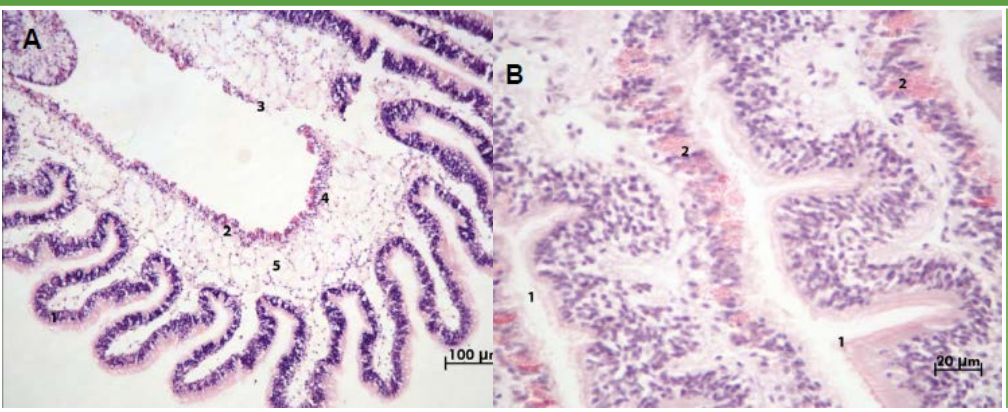
SEMARNAT
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

INECC
INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO

ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO DE LA ZONA COSTERA DEL GOLFO DE MÉXICO FASE II

Informe Final



2014

Coordinación General de Adaptación al Cambio Climático

https://www.dreamstime.com/stock-images-crassostrea-virginica-image11043124

Coordinado por:

Coordinación General de Adaptación al Cambio Climático

Elaborado por:
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa
Dra. Patricia Ramírez Romero
Dra. Xóchitl Guzmán García
Dra. Guadalupe Barrea Escorcia
Dra. María del Carmen Guzmán Martínez

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

ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO DE LA ZONA COSTERA DEL GOLFO DE MÉXICO.

FASE II

DRA. PATRICIA RAMÍREZ ROMERO

DRA. XÓCHITL GUZMÁN GARCÍA

DRA. GUADALUPE BARRERA ESCORCIA

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN MARTÍNEZ

Contenido

RESUMEN EJECUTIVO..... 1
EXECUTIVE SUMMARY. 2
INTRODUCCION..... 4
ANTECEDENTES 5
MICROTOX 5
BIOMARCADORES 6
Estabilidad lisosomal. 7
Acetilcolinesterasa (AChE). 7
Evaluaciones histopatológicas. 9
OBJETIVOS 10
Objetivo General 10
Objetivos Específicos..... 10
METODOLOGÍA..... 10
Selección de la temporalidad de los muestreos. 10
Muestreo de agua y sedimentos 11
Muestreo de organismos..... 11
Análisis de la calidad del agua. 11
Evaluación de la toxicidad de las muestras con la Microtox®. 12
BIOMARCADORES. 12
Aclimatación de los ostiones en el laboratorio. 12
Evaluación de medidas morfométricas de los ostiones. 14
Estabilidad de la membrana lisosomal. 14
Inhibición de la acetilcolinesterasa. 16
BIOENSAYO CON OSTIONES Y GASOLINA..... 25
Preparación de la soluciones de exposición..... 26
ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN OSTIONES Y SEDIMENTOS. 28
Metales 28
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) 28
Análisis Estadístico. 28
DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO..... 29

Laguna de Pueblo Viejo 29
Laguna de Tamiahua 29
Laguna de Alvarado 30
Laguna Carmen Machona 30
Laguna de Términos 31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 32
CALIDAD DEL AGUA DE LAS LAGUNAS COSTERAS. 32
Parámetros físico-químicos y toxicidad. 32
BIOMARCADORES 37
Parámetros morfométricos 37
Estabilidad lisosomal. 37
Inhibición de la Acetilcolinesterasa 40
Ensayo cometa. 44
Evaluaciones histopatológicas. 50
BIOENSAYO 70
Estabilidad lisosomal. 70
Acetil-colinesterasa 71
Ensayo Cometa. 72
ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN OSTIONES Y SEDIMENTOS. 74
Metales 74
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos 77
CONCLUSIONES 80
RECOMENDACIONES 82
REFERENCIAS 83
GLOSARIO DE TÉRMINOS 97
CREDITOS 101
ANEXO I. Medidas Morfométricas de los ostiones *Crassostrea virginica*, empleados para la evaluación de biomarcadores. 102
ANEXO II. Estabilidad Lisosomal. Tiempos de Retención del Rojo Neutro. 109
ANEXO III. Actividad de la Acetilcolinesterasa y Contenido de Proteínas en Glándula Digestiva. 123
ANEXO IV. Anexo fotográfico de Estabilidad Lisosomal. Tiempos de Retención del Rojo Neutro. 127

ANEXO V. INFORMES DE RESULTADOS DE CONCENTRACIONES DE METALES E HAPs EN SEDIMENTOS Y OSTIONES 138

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estadíos en la retención de rojo neutro en células de ostión (*Crassostrea virginica*). 16
Tabla 2. Evaluación en túbulos de la glándula digestiva de ostión Crassostrea virginica. 25
Tabla 3. Calendarización del bioensayo. 27
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del agua de las lagunas costeras del Golfo de México donde se obtuvieron ostiones. 32
Tabla 5. . Promedio y desviación estándar de los tiempos (minutos) de retención del rojo neutro en ostiones del Golfo de México en las dos etapas del proyecto. 38
Tabla 6. Clasificación del daño en la cadena de ADN con base en la longitud promedio de la migración del ADN. 44
Tabla 7. Número de células y porcentaje por categoría de daño de *Crassostrea virginica* del Golfo de México. 46
Tabla 8. Longitud promedio de la cola del cometa (µm) y desviación estándar calculadas para cada localidad. 47
Tabla 9. Tabla de Datos morfométricos e Índice de condición (IC) de Moluscos Bivalvos colectados en cinco Lagunas Costeras del Golfo de México. 50
Tabla 10. Concentraciones de metales en sedimento y ostión de las cinco lagunas analizadas (µg/Kg de base seca). 74
Tabla 11. Correlación entre los biomarcadores y las concentraciones de metales en sedimento y en ostión (r). 76
Tabla 12. Concentraciones de HAPs en sedimento de cinco lagunas del Golfo de México (µm/Kg de base húmeda). ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 13. Concentraciones de HAPs en sedimento de cinco lagunas del Golfo de México (µm/Kg de base seca). 78
Tabla 14. Concentraciones de HAPs en ostión de cinco lagunas del Golfo de México (µm/Kg de base seca). 79

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de aclimatación y mantenimiento de ostiones. 13
Figura 2. Homogenización de la solución de trabajo. 15
Figura 3. Ostión abierto y preparado la toma de muestra. ..... Figura 4. Extracción de hemolinfa 15
Figura 5. Homogenización del tejido de ostión. 17
Figura 6. Tubos Corning con sobrenadante para su análisis. 18
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. . 18

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. 19
Figura 9. Lector de Elisa para la determinación de AChE y Proteína. 19
Figura 10. Ejemplares de *Crassostrea virginica* utilizados para la obtención de la suspensión celular. 20
Figura 11. Geles de agarosa para la realización del ensayo cometa. 21
Figura 12. Solución de lisi en el frasco coplin, donde se incuban las muestra. 21
Figura 13. Electroforesis de las muestras. 22
Figura 14. Microscopio de epifluorescencia para tomar fotografías de las células de ostión (*C. virginica*) para identificar la categoría del daño. 23
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. 33
Figura 16. Concentración de Ortofosfatos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. 34
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. ... 35
Figura 18. Concentración de nitritos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. 35
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. ... 36
Figura 20. Peso en gramos de los ostiones de cinco lagunas del Golfo de México utilizados para la evaluación de biomarcadores en las fases I y II del proyecto..... 37
Figura 21. Comparación de la Retención de Rojo Neutro en ostiones del Golfo de México (Fase I y II). 39
Figura 22. Comparación de la actividad enzimática AChE en ostiones de las lagunas del Golfo de México. (Controles vs. Fase I vs. Fase II). 41
Figura 23. 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. 43
Figura 24. Imágenes de los diferentes niveles del daño al ADN: valoración cualitativa visual de la longitud del cometa de C. virginica del Golfo de México 45
Figura 25. Microfotografía del canal alimentario, formado por una serie de conductos con epitelio columnar (1). También se observa contenido alimenticio (2), secreciones eosinófilas (3) y tejido conjuntivo (4) rodeando los conductos. Ostión colectado en Alvarado 52
Figura 26. Microfotografía de esófago A) epitelio rugoso de forma plegada (1) y liso (2), las células epiteliales son pequeñas de forma ovoidal (3) y sus núcleos teñidos intensamente. Se observan secreciones eosinófilas (4), células mucosas y tejido conjuntivo 53
Figura 27. Sección del estómago. Se observan las ondulaciones del epitelio columnar ciliado irregular (1) con células en diferente disposición con núcleos centrales

pequeños y redondos. Entre el epitelio se muestran células mucosas (2). La membrana basal gruesa..... 54
Figura 28. En A) saco del estilete con epitelio columnar ciliado (1), cilios abundantes y uniformes (2), cuerpos parabasales (3), núcleos basales de forma ovoidal (4), tejido conjuntivo (5) y membrana basal gruesa (6). En B) Sección del saco del estilete mostrando el epitelio de transición tiflosol (1), los núcleos basales (2), tejido conjuntivo (3) y membrana basal gruesa (4). Ostión colectado en Machona, Tab. Tinción H-E..... 55
Figura 29. Microfotografía del intestino. En A) contenido alimenticio (1), epitelio ciliado con células prismáticas (2), núcleos basales (3) y tejido conjuntivo (4). En B) se observa la región del intestino cubierto por epitelio ciliado con células prismáticas (1), núcleos ovoidales basales (2) y cromatina condensada; también se observa la presencia de células eosinófilas (3) y mucosas (4), tejido conjuntivo (5) y membrana basal (6). Ostión colectado en Machona, Tab. Tinción H-E. 56
Figura 30. En A) apariencia de los túbulos digestivos (1), se observa el contenido alimenticio (2) y la membrana basal fina (3). En B) se aprecia un túbulo digestivo, mostrando la parte ciliada (1) y la parte no ciliada (2) con células eosinófilas (3) y células mucosas (4). Se observa que el epitelio presenta núcleos de posición basal, y una membrana basal fina. Ostión colectado en Alvarado, Ver. Tinción H-E. 58
Figura 31. Células café. En A) y B) células de color café más intenso y granulares. En C) y D) células café hialinas. Presentes en el tejido conjuntivo cerca de los túbulos digestivos. En A), B) y D) Ostiones colectados en Términos, Camp.; En C). Ostión colectado en Alvarado, Ver. Tinción H-E..... 60
Figura 32. Microfotografías de estructuras que se asemejan a parásitos. En A) y B) se observan incluidos en el tejido conjuntivo. En C) y D) se observan en el espacio intertubular de la glándula digestiva. En A) ostión colectado en Términos, Camp., en B) C) y D) ostiones colectados en Machona, Tab. Tinción H-E..... 61
Figura 33. En A) y B) se aprecian fibras que rodean a núcleos con una tinción eosinófila conformando granulomas dentro del tejido conjuntivo. En C) y D) muestran granulomas que se encuentran unidos a la membrana basal del epitelio del estómago y del saco del estilete. Ostiones colectados en Machona, Tab. Tinción H-E. 62
Figura 34. Lesión posiblemente irreversible, en A) y B) se aprecia el cambio de la estructura redonda a formas elongadas rodeadas con una doble membrana sin células epiteliales. En C) y D) se observa una doble membrana rodeando un cúmulo de núcleos irregulares hipercromáticos. Ostiones colectados en Términos, Camp. Tinción H-E. 63
Figura 35. En A), B) y D) se observan secreciones eosinófilas (1) en el epitelio que recubren los túbulos de la glándula digestiva y en C) en el epitelio del saco del estilete. Ostiones colectados en Machona, Tab. Tinción H-E. 64
Figura 36. Microfotografía mostrando la reacción de Schiff en A) PAS positivo en el epitelio (1), la membrana basal (2). En B) se aprecia reacción positiva en los ovocitos maduros (1). En C) se observa la reacción PAS positiva en túbulos digestivos, en epitelio (1). En D) la membrana basal (1) y cuerpos basales de los cilios (2) mostraron la presencia de mucopolisacáridos neutros. 65

Figura 37. Tinción de Masson. En A) túbulos digestivos (1), se observan secreciones eosinófilas y otras de color verde. En B) se aprecian secreciones que parecen ser mucoides de color verde (1). En C) colágeno de color azul fuerte de la membrana basal (1) y fibras musculares de color rojo (2). En D) la membrana basal (1) se apreció fuertemente teñida en color azul y en el tejido conjuntivo algunas fibras están teñidas de color azul lo que puede evidenciar fibras de colágena (2). 66
Figura 38. Estabilidad Lisosomal de ostiones expuestos a la FSG. 71
Figura 39. Actividad de AChE de ostiones expuestos a la FSG. 72
Figura 40. Longitud de la cauda de los cometas de ostiones expuestos a la FSG..... 73

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 en el año 2010 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 mes 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 en caso de otro accidente. Por lo anterior el objetivo de este proyecto fue completar una línea base ecotoxicológica para la zona costera del Golfo de México, para ello se hizo un segundo muestreo, en diferente época climática, en las cinco lagunas costeras en las que se trabajó en la fase I del proyecto, donde 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, se tomaron muestras del ostión *Crassostrea virginica* para evaluar por medio de biomarcadores (estabilidad lisosomal, actividad de la enzima Acetil-colinesterasa, ensayo cometa y evaluaciones histopatológicas) la salud de las poblaciones de estos organismos. Asimismo, se llevó a cabo un bioensayo con ostiones de Tamiahua en el que se expusieron a la fracción soluble de la gasolina Magna (FSG). 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. Las muestras de agua y sedimentos no presentaron toxicidad por Microtox®, lo que señala que en el momento de los muestreos 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 durante la etapa I y tuvo una mejora importante en la etapa II, mejora que también mostraron el resto de las lagunas. La evaluación de la acetil-colinesterasa (AChE) fue aún más sensible, al permitir la observación de la mejora en la condición de los organismos en la etapa II del proyecto, lo cual coincide con la mejora presentada por los ostiones luego de pasar por un período de depuración largo, ya que en todos los casos los ostiones del grupo control tuvieron niveles más altos de AChE. Las pruebas con el ensayo cometa mostraron que todos los organismos tienen un daño basal y que de acuerdo con la longitud de los cometas la laguna en la que los organismos presentaron menor daño en

el ADN fueron Carmen Machona y Tamiahua en la etapa I del proyecto y Tamiahua y Términos en la etapa II. 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; asimismo, los organismos de la laguna Carmen Machona presentaron el porcentaje más bajo de anormalidades histopatológicas en la etapa I del proyecto, mientras que en la etapa II fueron los organismos de la laguna de Alvarado. Así, todos los biomarcadores demostraron su utilidad para evaluar la salud de los organismos. Los resultados de la exposición de ostiones a la FSG evidenciaron que la estabilidad lisosomal y la inhibición de la acetil-colinesterasas son biomarcadores adecuados para la evaluación del daño por exposición a hidrocarburos del petróleo a corto plazo, mientras que el ensayo cometa es útil para plazos más largos. Se recomienda el establecimiento de un programa de monitoreo para el Golfo de México en el que, al menos una vez al año, se cuantifiquen contaminantes de interés como lo son los hidrocarburos del petróleo y que al mismo tiempo se lleven a cabo mediciones de biomarcadores, esto permitirá poder evaluar los daños ecológicos en caso de un derrame accidental de petróleo u otras sustancias tóxicas.

