos en la isóbata de los 48 m.

El clima del parque es cálido-húmedo con lluvias en dos épocas bien marcadas: la de nortes, de menor precipitación, que se presenta de septiembre a abril, con

temperatura baja y frecuentes invasiones de masas de aire frío del norte: éstas, por su fuerza, pueden ser desde vientos frescos hasta violentos y huracanados. La época de lluvias se presenta de mayo a agosto, con temperaturas elevadas, alta precipitación y vientos débiles del este. La temperatura promedio anual en la zona arrecifal es de 26°C, las temperaturas más bajas se registran en enero y febrero y oscilan alrededor de 18°C. (Gutiérrez *et al.*, 1993).

Costa de Campeche

El área de estudio se encuentra al sur del Golfo de México en el Estado de Campeche que limita al norte y noreste con el Estado de Yucatán y al sur con el de Tabasco. La zona de muestreo corresponde a Bahía de Campeche, situada en el Municipio de Campeche, Campeche, entre las coordenadas: 19°47'50.4"-19°53'31.5" N y 90°37'15.7- 90°30'58.0" O, limitada al noreste, por la Reserva Biosfera "Los Petenes". Corresponde a una zona tropical, la que presenta un clima Aw de Köppen del tipo cálido subhúmedo, donde se pone particular atención a la exposición que esta zona tienen con relación a los "nortes" (García de Miranda, 1988), con tres estaciones climáticas definidas: la época de lluvias (entre junio-septiembre), donde ocasionalmente se presentan ciclones y tormentas tropicales, la época de nortes o tormentas de invierno (entre octubre y febrero), y la época de secas (entre febrero y mayo; Yáñez-Arancibia & Sánchez-Gil, 1983, 1986). La zona costera de Campeche está conformada principalmente por sedimentos de composición calcárea y margosa. Dado que la dirección e intensidad de la circulación costera presenta un cambio estacional, no se presenta un cambio brusco en la temperatura de mar, por lo que se establece un gradiente fisicoquímico semipermanente de salinidad, pH, oxígeno disuelto y materia orgánica, principalmente debido al aporte de aguas epicontinentales y estuarinas propias de la zona costera (Yáñez-Arancibia & Sánchez-Gil, 1986). La temperatura máxima registrada en el agua de mar es de 35 °C durante el mes de septiembre y la mínima de 24 °C en febrero, la marea en el municipio de Campeche es mixta-semidiurna (Yáñez-Arancibia & Sánchez-Gil, 1986).

Cuenta con un litoral de 60 km lo que equivale al 11.47% del total con que cuenta la entidad, en estas costas se capturan ricas y variadas especies marinas distinguiéndose el pámpano, sierra, pulpo, camarón etc., las actividades pesqueras cuentan con la infraestructura necesaria como (bodegas, fábricas de hielo, talleres y laboratorios, congeladores, empacadoras, muelles y/o atracaderos, refugio, centro regional de investigación. La temperatura promedio anual es de 26°C, presentándose los niveles máximos antes del solsticio de verano con un promedio de 28°C alcanzándose una temperatura máxima histórica de 52°C. La temporada de lluvias está comprendida entre los meses de junio-octubre y la de estiaje, del mes de enero a mediados del mes de mayo. Los vientos dominantes soplan de noroeste a suroeste por la mañana y al mediodía, durante los meses de noviembre a marzo y por la noche de noroeste a suroeste, la mayor parte del año. (Pech, *et al.*, 1997).

Costa de Yucatán

La costa del Estado comprende una amplia (hasta 245 km de la línea de costa) y somera (50 m en promedio) plataforma continental, se encuentra en medio del Golfo de México y el Mar Caribe: Dos grandes ecosistemas comunicados a través del canal de Yucatán que mide 196 km de ancho y llega hasta 2000 m de profundidad. Este canal, en conjunto con la circulación general del Golfo de México, tiene una influencia directa en los patrones de circulación de las corrientes de la plataforma continental, una gran cantidad de agua que proviene del Atlántico choca con el continente en la región del Caribe, desviándose hacia el norte y se abre paso por el canal de Yucatán, generando la corriente de chorro conocida como la corriente de Yucatán.

El territorio marino costero del estado presenta una variabilidad ambiental, intra-anual, derivada principalmente de la temporalidad del régimen de lluvias, vientos y temperatura. Las condiciones climáticas regionales han permitido definir tres estaciones, secas, lluvias y la de tormentas y frentes fríos. Adicionalmente la península de Yucatán experimenta una temporada de huracanes que ocurre aproximadamente entre junio y noviembre. Esta variabilidad climática ocasiona

que las características fisicoquímicas del agua marina experimente cambios asociados a la estacionalidad ambiental.

Se encuentra en las costas del Golfo de México, desde la plataforma de Yucatán, hasta Cabo Catoche, está constituida por 8 lagunas costeras y por un relieve extremadamente bajo: 250 por 450 km de suelo carbonatado; sufre derramamientos de agua internos debido a la topografía y no presenta ríos; tiene costas e interior con clima de árido a subhúmedo y lluvias (no intensas) en verano; posee una plataforma continental notablemente ancha, un promedio de 125 km y poco profunda: aproximadamente 10 km. La energía de las olas es baja, excepto en los márgenes de la plataforma continental y arrecifes durante el verano, por los huracanes, y en invierno por los nortes; la baja energía de mareas varía por las tormentas agitadas. En la región están comprendidas: Laguna la Carbonera, Laguna la Soledad, Estero Yaltún, Laguna Celestún, Estero Progreso, Estero el Islote, Estero Lagartos y Laguna Yalahuan. (Contreras, 1985)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CALIDAD DEL AGUA DE LAS LAGUNAS COSTERAS.

Parámetros físico-químicos. Los muestreos en las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Carmen Machona se llevaron a cabo en temporada de lluvias, mientras que los de las lagunas de Alvarado y Términos fueron en época de secas. Asimismo, los muestreos en las zonas arrecifales de Tuxpan y Tamiahua, el Puerto de Veracruz y el segundo muestreo de la costa de Campeche y de Yucatán se hicieron en temporada de lluvias. Las temperaturas promedio para las lagunas muestreadas (Tabla 3) variaron de 28°C a 32.7°C. Por tratarse de ambientes salobres el pH fue muy estable presentando valores de 7.7 a 7.82 y salinidades que variaron de 22 ‰ a 29 ‰, con un valor extremo de 38 ‰ en la laguna de Carmen Machona. Las zonas de muestreo de los ostiones en general son muy someros con profundidades que variaron de 0.8 m a 1.5 m. El oxígeno disuelto en el agua de las lagunas de Alvarado y Carmen Machona fue bajo (2.9 mg/L y 3.3 mg/L respectivamente) a comparación con las otras tres, en los que se presentaron valores por arriba de los 6.0 mg/L.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del agua de las lagunas costeras del Golfo de México donde se obtuvieron ostiones.

	Pueblo Viejo	Tamiahua	Alvarado	Machona	Términos
Temperatura °C	32.7	28.5	29.9	31	28
pH	7.8	7.7	7.7	7.9	7.82
Salinidad ‰	22	28	29	38	29
Conductividad(mS/cm)	45.9	47.5	8.53	65.7	----
O. D. (mg/L)	10.8	9.03	2.9	3.3	6.3
Profundidad (m)	1.0	1.50	2.0	0.9	0.8

Nutrientes. Las concentraciones de fósforo total (Fig. 15) en agua presentaron niveles entre los 3.2 mg/L y los 16.5 mg/L, valores que superaron hasta en dos órdenes de magnitud el límite establecido por la Unión Europea (UNECE) y

también el marcado por los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua (CECA) de 1989.

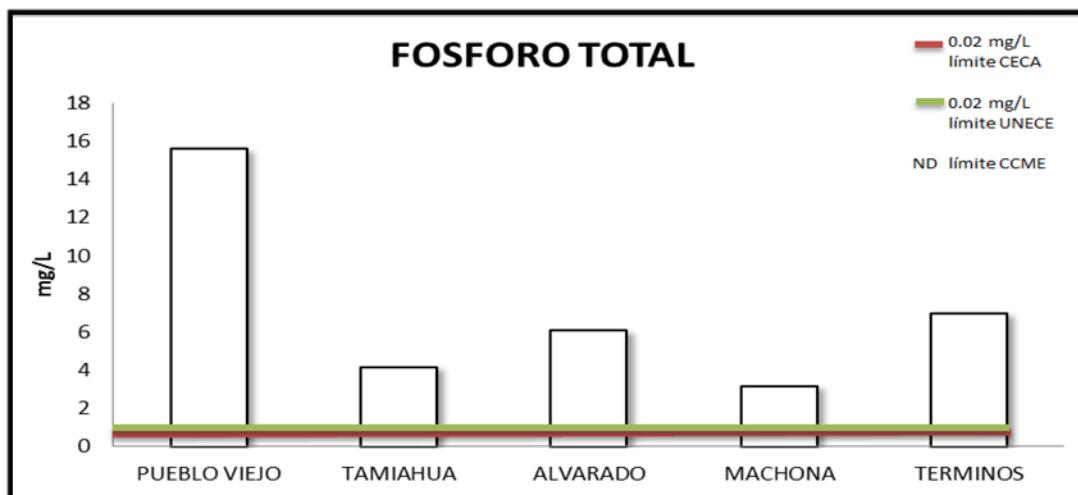


Figura 15. Concentración de fósforo total en el agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. UNECE: Clasificación Estadística Europea de la Calidad del Agua en protección de la Vida Acuática.

Los resultados obtenidos de ortofosfatos (Fig. 16), también mostraron un alto contenido de esta forma del fósforo. Los CECA indican que los ortofosfatos no deben exceder los 0.002 mg/L, para prevenir el desarrollo de especies biológicas indeseables y para controlar la eutrofización acelerada. Por lo tanto los valores que se presentan en los sitios de muestreo en el Golfo de México demuestran el carácter eutrófico de estas lagunas costeras.

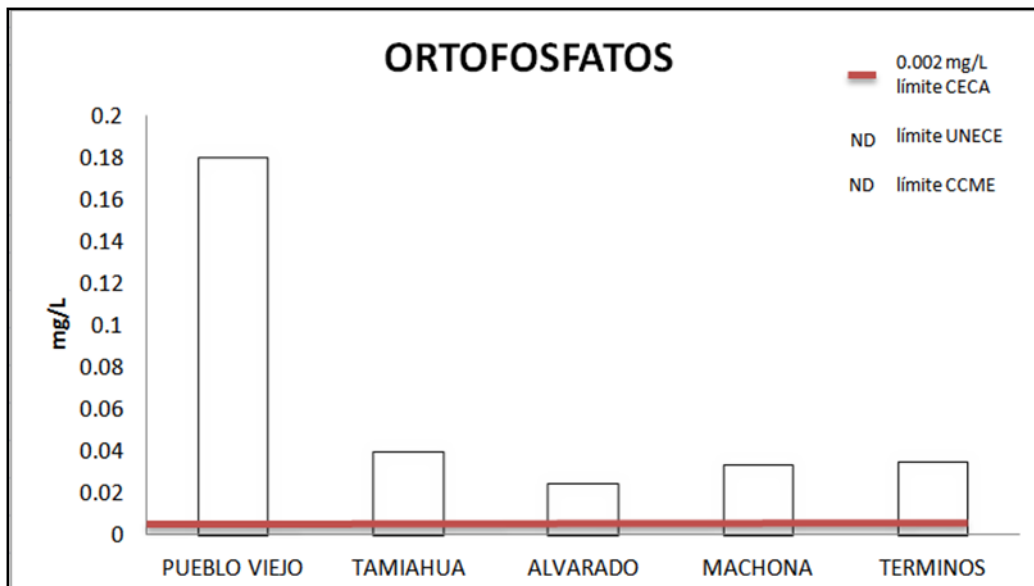


Figura 16. Concentración de Ortofosfatos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua.

En cuanto a las concentraciones de nitratos (Fig. 17), los valores más altos se presentaron en la laguna de Pueblo Viejo, seguida de Tamiahua, Alvarado y Carmen Machona, para volver a incrementarse en laguna de Términos. Todos los valores estuvieron por encima de los criterios de calidad de agua, rebasándolos significativamente. Los nitritos presentaron valores desde 3 mg/L hasta 20 mg/L, comportándose de una forma similar a los niveles de nitratos; sin embargo este parámetro no rebasó el límite de calidad del agua impuesto por los CECA (Fig. 18).

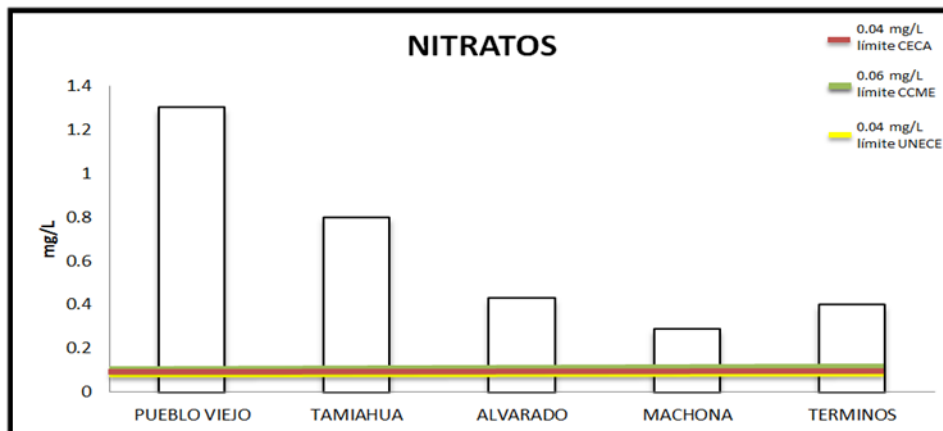


Figura 17. Concentración de nitratos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. UNECE: Clasificación Estadística Europea de la Calidad del Agua en protección de la Vida Acuática.

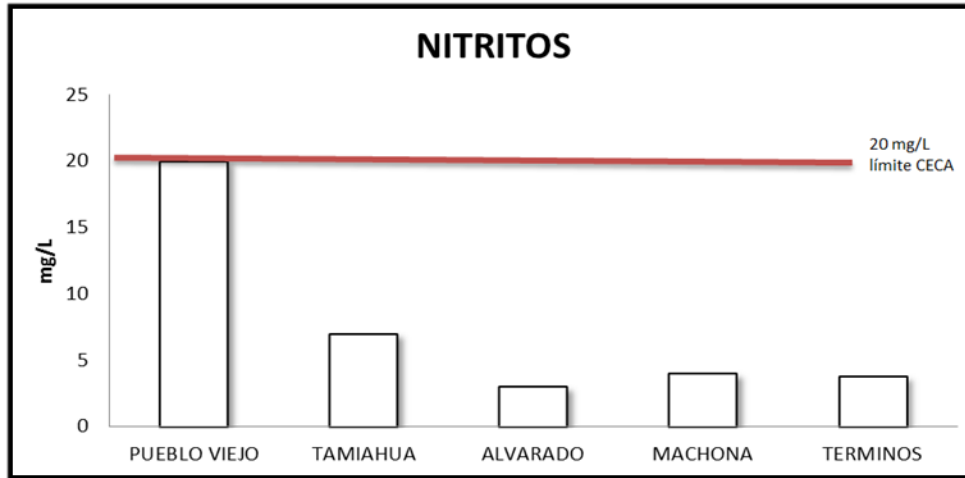


Figura 18. Concentración de nitritos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua.

De acuerdo con los CECA y UNECE para calificar los cuerpos de agua como aptos para la protección de la vida acuática, las concentraciones de amonio no deben rebasar los 0.01 mg/L y 0.07 mg/L respectivamente. Como se muestra en la figura 19 todas las localidades presentaron valores por encima de los límites, con excepción de la Laguna de Términos.