EXECUTIVE SUMMARY.

One 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 ecologic 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 this 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 complete an ecotoxicological baseline for the coastal zone of the Gulf of Mexico. Water and sediments were sampled in the five coastal lagoons monitored in phase I of this project, but in different weather condition, to measure physical-chemical parameters and toxicity with Microtox®. Also, oysters (*Crassostrea virginica*) were sampled to evaluate through biomarkers (lisosomal stability, acetyl-cholinesterase activity, comet assay and histopatological evaluations) the health of their populations. Furthermore, a bioassay to expose oysters to the water soluble fraction of Magna gasoline (FSG) was performed. 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. Water and sediment samples presented no toxicity with Microtox®, which demonstrated that at the moment of the samplings 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. Lisosomal stability results showed that the Carmen Machona Lagoon was the most deteriorated ecosystem during phase I of this project, showing a significant improvement in phase II, which was also observed for the other lagoons. The evaluations of acetyl-cholinesterase activity (AChE) were even more sensitive, allowing the observation of an improvement of the organism's condition during phase II of this project and after a depuration period. The comet assay showed that all organisms have basal damage and accordingly with the tail length the organisms from Carmen Machona and Tamiahua had less DNA damage in phase I and those from Tamiahua and Terminos in phase II. With respect to the histopathological evaluations, these showed that in all the lagoons there are organisms in different health conditions. When deterioration was observe, this occurred in the food channel; also, organisms from Carmen Machona presented the lowest percentage of histopathological abnormalities in phase I and those from Alvarado in phase II. Thus all biomarkers showed its usefulness to evaluate the health of the organisms. The results of the exposure of oysters to FSG showed that lisosomal stability and acetyl-cholinesterase inhibition are adequate biomarkers to evaluate damage derived from exposure to oil hydrocarbons in short periods of time and that the comet assay is good for longer exposures. It is recommend the establishment of a monitoring program for the Gulf of Mexico in which, at least once a year, contaminants of interest are measured as well as biomarkers. This will allow the evaluation of ecological damage in case of an accidental oil spill or other chemical accidents.

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.

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 (Laubiert, 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 porciento de concentración de la muestra que produce un porciento determinado de disminución de la luz, usualmente el 50%. Esta concentración es conocida como Concentración Efectiva o CE50 (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 toxico 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:

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.

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.

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 (RRN) 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 (RRN) (Lowe y Pipe, 1994;. Lowe et al, 1995a, b); también se ha usado para evaluar los efectos de las diferentes temporadas climáticas y los cambios ambientales asociados con la reproducción, 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). La aplicación de la RRN en ensayos con ostras ha 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 realizo 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 álcali-lábiles 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 (Bernet et al.,1999). Existen diferentes tinciones especiales, como la tinción de PAS y MASSON dentro de la histo-tecnología que permiten una evaluación morfológica para clasificar, cuantificar y diferenciar diagnósticos de las alteraciones inducidas por agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos) y/o por contaminantes tales como los metales, xenobióticos orgánicos y otros (Estrada-Flores et al., 1982).

Existen diversas tinciones especiales, las cuales deben aplicarse de acuerdo a los objetivos específicos del estudio; para la visualización microscópica y la identificación de células, orgánulos, carbohidratos, minerales, microorganismos patógenos y respuestas biológicas específicas dentro los cuatro tejidos básicos. Actualmente existen técnicas diagnósticas especiales que coadyuvan en la descripción de la morfología tisular y los componentes celulares para la evaluación de ciertas enfermedades, tales como la inmunohistoquimica, la citometría de flujo y la hibridación *in situ*, que con ayuda de la microscopia electrónica o el analizador de imágenes, entre otras, dan el perfil de los tratamientos a seguir.

En trabajos de monitoreo ambiental se han utilizado algunas herramientas histológicas e histopatológicas para la evaluación de la integridad fisiológica y/o para la identificación de las respuestas biológicas como mecanismos de defensa, reparación de daño o lesiones derivadas de la exposición a contaminantes. Los moluscos, han sido empleados como organismos indicadores de contaminación y poseen diferentes órganos relacionados con el almacenamiento de nutrientes (glucógeno, proteínas, lípidos y otros). Existen órganos y tejidos que pueden ser más sensibles a ciertos contaminantes, y en el ostión se ha reportado que la composición de la glándula digestiva puede indicar el estado fisiológico de los organismos; asimismo, se han reportado respuestas celulares inducidas en tejido epitelial y conectivo que pueden asociarse con el estrés fisiológico (Guzmán-García et al., 2009; Thompson et al., 1974; Eble, 1969).

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

Obtener muestras de agua, sedimentos y ostiones en los sitios seleccionados el año anterior durante épocas climáticas complementarias, para contar con información tanto de lluvias como de secas.

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

Evaluar una serie de biomarcadores en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* 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.

Evaluar la respuesta del ostión *Crassostrea virginica* al ser intoxicado con petróleo, así como su capacidad de desintoxicación a través de un bioensayo de laboratorio.

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

METODOLOGÍA

Selección de la temporalidad de los muestreos.

Con base en los resultados obtenidos en la fase I de este proyecto, se planearon los muestreos para poder contar con información para dos épocas climáticas: lluvias y secas; ya que éstas tienen una importante influencia en el comportamiento de los contaminantes en el ambiente y en la biología de los organismos; por ejemplo, se ha reportado que algunos biomarcadores son influenciados por la salinidad, la cual es variable en las lagunas costeras (Monserrat et al., 2007). Por lo anterior, es necesario

evaluar las variaciones de los biomarcadores si se pretende poder diferenciar entre la variabilidad del sitio y la causada por efectos un derrame de petróleo u otras sustancias contaminantes.

Muestreo de agua y sedimentos

En cada laguna, se visitó el banco ostionero que los pescadores recomendaron y antes de recoger las muestras de animales, 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, 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.

Muestreo de organismos.

Se tomaron dos tipos de muestras de ostión; aquellos organismos que serían utilizados para los análisis de biomarcadores se sacaron del medio procurando que 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). Adicionalmente se sacaron organismos de los bancos de ostión y se seleccionaron para conformar muestras de talla uniforme que se colocaron en hieleras y se transportaron al laboratorio de la UAMI donde se aclimataron para su uso en el bioensayo.

Análisis de la calidad del agua.

Antes de procesar las muestras de agua, 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. En todos los casos se utilizaron las técnicas descritas en el manual del laboratorio portátil HACH (HACH, 1992).

Evaluación de la toxicidad de las muestras con la 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 diluente, 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 liquida, la cual se trató como cualquier muestra de agua, es decir se le agregaron 10 µL de bacteria reconstituida, y siguiendo las instrucciones del softwear 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 CE_{50}. 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 o/oo.

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 24 ºC.

El agua estuarina (22 *o/oo*) 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 el sistema de aclimatación de los ostiones.

Sistema de aclimatación.

El sistema de aclimatación consta de 14 acuarios de una capacidad de 60 L y un acuario de 160 L, donde recircula el agua hacia un Wet-Drive o sistema de filtrado, que es acompañado por un filtro Espumador (marca Diablo), un calcetín para retención de partículas, y dos más con carbón activado y calcio respectivamente. Los acuarios están interconectados por un sistema de abastecimiento y recirculación tipo flauta, y el agua es movida por dos bombas con capacidad de 2500 L/h., una para cada serie de acuarios (superior e inferior). Adicionalmente, el sistema tiene lámparas de barra para la

iluminación (luz blanca) o fotoperiodo. El sistema permite mantener condiciones estables de temperatura y salinidad a 24°C (±1°C) y 22 º/oo, respectivamente (Fig. 1)

En cada acuario se colocaron un máximo de doce organismos; todos los días se realizó el mantenimiento de los acuarios así como la alimentación de los ostiones con alga cultivada. Los organismos fueron alimentados con alga *Chlorella* sp., a una densidad de 15 a $20x10^6$cél/organismo/día. Todos los días se hizo la limpieza del sistema, la cual consistió en lavar con agua todos los aditamentos y retirar las heces de los ostiones por medio de un sifón. Los parámetros físico-químicos de los acuarios se registraron diariamente, mientras que la frecuencia del análisis de niveles de amonio fue cada 3er día.

Los ostiones permanecieron en aclimatación por un plazo de una a dos semanas antes de la medición de los diferentes biomarcadores o de su exposición a hidrocarburos en el bioensayo.

Figura 1. Sistema de aclimatación y mantenimiento de ostiones.

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), $MgSO_4$ (53 mM), KCl (10 mM) y $CaCl_2$ (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 obscuridad 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. 2).

Figura 2. 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. 3 y 4). Una vez obtenida la hemolinfa se procedió a mezclarla suavemente con la solución salina.

Figura 3. Ostión abierto y preparado la toma de muestra.

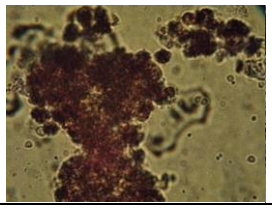
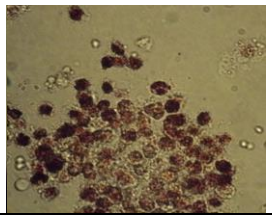
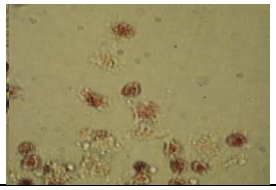
Figura 4. Extracción de hemolinfa

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 con un microscopio óptico (DIAPLAN Leitz) usando el objetivo 10X40, con baja intensidad de luz. Durante los primeros 60 minutos se hizo observaciones cada 15 minutos y posteriormente cada 30 minutos. Se registró el tiempo

de retención del colorante 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 cuando se detectaron anormalidades 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 abrió los ostiones con un cuchillo, cuidando de no maltratarlos. En seguida se realizó una disección de los tejidos, los cuales se congelaron a -20 ºC 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.

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.

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

Figura 5. Homogenización del tejido de ostión.

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).

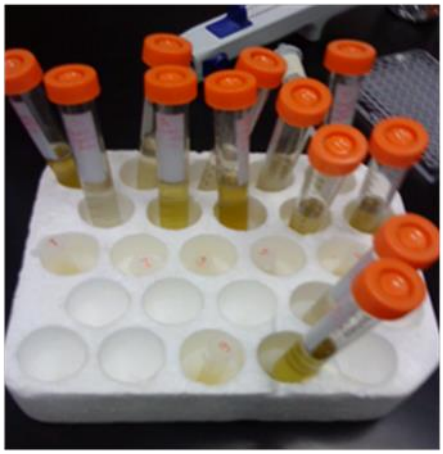


Figura 6. Tubos Corning con sobrenadante para su análisis.

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).

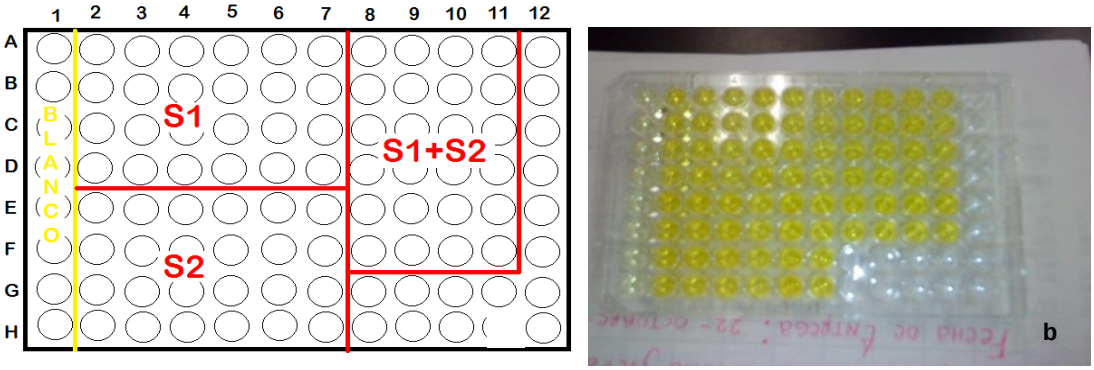


Figura 7. a: disposición de las diferentes soluciones que se evalúan en la microplaca. b:coloración de las soluciones en la microplaca para la determinación de AChE.

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).

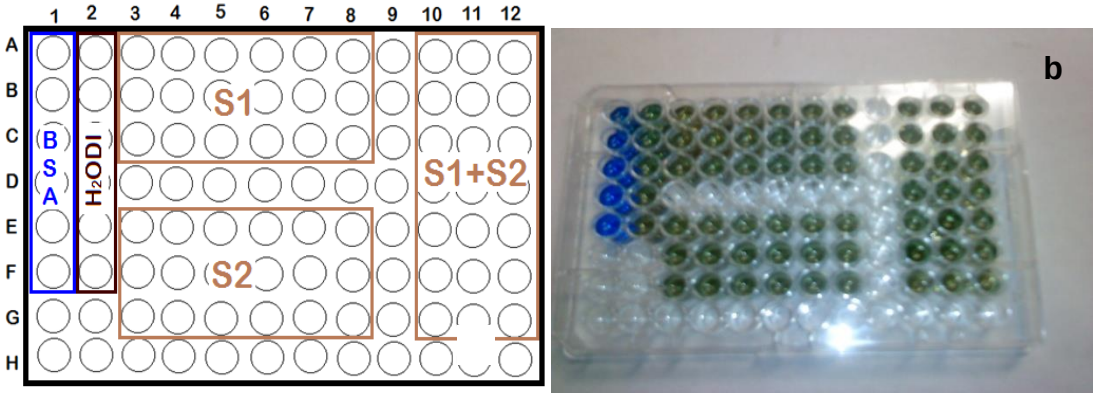


Figura 8.a: disposición de las diferentes soluciones que se evalúan en la microplaca. b:coloración de las soluciones en la microplaca para la determinación de proteínas.

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 cuadriplicado, 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 *Crassotrea virginica*. (Fig. 10).

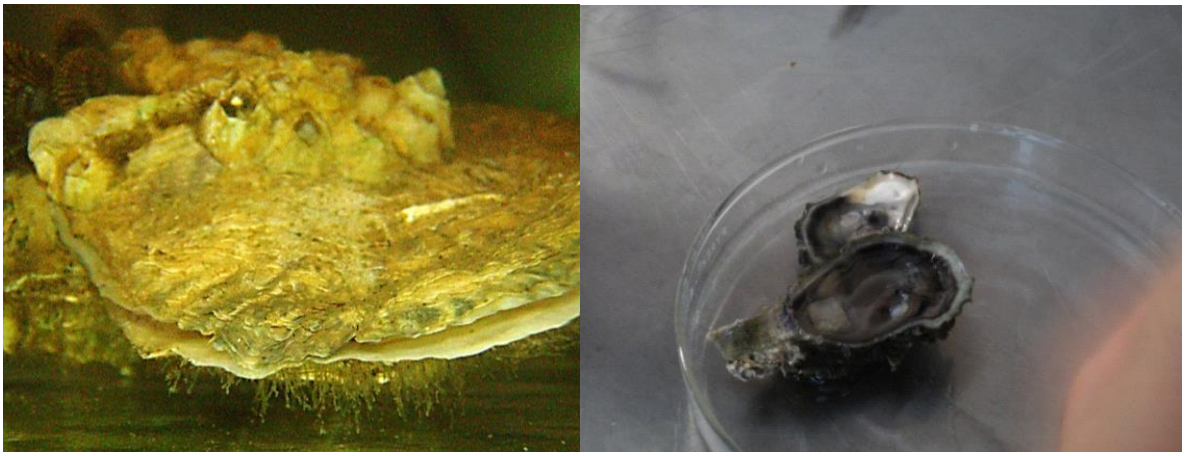


Figura 10. Ejemplares de *Crassostrea virginica* utilizados para la obtención de la suspensión celular.

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 500 µL de agua marina.

Preparación de los geles.

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

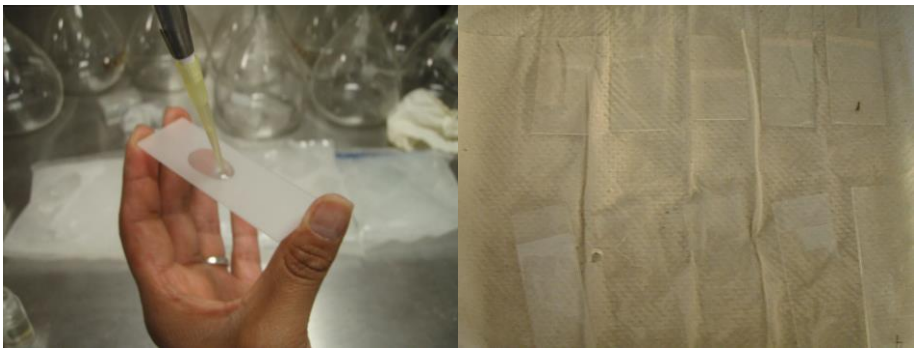


Figura 11. Geles de agarosa para la realización del ensayo cometa.

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 etilendiaminotetracetico (EDTA) y 10 µM de tris (Hycel 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 ^{o}C.

Figura 12. Solución de lisi en el frasco coplin, donde se incuban las muestra.

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 µM de EDTA (J.T. Baker), a pH 10 y se dejaron reposar en la cámara por 20 minutos para permitir el desenrrollamiento de la cadena de ADN. En seguida se aplicó una corriente de 25 V y 300 mA por 20 minutos (Fig. 13).

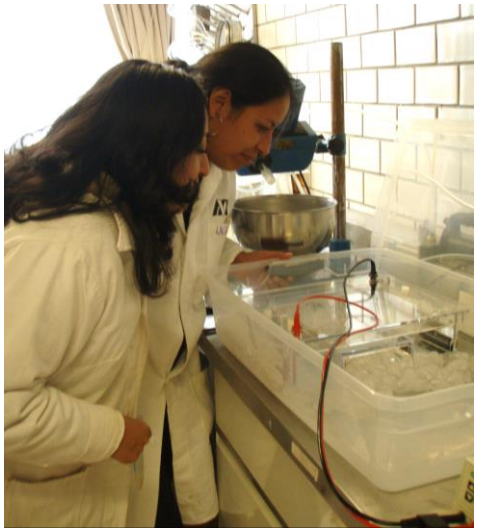


Figura 13. Electroforesis de las muestras.

Lavado de las muestras.

Las preparaciones se sacaron de la cámara de electroforesis y se lavaron tres veces con amortiguador de neutralización (Tris, Hycel 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 µL de red gel (Sigma) (20 kg/mL) y se les colocó un cubreobjetos. Los geles se almacenaron en una cámara húmeda a 4 oC en oscuridad hasta su revisión.

Análisis de las preparaciones.

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Axiostar Plus Zeiss equipado con una lámpara de fluorescencia HBO 50/AC, un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se tomaron fotografías de las células de los ostiones de cada localidad y del bioensayo, con una cámara fotográfica Canon EOS

(Fig. 14). Las medidas de longitud de los cometas se obtuvieron mediante el análisis de imágenes digitales con el software CROMAGEN. Cabe destacar que este software es distinto al usado en la Fase I de este proyecto, por lo que hubo que medir tanto las preparaciones de esta fase del proyecto como las del anterior ya que no son comparables los resultados de un programa a otro.

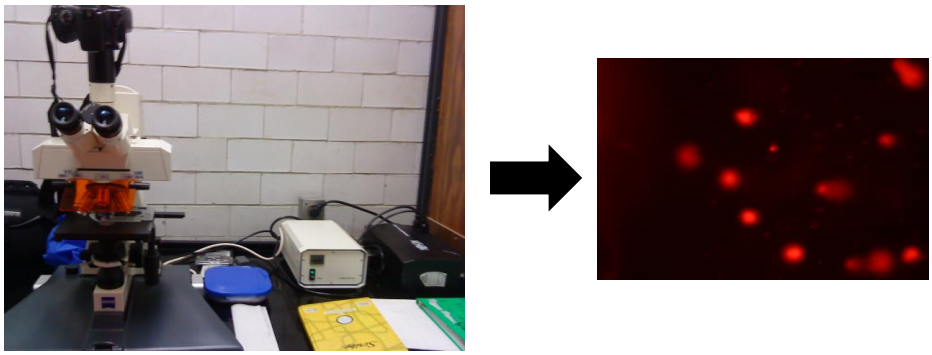


Figura 14. Microscopio de epifluorescencia para tomar fotografías de las células de ostión (*C. virginica*) para identificar la categoría del daño.

Análisis estadístico.

Las mediciones se expresaron como longitud en micras y se reportó la media de la población ± el error estándar para cada tratamiento experimental. Se aplicó la prueba no paramétrica de rango múltiple de Kruskall-Wallis, la cual se aplica para datos que tienen una distribución normal, donde los tamaños muestrales no son iguales y sea ni, i= 1, ...,k, el tamaño de la muestra de la i-ésima población. Con la hipótesis nula (H0): todas las distribuciones poblacionales son idénticas y como hipótesis alternativa (Ha): 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. Se consideró la prevalencia de lesiones para elaborar el diagnóstico (el incremento de células café, hemocitos, secreciones eosinófilas, inflamaciones, parásitos, atrofia de epitelios y tejido conjuntivo, cicatrizaciones, fibrosis, granulomas, hiperplasia-hipertrofia y displasia). Para evidenciar las respuestas histopatológicas, se seleccionaron cortes histológicos (10% aproximadamente) para realizar tinciones especiales que permitieran evidenciar la estructura tisular, como una prueba complementaria para el diagnóstico. Se utilizó el Kit de tinción para PAS que en términos generales evidenció la presencia de mucopolisacáridos neutros y permitió localizar la membrana basal (que es una capa extracelular de sostén). De manera análoga se realizó la tinción de Masson para observar la presencia del colágeno, producto posiblemente de los mecanismos de reparación del tejido conjuntivo (marca Hycel No. 64295). Posteriormente se llevó a cabo la fotodocumentación de las respuestas tisulares resaltadas mediante las tinciones especiales.

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

BIOENSAYO CON OSTIONES Y GASOLINA

Se planteó el desarrollo de un bioensayo en el que ostiones aclimatados a las condiciones de laboratorio fueran expuestos a la fracción soluble del petróleo; sin embargo no fue posible conseguir una muestra en cantidad suficiente para llevar a cabo dicho experimento, por lo que se procedió a sustituir el petróleo por gasolina Magna, la cual es un derivado del petróleo obtenido por destilación en las refinerías. Este experimento tuvo como objetivo observar la respuesta de los biomarcadores (estabilidad lisosomal, inhibición de la acetil-colinesterasa y ensayo cometa) durante una exposición a hidrocarburos y posteriormente durante una etapa de depuración, para demostrar su utilidad en la detección de efectos en caso de un derrame de petróleo.

Preparación de la soluciones de exposición.

Se prepararon 2,600L de agua a una salinidad de 22 $^{o}/_{oo}$; los cuales fueron utilizados para elaborar la mezcla de agua y gasolina y para el grupo control sin gasolina.

Para el bioensayo con gasolina se utilizó únicamente la fracción soluble en agua de la gasolina (FSG), ésta se obtuvo agitando suavemente por 24 h una mezcla de gasolina y agua en una proporción de 1:4. El agua se separó de la gasolina y se consideró a esta como el 100% de la FSG. A partir de esta solución se preparó una concentración de 12.5%, la cual fue utilizada para exponer a los ostiones, ya que en una prueba presuntiva, se demostró que a esta concentración los animales mantienen activa su filtración y por lo tanto su exposición al tóxico.

Diseño experimental.

El sistema de exposición consistió de ocho acuarios de 40 L (cuatro para el control negativo y cuatro para la exposición a gasolina). En cada acuario se colocaron 10 organismos. El tipo de circulación del sistema fue cerrado, con un recambio parcial del 50% del volumen de agua cada 24 horas.

Los acuarios estuvieron equipados con bombas de aireación para mantener los niveles de oxígeno disuelto (>5mg/L). La alimentación de los organismos fue igual que en el mantenimiento y la limpieza del sistema consistió en sólo retirar las heces de los ostiones por medio de un sifón. Los parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto) fueron registrados diariamente, mientras que el análisis de amonio se realizó cada 3er día.

Así, se tuvieron cuatro acuarios con 10 organismos para el grupo control y cuatro más para la exposición a la FSG. La fase de exposición tuvo una duración de siete días, seguida de una fase de recuperación, también de siete días.

Para la fase de recuperación, los ostiones que se encontraban en los acuarios de exposición fueron trasladados a acuarios con agua salobre artificial libre de hidrocarburos. En este periodo se observó un incremento de la presencia de heces sólidas, por lo que se procedió a retirarlas dos veces por día utilizando un sifón.

En la tabla 3 se muestran los días en los que se procedió a extraer del sistema cinco ostiones, de manera aleatoria, para la evaluación de biomarcadores. Estos organismos se disectaron para la obtención de: glándula digestiva para el análisis de acetilcolinesterasa, la cual se almacenó en un tubo de Eppendorf previamente etiquetado y se almacenó en un congelador a -20 °C; hemolinfa para estabilidad lisosomal; branquias para evaluación de daño al ADN. Los análisis de estabilidad lisosomal y ensayo cometa se llevaron a cabo simultáneamente al momento de la

extracción de los tejidos. Por otro lado, en los días 0, 4, 7, 10 y 14 se llevó a cabo la extracción de 5 organismos al azar para la determinación de la concentración de hidrocarburos totales. A estos organismos se les midió el índice de condición (IC) y con ellos se formó un pool, el cual se almacenó en un frasco color ámbar, previamente lavado y etiquetado, para su posterior análisis.

Tabla 3. Calendarización del bioensayo.

	Fase Exposición							Fase Recuperación							
Día	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
A	X	X	X	X	x	X	X	x	x	x	x	x	x	x	X
B	X	X			x			x	x	x					X
HC	X				x			x			x				X

A: Alimentación, limpieza y recambio de agua; B: Extracción de muestras para análisis de biomarcadores; HC, extracción de muestras para análisis de hidrocarburos.

ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN OSTIONES Y SEDIMENTOS.

Metales

La preparación de las muestras se hizo por digestión ácida asistida por microondas, de acuerdo con el método EPA 3051A; mientras que el análisis de los metales Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y V en sedimentos se llevó acabo por ICP-OES (iCAP 6500 DUO) de acuerdo con el método EPA 6010 C y por ICP-MS (X SERIES II) en ostiones de acuerdo al método EPA 6020 A.

Los contenidos de mercurio en sedimentos y ostiones se analizaron por absorción atómica con un equipo FIMS-400 de acuerdo con los métodos EPA 7470 A para ostiones y EPA 7471 B para sedimentos.

Como materiales de referencia se utilizaron:

- 2400/12 Metals in Soil Cat. 620, Study Soil 79, Lote D079-540, ERA (in home).
- Lake Superior Fish Tissue, SMR 1946, NIST.
- Trace Metals-Sandy Loam 9, lote= LRAA1192, catálogo= CRM026-50G,

Todos los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios del INECC y el informe de resultados tiene el número de folio INECC/0001/2015.

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Las muestras de sedimentos fueron preparadas para análisis siguiendo los métodos EPA – 3540C (Extracción soxhlet) y EPA – 3630C (Limpieza gel de sílice), mientras que la determinación de los HAPs se hizo de acuerdo con el método EPA – 8270D (Compuestos orgánicos semivolátiles) por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM-P&T IICOV – 0023 a IICOV – 0027).

Para el análisis de las muestras de ostiones, éstas fueron preparadas siguiendo el método USEPA 3541 (Extracción Soxhlet automático),mientras que la determinación de HAPs por HPLC se hizo con el método USEPA 8310 (Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100).

Todos los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios del INECC y los informes de resultados tiene el número de folio INECC/0002/2015 e INECC/0003/2015.

Análisis Estadístico.

Se aplicó estadística descriptiva para el análisis de los datos de concentraciones de contaminantes, obteniendo el promedio, el máximo y el mínimo como parámetros para comparar con los resultados reportados en la literatura.

La asociación de las concentraciones de contaminantes con los biomarcadores se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson a través de correlaciones múltiples con el paquete de computadora Statistica 7.

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 km se 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°/$_{OO}$, 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 a porte proveniente del rio 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 Temapache 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. , Penaus 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 $^{\circ}/_{oo.}$ 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 °/$_{OO.}$, 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CALIDAD DEL AGUA DE LAS LAGUNAS COSTERAS.

Parámetros físico-químicos y toxicidad.

Los parámetros físico-químicos medidos *in situ* se muestran en la tabla 4, donde se puede observar que la temperatura de las zonas de muestreo fue muy estable en ambas fases del proyecto, variando de 27.3 a 32.7 °C; la salinidad solo mostró diferencias temporales en las lagunas de Pueblo Viejo (22 y 3.4 ups) y Carmen Machona (38 y 28 ups), mientras que el oxígeno disuelto mostró diferencias en todas las lagunas excepto en Términos, con un máximo de 10.03 mg/L y un mínimo de 2.9 mg/L; éste último valor representa una condición estresante para los organismos acuáticos ya que está por debajo del 40% de la solubilidad del oxígeno en el agua. Por otra parte, ninguna de las muestras de agua o sedimento mostraron toxicidad con la prueba de Microtox®, lo que indica que la presencia de contaminantes no es suficiente para causar toxicidad aguda y por lo tanto que los bancos ostioneros no se encuentran en lugares altamente contaminados.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del agua de las lagunas costeras del Golfo de México donde se obtuvieron ostiones.

	Pueblo Viejo		Tamiahua		Alvarado		Machona		Términos	
Fase	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
T°C	32.7	27.3	28.5	30.2	29.9	30.0	31.0	30.0	28.0	30.0
Salinidad	22.0	3.4	28.0	30.0	29.0	12.0	38.0	28.0	29.0	29.5
Profundidad (m)	1.0	1.5	1.5	1.2	2.0	2.0	0.9	1.0	0.8	1.0
pH	7.8	8.8	7.7	7.0	7.7	8.3	7.9	8.2	7.8	7.8
O.D.	10.3	6.5	9.0	3.7	2.9	5.9	3.3	5.2	6.3	6.5
Microtox®	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(NT) Muestra NO Toxica

Nutrientes.