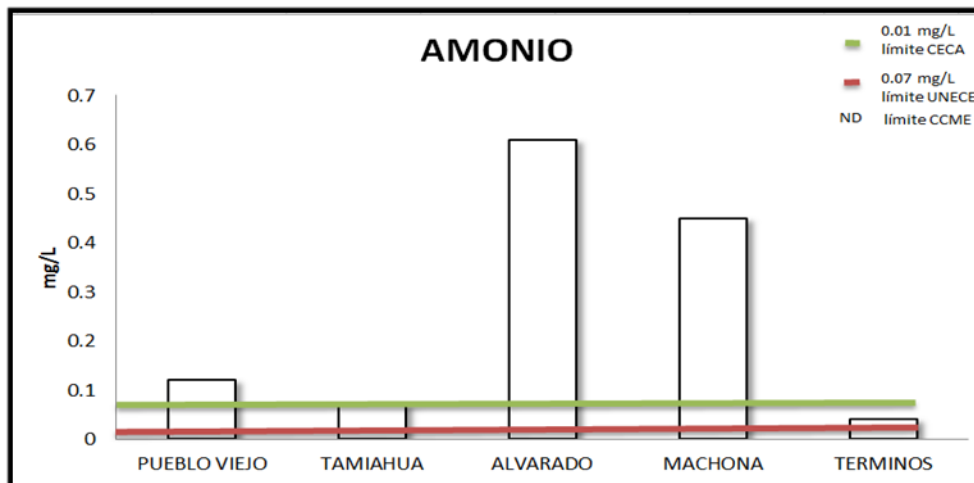


Figura 19. Concentración de amonio en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. UNECE: Clasificación Estadística Europea de la Calidad del Agua en protección de la Vida Acuática.

CALIDAD DEL AGUA Y TOXICIDAD EVALUADA CON MICROTOX.

Como se puede observar en las tablas 4 y 5, los parámetros fisicoquímicos del agua de los transectos muestreados son característicos de las zonas costeras del país, con temperaturas que variaron de los 27 °C a los 32 °C, pH neutro, salinidades altas que alcanzaron las 40 ‰ en la Costa de Yucatán y concentraciones de oxígeno disuelto altas, lo cual está relacionado con el movimiento del agua y la productividad primaria que en los horarios de los muestreos está en su fase más alta.

En cuanto a los parámetros medidos en el laboratorio cabe destacar que la mayoría de la muestras no presentó toxicidad, cuando esta se midió con el sistema Microtox®, en el Puerto de Veracruz y en la Costa de Yucatán, solo una muestra presentó toxicidad, mientras que en la Costa de Campeche seis muestras fueron tóxicas, dos en el primer muestreo y cuatro en el segundo. Lo anterior mostró que la presencia de agentes tóxicos en los ambientes muestreados no son lo suficientemente altos, en general, para causar toxicidad aguda.

Tabla 4. Parámetros físico-químicos medidos *in situ* de las zonas muestreadas del Golfo de México.

PUERTO DE VERACUZ.

Estación	Profundidad	T °C	pH	SALINIDAD ‰	CONDUCTIVIDAD (mS/cm)	OD (mg/L)	Nombre del Transecto
1	1.5m	30	7.7	35	60.6	9.36	Isla En medio
2	1.8m	30	7.6	36	59.5	11.56	Isla En medio
3	1.1m	27.7	7.9	35	59.2	13.3	Isla Verde
4	1.6m	29.3	7.9	36.7	58.7	11.8	Sacrificios
5	80cm	26.8	7.7	36.3	58.1	12.85	Galleguilla
6	1m	26.2	8	37	56.6	13	Gallega

SISTEMA ARRECIFAL DE TAMIAHUA.

Estación	Profundidad	T °C	pH	SALINIDAD ‰	CONDUCTIVIDAD (mS/cm)	OD (mg/L)	Nombre del Transecto
1a	1 m	28.3	7.8	36	40.9	3.7	Arrecife de Lobos
1b	1 m	28	7.8	36	41.8	4	Arrecife de Lobos

SISTEMA ARRECIFAL DE TUXPAN.

Estación	Profundidad	T °C	pH	SALINIDAD ‰	CONDUCTIVIDAD (mS/cm)	OD (mg/L)	Nombre del Transecto
1	50 cm	27.5	7.9	36.1	58.2	10.05	Arrecife de Tuxpan

COSTA DE CAMPECHE.

Estacion	Profundidad	T°C	pH	Salinidad ‰	CONDUCTIVIDAD (mS/cm)	OD (mg/L)	Nombre del Transecto
1	3m	29	7.9	30	35.7	5.9	Peten Neyak
2	2m	30	7.3	35	40.2	8.1	Paso Nuevo
3	3m	32	7.3	30	45.6	6.8	Nitum
4	3m	33	7.1	40	45.5	7.2	Vaku
5	5m	27	7.5	35	44.3	8	Rio Verde
6	6m	29	7.8	40	44.3	7.9	El Seco

LAGUNA DE TERMINOS, CAMPECHE.

Estacion	Profundidad	T°C	pH	Salinidad ‰	Conductividad mS/cm	OD(mg/L)	Nombre del Transecto
1	30cm	28.5	8.4	33	47.5	9.5	Cayo Arena
2	1m	27.5	8.5	34	48.6	10.9	Cayo Arena
3	1.5m	27.8	8.8	34	48.5	11.2	Cayo Arena
4	2.1m	29	8.2	26	50.3	12	San Julian
5	1.5m	28	8.4	32	52.2	12	Ensenada de la deseada
6	1.2m	30	7.8	33	54.3	6.13	Bocai
7	1.9m	32	7.6	28	54.4	8.6	Isla pajaros
8	2.2m	32	8.3	27.8	55.5	15.2	Banco Arena
9	2.5m	29.5	8.4	26.3	55.7	7.5	Las pilas

COSTA DE YUCATAN I

Estacion	Profundidad	T°C	pH	Salinidad ‰	Conductividad mS/cm	OD mg/l	Nombre del Transecto
1	2.50 m	32	8.4	37.8	51.7	5.2	Chekuzan
2	3.90m	30.6	7.6	33.5	51.8	6.4	Palabtabche
3	4 m	29.5	8.4	40	60.2	8.2	Boloju
4	80 cm	27.3	7.4	40	58.2	7.2	El cerro

COSTA DE YUCATAN II

Estacion	Profundidad	T°C	pH	Salinidad ‰	Conductividad mS/cm	OD mg/l	Nombre del Transecto
1	2 m	32.1	8.7	24.1	43.5	5.8	Rio hobonche
2	1.80 m	31.7	6.2	35.7	61.2	5.9	Isla Arena
3	2.5 m	28.8	7.3	33.3	69.9	6.8	Playa maya
4	3 m	29	7.2	35	67.2	6.9	Bocana
5	2.5	32	7.5	35	59.4	7.8	Herradura

Tabla 5. Parámetros físico-químicos medidos en el laboratorio de las zonas muestreadas del Golfo de México.

PUERTO DE VERACRUZ.

Estación	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Amonio (mg/L)	Ortofosfat os (mg/L)	Fosforo Total (mg/L)	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua	LC50 (IC)
1	0.3	3	0.05	0.03	0.8	NP	SP	56.51% (55.87 a 57.15)
2	0.2	3	0.08	0.03	0.9	NP	NP	
3	0.3	6	0.02	0.01	3.2	NP	NP	
4	1.2	5	0.03	0.03	1.4	NP	NP	
5	0.7	5	0.25	0.06	0.5	NP	NP	
6	1.3	7	0.03	0.03	1.2	NP	NP	

SISTEMA ARRECIFAL DE TAMIAHUA.

Estación	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Amonio (mg/L)	Ortofosfat os (mg/L)	Fosforo Total (mg/L)	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua
1a	1.6	2	0.05	0.03	0.7	NP	NP
1b	1.8	1	0.07	0.03	0.7	NP	NP

SISTEMA ARRECIFAL DE TUXPAN.

Estación	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Amonio (mg/L)	Ortofosfat os (mg/L)	Fosforo Total (mg/L)	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua
1	0.8	7	0.07	0.04	0.8	NP	NP

COSTA DE CAMPECHE.

Estacion	Nitratos mg/L	Nitritos mg/L	Amonio mg/L	Ortofosfat os mg/L	Fosforo Total mg/L	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua	LC50 (IC)
1	0.5	5	0.10	0.10	0.10	NP	NP	
2	0.5	5	0.1	0.10	0.11	NP	NP	
3	0.8	8	0.13	0.35	2.10	NP	NP	
4	1.3	7	0.13	0.14	1.40	NP	NP	
5	1.8	8	0.25	0.10	2.30	NP	SP	16.94% (66.95)
6	2.3	8	0.30	0.13	3.30	NP	SP	18.65% (67.88)

COSTA DE CAMPECHE.

Estacion	Nitratos mg/L	Nitratos mg/L	Nitratos mg/L	Nitratos mg/L	Nitratos mg/L	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua	LC50 (IC)
1	0.8	6	0.11	0.11	0.12	NP	NP	
2	0.7	7	0.10	0.10	0.11	NP	NP	
3	0.8	6	0.11	0.12	0.12	NP	SP	5.931% (3.530 a 9.965)
4	1.4	8	0.14	0.16	1.42	NP	NP	
5	1.5	9	0.30	0.18	1.52	NP	SP	20.27% (14.41 a 28.50)
6	1.9	9	0.34	0.20	2.21	NP	NP	
7	2.2	10	0.35	0.22	2.35	NP	NP	
8	2.3	11	0.40	0.22	2.36	NP	SP	26.31% (15.56 a 44.48)
9	2.5	11.5	0.45	0.24	2.41	NP	SP	26.29% (15.12 a 45.72)

COSTA DE YUCATAN I

Estacion	Nitratos mg/L	Nitritos mg/L	Amonio mg/L	Ortofosfat os mg/L	Fosforo Total mg/L	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua	LC50 (IC)
1	0.4	6	0.12	0.10	0.12	NP	SP	30.51% (28.91 a 32.20)
2	0.4	6	0.11	0.10	0.13	NP	NP	
3	0.6	9	0.11	0.12	0.90	NP	NP	
4	0.7	7	0.15	0.14	1.02	NP	NP	

COSTA DE YUCATAN II

Estacion	Nitratos mg/L	Nitritos mg/L	Amonio mg/L	Ortofosfat os mg/L	Fosforo Total mg/L	Toxicidad Microtox Sedimento	Toxicidad Microtox Agua
1	1.5	18	0.22	0.28	1.9	NP	NP
2	1.2	15	0.15	0.22	1.3	NP	NP
3	1.7	18	0.2	0.27	1.8	NP	NP
4	1.9	21	0.13	0.16	2.5	NP	NP
5	2	22	0.15	0.18	2.8	NP	NP

BIOMARCADORES

En el anexo I se pueden observar los detalles de los datos morfométricos de los organismos utilizados para la evaluación de los diferentes biomarcadores, el largo varió entre los 4 y los 10 cm, mientras que el ancho osciló entre los 2.2 y los 8.7 cm.

Estabilidad lisosomal. En la tabla 6 se presentan los resultados del tiempo de retención de los organismos que provienen de la Laguna de Pueblo Viejo. Las preparaciones analizadas para esta localidad mostraron que el promedio del tiempo de retención fue de 60 minutos y que a los 90 minutos comenzaban a perder la coloración.

Tabla 6. Tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, de la laguna de Pueblo Viejo.

No. Ostión	Minutos							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
T1	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
T1*	+	+	+	+	+	+	+	180
T2	+	+	+	+	+	+/-	-	120
T3*	+	+	+	+	+	+/-	-	120
T4	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
T4*	+	+	+	+	+/-	-		90
T5	+	+	+	+	+/-	-		90
T5*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120

+ = Más del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

+/- = Menos del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

- = Células sin retención del colorante

* Duplicado de la muestra

En la tabla 7 se presentan los resultados del tiempo de retención de los organismos que provienen de la Laguna de Tamiahua, Veracruz. De las muestras analizadas 25 comenzaron a perder la coloración a los 60 minutos, 16 muestras tuvieron un tiempo de retención mayor a 60 minutos y 2 muestras tuvieron una menor retención menos de 60 minutos.

Tabla 7. Tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, de la laguna de Laguna de Tamiahua, Veracruz.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
T1	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-		90
T1*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T2	+	+	+	+/-	+/-	-		90
T3	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
T4	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T4*	+	+	+	+/-	+/-	-		90
T5	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T5*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
T6	+	+	+	+	+	+	-	120
T6*	+	+	+	+	+	+	+/-	180
T7	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
T8	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
T9	+/-	+/-	-					15
T9*	+	+	+	+	+	+	+/-	180
T10	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	120
T10*	+	+/-	+/-	+/-	-			60
T11	+	+	+	+	-			60

T11*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
T12	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
T13	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
T14	+	+	+	+/-	+/-	-		90
T15	+	+	+/-	-				30
T15*	+	+	+	+/-	-			60
T16	+	+	+	+/-	-			60
T17	+/-	+/-	-	-	-			15
T17*	+	+	+	+	+/-	-		90
T18	+	+	+/-	+/-	+/-	-		90
T18*	+	+/-	+/-	+/-	-			60
T19	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
T19*	+	+	+	+	+	+/-	-	120
T20	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T20*	+	+	+/-	+/-	-			60
T21	+	+	+	+	+/-	-		90
T22*	+	+	+	+	+	+	+	180
T23*	+	+	+/-	+/-	+/-	-		90

+ = Más del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

+/- = Menos del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

- = Células sin retención del colorante

* Duplicado de la muestra

En la tabla 7 se presentan los resultados del tiempo de retención de los organismos obtenidos en la laguna de Alvarado, Veracruz. Los resultados obtenidos para las muestras analizadas en esta localidad todas tuvieron un tiempo de retención de 180 minutos.

Tabla 7. Tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, de la laguna de Laguna de Alvarado, Veracruz.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	Cero	15	30	60	90	120	180	
A1	+	+	+	+	+	+	+	180
A2	+	+	+	+	+	+	+	180
A3	+	+	+	+	+	+	+	180
A4	+	+	+	+	+	+	+	180
A5	+	+	+	+	+	+	+	180

+ = Más del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

+/- = Menos del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

- = Células sin retención del colorante

* Duplicado de la muestra

En la tabla 8 se presentan los resultados del tiempo de retención de los organismos que provienen de la Laguna Carmen Machona en el estado de Tabasco.

Tabla 8. Tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, de la laguna de Laguna Carmen Machona, Tabasco.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
M1	+	+	+/-	+/-	-			60
M1*	+	+	+/-	-				30
M2	+	+	+	+/-	+/-	-		90
M2*	+	+	+/-	-				30
M3	+	+	+/-	-				30
M3*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
M4	+	+	+/-	+/-	-			60
M5	+	+	+	+	+/-	-		90
M5*	+	+	+	+	-			60

M6	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
M6*	+	+	+	+/-	+/-	-		90
M7	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
M7*	+	+	+/-	+/-	-			60
M8	+	+	+/-	-				30
M9	+	+	+	+/-	-			60
M9*	+	+	+	+/-	+/-	-		90
M10	+	+/-	-					15
M10*	+	+/-	+/-	-				30

+ = Más del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

+/- = Menos del 50 % de los lisosomas en las células retienen el rojo neutral.

- = Células sin retención del colorante

* Duplicado de la muestra

Los organismos de las localidades de Alvarado Ver., Laguna de Términos Campeche y Laguna de Tamiahua tuvieron un tiempo de retención mayor, lo que sugiere que no tienen un daño significativo. Sin embargo, estos organismos no se analizaron inmediatamente que llegaron al laboratorio ya que se mantuvieron en acuarios por más de 30 días, lo que permitió que los organismos se depuraran y al estar en un ambiente estable e ideal, se pudieron presentar procesos de reparación en estos.

En la figura 20 se graficó el tiempo de retención de las diferentes localidades con la finalidad de comparar los tiempos de retención del colorante, no se observaron diferencias significativas entre las localidades. Las muestras de Alvarado, Veracruz tuvieron el mayor tiempo de retención (3 horas). Para las muestras obtenidas de la Laguna Carmen y Machona, Tabasco los tiempos de retención fueron los más bajos (75 min).