Las concentraciones de fosforo total (Fig. 15) en agua presentaron niveles entre los 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, en ambas fases del proyecto; cabe destacar que en el muestreo de la fase II del proyecto, se observó una baja importante de este parámetro en la laguna de Pueblo Viejo, pero no suficiente para dejar de representar un riesgo para los organismos acuáticos.

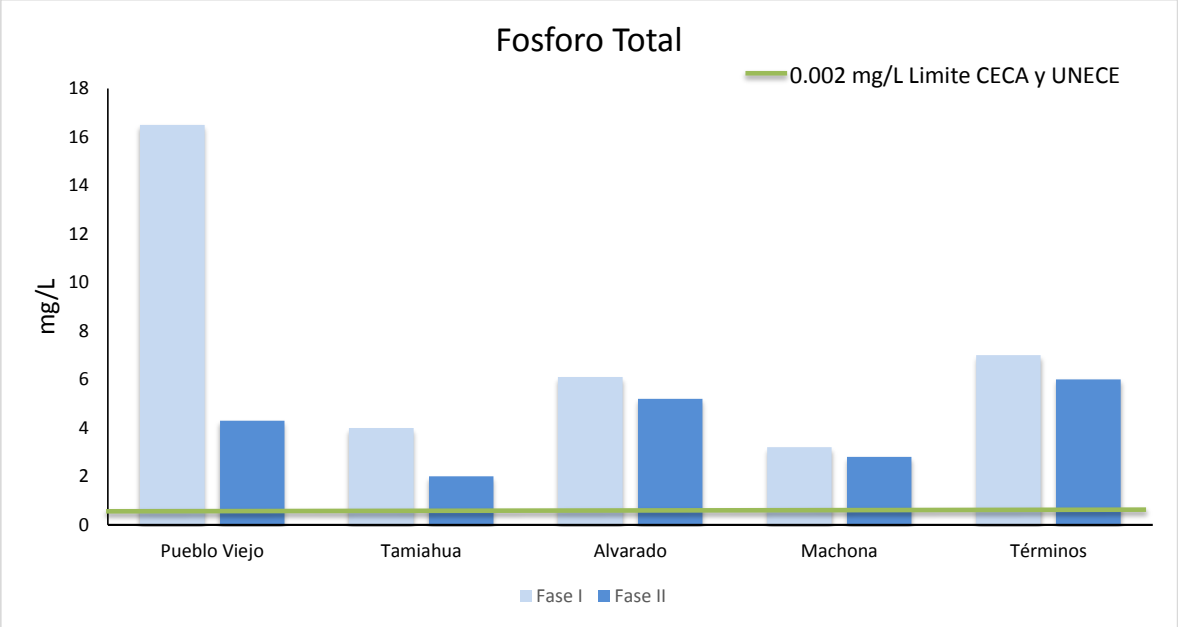


Figura 15. Concentración de fósforo total en el agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. UNECE: Clasificación Estadística Europea de la Calidad del Agua en protección de la Vida Acuática.

Los resultados obtenidos de ortofosfatos (Fig. 16), también mostraron un alto contenido de esta forma del fósforo en ambas fases del proyecto. 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. La única excepción fue el valor registrado para la laguna de Tamiahua en la fase II de este proyecto.

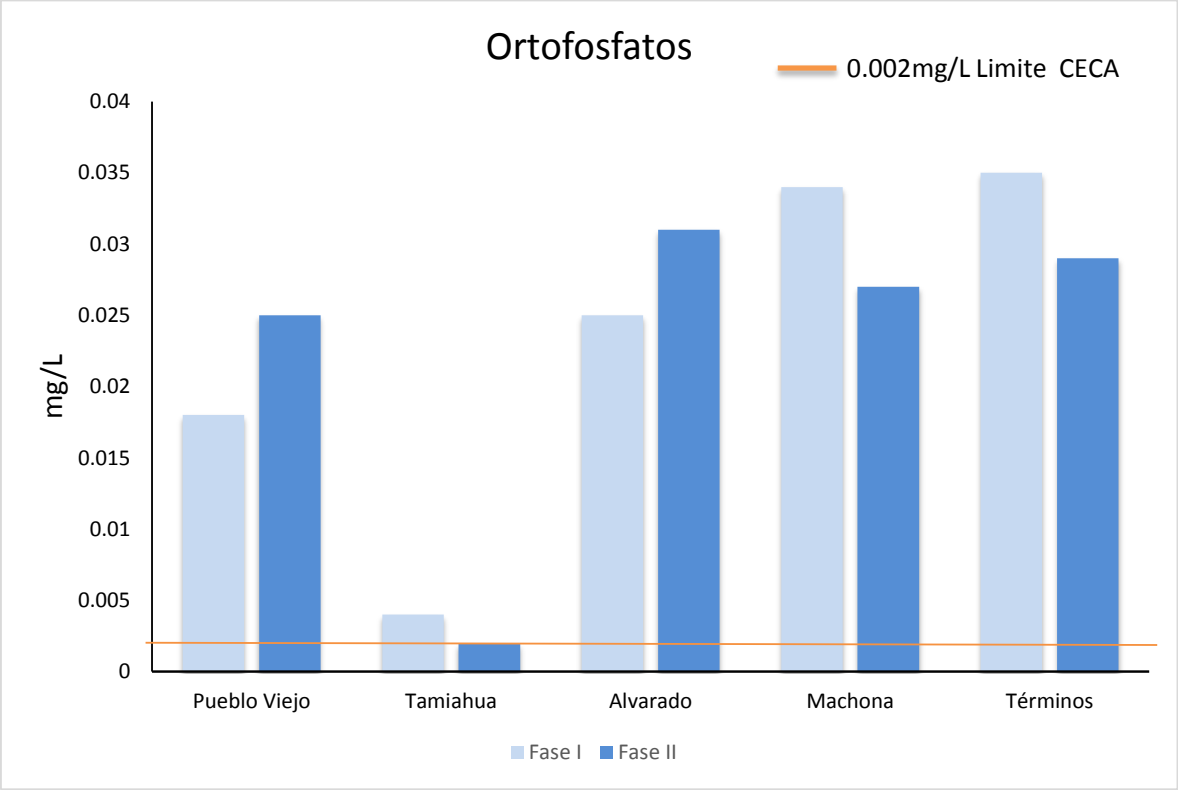


Figura 16. Concentración de Ortofosfatos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua.

En cuanto a las concentraciones de nitratos (Fig. 17), los valores más altos se presentaron en la laguna de Pueblo Viejo, seguida de Tamiahua, Términos, Alvarado y Carmen Machona. Todos los valores estuvieron por encima de los criterios de calidad del agua, rebasándolos significativamente. En la fase II del proyecto las lagunas de Pueblo Viejo y Alvarado presentaron valores más altos que en la fase I, mientras que los valores de las lagunas de Tamiahua, Machona y Términos bajaron.

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). La concentración registrada para la laguna de Pueblo Viejo en la fase II fue cinco veces menor que la de la fase I, lo cual disminuye los riesgos de daño ecológico.

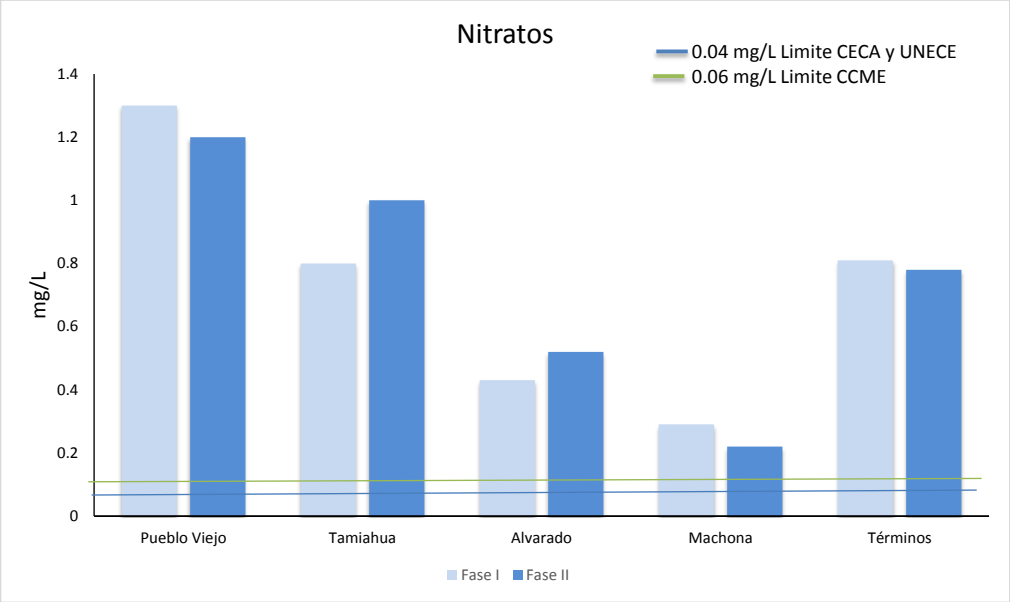


Figura 17. Concentración de nitratos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. UNECE: Clasificación Estadística Europea de la Calidad del Agua en protección de la Vida Acuática.

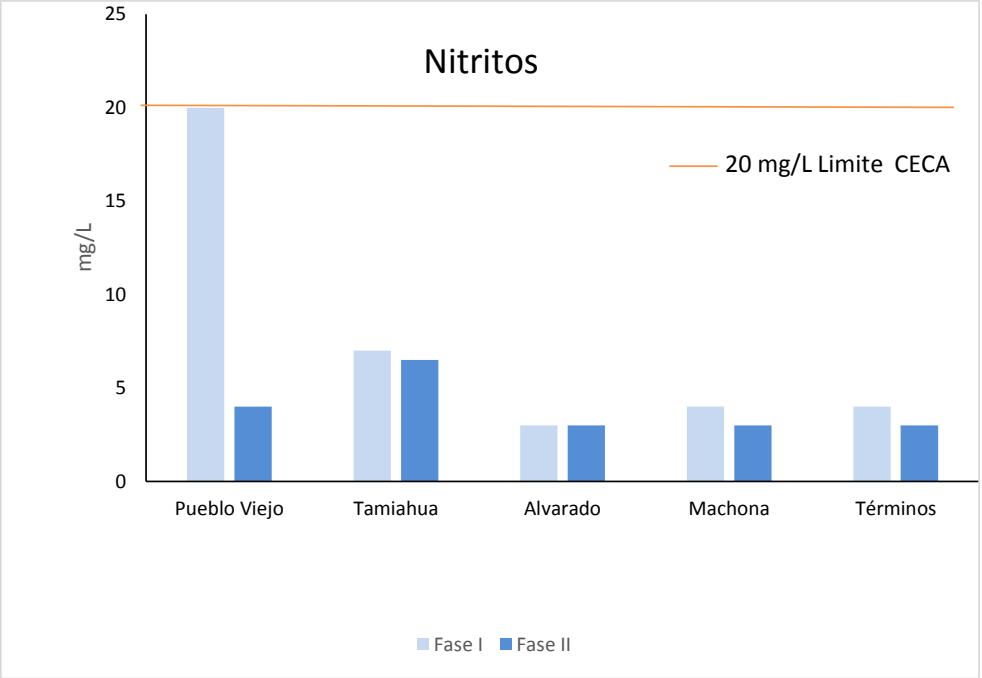


Figura 18. Concentración de nitritos en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua.

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 estos límites tanto en la fase I como en la fase II de este proyecto, con excepción de la laguna de Términos. En casi todos los casos, los valores del la fase II fueron menores a los de la fase I.

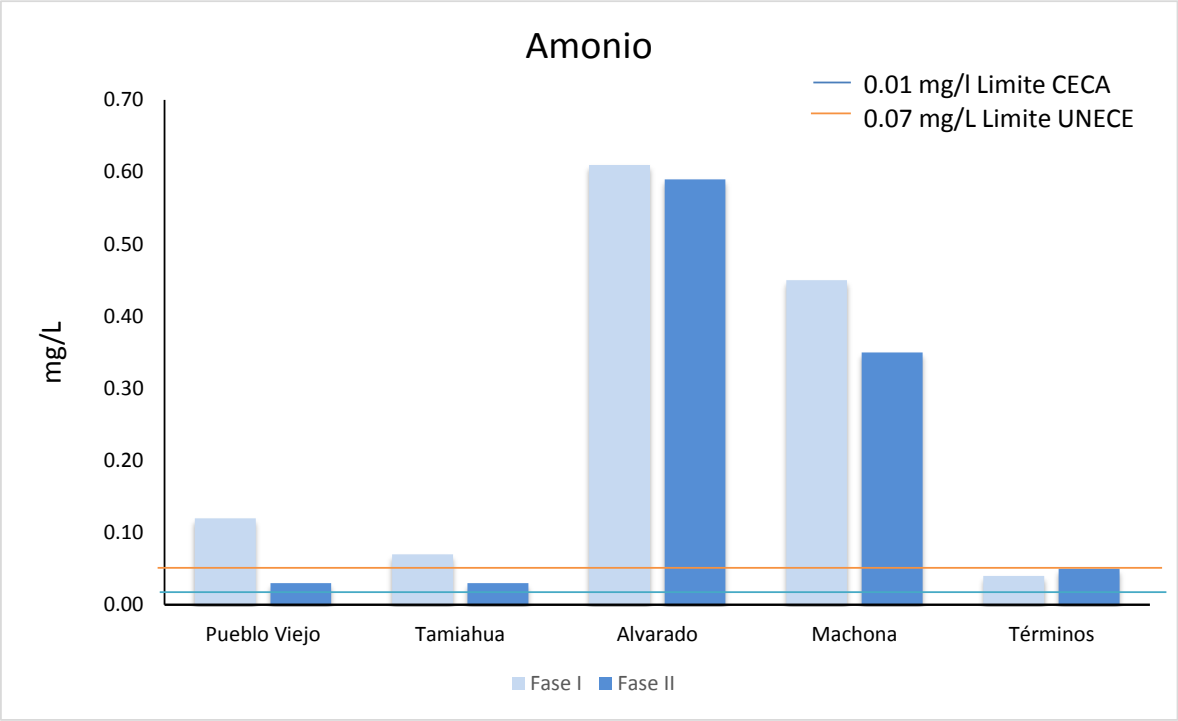


Figura 19. Concentración de amonio en agua de las lagunas costeras del Golfo de México. CECA: Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua. UNECE: Clasificación Estadística Europea de la Calidad del Agua en protección de la Vida Acuática.

BIOMARCADORES

Parámetros morfométricos

Los ostiones obtenidos para la evaluación de biomarcadores, de esta segunda fase presentaron un largo promedio de 7.5 a 10.3 cm, y un ancho promedio de 4.3 a 7.2 cm (Anexo I); en general estos animales no presentaron diferencias de tamaño con respecto a los organismos analizados en la fase I, excepto para Tamiahua donde los animales de la fase II son significativamente más grandes que los de la fase I, lo cual se puede apreciar en la figura 20. Esta situación no afectó la evaluación de los biomarcadores ya que la estabilidad lisosomal, el daño al ADN y la histopatología no dependen del tamaño de los individuos y en el caso de la inhibición de la acetilcolinesterasa, las mediciones se estandarizan por gramo de proteína obtenida.

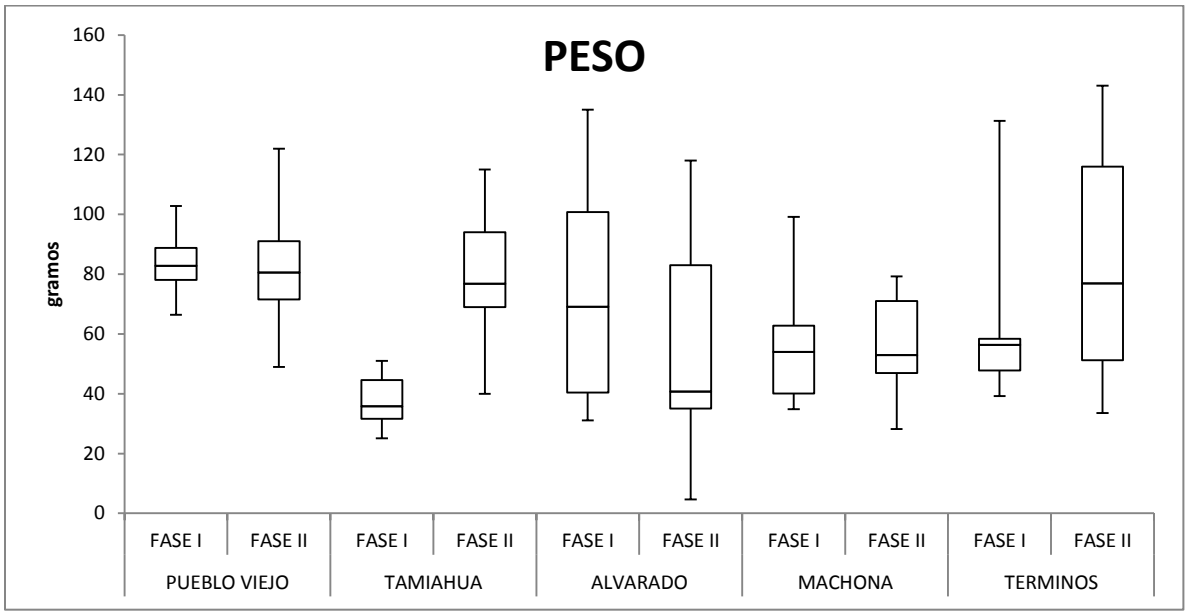


Figura 20. Peso en gramos de los ostiones de cinco lagunas del Golfo de México utilizados para la evaluación de biomarcadores en las fases I y II del proyecto.

Estabilidad lisosomal.

Como se puede observar en la tabla 5 el promedio de los tiempos de retención del rojo neutro (RRN) para los ostiones evaluados en esta fase varía de 126 a 163 minutos, lo que indica que en general el estado de salud de los animales en todas las lagunas es similar.

Tabla 5. . Promedio y desviación estándar de los tiempos (minutos) de retención del rojo neutro en ostiones del Golfo de México en las dos etapas del proyecto.

		P.VIEJO	TAMIAHUA	ALVARADO	MACHONA	TÉRMINOS
FASE I	$\bar{x}$	120.00	115.71	180.00	69.75	151.25
	σ	21.21	42.79	0.00	35.72	43.12
FASE II	$\bar{x}$	131.54	126.67	163.75	152.31	130.38
	σ	67.68	66.71	29.31	33.86	42.38

Al comparar los resultados de las dos fases (Fig. 21) se puede observar que la dispersión de las mediciones aumentó en los animales de Pueblo Viejo, Tamiahua y Alvarado, lo que indica que los organismos están estresados pero sin cambios, estadísticamente significativos, entre los resultados obtenidos en las fases I y II; sin embargo los ostiones de la laguna Carmen Machona mostraron una mejora en su estado fisiológico al aumentar de 69 a 152 minutos el promedio del tiempo de RRN, esto pudiera estar relacionado con una concentración de oxígeno disuelto mayor (5.2 mg/L) y una salinidad menor (28 ups), que coinciden con el intervalo óptimo para el cultivo del ostión (SEPESCA, 1988), mientras que la concentración de oxígeno disuelto es menor y la salinidad mayor para la fase I (ver tabla 4).

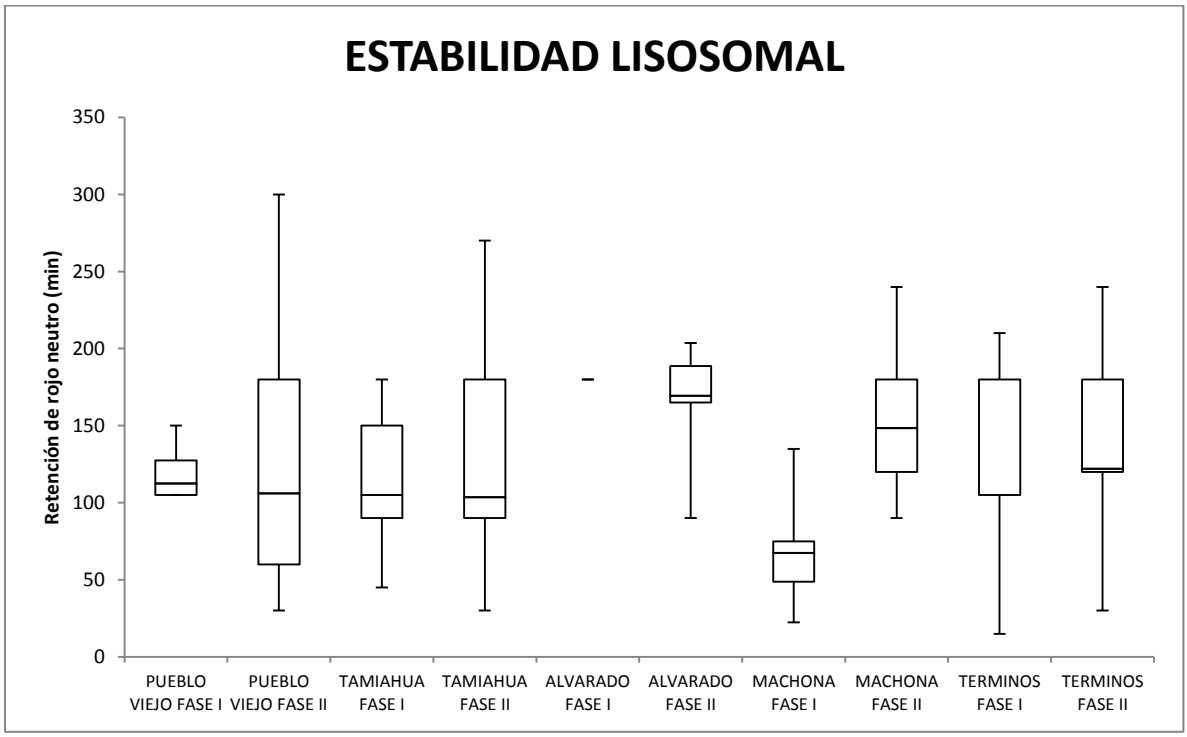


Figura 21. Comparación de la Retención de Rojo Neutro en ostiones del Golfo de México (Fase I y II).

La RRN es un ensayo que mide el daño lisosomal siendo este un indicador integrado y rápido del estado de salud de un organismo, que se ha aplicado 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), a el cambio de las condiciones ambientales y la temporada climática (Ringwood et al, 2002; Hauton *et al*, 1998), así como a la inoculación bacteriana (Hauton *et al*., 2001), etc.

En el presente estudio, no se detectaron diferencias significativas en la RRN en cuatro de las cinco localidades evaluadas; sin embargo en la fase I del proyecto se pudo observar una menor retención en organismos que estuvieron en aclimatación por un largo periodo y que entonces tuvieron la oportunidad de depurarse (Ramírez, et al., 2012), así como en los ostiones de la Machona en la fase II que se encontraban en un ambiente más propicio para su desarrollo, lo que indica que la técnica de estabilidad lisosomal es 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.

Inhibición de la Acetilcolinesterasa

En la figura 22 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 de la fase I con aclimatación corta y larga (controles) y los resultados de las muestras de la fase II.

Los valores registrados para Pueblo Viejo no presentan diferencias significativas, sin embargo los organismos de la fase II muestran valores de AChE ligeramente más altos que los otros dos grupos, lo que indica que la salud de los organismos muestreados en la fase II es ligeramente mejor.

Los organismos de Tamiahua muestran diferencias significativas ($p<0.05$) entre los controles y la fase I, apreciándose el efecto positivo de una aclimatación larga. Los resultados de la fase II, también son diferentes de los de la fase I, pareciéndose más a los de los ostiones aclimatados, por lo que en este grupo se observó, igual que en el anterior, un mejor estado de salud en la fase II de este proyecto.

En el caso de los organismos de Alvarado no hay diferencias significativas entre los grupos de la fase I, pero los ostiones de la fase II presentan valores más altos que los animales de la fase I ($p<0.05$). Este mismo comportamiento lo presentaron los organismos de la laguna Carmen Machona y también los ostiones de la laguna de Términos. Así, podemos decir que en general los ostiones muestreados durante la fase II de este proyecto presentaron un mejor estado de salud que aquellos de la fase I, y que cuando los organismos de la fase I tuvieron la oportunidad de aclimatarse por largo tiempo mejoraron la respuesta enzimática de la AChE. 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.

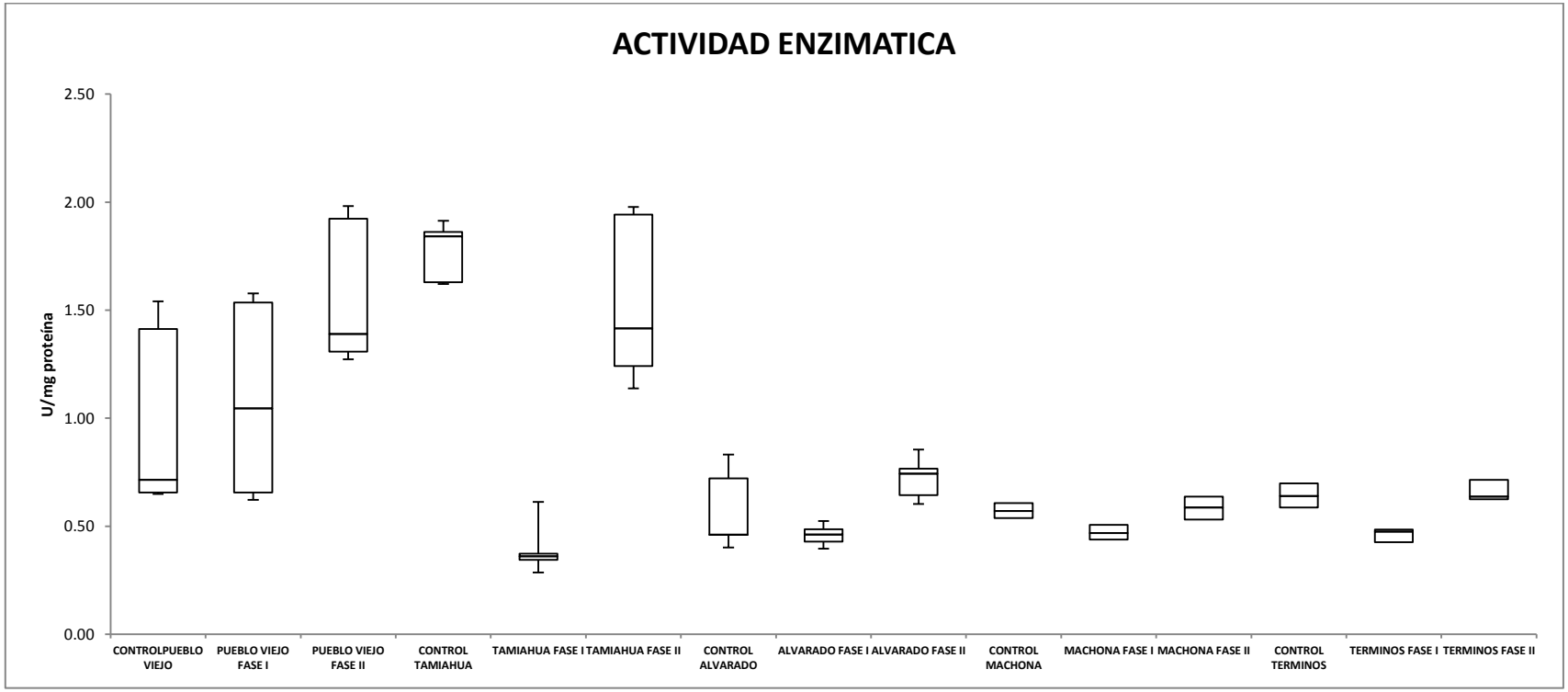


Figura 22. Comparación de la actividad enzimática AChE en ostiones de las lagunas del Golfo de México. (Controles vs. Fase I vs. Fase II).

En la figura 23 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. Para el caso los ostiones de la laguna de Pueblo Viejo la fracción S2 muestra un nivel más alto en la fase II. En los animales de Alvarado ambas fracciones expresaron una actividad significativamente mayor en la fase II, y al igual que en el grupo anterior la S2 es la que muestra mayores diferencias. En cuanto a los organismos de las lagunas Carmen Machona y Términos aunque también ambas fracciones mostraron una actividad mayor en la fase II, en este caso el la fracción S1 la que muestra la mayor diferencia. En casi todos los casos los animales que estuvieron en aclimatación por largo tiempo también muestra este patrón de mejora en la expresión de ambas fracciones, como ya se había reportado en el informe de la fase I de este proyecto (Ramírez, et al., 2011).

Los resultados de ambas fases de este proyecto muestran la utilidad de la medición de la AChE como biomarcador para evaluar el estado de salud de organismos acuáticos como los ostiones, que se encuentran en el ambiente expuestos a hidrocarburos del petróleo y que al ser trasladados a mejores condiciones, como lo son las de aclimatación al laboratorio, muestran una mejora en la expresión de esta enzima. Estos resultados coinciden con lo ya reportado por otros autores como Bocquené et al., (2004), Ribeiro et al., (1999) Stien et al., (1998) y Payne et al. (1996) por mencionar algunos.