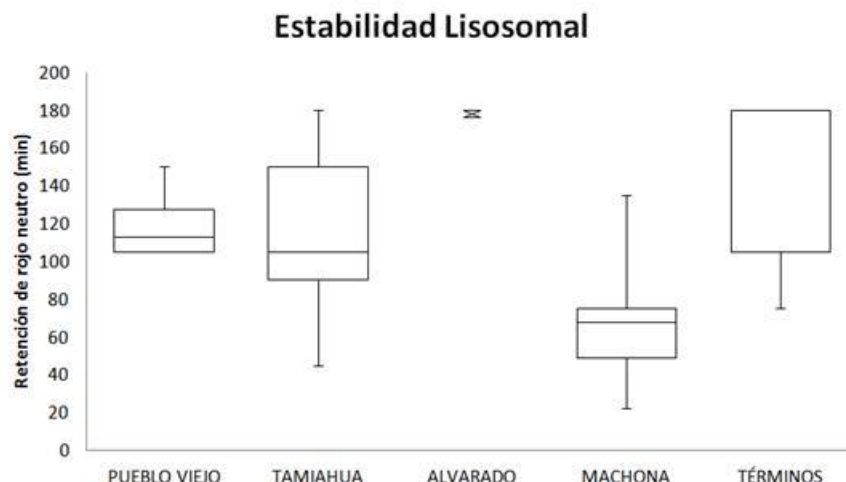


Figura 20. Retención de rojo neutro en ostiones del Golfo de México.

Los resultados obtenidos (Fig. 19) muestran diferencias significativas con respecto a la laguna de Alvarado, debido a que estos organismos tuvieron un tiempo mayor de aclimatación y depuración, por lo que su tiempo de retención del colorante rojo neutro en sus hemocitos fue el más alto. Las muestras de la Laguna Carmen Machona y la Laguna de Pueblo viejo en Tamaulipas fueron los que tuvieron el menor tiempo de retención, lo que parece reflejar una menor condición de estos ostiones respecto al resto de los organismos evaluados.

Adicionalmente, las condiciones ambientales jugaron un papel importante en los resultados, pues la temperatura promedio en las lagunas fue de 30°C, y la temperatura óptima para estos organismos es de alrededor de 20°C (Wallace 2001, Wilson *et al.*, 2005). Por su parte el promedio de la salinidad fue 29.2 ‰, y óptimo para el cultivo de esta especie es de 35 ‰ (Buroker 1983).

La retención de rojo neutro (NRR) es un ensayo que mide el daño lisosomal siendo este un indicador integrado y rápido del estado de salud de un organismo, y se aplica con éxito en organismos marinos. Es bien sabido que la desestabilización lisosomal está asociada con la exposición a contaminantes (Lowe y Fossato, 2000; Moore, 1982; Regoli *et al.*, 1998.; Ringwood *et al.*, 1998), el cambio de las condiciones ambientales y la temporada (Ringwood *et al.*, 2002; Hauton *et al.*, 1998), la inoculación bacteriana (Hauton *et al.*, 2001), etc.

En el presente estudio, no se detectaron diferencias en la NRR entre las localidades evaluadas, sin embargo la menor retención de los organismos que tuvieron la oportunidad de depurarse indicó que la técnica de estabilidad lisosomal fue un método sensible para indicar el estado de salud de los organismos; por lo tanto este biomarcador puede utilizarse como indicador del estado de salud de los organismos en un programa de monitoreo de la calidad de los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, hace falta completar este estudio con evaluaciones de organismos obtenidos en la época de LLUVIAS/SECAS para contar con información sobre la variación natural de este biomarcador, que como se ha mencionado se modifica al cambiar la temperatura y la salinidad, así como ante la presencia de contaminantes.

Acetilcolinesterasa

En la figura 21 se observan los resultados de la actividad de la AChE de glándula digestiva de ostiones de las cinco lagunas muestreadas, se comparan los lotes de organismos con aclimatación corta y larga (controles). En primer lugar se aprecia que no hay diferencias significativas entre las muestras procesadas después de una corta aclimatación. Sin embargo, la actividad de los grupos controles si es mayor, lo que indica una mejor condición de los ostiones. Entonces, la menor actividad de la AChE en las muestras con aclimatación corta puede deberse al estrés ambiental al que estuvieron expuestos los animales, tales como las variaciones del ambiente y probablemente diferentes contaminantes. En el caso de los controles, la actividad enzimática es mayor en casi todos los casos, situación que se atribuye al largo período de aclimatación que les permitió a los organismos depurarse en comparación con los otros animales. Esto se hizo de manera deliberada ya que se quería observar si el período de depuración al mejorar la condición de los organismos, causaba diferencias detectables en este biomarcador, lo cual ocurrió excepto en el caso de los organismos de la laguna de Alvarado, ya que no hubo oportunidad de procesar los organismos con prontitud y ambos grupos estuvieron en aclimatación por más de un mes. Las concentraciones de proteína se pueden consultar en el Anexo II.

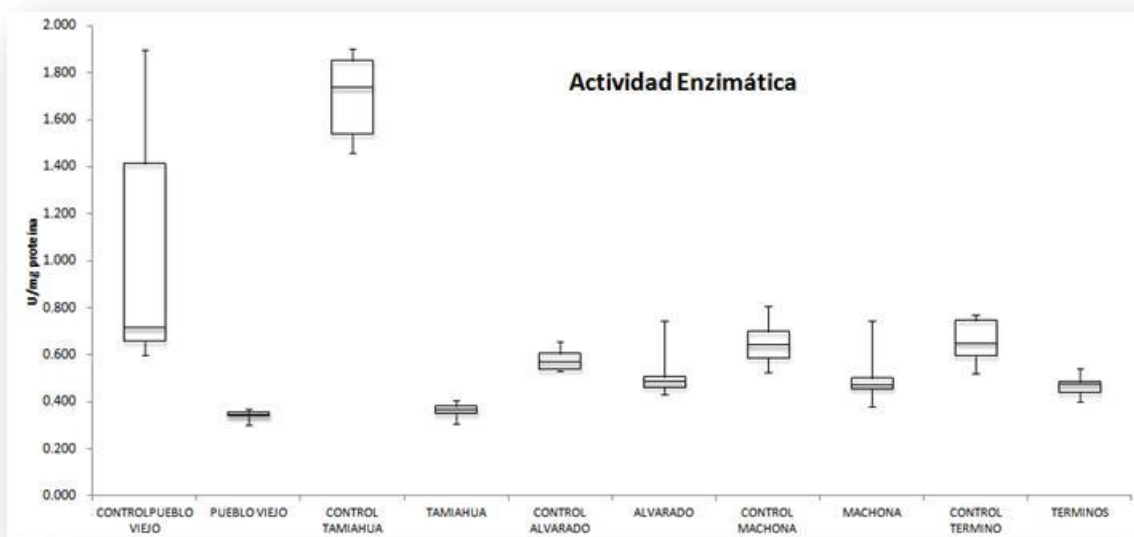


Figura 21. Comparación de la actividad enzimática AChE en ostiones de las lagunas del Golfo de México (muestras vs. controles).

En la figura 22 se muestran los valores de la actividad enzimática de la AChE tanto para las proteínas débilmente unidas a la membrana (S1) como para las proteínas fuertemente unidas a la membrana (S2). El propósito de esta separación es ver si alguna de las fracciones es más o menos sensible a la aclimatación o el estrés ambiental. Sin embargo, como se puede observar, en general, no hay diferencias entre sus respuestas, siendo la respuesta de ambas fracciones mayores en los organismos de los grupos control, lo cual fue explicado en el párrafo anterior. Una particularidad de estos gráficos es que en ellos si se observa una diferencia entre los dos grupos de la laguna de Alvarado y aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa, si se puede observar que la fracción S2 es mayor en el grupo control.

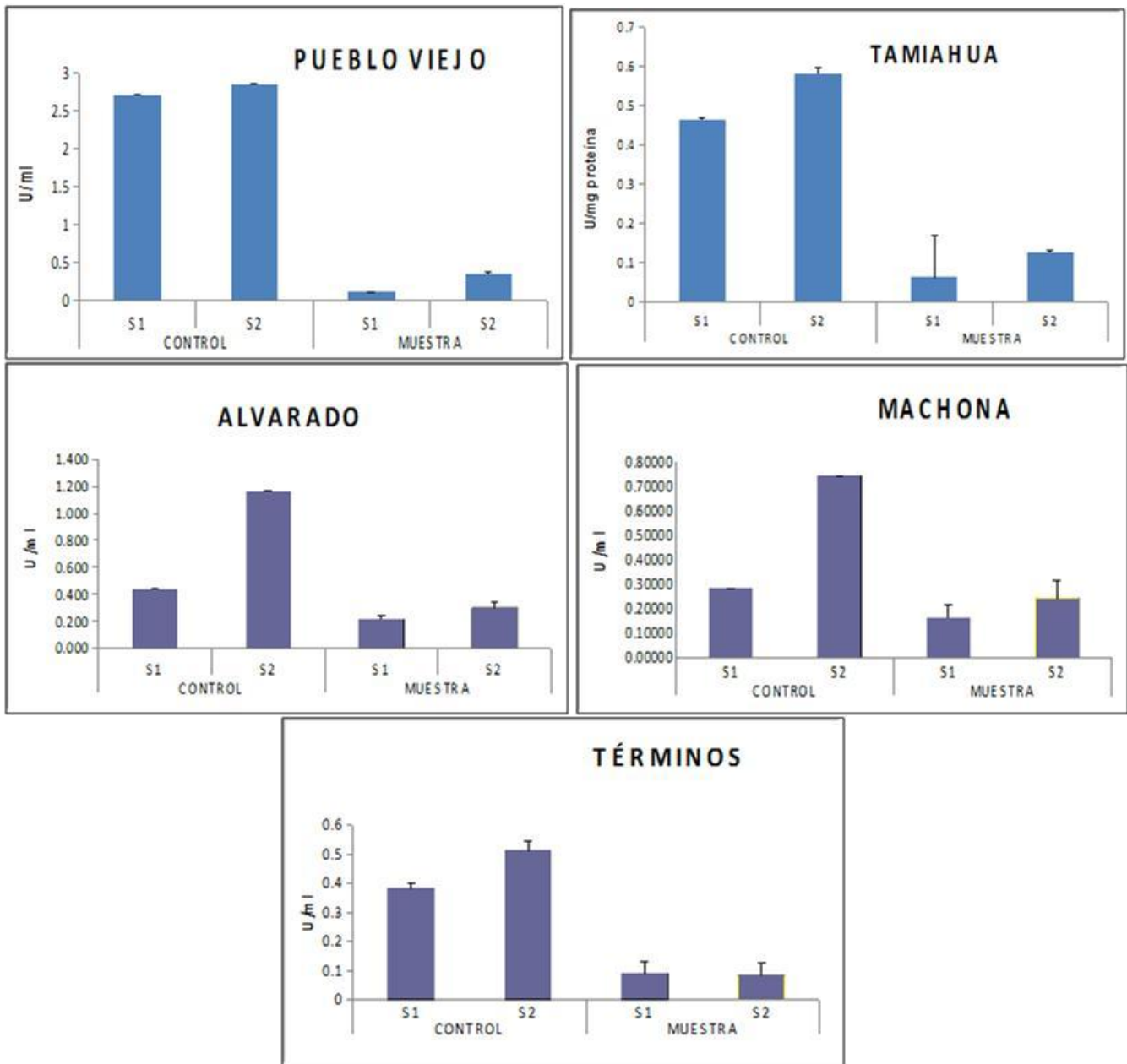


Figura 22. Comparación de la actividad enzimática de los ostiones de las diferentes localidades con su control (U/mL). S1: proteínas débilmente unidas a la membrana. S2: proteínas fuertemente unidas a la membrana.

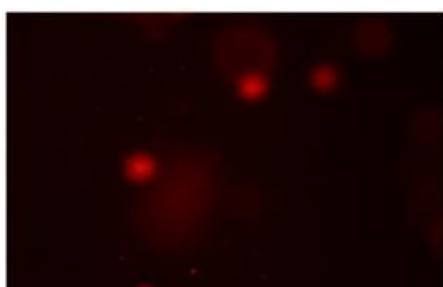
Ensayo cometa.

En la tabla 9 se muestran las diferentes categorías de daño en la cadena de ADN con base en la longitud promedio, en la figura 23 se presentan los diferentes niveles de daño que se identificaron visualmente.

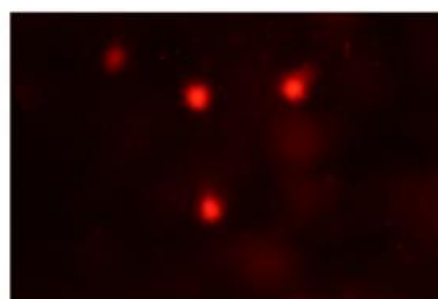


TABLA 9. Clasificación del daño en la cadena de ADN con base en la longitud promedio de la migración del ADN.

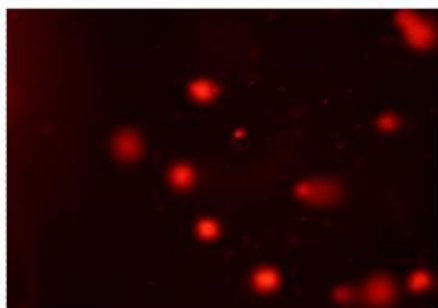
Estadio	Longitud promedio (μm)	Categoría del daño
1	0	Sin daño
2	1-20	Bajo
3	21-60	Medio
4	60-80	Alto
5	80-140	Total



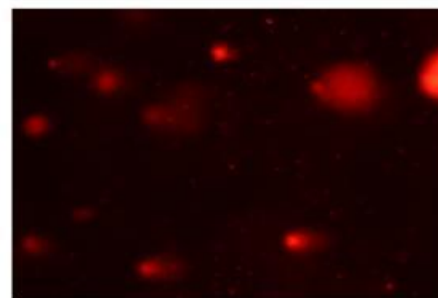
Sin daño 0 μm



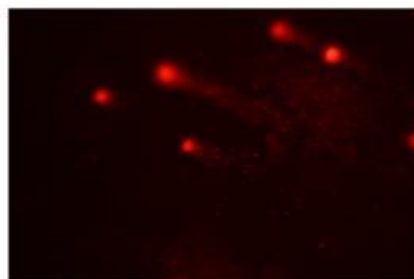
Daño bajo 1-20 μm



Daño medio 21-60 μm



Daño alto 61-80 μm



Daño total 81-140 μm

Figura 23. Ejemplos de los diferentes niveles del daño al ADN: valoración cualitativa visual de la longitud del cometa de *C. virginica* del Golfo de México.

Porcentaje de daño

Al analizar el porcentaje de daño en la tabla 10 se observa que los organismos de las localidades que tienen el mayor número de células sin daño fueron las Lagunas de Alvarado con 18.14%, y Carmen Machona con 32.2 %, seguido de la Laguna de Tamiahua (12.9 %) y finalmente la Laguna de Términos (12 %). El porcentaje de daño bajo se observa en Carmen Machona con 110 células que representa el 38.06 % del lote analizado seguido de Tamiahua con 33.4 %, Alvarado con 27.4 % y Laguna de Términos con 28.9 %. Para daño medio se observa que Tamiahua (21.13 %) > Alvarado (20.8 %) > Laguna de Términos (19.72 %) > Carmen Machona (18.34 %). Se observó daño alto (61- 80 μm) y total (81>200 μm) en todas las localidades sin embargo los sitios de estudio que tuvieron el mayor porcentaje de daño fueron la Laguna de Tamiahua (25.9 %) y la Laguna de Términos (28.9 %).

Tabla 10. Número de células por categoría de daño, de las células de *Crassostrea virginica*.

Muestra	Total de células	Sin daño (0 μm)	Bajo (1-20 μm)	Medio (21-60 μm)	Alto (61-80 μm)	Total (81>200 μm)
Tamiahua	317	41	106	67	21	82
Alvarado	226	84	62	47	15	18
Machona	289	93	110	53	12	21
Términos	142	17	41	28	15	41

En la tabla 11, se presentan los datos de longitud promedio obtenidos para cada localidad, el lote de Tamiahua fue el que tuvo la mayor longitud promedio 57.3 μm seguido del lote de Términos, con un promedio de 54.7 μm y los que tienen el menor promedio en la longitud del cometa fueron Alvarado (18.64 μm) < Tabasco (22.8 μm).

Tabla 11. Longitud promedio de la cola del cometa (μm) y desviación estándar calculadas para cada localidad.