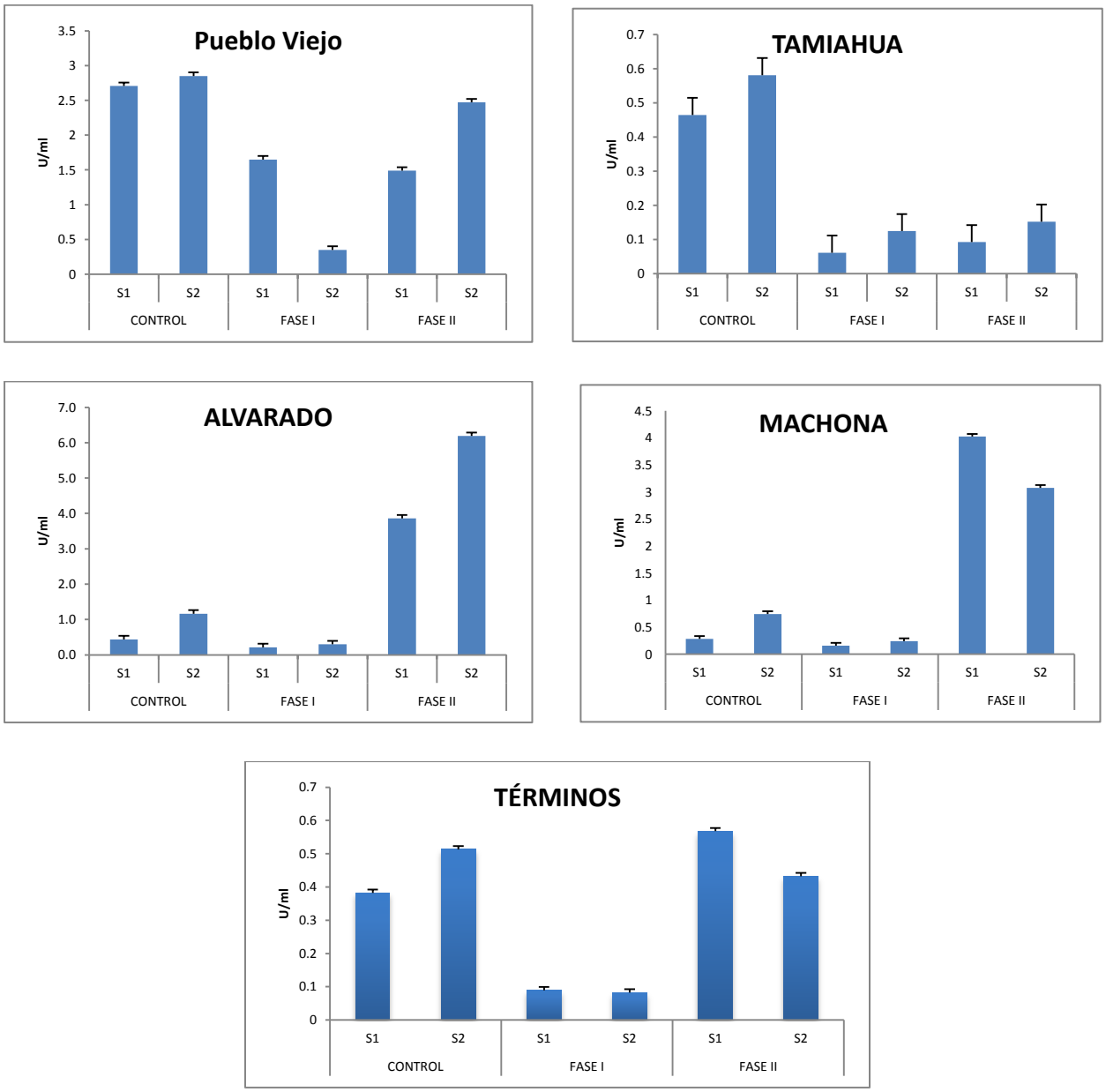


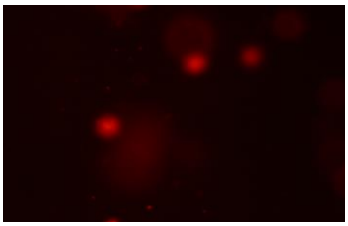
Figura 23. Comparación de la actividad enzimática de los ostiones de las diferentes localidades con su control (U/mL). S1: proteínas débilmente unidas a la membrana. S2: proteínas fuertemente unidas a la membrana.

Ensayo cometa.

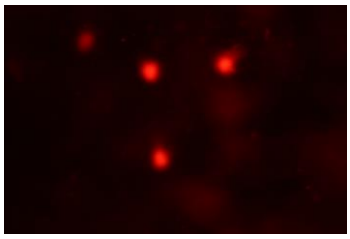
En la tabla 6 se muestran las diferentes categorías de daño en la cadena de ADN con base en la longitud promedio, en la figura 24 se presentan los diferentes niveles de daño que se identificaron visualmente.

Tabla 6. Clasificación del daño en la cadena de ADN con base en la longitud promedio de la migración del ADN.

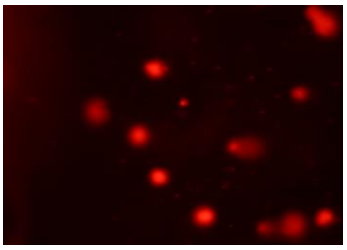
Estadio	Longitud promedio (µm)	Categoría del daño
1	0	Sin daño
2	1-20	Bajo
3	21-60	Medio
4	60-80	Alto
5	80-140	Total



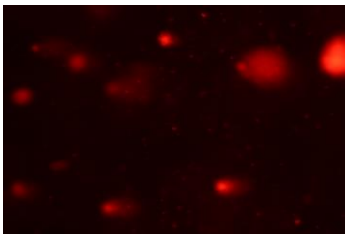
Sin daño 0 µm



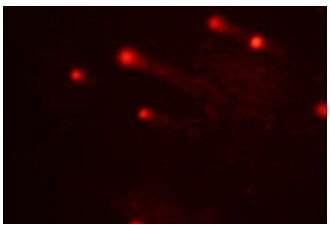
Daño bajo 1-20 µm



Daño medio 21-60 µm



Daño alto 61-80 µm



Daño total 81-140 µm

Figura 24. Imágenes 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

El análisis del porcentaje de número de células con daño mostró que en general, los bancos ostioneros no se encuentran expuestos de manera importante a substancias genotóxicas, por lo que sólo se observaron células en las categorías de daño bajo y medio tanto en la fase I como en la fase II (ver tabla 7); cabe mencionar que debido a la descompostura de un congelador se perdieron algunas muestras y como consecuencia el número de células analizadas para la fase II es menor, especialmente para Carmen-Machona.

En la fase I, los ostiones de la Laguna de Tamiahua y Carmen-Machona presentaron un 100% de células con daño bajo, seguidos de los ostiones de Pueblo Viejo (99.6 %) y de la Laguna de Términos (93.8 %). El mayor número de células con daño medio se observaron en los organismos de la Laguna de Alvarado (12.3%).

En la fase II, los ostiones siguen presentando la misma tendencia, de hecho los resultados para los animales de la Laguna de Tamiahua fueron iguales a los de 2011 (100% de células con daño bajo), pero ahora se unieron a este grupo los organismos de las Lagunas de Términos y Alvarado. Los ostiones de Pueblo Viejo siguieron al grupo anterior con un 97.8% de células con daño bajo y los de Carmen Machona presentaron el mayor porcentaje de células con daño bajo (12.3%).

Tabla 7. Número de células y porcentaje por categoría de daño de *Crassostrea virginica* del Golfo de México.

Fase I

Localidad	Total de células	Sin daño (0 µm)	Bajo (1-20 µm)	Medio (21-60 µm)
Pueblo Viejo	273	0	272 (99.6%)	1 (0.4%)
Tamiahua	269	0	269 (100%)	----
Alvarado	253	0	222 (87.7%)	32 (12.3%)
Carmen-Machona	294	0	294 (100%)	----
Laguna de Términos	290	0	272 (93.8%)	18 (6.2%)

Fase II

Localidad	Total de células	Sin daño (0 µm)	Bajo (1-20 µm)	Medio (21-60 µm)
Pueblo Viejo	186	0	182 (97.8%)	4 (2.2%)
Tamiahua	370	0	370 (100%)	0
Alvarado	108	0	108 (100%)	0
Carmen-Machona	29	0	27 (93.1%)	2 (6.9%)
Laguna de Términos	84	0	84 (100%)	0

Longitud de las caudas de los cometas.

El análisis de la longitud promedio de la cauda de los cometas (Tabla 8), reveló para la fase I el siguiente orden:

Carmen-Machona < Tamiahua < Pueblo Viejo < Términos < Alvarado

y para la fase II:

Tamiahua < Términos < Alvarado < Pueblo Viejo < Carmen-Machona

Estos resultados de longitud son similares a los anteriores de porcentaje de células con daño, colocando a Tamiahua como el ambiente en el que menor daño al ADN se observó tanto en la fase I como en la fase II.

Tabla 8. Longitud promedio de la cola del cometa (µm) y desviación estándar calculadas para cada localidad.

Fase I

Localidad	Pueblo Viejo	Tamiahua	Alvarado	Carmen-Machona	Laguna de Términos
Promedio	10.13	7.13	10.95	6.57	10.5
Des. Std.	2.92	2.22	10.65	1.89	8.5

Fase II

Localidad	Pueblo Viejo	Tamiahua	Alvarado	Carmen-Machona	Laguna de Términos
Promedio	12.6	5.54	10.17	13.5	9.61

Des. Std.	4.52	2.0	1.97	5.21	2.7

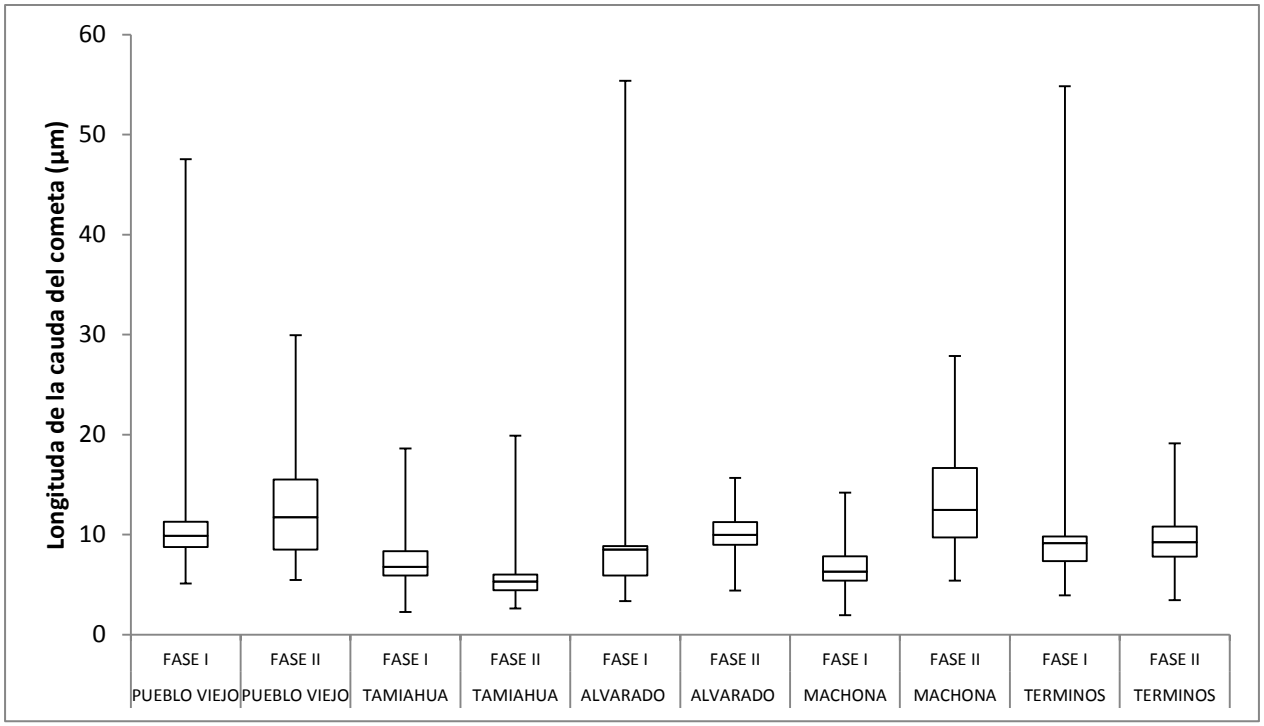


Figura 25. Longitud de la cauda del cometa de los ostiones de cinco lagunas costeras en las fases I y II del proyecto.

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas ($p< 0.05$) entre los lotes de células analizadas de todas las localidades (Fig. 25) aunque se puede identificar que la laguna de Tamiahua fue la localidad donde los ostiones presentaron menor daño en la cadena de ADN.

Todas las células de los sitios de estudio mostraron daño bajo, 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 protegen 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 las diferentes localidades de este estudio fue mucho menor. 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 para todas las localidades de estudio (Pueblo Viejo, Tamiahua, Alvarado Machona 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 µm (± 12.25) y 28.92 µm (± 6.7) respectivamente y en hemocitos fue de 22.6 µm (± 6.3) y 19.4 µm (± 19.4). Para M. arenaria en el mismo periodo de aclimatación, empleando la glándula digestiva, la longitud de los cometas fue de 34.31 µm (± 6.29) y 22.1 µm (± 12.13) y para hemocitos fue de 22.85 µm (± 4.8) 23.9 µm (± 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 µm, 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 análisis morfométrico de los ostiones colectados en 2011, 2012 y 213 indica que se existe una relación alométrica y que las condiciones alimenticias fueron adecuadas, ya que el índice de condición (IC) en los organismos colectados fue relativamente alto, es decir mayor a 100 (Tabla 9). De acuerdo al índice de condición los organismos presentaron condiciones fisiológicas que no comprometen sus procesos metabólicos. El valor del IC en los ostiones, fue de mayor a menor, en el siguiente orden: Machona > Alvarado > Tamiahua > Términos > Pueblo Viejo.

En el análisis macroscópico se identificaron organismos asociados similares en todas las colectas: mejillones, balanos, cangrejos, poliquetos y esponjas. Las conchas no presentaron perforaciones y su consistencia fue regular, es decir no fue frágil.

Tabla 9. Tabla de Datos morfométricos e Índice de condición (IC) de Moluscos Bivalvos colectados en cinco Lagunas Costeras del Golfo de México.

FASE I.

Lugar de colecta	Términos, Cam.	Alvarado, Ver.	Machona, Tab.	Tamiahua, Ver.	Pueblo Viejo, Tam.
No. de organismos	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 (g)	3	9	4	4.5	5.8
I.C.	138	212	228	195	120

FASE II

Lugar de colecta	Términos, Cam.	Alvarado, Ver.	Machona, Tab.	Tamiahua, Ver.	Pueblo Viejo, Tam.
No. de organismos	25	35	25	25	25
No. de cortes	30	50	30	30	30
Técnicas Especiales PAS	32				
MASSON	32				

Longitud (cm)	8	8	8	7.9	8.7
Ancho (cm)	4	5	4	5	4
Alto (cm)	3	3	2	3	2
Peso (g)	4	11	6	8	5.6
I.C.	139	215	230	200	115

Análisis Tisular en Bivalvos.

El canal alimentario incluye el esófago, estómago, saco del estilete, intestino y glándula digestiva. En términos generales el canal alimentario presenta una estructura tisular, que distingue; una serie de conductos revestidos por epitelio (Fig. 25). Los epitelios, son relevantes en el esófago, estómago y en la glándula digestiva. El epitelio del esófago, presenta numerosas microvellosidades en la parte apical y se observan células eosinófilas y mucosas, se distingue la membrana basal del epitelio que contiene abundantes elementos celulares y está conformada con mayor número de fibrillas reticulares (Fig. 26). El epitelio del estómago es ciliado, irregular con numerosas ondulaciones tapizadas por células de diferentes tamaños de tipo columnar, con núcleo central pequeño y esférico (Fig. 27). El saco del estilete es una estructura con posición paralela al intestino, su estructura contiene una reserva de enzimas digestivas, en algunas porciones existen cuerpos parabasales (constituidos por una estructura molecular semejante a los centriolos) que conforman una línea gruesa (Fig. 28). En el intestino, El epitelio ciliado está constituido por células prismáticas, regulares, alargadas y estrechas con núcleos ovoidales en posición basal y cromatina condensada en gruesos gránulos, además de contener células mucosas y eosinófilas (Fig 29). Además de las características observadas en la región epitelial fue posible definir respuestas en el tejido conectivo al observar células vesiculares ricas en glucógeno así como la presencia de células café.