Localidad	Tamiahua	Alvarado	Tabasco	Campeche
Promedio	54.72	18.64	22.8	57.27
Des. Std.	65.97	20.22	36.01	53.07

El análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los lotes de células analizadas de todas las localidades (Fig. 24) aunque se puede identificar que las lagunas de Alvarado y Carmen Machona fueron los sitios en los que los ostiones presentaron menor daño en la cadena de ADN.

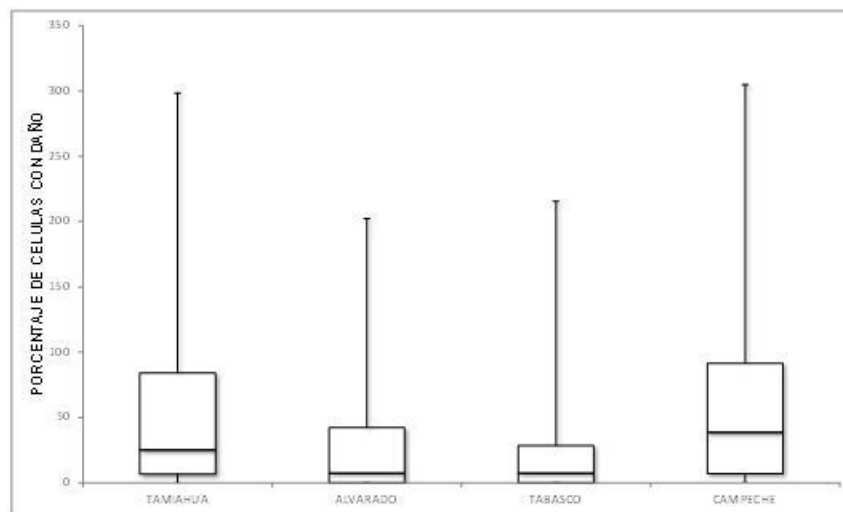


Figura 24. Porcentaje de células que presenta daño en el ADN por localidad.

El ensayo cometa permitió identificar las diferentes categorías de daño, las cuales se evidenciaron en las diferencias de la longitud de la migración del ADN. La longitud de la cola es un indicador de la ruptura de las hebras (Sotil *et al.*, 2007).

Todas las células de los sitios de estudio mostraron daño, las lesiones observadas en los ostiones de *C. virginica* pueden ser producto de cambios estacionales y de las características fisiológicas del propio organismo, como por ejemplo el estado hormonal (Sotil *et al.*, 2007), así como del tipo de alimento, es decir una dieta con agentes antioxidantes protege al organismo contra el daño en el ADN (Wilson, 1998).

Wilson *et al.*, (1997) reportaron un daño basal en la cadena de ADN en el mejillón *Mytilus edulis*, donde explican que en los organismos aeróbicos el ADN está constantemente expuestos a radicales oxígeno: endógenos, exógenos y oxidantes relacionados que pueden inducir estrés oxidativo (Pacifi y Davies 1991). Estos dos trabajos pueden explicar porque se presenta un daño basal en las células de *C. virginica* en los diferentes sitios de estudio, ya que por un lado pueden producirse radicales oxígeno provocando estrés oxidativo y por lo tanto daño en la cadena de ADN, y por el otro factores como la edad, el tamaño del organismo, el tiempo de la colecta, parámetros ambientales, régimen alimenticio y condiciones de exposición a contaminantes (Wilson, 1998).

El ensayo cometa resultó ser una técnica conveniente para evaluar el daño en el ADN en ejemplares de *C. virginica*, los resultados obtenidos en los análisis realizados en el presente estudio coinciden con la capacidad para detectar daño en el ADN en experimentos realizados con otros moluscos reportados por otros autores (Mitchelmore *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Hamoutene *et al.*, 2002; González 2004; Cheung *et al.*, 2006; Laffon *et al.*, 2006 y Sotil *et al.*, 2007).

Al comparar los resultados del presente estudio, con datos de otros trabajos se encontró que para *C. virginica*, en tejido branquial, el nivel de daño fue de 43.69 μm (Razo 2000) mientras que para los ostiones de la laguna de Alvarado y Carmen Machona fue menor: 18.64 μm y 22.8 μm respectivamente; pero menor comparado con los animales de las lagunas de Términos (57.27 μm) y Tamiahua (54.72 μm). En otro trabajo para la misma especie se reportó un daño basal promedio de 35.5 μm (González, 2004) que corresponde a un daño medio de acuerdo a las categorías identificadas en el presente trabajo; este valor es mayor en algunas localidades (Alvarado y la Machona) y menor en Tamiahua y Términos. Como información adicional de daño basal en moluscos bivalvos se puede mencionar el trabajo de Cheung *et al.*, (2006), en el que se encontró un daño basal en hemocitos para *Cerastoderma edule* y *Mytilus edulis*. Los resultados tuvieron un rango de 0 a 30 μm que representa un daño medio. Por otra parte, Hamoutene *et al.*, (2002) también demostraron en dos moluscos bivalvos *Mytilus edulis* y *Mya arenaria* daño en organismos control en la glándula digestiva

después de 7 y 12 días de aclimatación, así en *M. edulis* los cometas tuvieron una longitud promedio de $46.2 \mu\text{m}$ (± 12.25) y $28.92 \mu\text{m}$ (± 6.7) respectivamente y en hemocitos fue de $22.6 \mu\text{m}$ (± 6.3) y $19.4 \mu\text{m}$ (± 19.4). Para *M. arenaria* en el mismo periodo de aclimatación, empleando la glándula digestiva, la longitud de los cometas fue de $34.31 \mu\text{m}$ (± 6.29) y $22.1 \mu\text{m}$ (± 12.13) y para hemocitos fue de $22.85 \mu\text{m}$ (± 4.8) $23.9 \mu\text{m}$ (± 7.44).

Laffon *et al.*, (2006), detectaron también un daño basal en células de branquia de la almeja *Mytilus galloprovincialis* en sitios de referencia o poco contaminados, presentando una longitud promedio de $20 \mu\text{m}$, que corresponde a un daño bajo comparado con los resultados del presente trabajo.

El presente estudio demuestra que el ensayo cometa es un buen biomarcador de efecto que ha sido empleado como una técnica de importancia potencial en la elaboración de planes de monitoreo, antes y después de eventos de contaminación por petróleo, por lo tanto es importante el uso de biomarcadores para evaluar las condiciones de salud de los organismos acuáticos en caso de un derrame o cualquier tipo de contaminación. (Hamoutene *et al.*, 2002; Laffon *et al.*, 2006 y Mamaca *et al.*, 2005).

Evaluaciones histopatológicas.

El índice de estado en los organismos colectados fue alto (tabla 12). Esto significa que los parámetros alométricos y las condiciones alimenticias fueron adecuados. El índice de condición (IC) fue diferente en cada zona de colecta. El IC, del valor más alto al más bajo, fue; 1) Carmen Machona 2) Alvarado 3) Tamiahua 4) Términos y 5) Pueblo Viejo.

En el análisis macroscópico se identificaron organismos asociados como: mejillones, balanos, cangrejos, poliquetos y esponjas. No se observaron lesiones aparentes.

Tabla 12. Datos Morfométricos e Índice de condición (IC) de moluscos bivalvos colectados en la línea base del Golfo de México.

Lugar y fecha de colecta	Términos 25.03.2011.	Alvarado 16.05.2011.	Machona 09.06.2011.	Tamiahua 16.07.2011	Pueblo Viejo 21.09.2011.
No. de organismos procesados	41	30	44	25	42
No. de cortes	90	45	132	45	27
Longitud (cm)	6.5	7.4	7.5	7.6	7.5
Ancho (cm)	4	5	4	5	5
Alto (cm)	3	3	2	3	3
Peso (gr)	3	9	4	4.5	5.8
I.C.	138	212	228	195	12.22

Análisis Tisular en Bivalvos.

La descripción del análisis tisular se hace ordenando las localidades del valor más alto del IC al menor.

Laguna Carmen Machona, Tabasco. Se analizaron organismos de dos puntos de colecta. En los cortes histológicos, de la parte media de los organismos, se observó; El músculo abductor, regiones del manto, de la branquia y parte de la gónada. La gónada presentó diferentes estadios de desarrollo (desde el desarrollo, madurez hasta el postdesove y reabsorción). La relación hembra-macho de los 10 organismos analizados del PM 1 (punto de muestreo) fue 4:1 en 5 organismos no se observó la gónada. En los ostiones colectados en el PM 2 de 14 solo 9 desarrollaron gónada, La relación fue 8:1. Estos resultados indican que la presencia de la gónada femenina es más frecuente.

En el canal alimentario, fue posible observar los palpos, intestino, saco del estilete, así como, abundante alimento presente en el estómago y túbulos digestivos (Fig. 25).

El tejido conjuntivo presentó vesículas de diferente tamaño que corresponden a las denominadas células cafés en bivalvos.

En los organismos colectados en el segundo punto de colecta, se observaron las mismas características tisulares. Sin embargo, en los cortes fue evidente la presencia de secreciones eosinofilas en la branquia y la presencia de microvellosidades de revestimiento en el tracto digestivo.

Con algunas excepciones (organismo 25) se observaron alteraciones tisulares posiblemente no progresivas, con respuestas primarias inflamatorias. Algunos túbulos se encontraron deteriorados (organismo 28, 29, 30).

En resumen dentro de los parámetros evaluados para el diagnóstico podemos señalar que los ostiones de la laguna del Carmen Machona Tabasco fueron predominantemente femeninos con un estado de la gónada; entre maduro (2) a post-desove (4). Con respecto al contenido Intestinal se observó alimento en varias vueltas del tracto digestivo; las infiltraciones fueron reacciones moderadas; las anomalías como ausencia de epitelio o deformidades solo se observaron

en 1% de organismos analizados; las células cafés, se presentaron asociadas a los organismos con deformaciones (organismos 28 y 29) y con necrosis focal.

El estado de los túbulos de la glándula se asocia con la fase de absorción y desintegración principalmente (Fig. 26). Estos organismos fueron colectados en junio, con desarrollo de gónada y registro de alimento en el canal alimentario.

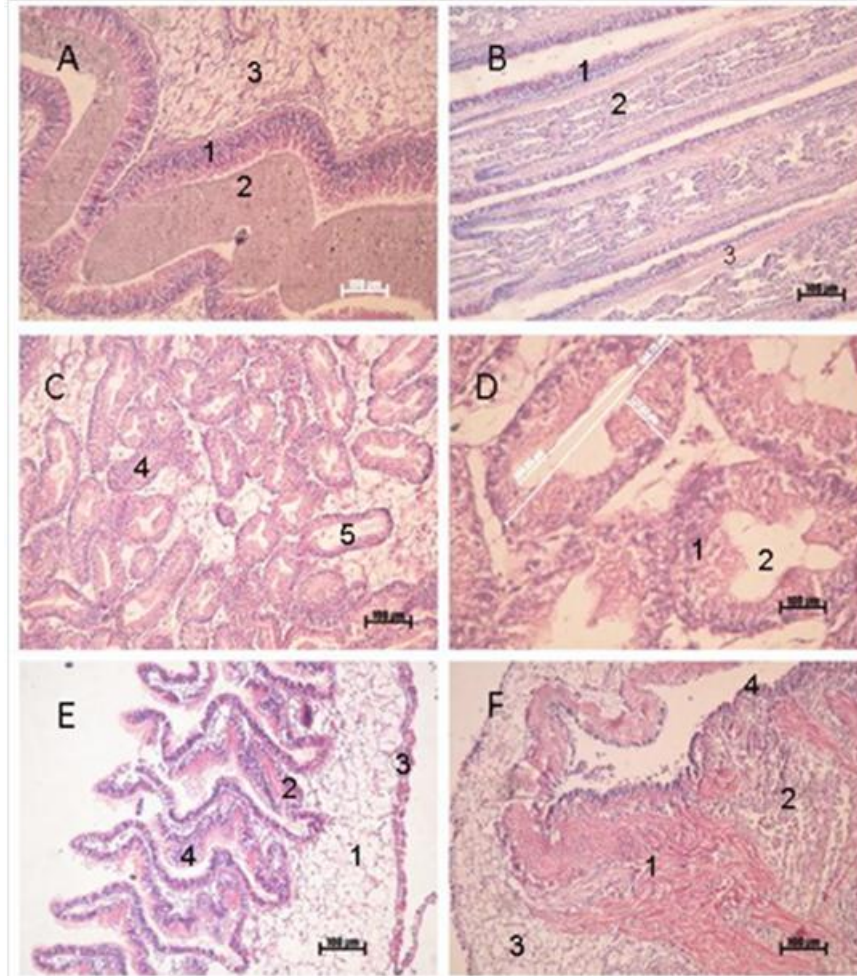


Figura 25. Secciones del canal alimentario, branquias y regiones del manto en organismos colectados en la Laguna de Carmen Machona, Tabasco. En A, se observan los epitelios de recubrimiento del tracto digestivo (1); restos de alimento (2); y tejido conjuntivo periférico (3). En B, las laminillas branquiales con abundantes secreciones (1), los ductos de las branquias y tejido, tinción eosinófila subyacente a los epitelios (3); en C, aspectos de los túbulos de la glándula digestiva sin lumen (4) y con presencia de lumen (5); en D, un acercamiento de los túbulos digestivos, células basofílicas con revestimientos epiteliales de aproximadamente 127 micras (1) y lumen de forma irregular con un diámetro aproximado de 364 a 546 nanómetros (2); En E, observe la estructura del esófago, el tejido conjuntivo (1), secreciones (2) y (3) y microvellosidades (4); y en F, un lóbulo del manto, haces musculares (1), infiltraciones (2), tejido conjuntivo (3) y secreciones apicales (4). Cortes 5 micras. Tinción H-E.

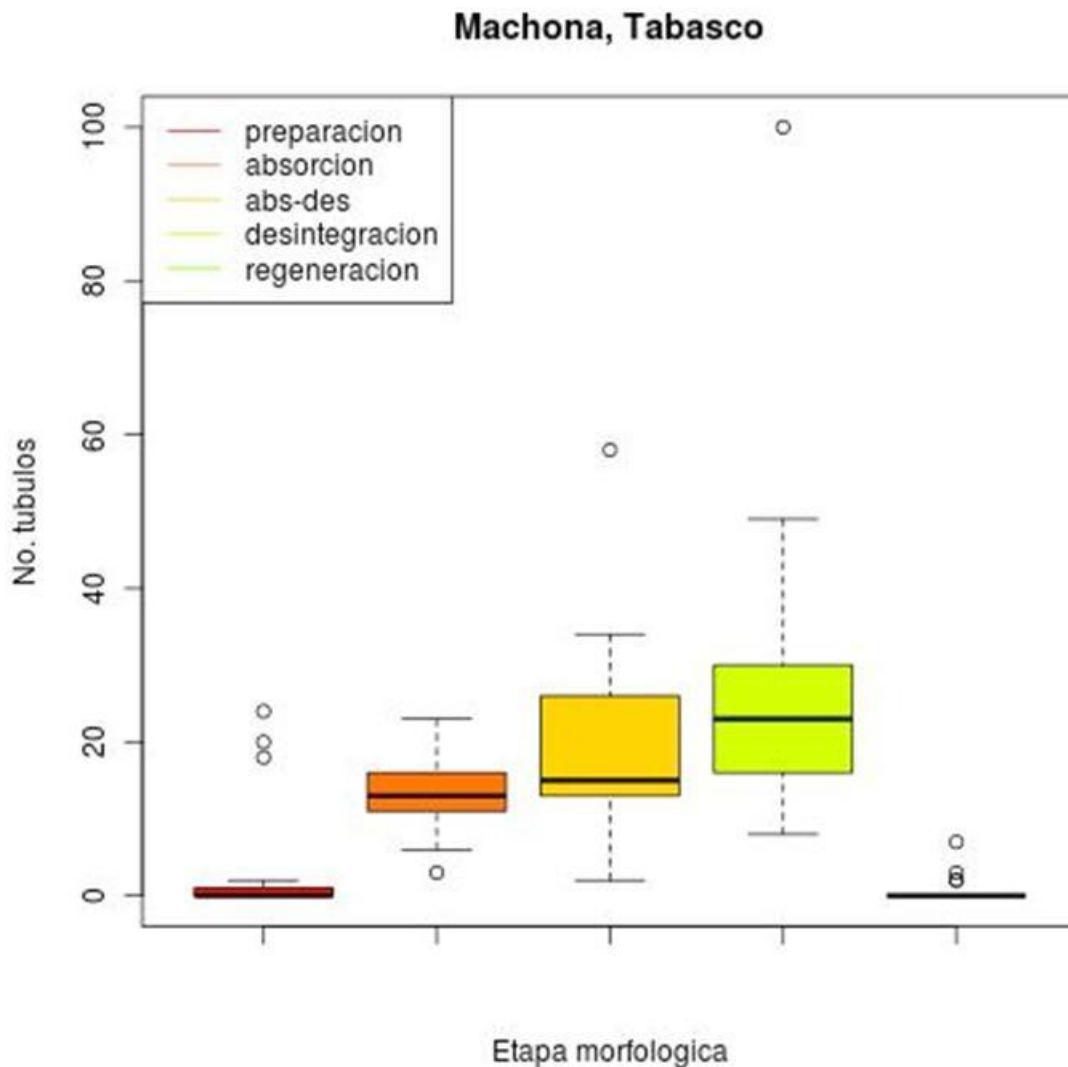


Figura 26. Fases predominantes de los túbulos de la glándula digestiva.

Laguna de Alvarado, Veracruz.

Los ostiones colectados en Alvarado Veracruz presentaron la gónada predominantemente madura (2), la relación hembra-macho fue 6:5.

En los ostiones colectados en la laguna de Alvarado, se observaron infiltraciones de hemocitos (pocos) alrededor del epitelio intestinal y estomacal. Gran cantidad de los túbulos se observaron con los epitelios desintegrados o sin luz central (Fig. 26).

Es evidente la presencia de células cafés (alrededor de 15 células cafés en un campo de 10x), así como, secreciones ceroides en algunos ostiones (ostiones 12 y 17). Se observó necrosis focal en el tracto digestivo, y abundantes secreciones eosinofilas.

Los túbulos de la glándula digestiva al parecer estuvieron predominantemente en fase de desintegración y reconstrucción (40 de 60), se observó la membrana basal que sostiene las microvellosidades. Algunos túbulos presentaron diámetro intermedio y compartimiento piramidales, en la luz de la mayoría de los organismos existe abundante secreciones eosinofilas así como en la base de los túbulos (Fig. 27).

En la gónada masculina, las branquias y el esófago se observó fuerte actividad de secreción.

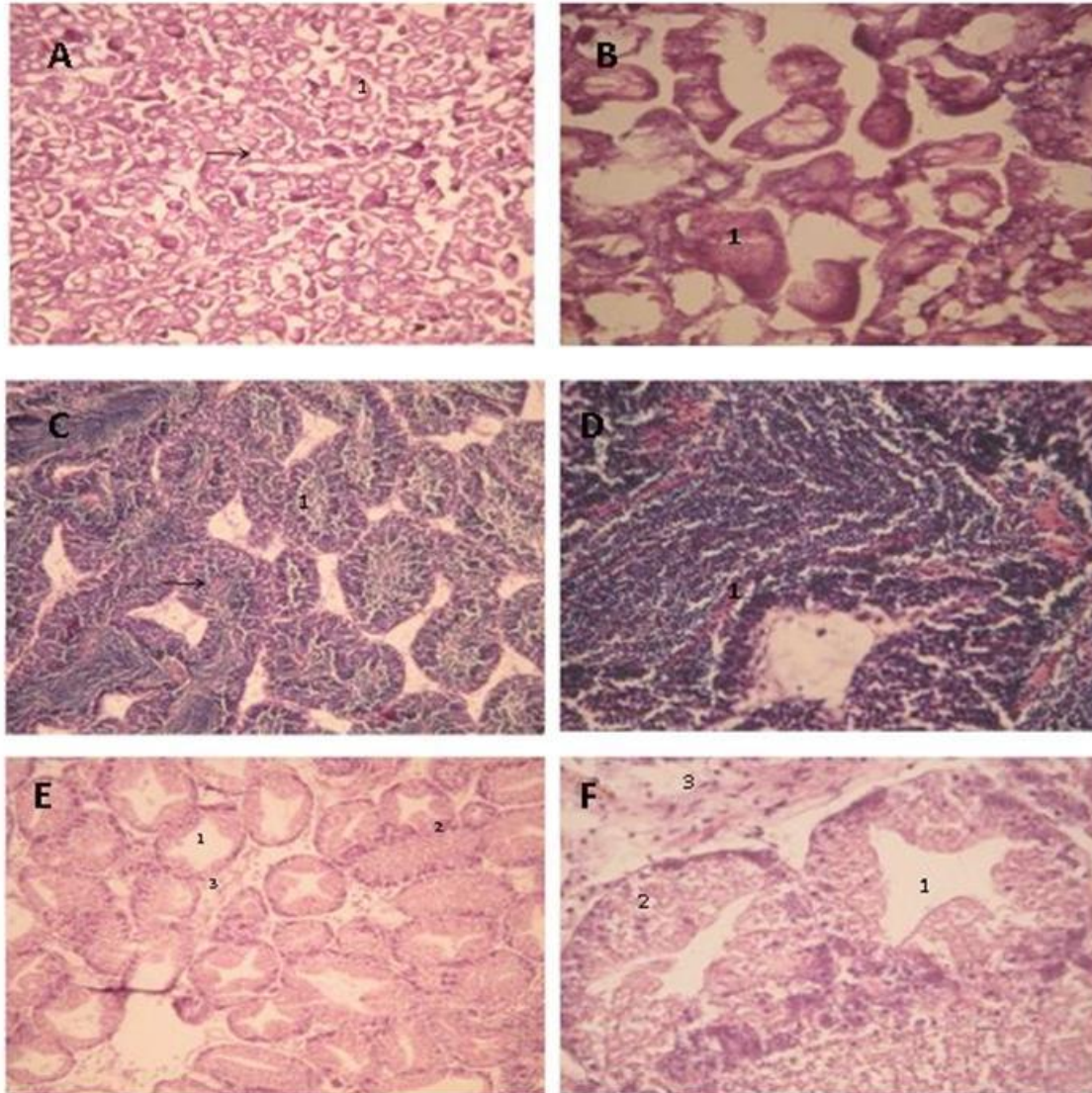


Figura 27. Secciones tisulares colectadas en Alvarado, Veracruz. En A, aspecto general de la gónada femenina; en B, ovocitos en etapa inmadura; en C, aspecto de la gónada masculina; en D, observe las abundantes secreciones intratubulares en la gónada masculina; en E, túbulos de la glándula digestiva con lumen irregular (1 en E y F), abundante tejido conectivo entre los túbulos (2). Cortes a 5 micras. Tinción H-E.

Alvarado, Veracruz

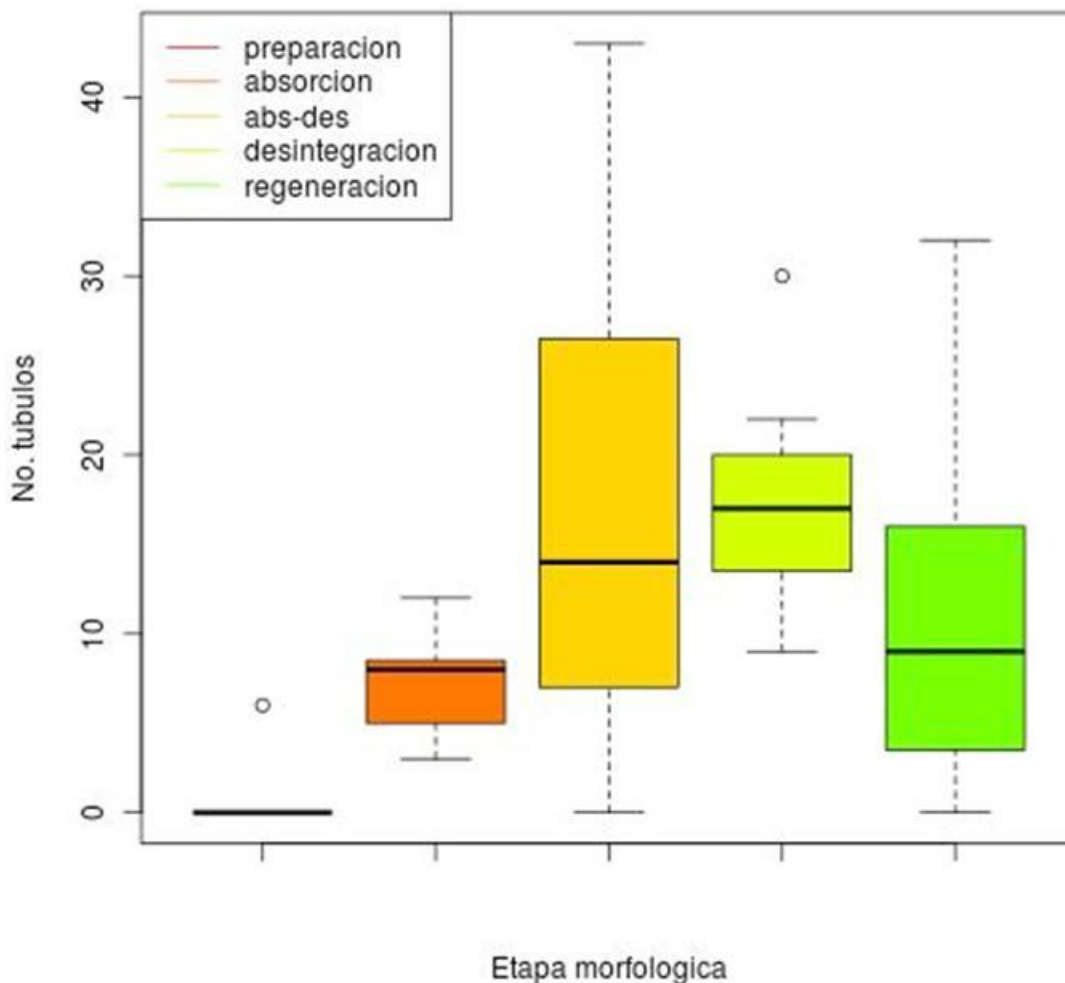


Figura. 27. Etapas predominantes en la glándula digestiva

Laguna de Tamiahua, Veracruz.

En algunos ostiones colectados en Tamiahua, Ver., se observó destrucción de la membrana basal, aspectos inflamatorios severos, tejido conectivo amorfo. Se pueden observar restos de lo que fuera gónada femenina. Los epitelios de recubrimiento en los túbulos, están ausentes, en más de la mitad de los animales. Asimismo, se observaron focos inflamatorios, numerosas células cafés así como infiltración de hemocitos en el tejido conectivo (Fig. 28).

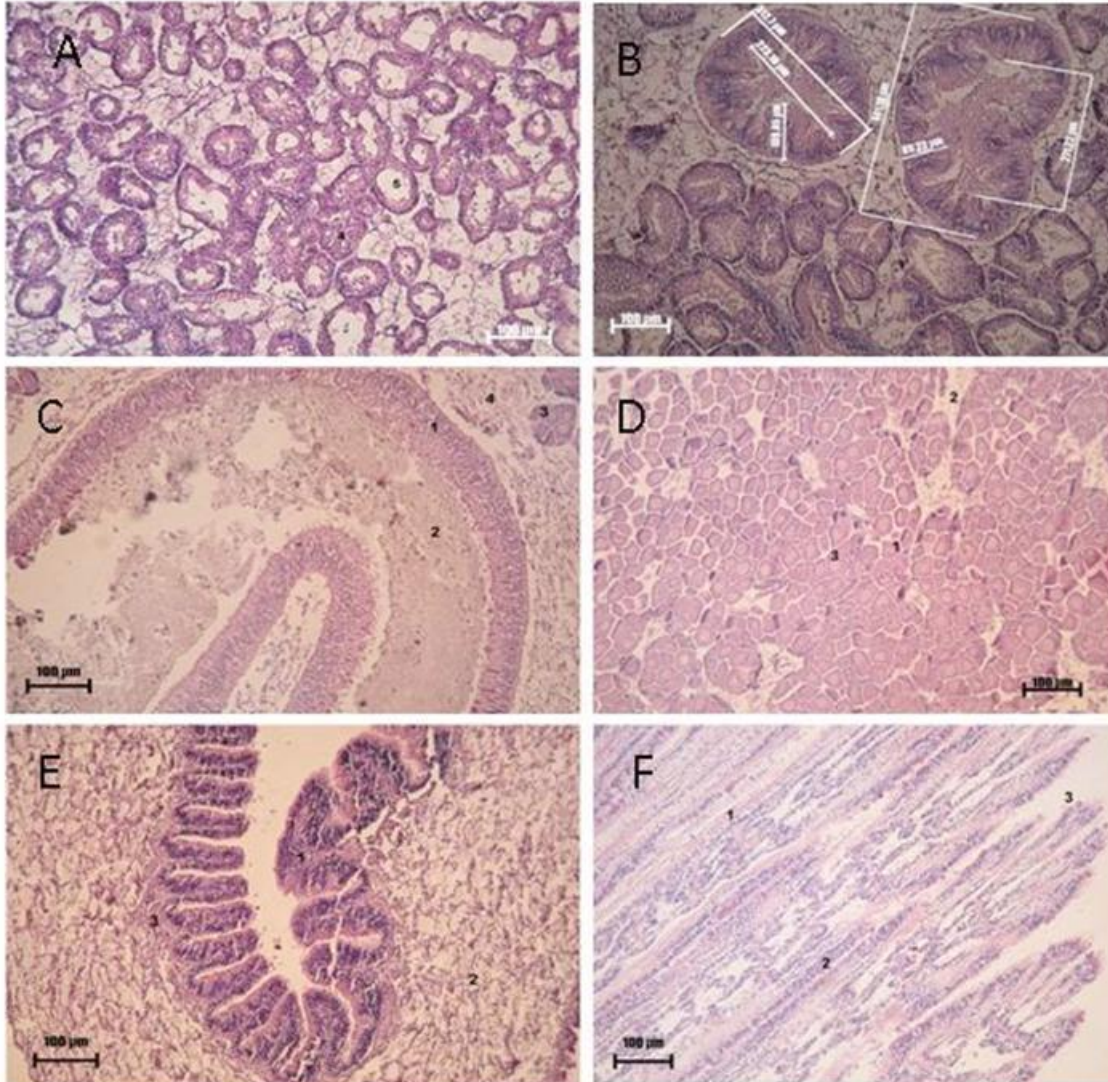


Figura 28. Cortes histológicos de ostiones de Tamiahua, Veracruz. En A, se observan los túbulos de la glándula digestiva; en B, se observa el aspecto tubular del tracto digestivo (entre 300 a 441 micras) con un amplio epitelio de revestimiento de aproximadamente 90 y 109 micras. Y un lumen irregular entre 271 a 223 micras. En C, se observa el epitelio del tracto digestivo (1) con contenido de alimento (2). En D, se observa la gónada femenina con ovocito (1 y 3) y tejido conjuntivo (3). En E, aspecto del esófago con secreciones (1) y tejido conjuntivo. En F, laminillas branquiales con abundantes secreciones (1). Cortes a 5 micras. Tinción H-E.

Laguna de Términos, Campeche.

En el lumen de los túbulos, las secreciones y vacuolización son evidentes. En el tracto digestivo, no se observaron restos de alimento y los epitelios intestinales en algunos organismos presentan infiltraciones y metaplasia (Fig. 29). La glándula digestiva de los organismos muestra características heterogéneas, no se aprecia la luz de los túbulos, la fase correspondería a un proceso de desintegración (Fig. 30). Se observó la gónada femenina y masculina en relación 6:5.