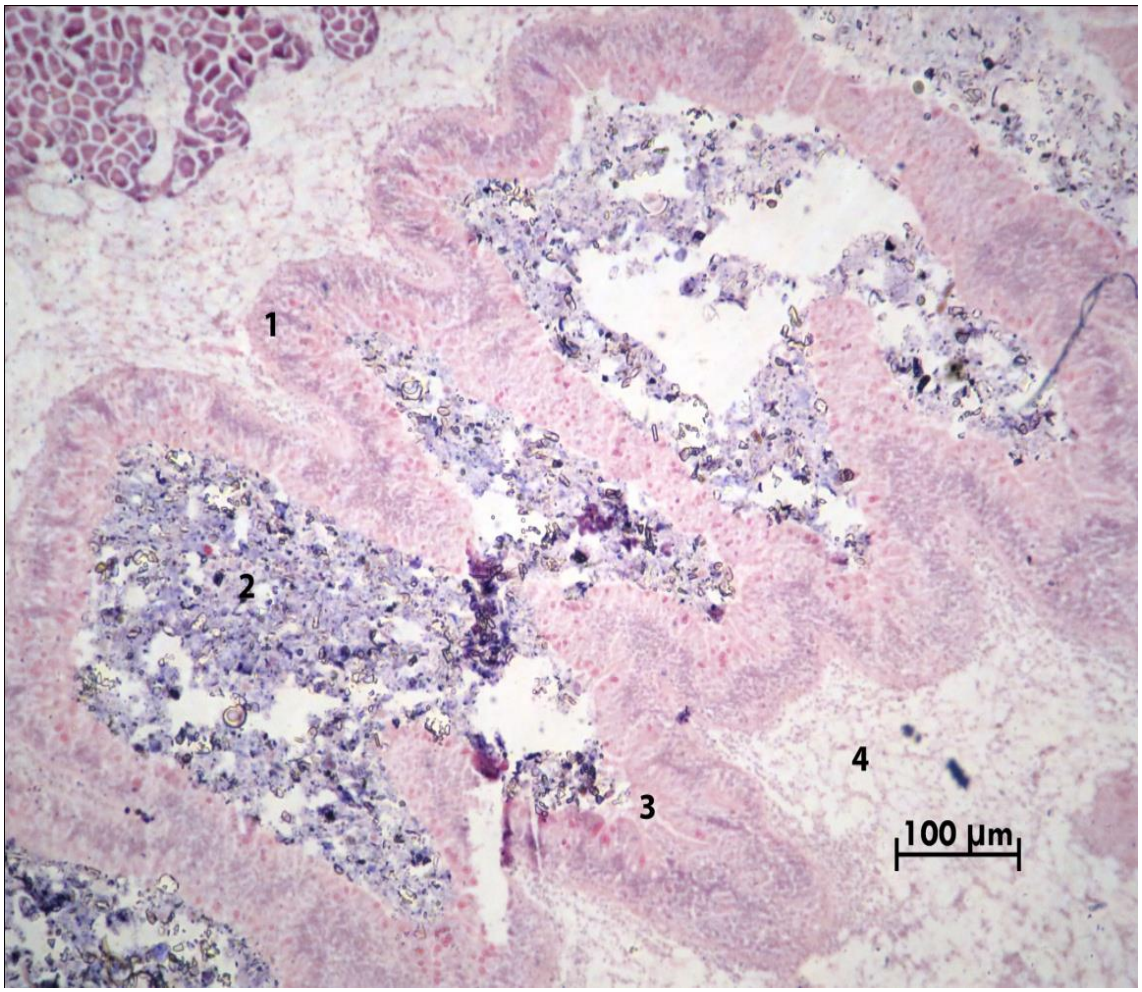


Figura 25. Microfotografía del canal alimentario, formado por una serie de conductos con epitelio columnar (1). También se observa contenido alimenticio (2), secreciones eosinófilas (3) y tejido conjuntivo (4) rodeando los conductos. Ostión colectado en Alvarado

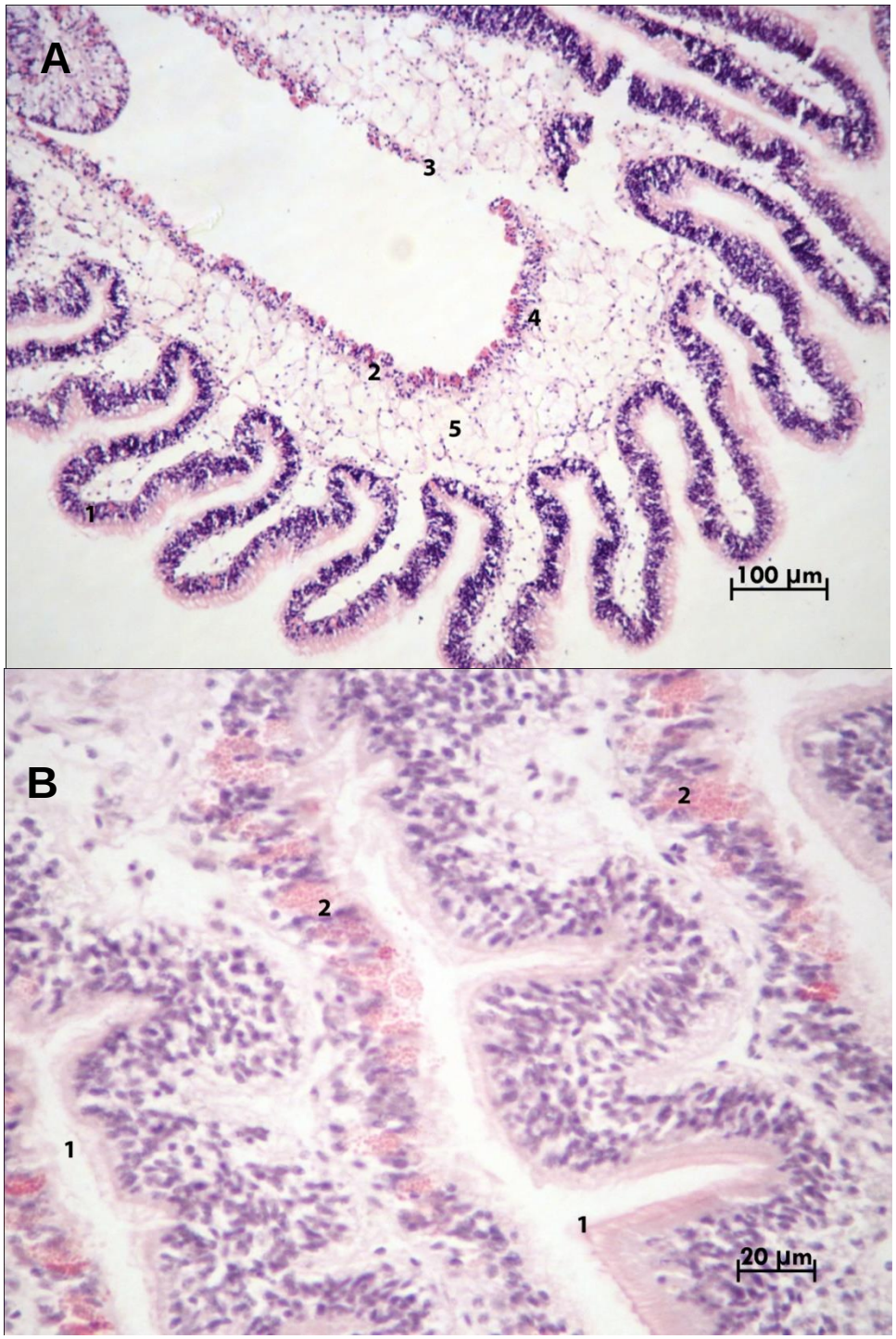


Figura 26. Microfotografía de esófago A) epitelio rugoso de forma plegada (1) y liso (2), las células epiteliales son pequeñas de forma ovoidal (3) y sus núcleos teñidos intensamente. Se observan secreciones eosinófilas (4), células mucosas y tejido conjuntivo

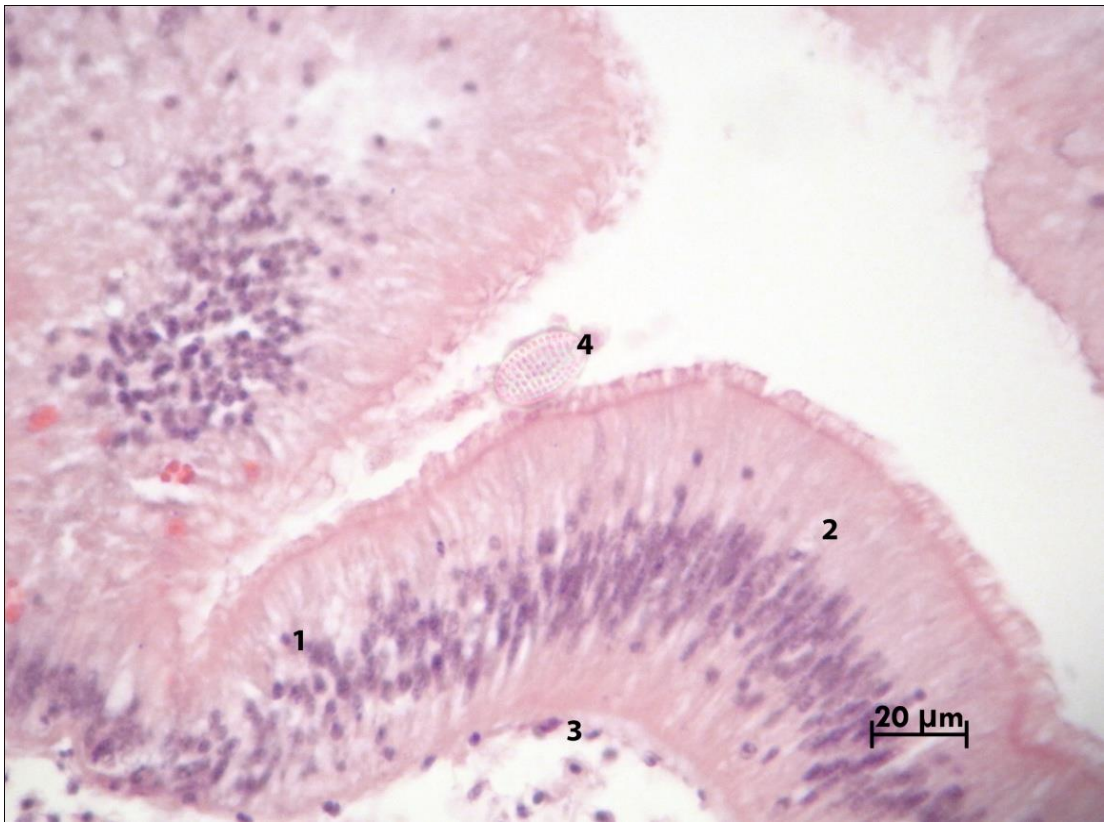


Figura 27. Sección del estómago. Se observan las ondulaciones del epitelio columnar ciliado irregular (1) con células en diferente disposición con núcleos centrales pequeños y redondos. Entre el epitelio se muestran células mucosas (2). La membrana basal gruesa

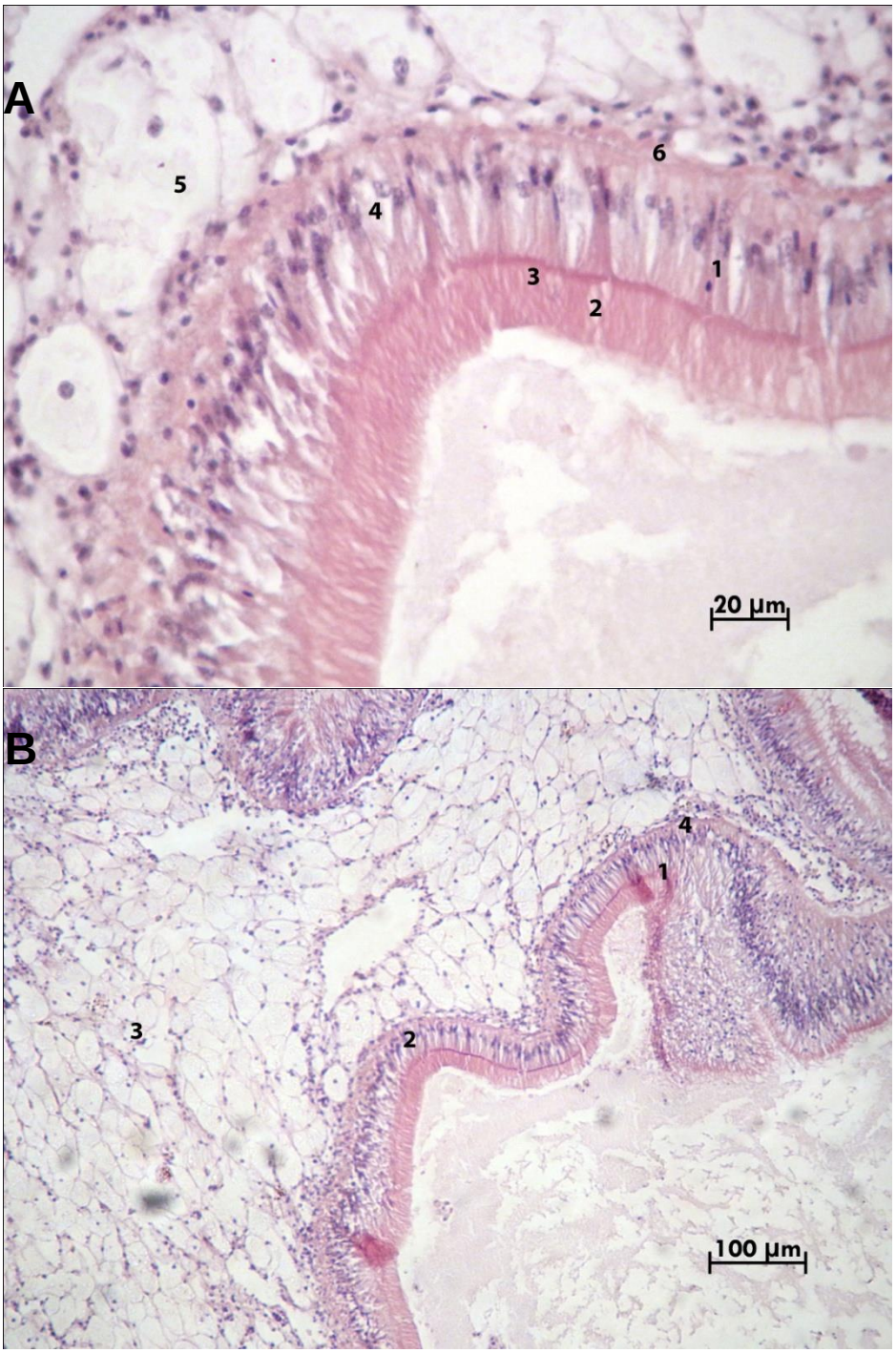


Figura 28. En A) saco del estilete con epitelio columnar ciliado (1), cilios abundantes y uniformes (2), cuerpos parabasales (3), núcleos basales de forma ovoidal (4), tejido conjuntivo (5) y membrana basal gruesa (6). En B) Sección del saco del estilete mostrando el epitelio de transición tiflosol (1), los núcleos basales (2), tejido conjuntivo (3) y membrana basal gruesa (4). Ostión colectado en Machona, Tab. Tinción H-E.