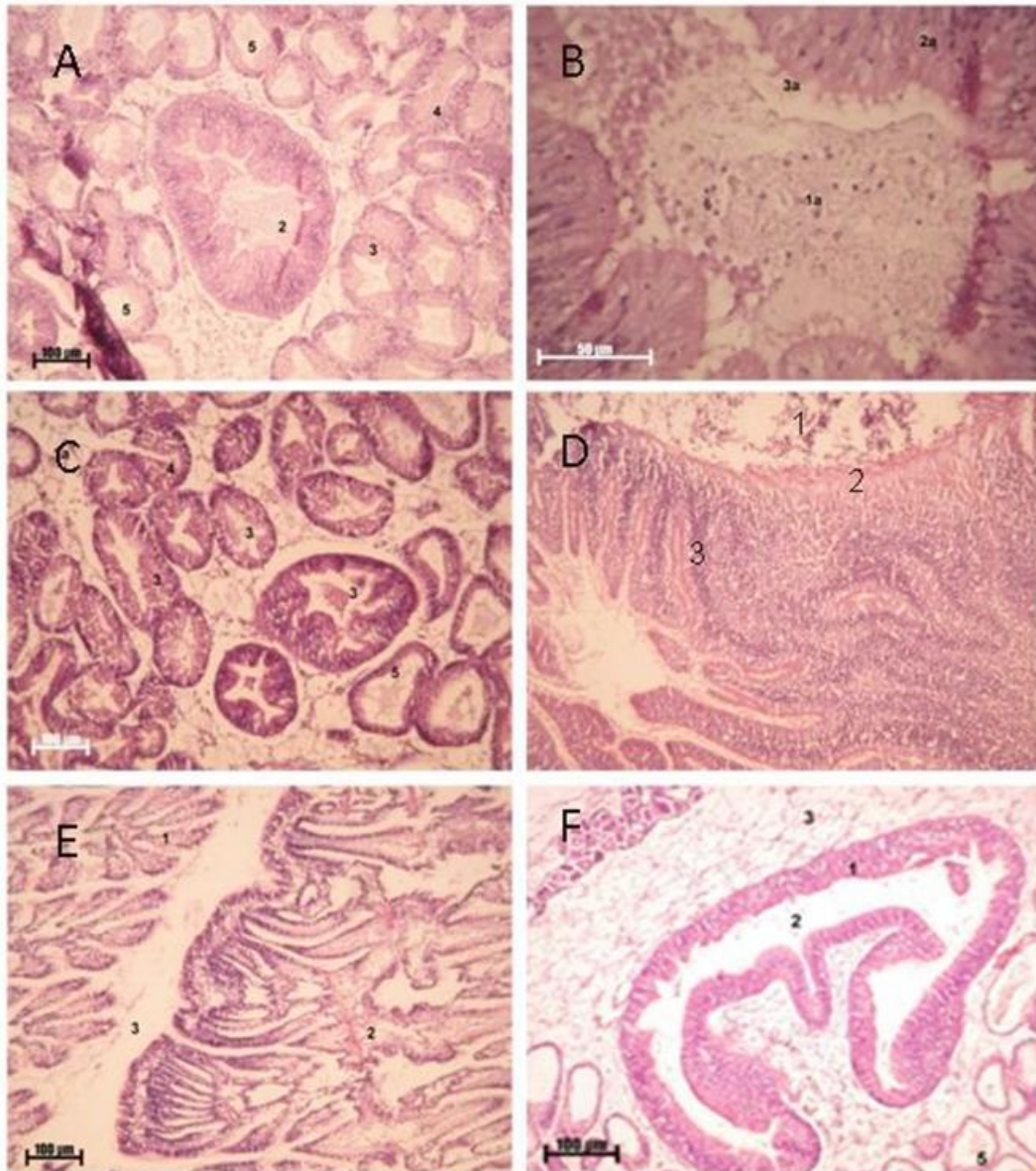


Figura 29. Aspecto tisular de secciones tisulares colectadas en Términos, Campeche. En A, se observa el aspecto tubular del tracto digestivo con alimento o secreciones (2). En B, acercamiento del tracto digestivo donde se observa el epitelio estratificado (2a) revestido con microvellosidades (3a). En C, se observan túbulos digestivos con lumen irregular (3). En D, se observa una fuerte infiltración que no permite identificar la estructura. En E, laminillas branquiales con algunas secreciones (2). En F, se observa el estómago con un amplio lumen (2).

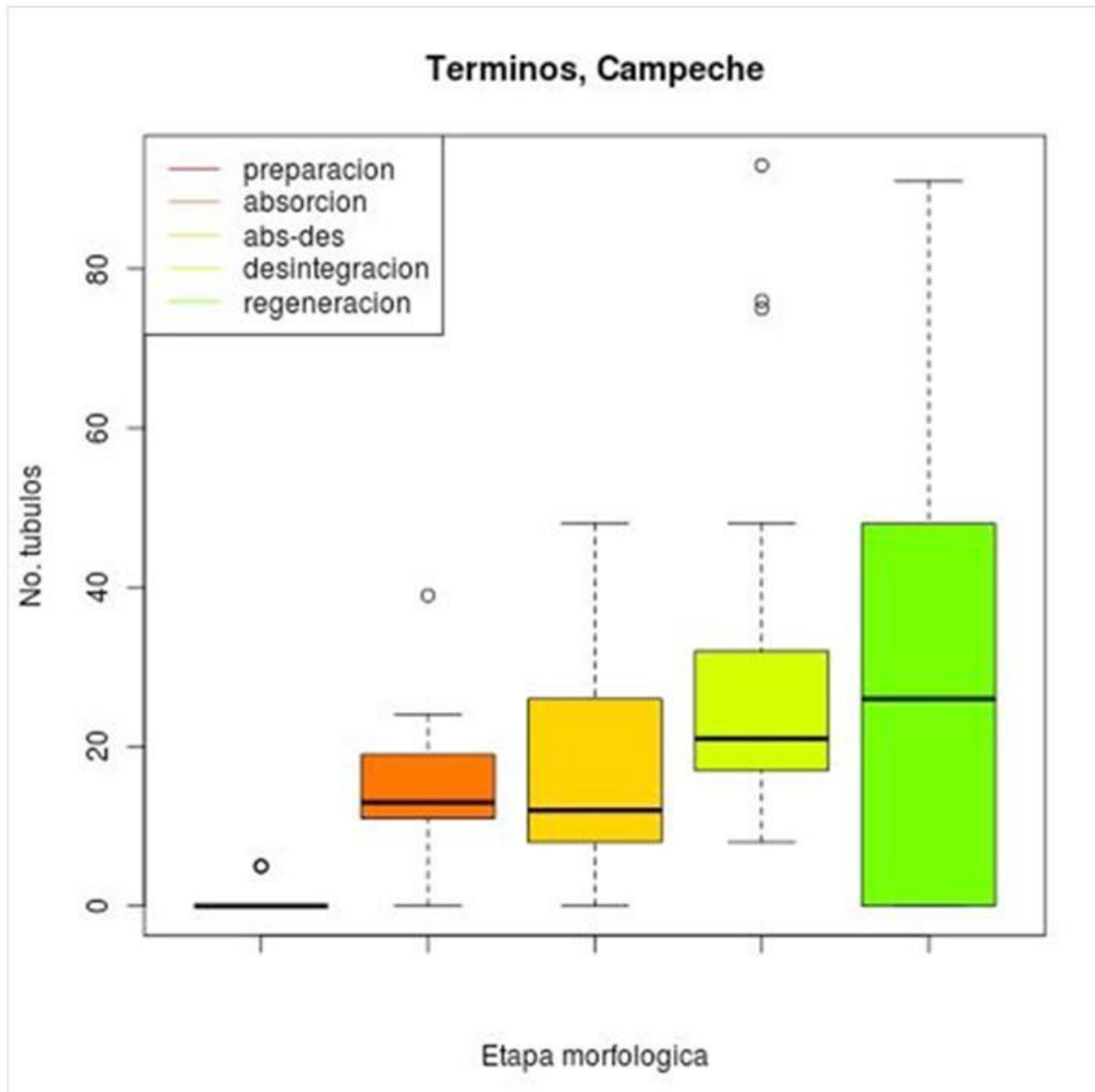


Figura 30. Etapa regenerativa predominante en los túbulos de ostiones de la laguna de Términos.

Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz.

La apariencia de los túbulos de la glándula digestiva revela inflamación en el tejido conjuntivo así como numerosas células cafés, los túbulos presentan secreciones severas en el lumen, apariencia hialina, infiltraciones, y vacuolización. El tracto digestivo de algunos organismos no presentó alteraciones (Fig. 30).

El estado de los túbulos de la glándula digestiva se muestra en la Figura 31. Predominantemente representaron en etapa de absorción-desintegración-regeneración.

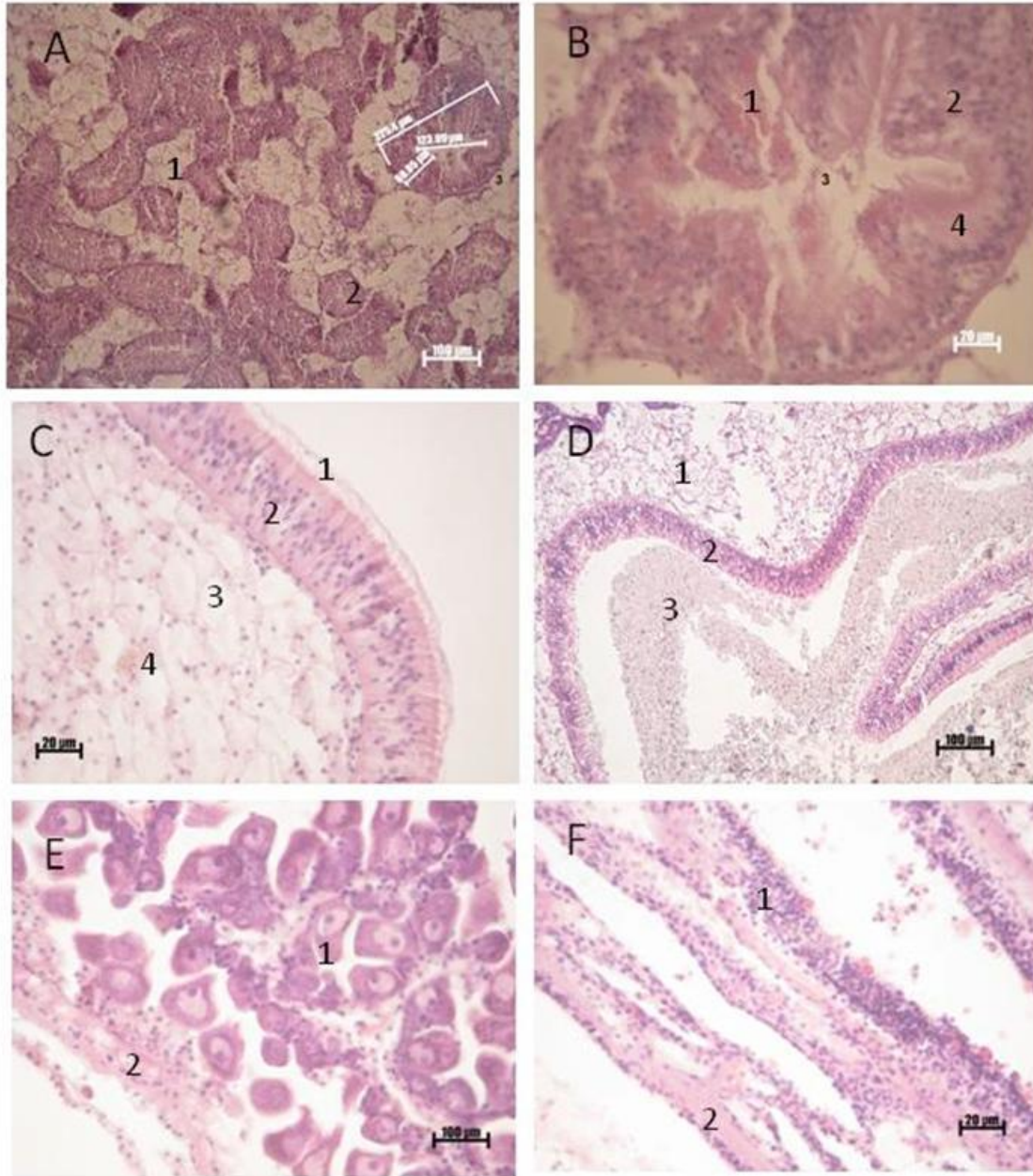


Figura 31. Cortes histológicos de ostiones de Laguna Pueblo Viejo, Tamaulipas. En A, túbulos digestivos con infiltración. La longitud total del túbulo es de 225 micras, el grosor del epitelio de revestimiento es de 68 micras mientras que el lumen midió 123 micras. En B, acercamiento del túbulo digestivo con secreciones (1), células basofílicas (2), lumen (3) y microvellosidades (4). En C, se observa las microvellosidades del manto (1) con epitelio estratificado (2), así como el tejido conjuntivo (3) y células cafés (4). En D, tracto digestivo con epitelio de revestimiento (2) y abundante alimento (3). En E, gónada femenina (1) en estado maduro con desove parcial. En F, laminillas branquiales con secreciones (2). Cortes a 5 micras. Tinción H-E.

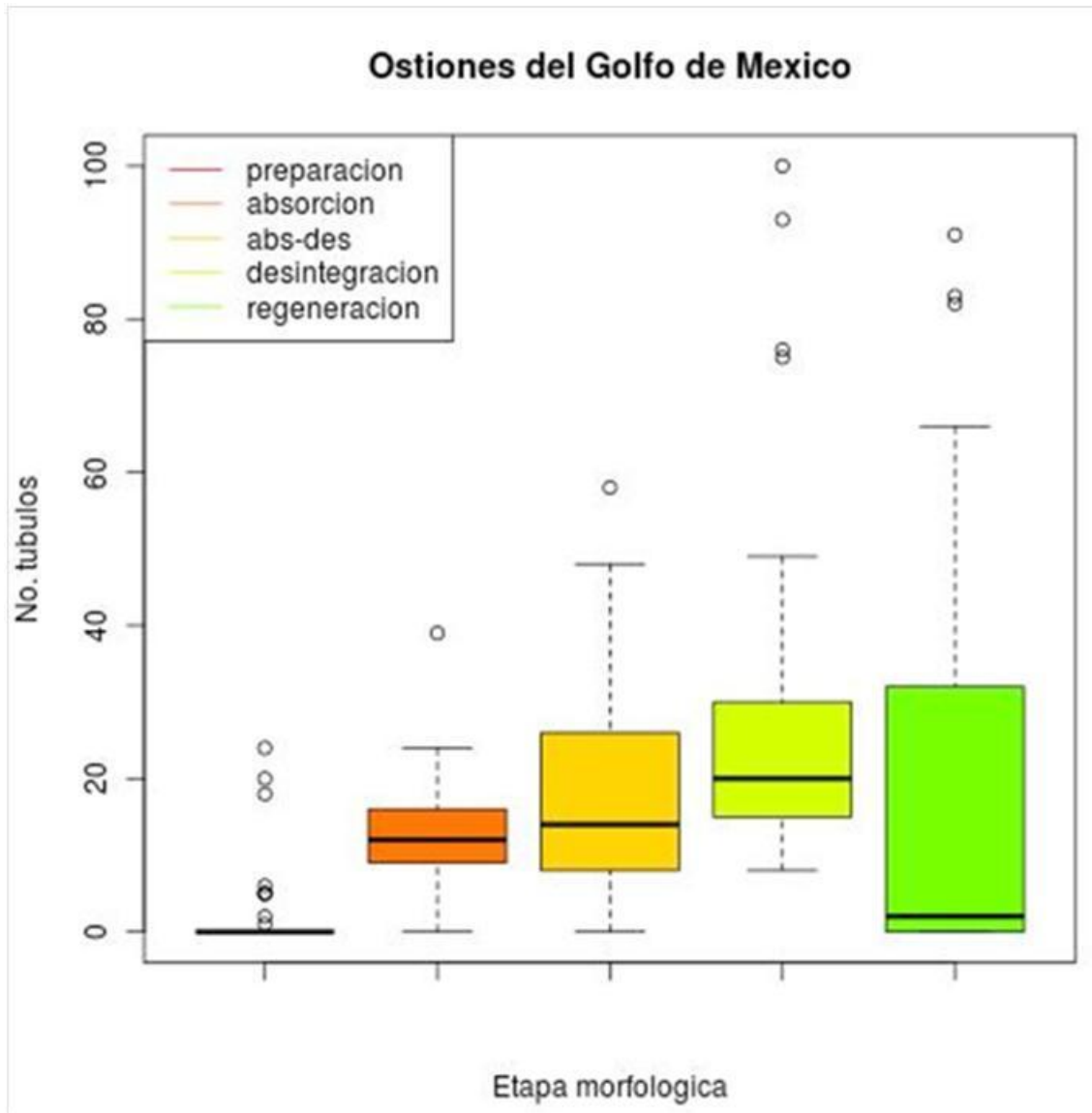


Figura 31. Resumen de las fases de los túbulos de la glándula digestiva analizados.

Los túbulos de la glándula digestiva se han asociado con el desarrollo de la gónada, Algunos autores mencionan que el número y tamaño de los túbulos y células basofílicas disminuye dependiendo del estadio de madurez de la gónada, principalmente en hembras. Sugieren que se relaciona con las células tipo B encargadas del almacenamiento de calcio y su movilización (Cajaraville *et al.*, 1990).

Las células basofílicas están involucradas en la síntesis y secreción de enzimas para la digestión extracelular. Hay dos tipos de células las piramidales ricas en RE granular y células columnares flageladas consideradas inmaduras y que quizá sirvan para remplazar cualquier célula basofílicas piramidal o célula digestiva o ambas.

También se ha reportado que el incremento en el epitelio que contiene las células basofílicas se incrementa independientemente de la exposición a derivados de hidrocarburos y/o metales pesados siendo directamente proporcional a la concentración de exposición (Cajaraville, 1990).

La presencia de células basofílicas es común en las diferentes especies de moluscos, demostrando que puede ser esta respuesta utilizada como indicador en el monitoreo de la contaminación marina.

Sin embargo el número y presencia de las células basofílicas en los túbulos digestivos de los moluscos responden a múltiples condiciones adversas por el incremento de sus números. Esta respuesta es usualmente asociada a los cambios degenerativos de las células, si el incremento de las células basofílicas son simplemente debidas a la concomitante reducción en el numero o si la proliferación es un paso necesario para la regeneración celular digestiva queda por ser investigada (Cajaraville, 1990).

Se ha reportado que falta investigar sobre la apariencia y el papel biológico de las células basofílicas en un ambiente con presencia de hidrocarburos de petróleo.

7. CONCLUSIONES

- Los parámetros físico-químicos del agua mostraron el carácter eutrófico de las cinco lagunas muestreadas.
- La presencia de agentes tóxicos en las lagunas durante los muestreos no fue suficientemente alta para causar toxicidad aguda.
- El ostión *C. virginica* puede ser empleado como un organismo centinela para evaluar la calidad de los ecosistemas costeros.
- Todos los biomarcadores analizados fueron útiles para evaluar el estado de salud de los ostiones.
- Tanto el ensayo cometa como las evaluaciones histopatológicas mostraron daño basal en los ostiones de las cinco lagunas.
- La estabilidad lisosomal de los ostiones de las cinco lagunas no presenta diferencias significativas, sin embargo los animales de Carmen Machona, seguidos por los de Tamiahua y Pueblo Viejo mostraron estar bajo estrés.
- La evaluación de la actividad de la AChE mostró ser un biomarcador sensible a los cambios en la condición de los ostiones al detectar la mejora en la condición de los ostiones expuestos a un período de depuración largo.
- De acuerdo con la longitud de los cometas las lagunas en las que los organismos presentaron menos daños fueron Alvarado y Machona y mayor daño Tamiahua y Términos.
- Las evaluaciones histopatológicas mostraron que en todas las lagunas existen animales en condiciones de salud óptimas y deterioradas y que el daño se puede observar en el canal alimentario, siendo los organismos de Carmen Machona los que presentaron el porcentaje más bajo de anormalidades.

8. RECOMENDACIONES

Es necesario implementar complementar estos estudios con muestreos en épocas climáticas complementarias, es decir para aquellos que fueron muestreados en secas, hace falta la evaluación en lluvias y viceversa.

Aún más recomendable sería la implementación de un programa de monitoreo para el Golfo de México en el que los muestreos para las evaluaciones químicas se hagan al mismo tiempo que para las biológicas.

Como biomarcadores es recomendable seguir trabajando con la estabilidad lisosomal, la actividad de AChE, el ensayo cometa y los estudios histopatológicos, además de incluir algunos otros como la actividad de la glutatión-s-transferasa (GST), el citocromo P450 entre otros que se ocupan en otros sistemas de monitoreo a nivel internacional en lugares de producción y transporte de petróleo.

En una siguiente etapa es recomendable realizar bioensayos con los ostiones de los diferentes sitios exponiéndolos a los diferentes petróleos producidos en México así como a sus derivados para cuantificar la variabilidad de los biomarcadores y su posible recuperación después de un período de depuración.

9. REFERENCIAS

Alvarez, D.C., L. Celis G., M.E. Floriuk G., y J.R. Mejia P., 1982. Distribución y concentración de hidrocarburos fósiles en sedimentos y organismos del sistema lagunar Carmen y Machona, Edo. de Tabasco, México. *Rep. de Inv.* 27. UAM-I.

Barrera Escorcia G. 2006. *Toxicidad del cromo y cadmio en ostión Crassostrea virginica de la Laguna de Mandinga, Veracruz*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. UAM-I.

Barrera-Escorcia G e I. Wong Chang. 2010. Lipoperoxidación e inducción de metalotioneínas por cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la Laguna de Mandinga, Veracruz. *Hidrobiológica*. 20(1): 31- 40.

Bernet D., H. Schmidt, P. Burkhardt-Holm y T. Wahli. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25-34.

Bitensky L, Butcher RS, Chayer J. 1973. Quantitative cytochemistry in the study of lysosomal function. In: Dingle JT (ed.) *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol. 3. North Holland, Amsterdam. The Netherlands, 465–510.

Boening, D.W. 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental Monitoring and Assessment*. 55: 459–470.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bocquené G, S Chantereau, C Clérendeau, E Beausir, D Ménard, B Raffin y C Minier. 2004. Biological effects of the Erika oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources*, 17: 309–316.

Bocquené, G y F Galgani. 1998. Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 22. 19 pp.

Boutet, I., A. Tanguy, M. Auffret, R. Riso y D. Moraga. 2002. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of metal exposure bioindicator. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (5): 1009-1014.

Buroker NE. 1983. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and Gulf of Mexico. *Marine Biology* 75:99-112.

Butler R.A. and G. Roesijadi, (2001), Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Toxicol. Sci.* 59 pp. 101–107.

- Cajaraville, M.P., M.J. Bebian, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete y A. Viarengo. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environmental of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*.247: 201-212.
- Cajaraville, M. Guzmán, D. Marigomez, I. y Angulo E. 1990 Response of basophilic cells of the digestive gland of mussel to petroleum hydrocarbon exposure. *Disease of aquatic organisms*. 9; 221-228.
- Camus, L., Grbsvik, B.E., Bbrseth, J.F., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2000. Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperature. *Mar. Environ. Res.* 50, 325–329.
- Caeiro S, M Painho, P Goovaerts, H Acosta y S. Souza. 2003. Spatial sampling design for sediment quality assessment in estuaries. *Environmental Modelling & Software*. 18: 853–859
- CCME. 2009. *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*.
- CECA, Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. 1989. *Diario Oficial de la Federación*, Miércoles 13 de diciembre de 1989.
- Chachere V. 2010. USF Scientists Detect Oil on Gulf Floor. USF News. <http://usfweb3.usf.edu/absoluteNM/templates/?a=2604&z=120>. Consultado el 10 de Diciembre de 2010.
- Cheung V. V., Depledge M. H., y Jha A. N. 2006. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. *Mar. Environ. Res.* 62 S301–S305.
- Cho SM, Jeong WG (2005). Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 244: 383-387.
- Contreras, F., 1985. *Las lagunas costeras mexicanas*, Centro de Ecodesarrollo, Secretaría de Pesca, D.F., 253 p.
- Contreras E. F. 1994. *Manual de técnicas hidrobiológicas*. Trillas, UAM, México.
- Dixon, D., A. Pruski, L. Dixon & A.N. Jha. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17 (6): 495-507.
- Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2001. Lysosomal and lipid alteration in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.* 115: 123– 137.
- Eisman, M P, Landon-Arnold S. y C. M. Swindoll. 1991. Determination of petroleum hydrocarbon toxicity with Microtox. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47:811-816.

Ellman, G.I., Courtney, D, Andres, Jr V. Featherstore, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*: 88-95.

Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P. and Marigomez, I (1994). Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from a Zn-polluted site. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 338–45.

Farris, J.L. y J.H. Van Hassel. 2007. *Freshwater bivalve ecotoxicology*. SETAC CRS Press. 375 pp.

Fernley, P.W., Moore, M.N., Lowe, D.M., Donkin, P., Evans, S., 2000. Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 50, 451– 455.

Frías-Espericueta, G.M., A.M. Ortiz-Arella no, I.J. Osuna-López & J.A. Ronson-Paulin. 1999. Heavy metals in the rock oyster *Crassostrea iridescens* (Filibranchia: Ostreidae) from Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Revista Biología Tropical* 47(4): 843-849.

García, D. M., 1988. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. México*. Instituto de Geografía, UNAM. 252 p.

Goldberg, E.D.1975. The mussel-watch-a first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin.* 6 (7):111.

González B. J. F. 2004. Genotoxicidad por exposición al cadmio (Cd⁺²) en células del epitelio branquial del ostión *Crassostrea virginica* de la laguna de Mandinga, Veracruz. *Servicio Social División de CBS, UAM-Iztapalapa* 37 pp.

Guzmán-García X. 2001. *Toxicocinética de cadmio y daño histopatológico en ostión Crassostrea virginica en condiciones de ayuno y alimentación*. Tesis de maestría. UAM-I. México. 65 pp.

Gutiérrez, D., C. García Sáez, M. Lara y C. Padilla. 1993. "Comparación de arrecifes coralinos: Veracruz y Quintana Roo". En: S.I. Salazar Vallejo y N.E. González (comps.). *Biodiversidad marina y costera de México*. CONABIO-CIQRO. 787-806.

Guzmán-García X. 2001. *Toxicocinética de cadmio, efecto de la alimentación y posibles cambios histopatológicos en ostión Crassostrea virginica*. Tesis para obtener el título de Maestra en Biología Experimental, UAM-I.

Guzmán-García, X., A. Martínez-López, L. Rodríguez-Medina, H. González Márquez y A.V. Botello. 2007. Cambios tisulares en el ostión *Crassostrea virginica* por exposición y depuración de cadmio. *Hidrobiológica*. UAM-I. 7: 41-48

Guzmán-García X. 2007. *Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión Crassostrea virginica y su respuesta ambiental*. Tesis para obtener el título de Doctora en Biología Experimental, UAM-I.

Guzmán-García X, P. Ramírez-Romero y S. López Vite. 2010. Manual de Procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. En: Ramírez-Romero (Ed.): *Manual de Procedimientos de Operación Estándares (MPOE) para la Toma de Muestras, su Análisis Ecotoxicológico e Histológico dentro del Marco del Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación de Sustancias Tóxicas Persistentes (PRONAME)*. Informe Final de Proyecto presentado a la CCA/SEMARNAT.

Hamoutene D., Payne J.F., Rahimtula, A. and Lee K. 2002. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54 471–474.

Harding JM, Couturiera C, Parsons GJ, Ross NW (2004). Evaluation of the neutral red assay as a stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus* spp.) in relation to post-harvest processing activities and storage conditions. *Aquaculture*. 231: 315-326.

HACH. 1992. *Water Analysis Handbook*. HACH Company, 220 pp.

Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 1998. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European Flat Oyster *Ostrea edulis* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 119B, 619–623.

Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella aguiilarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. *Comp. Biochem. Physiol.* 127B, 203– 212.

Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 2001. Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 143–153.

Herbert, A., Guillermo, L., Assis de Silvia, C. H. y Hansen, P. D. 1995. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*. 3: 1 – 15.

Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, Gotow T, Watanabe T, Momoi T, Urase K, Kominami E, Uchiyama Y. 1999. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience* 91: 233–249.

Kennedy VS, RIE Newell y Eble AF. 1996. *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. NOAA/Maryland Sea Grant Book. Maryland, EUA. 734 pp.

Köhler A, E Wahl, y K Söffker. 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine fish (*Platichthys flesus* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 2434–2444.

Kim B, Park J.J, Edlaer L, Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl M, Gotzes F, Thielmann HW. 2002. New measurement of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Environ Mol. Mutagen* 40:50 –56.

Laffon B., Rábade T., Pásaro E., Méndez J. 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environ. Inter.* 32 342 – 348.

Lasse, B.A. 1991. *Histological and ultrastructural studies of larval and juvenile Lampsilis (Bivalvia) from the upper Mississippi River*. Tesis de doctorado. Iowa State University. Ames. IA. 233 pp.

Laubiart L, M Le Moigne, P Flammarion, E Thybaud y D Cossa. 2004. The monitoring programme of the ecological and ecotoxicological consequence of the “Erika” oil spill. *Aquatic Living Resources*, 17: 239–241.

Lee E., Oh E., Lee J., Sul D. and Lee J. 2004. Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Toxicological Sciences* 81, 121–132.

Lee R.F. and Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mut. Res.* 544, 43-64.

Lee R. and Kim G.B. 2002. Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Mar. Environ. Res.*, 54, 465-469.

Levi, P. 1987. *A textbook of modern Toxicology*. Elsevier. Nueva York. 386 pp.

Lowe, D.M., Fossato, V.U., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 48, 75– 85.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Evans, B.M., 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 135–140.

Lowe, D.M., Soverchia, C., Moore, M.N., 1995a. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 33, 105–112.

Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995b. Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 129, 189– 196.

Mamaca E., Bechmann R. K., Torgrimsen S., Aas E., Bjørnstad A., Baussant T., Le Floch S. 2005. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquat. Toxicol.* 75 (2005) 191–201.

Marigomez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Exteberria, M. and Cajaraville, M.P (1996). Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel-watch programmes. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C(2), 291–7.

Markert, B.A., A.M. Breure y H.G. Zeichmeister. 2003. *Bioindicator and biomonitoring: principles, concepts and applications*. Elsevier. Amsterdam, 433 pp.

Martínez-Gómez C, A D Vethaak, K Hylland, T Burgeot, A Köhler, B P Lyons, J Thain, M J Gubbins y I M Davies. 2010. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *ICES Journal of Marine Science*. 67: 1105–1118.

McCarthy, J.F. y L.R. Shugart. 1990. Biological markers of environmental contamination. En: McCarthy J.F. y R.L. Shugart. (Eds), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 13-14.

Mitchelmore C.L, Chipman JK. 1998a. Detection of DNA strand breaks in Brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.* 41: 161–182.

Mitchelmore CL, Chipman JK. 1998b. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 399:135–147.

Matthew, J.J., A.H. Ringwood, E.R. Lacy, A.J. Lewitus, J.W. Kempton, P. S. Gross, G.W. Warr & R.W. Chapman. 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology* 4: 81-93.

Moore MN. 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells in the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res* 175:279–287.

Moore MN. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.* 16:134–139.

Moore MN, Pipe RK, Farrar SV, Thomson S, Donkin P. 1986. Lysosomal and microsomal responses to oil-derived hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo JM, Kester DR (eds,) *Oceanic Processes in Marine Pollution*, Vol. 1—Biological Processes and Waste in the Ocean. Krieger, Melbourne, FL, USA, pp. 89–96.

Moore, M., Lowe, D., and Köhler, A. 2004. *Biological effects of contaminants: measurements of lysosomal membrane stability*. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, 36. 31 pp.

National Research Council (NRC). 1993. Committee on Pesticides in the Diets of Infants and Children. *Pesticides in the Diets of Infants and Children*. National Academy Press, Washington, D.C.

Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Fossato, V.U., 1998. Assessment of the impact of chemical pollutants on mussel, *Mytilus galloprovincialis*, from the Venice lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.* 46 (1–5), 279–282.

Ohkuma, S., Moriyama, Y., Takano, T., 1982. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2758–2762.

Owen, G. 1970. The fine structure of the digestive tubule of the marine bivalve. *Phil. Trans. R. Soc.* 258:245-260.

Owen, G. 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci. Prog., Oxf.* 60: 299 – 318.

Owens, E H, Mauseth, G S; Martin, C A, Lamarche A, y J Brown. 2002. Tar ball frequency data and analytical results from a long-term beach monitoring program. *Mar. Pollut. Bull.* 44(8), 770-780.

Pacifi R.E., Davies K.J.A. 1991. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of ageing revisited. *Gerontology* 37 166-180.

Payne, J. E., Mathieu, A., Melvin, W., y Francey, L. L. 1996. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and paper mill newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32 (2): 225 –230.

Pech, P.D., Máscaro, M.M., Simoes, N., Ortiz, C.E., 1997. *Biodiversidad y Desarrollo humano en Yucatán, Ambientes marinos*, <http://www.cicy.mx/sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap1/07%20Ambientes%20marinos.pdf>. Consultado el 10 de junio de 2011.

Pérez-Cadahía B., Laffón B., Pásaro E., Méndez J. 2004 Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. *Comp. Biochem. and Physiol., Part C* 138 453–460.

Pruski A.M. and Dixon D.R. 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol.* 57, 127-137.

Razo E. C. A. 2000. Efecto de la exposición al cromo (Cr⁺⁶) sobre el ADN de células del epitelio branquial del ostión *Crassostrea virginica*, de la Laguna de Mandinga, Veracruz. *Informe final de Servicio Social UAM-Iztapalapa* 24 p.

Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* 40, 375– 392.

Ribeiro, S., Guilhermino, L., Sousa, J. P. Y Soares, A. M. V. M. 1999. Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44: 287 – 293.

Ringwood, A.H., Connors, D.E., Hoguet, J., 1998. The effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 166, 163– 171.

Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C.J., 2002. Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 54, 1– 5.

Rogers, P. & A. García-Cubas. 1981. Evolución gonádica a nivel histológico del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) del sistema fluvio lagunar Atasta-Pom, laguna de Términos, Campeche, México. *Anales del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología*. 8(1): 21-42.

Sánchez, C. 2007. Volumen XX N. 2, Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana “La Ciencia y el Hombre”. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol20num2/articulos/mariscos/index.html>
Consultado el 03 de Octubre de 2011.

Sancho, P. 2008. Tema 12. Neurotoxicidad de Organofosforados y Carbamatos. http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/tema12/tema%2012-indice.htm. Consultado el 03 de octubre de 2011.

Schneider A, A.J. Jonas, M.L. Smith and A.A. Greene, (1984) Lysosomal transport of cystine and other molecules. *Biochem. Soc. Trans.* 12 pp. 908–910.

Shepard, J.L., Bradley, B.P., 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations. *Mar. Environ. Res.* 50, 457– 463.

Siu W, J Cao, R Jack, R Wu, B Richardson, L Xu y P Lam. 2004. Application of the comet assay and micronucleus assays to the detection of B(a)P genotoxicity in haemocytes of the green lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66: 381–392.

Soreq H, Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2 (4): 294-302.

Sotil G., Alvis R., Francia J. C. y Shiga B. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev. Peru. Biol.* Número especial 13(3): 249 - 253

Stein, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M. Y Lafaurie, M. 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*. 99: 339 – 345.

Steinert S. A., Montee R. S. y Sastre M.P. 1998. Influence of sunlight on DNA in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.*, Vol., 46, No. 1-5, 355-358 pp.

Thompson HM, Walker CH y Hardy AR. 1991. Inhibition of avian esterases by organophosphorus insecticides: problems of reactivation and storage. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 20:509-513.

Tice R.R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi K, Miyamae E, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206 –221.

UNECE. 1994. Standard Statistical Classification of Surface Freshwater Quality for the Maintenance of Aquatic Life. In: *Readings in International Environment Statistics*. United Nations Economic Commission for Europe. United Nations, New York and Geneva.

UNEP (United Nations Environment Programme). 1997. *Report of the Meeting of Experts to Review the MED POL Biomonitoring Programme*. UNEP (OCA)/MEDWG.132/7. Athens. 8 pp.

UNEP/RAMOGGE (United Nation Environment Programme. 1999. *Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme*. UNEP. Athens. 39 pp.

Universidad Autónoma Metropolitana. 2010. *Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud*. UAM. México, DF. 25 pp.

Varona, M. Morales, L. Ortiz, J.; Sánchez, J. F; Cárdenas, O., De la Hoz, F. 1998. An epidemiological panorama of exposure to cholinesterase pesticides in 17 of the country's departments. *Biomédica*.18(1):22-9, mar.

Vázquez Botello, A., 1978. Presencia de hidrocarburos fósiles en ecosistemas estuarinos del Golfo de México . *Rev. Biol. Trop.* 26 (supl. 1):135/151.

Wallace RK. 2001. Cultivating the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Southern *Regional Aquaculture Center*. Publication Number 432. 4 pp.

Viarengo, A., B. Burlando, A. Giordana, C. Bolognesi y G.P. Gabrielides. 2000. Networking and expert-system analysis: next frontier in biomonitoring. *Marine Environment Research*. 49: 483-486.

Wijngaarden Van, R., P.J. van den Brink, S.J.H. Crum, J.H. Oude Voshaar, T.C.M. Brock and P. Leeuwangh. 1996. Effects of the insecticide Dursban 4E (active ingredient Chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: I. Comparison of short-term toxicity between the laboratory and the field. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(7): 1133-1142.

Wilson C, Scotto L, Scarpa J, Volety A, Laramore S, and D Haurert. 2005. Survey of water quality, oyster reproduction and oyster health status in the St. Lucie Estuary. *Journal of Shellfish Research*. 24:157-165.

Wilson J.T., Pascoe P. L. Parry J.M. and Dixon D.R. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mut. Res.*, 399, 87-95.

Yáñez, A.A., Sanchez, G.P., 1983. Environmental behavior of Campeche Sound ecological system, off Terminos Lagoon, México: Preliminary results. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, Universidad Nacional Autónoma de México 10: 117-136.

Yáñez, A.A., Sánchez, G.P., 1986. The Demersal Fishes of the Southern Gulf of Mexico Shelf: Environment, Ecology and Evaluation. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. U.N.A.M. Press México. Publ. Esp. 9: 1-230.

Zorita, I., I. Apraiz, M. Ortiz-Zarragoitia, A. Orbea, I. Cancio, M. Soto, I. Marigómez y M.P. Cajaraville. 2007. Assessment of biological effect of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental Pollution*. 148: 236-250.

Zhang Z, Li X, Vandeppeer M, Zhao W (2006). Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 256: 502–509

ANEXO I.

Medidas Morfométricas de los ostiones *Crassostrea virginica*, empleados para la evaluación de biomarcadores.

Medidas morfométricas de ostiones *C. virginica* de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, empleados para la evaluación de estabilidad lisosomal y ensayo cometa.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
T1	6.6	4.8	84	6
T5	7.4	4.9	146	7
T8	6.3	4.3	131	5
T10	4.0	5.0	170	5
T16	9.7	5.6	176.4	5
T17	4.9	3.2		1
T19	10.6	4.9	185.1	9.4
T20	6.9	4.4		4.9
T21	6.0	3.7	185.1	0.5
T22	5.4	3.4	47.6	0.6
T23	6.9	3.8	68.7	4.5
T24	5.4	2.9		2.5
T27	8.5	5.8	124.8 (racimo)	4
T29	5.4	5.2	130.1 (racimo)	7
T35	6.4	3.5	25.1	2
T36	5.6	3.3	51	2
T40	6.8	5.2	106.4	4
T41	8.4	3.5	----	7.5
T44	8.5	4.5	74.7	3.5
T47	9	6.5	104.5	4

Medidas morfométricas de ostiones *C. virginica* de la Laguna Carmen Machona Tabasco empleados para la evaluación de estabilidad lisosomal y ensayo cometa.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
M2	6.9	5.0	53	2
M4	5.8	3.7	49.6 (racimo)	3
M7	5.0	4.0	34.8	1.5
M8	6.5	3.5	64.1 (racimo)	2.5
M9	7.5	4.0		2.0
M10	9.0	4.0	35.8	2.5
M14	8.0	4.0	64	4.5
M15	8.5	4.0	59.2	4.0
M16	9.5	5.0	99.2	4.0
M17	9.5	5.0	80.9 (racimo)	5.0

Medidas morfométricas de ostiones *C. virginica* de la Laguna Pueblo Viejo empleados para la evaluación de estabilidad lisosomal y ensayo cometa.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
Ta1	8.4	5.0	84.1	7.0
Ta2	9.8	5.2	66.4	7.0
Ta3	9.4	4.9	81.9	8.0
Ta4	9.3	8.7	102.8	4.0

Fecha: 15 de abril 2011
 Sitio Muestreo: Términos, Campeche.
 Fecha de muestreo: del 01 al 04 abril

Medidas morfométricas Ostión, AChE				
No.	Largo	Ancho	Peso c/Concha	Líquido Intervalvas (mL)
1	6.30	2.20	42.00	3.00
2	6.40	2.70	50.00	2.00
3	5.70	2.80	43.00	2.00
4	5.80	2.30	34.00	2.00
5	6.80	3.10	59.00	3.00
6	6.90	1.80	51.00	1.00
7	6.40	3.10	35.00	2.00
8	7.00	2.70	52.00	3.00
9	7.10	3.30	64.00	2.50
10	6.80	2.60	54.00	4.00

Fecha: 16 de mayo 2011
 Sitio Muestreo: Alvarado, Veracruz.
 Fecha de muestreo: del 13 al 16 de mayo

Medidas morfométricas Ostión, AChE					
No.	Largo	Ancho	Peso c/Concha	Líquido Intervalvas (mL)	Peso s/concha
1	7.30	3.30	142.50	12.00	9.90
2	8.70	5.10	78.10	9.00	8.20
3	8.20	4.70	80.20	6.00	8.60
4	6.60	4.50	75.40	5.00	5.80
5	6.40	4.20	98.70	1.20	2.70
6	5.90	2.70		0.80	2.50
7	7.10	4.60	71.80	1.00	7.40
8	7.80	5.10	93.20	3.00	7.30
9	5.50	3.70	43.20	0.70	5.90
10	7.10	4.70	71.80	1.00	4.30
11	6.70	4.70	76.60	5.00	5.60
12	7.80	4.60	90.80	4.00	8.90
13	8.00	4.40	77.80	1.00	5.90

Fecha: 10 de junio de 2011

Sitio Muestreo: Carmen Machona, Tabasco.

Fecha de muestreo: del 03 al 09 de abril

Medidas morfométricas Ostion, AChE(2do. Lote)				
No.	Largo	Ancho	Peso c/Concha	Líquido Intervalvas (mL)
50	9.50	3.90	74.00	3.00
51	9.80	3.70	54.40	2.00
52	7.90	3.50	79.90	2.00
53	6.90	3.60	41.00	0.50
54	7.60	3.40	34.30	4.00
55	6.10	2.90	60.30	0.50

Fecha: 19 de septiembre de 2011

Sitio Muestreo: Carmen Machona, Alvarado, Términos.

Fecha de muestreo: Grupo control

Medidas morfométricas Ostión, AChE				
No.	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/Concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
T1	8.9	4.5	69.1	3.5
T2	5.4	3.5		1.0
T3	5.7	4.0	87.1	6.0
A1	7.6	4.0	70.2	3.0
A2	5.0	4.5	39.5	5.0
A3	8.5	4.9	74.8	5.5
C1	6.6	3.0	35.9	3.0
C2	6.0	2.7	32.9	2.0
C3	5.5	3.5	40.1	1.0

ANEXO II

ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA Y CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN GLÁNDULA DIGESTIVA.

Actividad acetilcolinesterasa en glándula digestiva de Crassostrea virginica					
MUESTRA					
		Actividad AChE		Contenido de proteínas	
	U/ml	U/mg proteína	U/g tejido	ug/ml	mg/g tejido
Pueblo Viejo					
Total	0.126 ± 0.05	0.959 ± 0.005	0.076 ± 0.006	1.419 ± 0.024	0.851 ± 0.014
S ₁	0.030 ± 0.07	0.580 ± 0.002	0.018 ± 0.007	0.764 ± 0.036	0.459 ± 0.023
S ₂	0.097 ± 0.02	0.380 ± 0.001	0.058 ± 0.001	0.654 ± 0.014	0.393 ± 0.037
Tamiahua					
Total	0.510 ± 0.06	0.110 ± 0.006	0.031 ± 0.004	0.724 ± 0.015	0.434 ± 0.026
S ₁	0.169 ± 0.04	0.036 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.384 ± 0.013	0.231 ± 0.017
S ₂	0.034 ± 0.06	0.074 ± 0.003	0.021 ± 0.003	0.339 ± 0.026	0.204 ± 0.014
Alvarado					
Total	0.356 ± 0.04	0.726 ± 0.002	0.285 ± 0.010	0.993 ± 0.069	0.794 ± 0.069
S ₁	0.136 ± 0.01	0.261 ± 0.001	0.109 ± 0.003	0.521 ± 0.053	0.416 ± 0.053
S ₂	0.220 ± 0.02	0.465 ± 0.003	0.176 ± 0.014	0.472 ± 0.016	0.378 ± 0.016
Machona					
Total	0.400 ± 0.05	0.823 ± 0.003	0.240 ± 0.017	0.968 ± 0.072	0.581 ± 0.072
S ₁	0.158 ± 0.01	0.334 ± 0.001	0.095 ± 0.03	0.474 ± 0.020	0.284 ± 0.020
S ₂	0.242 ± 0.04	0.489 ± 0.006	0.145 ± 0.007	0.495 ± 0.052	0.297 ± 0.052
Términos					
Total	0.022 ± 0.04	0.047 ± 0.002	0.013 ± 0.052	0.931 ± 0.031	0.559 ± 0.031
S ₁	0.007 ± 0.02	0.016 ± 0.002	0.004 ± 0.003	0.465 ± 0.011	0.279 ± 0.011
S ₂	0.015 ± 0.02	0.031 ± 0.002	0.009 ± 0.022	0.466 ± 0.020	0.280 ± 0.020

Actividad acetilcolinesterasa en glándula digestiva de Crassostrea virginica CONTROL					
	U/ml	Actividad AChE		Contenido de proteínas	
		U/mg proteína	U/g tejido	ug/ml	mg/g tejido
Pueblo viejo					
Total	1.531 ± 0.04	2.343 ± 0.006	2.790 ± 0.003	0.684 ± 0.053	0.411 ± 0.053
S ₁	0.745 ± 0.01	1.005 ± 0.003	0.447 ± 0.004	0.354 ± 0.026	0.212 ± 0.015
S ₂	0.781 ± 0.03	1.338 ± 0.008	2.343 ± 0.003	0.330 ± 0.023	0.198 ± 0.016
Tamiahua					
Total	0.288 ± 0.02	0.445 ± 0.003	0.173 ± 0.001	1.770 ± 0.060	1.062 ± 0.045
S ₁	0.127 ± 0.03	0.172 ± 0.002	0.077 ± 0.003	0.721 ± 0.049	0.432 ± 0.023
S ₂	0.160 ± 0.01	0.273 ± 0.001	0.096 ± 0.003	1.049 ± 0.036	0.629 ± 0.021
Alvarado					
Total	0.427 ± 0.001	0.773 ± 0.018	0.342 ± 0.011	1.159 ± 0.042	0.927 ± 0.042
S ₁	0.059 ± 0.001	0.096 ± 0.008	0.047 ± 0.023	0.614 ± 0.018	0.491 ± 0.018
S ₂	0.368 ± 0.00	0.677 ± 0.042	0.295 ± 0.051	0.544 ± 0.008	0.435 ± 0.008
Machona					
Total	1.025 ± 0.083	1.685 ± 0.005	0.615 ± 0.002	1.302 ± 0.103	1.042 ± 0.103
S ₁	0.282 ± 0.024	0.386 ± 0.002	0.169 ± 0.001	0.730 ± 0.082	0.584 ± 0.082
S ₂	0.743 ± 0.059	1.299 ± 0.008	0.446 ± 0.004	0.572 ± 0.010	0.457 ± 0.010
Términos					
Total	1.205 ± 0.03	1.782 ± 0.001	0.723 ± 0.002	1.329 ± 0.093	1.063 ± 0.093
S ₁	0.760 ± 0.01	1.025 ± 0.001	0.456 ± 0.003	0.742 ± 0.040	0.594 ± 0.040
S ₂	0.445 ± 0.01	0.758 ± 0.002	0.267 ± 0.001	0.587 ± 0.008	0.470 ± 0.008