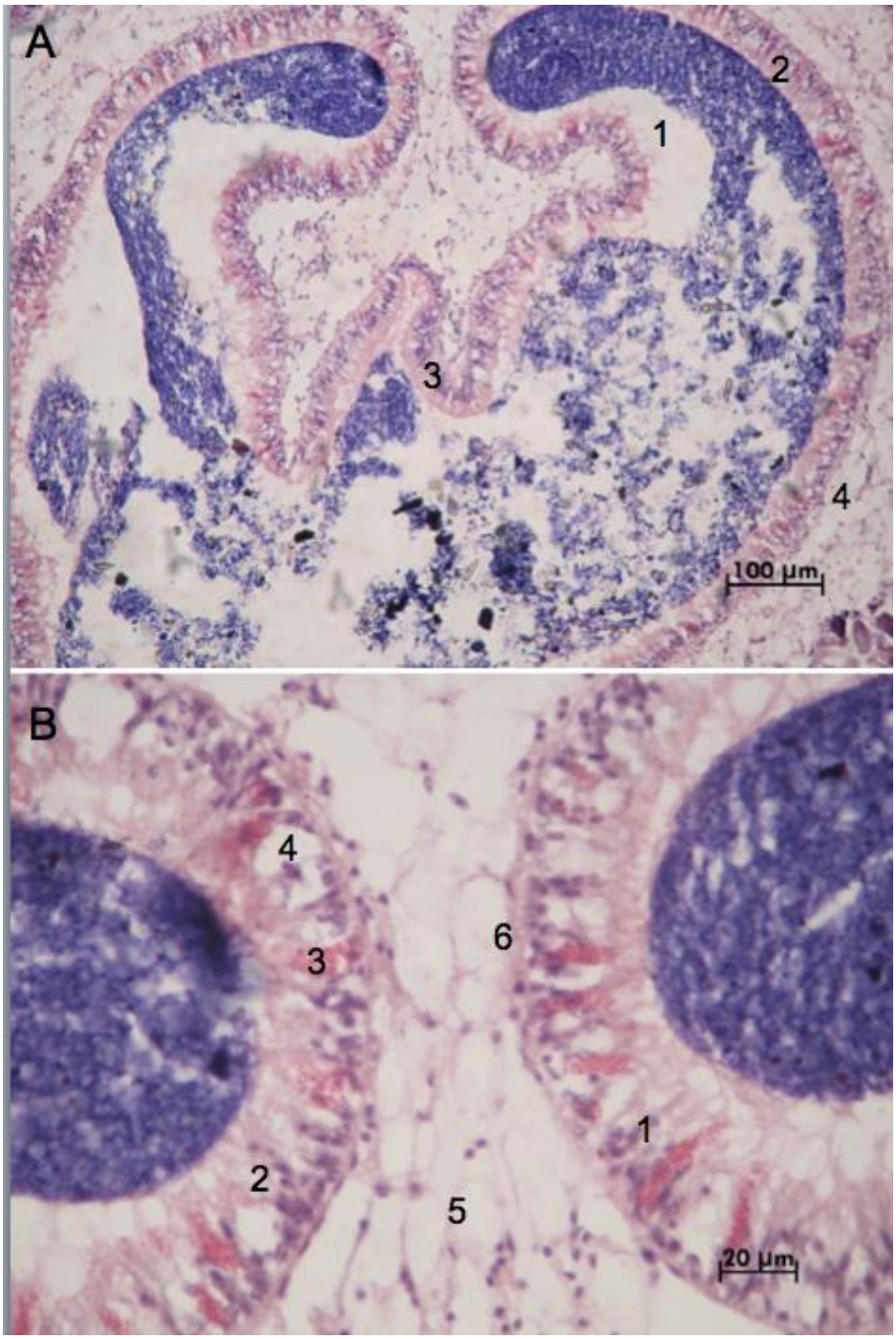


Figura 29. Microfotografía del intestino. En A) contenido alimenticio (1), epitelio ciliado con células prismáticas (2), núcleos basales (3) y tejido conjuntivo (4). En B) se observa la región del intestino cubierto por epitelio ciliado con células prismáticas (1), núcleos ovoidales basales (2) y cromatina condensada; también se observa la presencia de células eosinófilas (3) y mucosas (4), tejido conjuntivo (5) y membrana basal (6). Ostión colectado en Machona, Tab. Tinción H-E.

Glándula digestiva

La glándula digestiva también conocida como hepatopáncreas es la gran masa compacta que rodea el estómago y gran parte del intestino. Se compone de numerosos túbulos digestivos de fondo ciego, globulares o elongados, muy ramificados que se comunican con el estómago. El sistema de túbulos o conductos primarios van engrosándose hasta desembocar en el intestino. Se distinguen los túbulos primarios que presentan una forma externa redondeada, con luz irregular con entrantes y salientes, de forma estrellada (fases tubulares que corresponden a la fase de preparación (fase 1) y absorción (fase 2)).

Dentro de los túbulos primarios existe una parte ciliada y otra no ciliada. Su epitelio es cúbico conteniendo células mucosas basofílicas y eosinófilas. Debido a la irregularidad de la luz, la altura de las células es variable y presentan un núcleo ovoidal con posición basal. La membrana basal es fina a diferencia de la membrana gruesa presente en el estómago y saco del estilete (Fig. 30). En la glándula digestiva también es posible observar túbulos en proceso de desintegración, sin luz tubular definida hasta la pérdida completa de los epitelios donde la luz tubular está definida por la membrana basal (fase 3, 4 y 5). En los estudios realizados durante 2011, 2012-2013, se pudo observar que los túbulos de la glándula digestiva de los ostiones, independientemente de la zona de colecta y estación climática, presentan heterogeneidad en sus fases tubulares con clara tendencia a registrar prevalencia de las fases absorción-desintegración-reconstrucción. Cada fase tubular está asociada a células y respuestas biológicas que dependen del estado fisiológico del organismo.

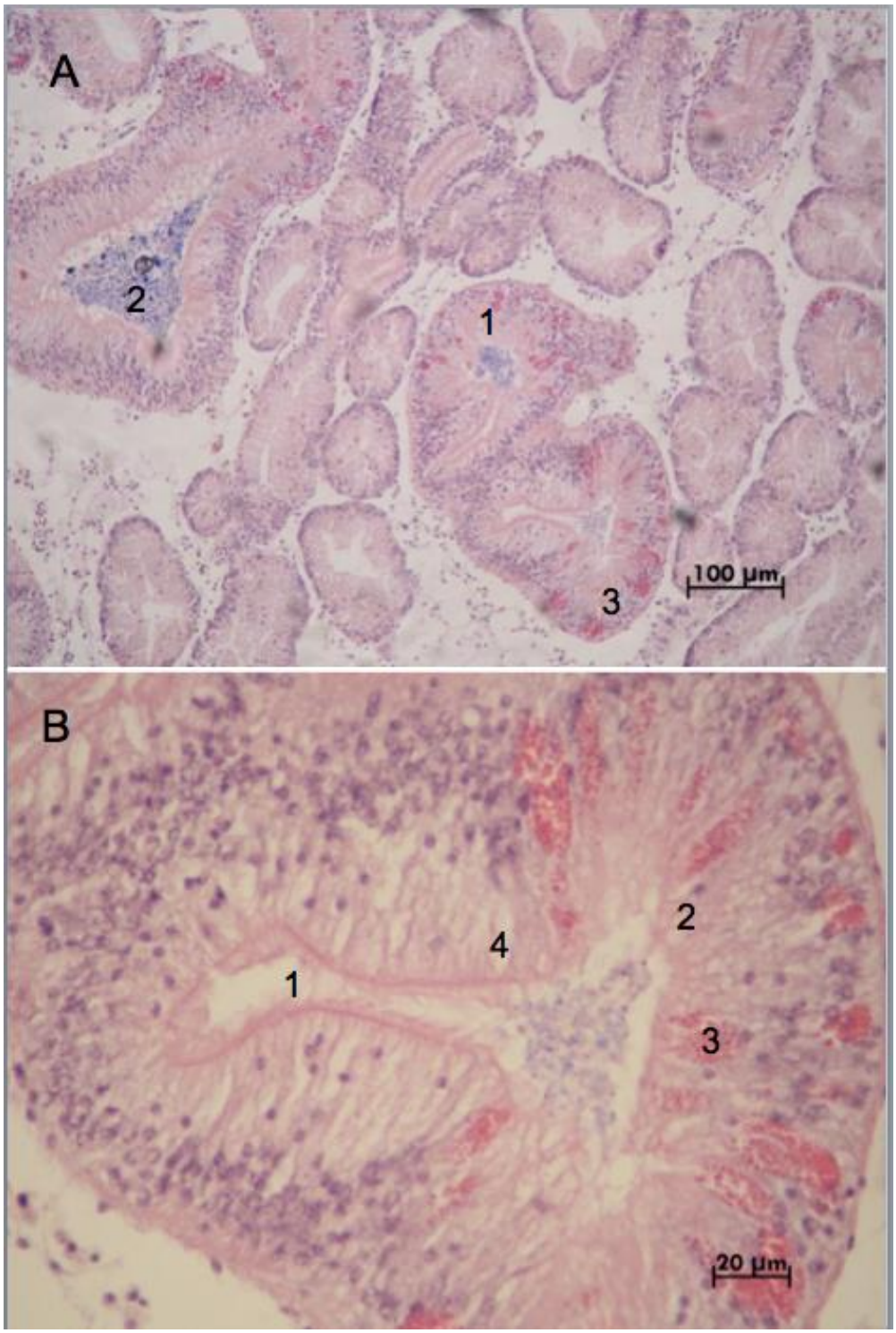


Figura 30. En A) apariencia de los túbulos digestivos (1), se observa el contenido alimenticio (2) y la membrana basal fina (3). En B) se aprecia un túbulo digestivo, mostrando la parte ciliada (1) y la parte no ciliada (2) con células eosinófilas (3) y células mucosas (4). Se observa que el epitelio presenta núcleos de posición basal, y una membrana basal fina. Ostión colectado en Alvarado, Ver. Tinción H-E.

Aspectos histopatológicos

En los ostiones analizados se observaron espacios tanto interfoliculares como intertubulares en el tejido conjuntivo considerados como inflamaciones. Se observaron inflamaciones en tejido conjuntivo, tanto cerca de los túbulos digestivos, como en el epitelio de intestino cerca de la membrana basal. También se observaron las llamadas células café en el tejido conjuntivo muy cerca de estructuras como la membrana basal del epitelio del canal alimentario, estas estructuras de color café obscuro con tinción H-E, también fueron observadas en tonalidad más claro, con apariencia hialina o refringente. La presencia de las células café implica la activación de un mecanismo de fagocitosis, por lo que el incremento en el número de células café sugiere una mayor actividad (Fig. 31).

Frecuentemente se observó la presencia de estructuras con membrana transparente y núcleo eosinófilo que aparentemente son parásitos. Estas estructuras están dentro del tejido conjuntivo, muy cerca del epitelio del canal alimentario, así como en el espacio intertubular. Asociado a los parásitos se observó atrofiado el tejido conjuntivo periférico y el epitelio de recubrimiento de los túbulos de la glándula digestiva (Fig. 32).

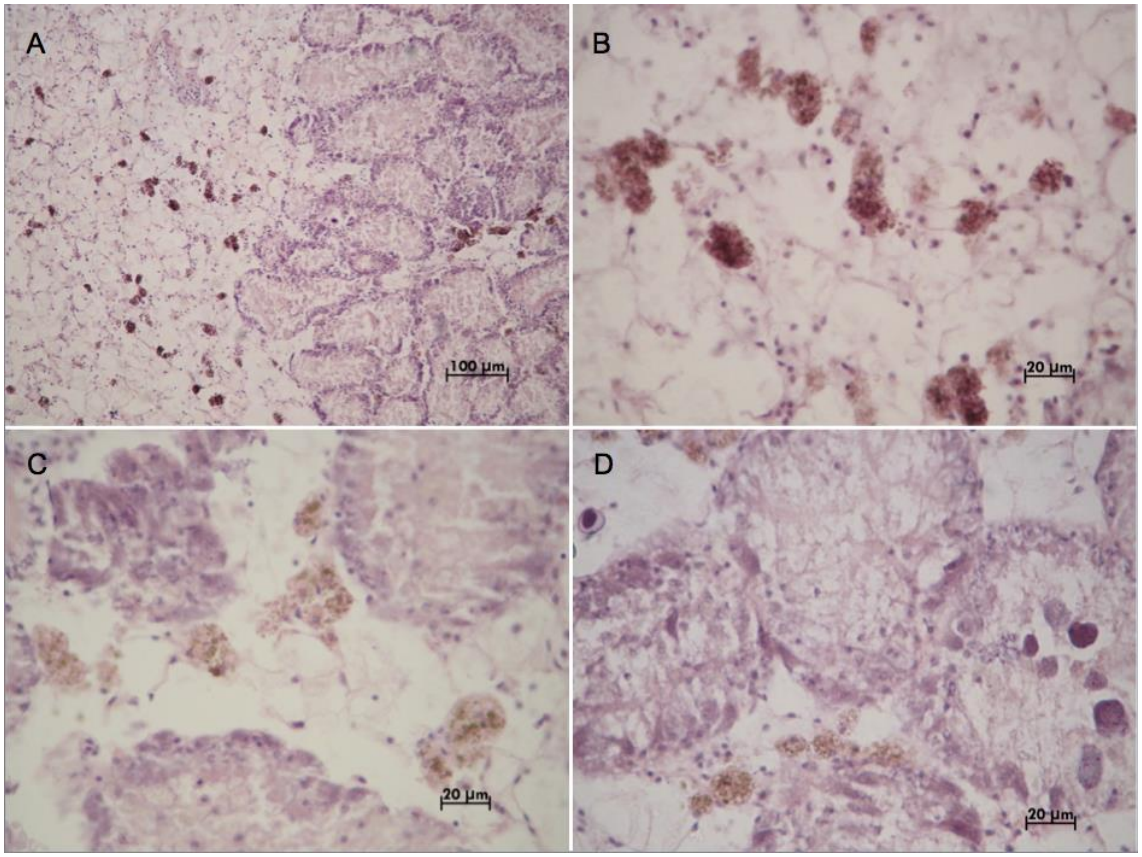


Figura 31. Células café. En A) y B) células de color café más intenso y granulares. En C) y D) células café hialinas. Presentes en el tejido conjuntivo cerca de los túbulos digestivos. En A), B) y D) Ostiones colectados en Términos, Camp.; En C). Ostión colectado en Alvarado, Ver. Tinción H-E.

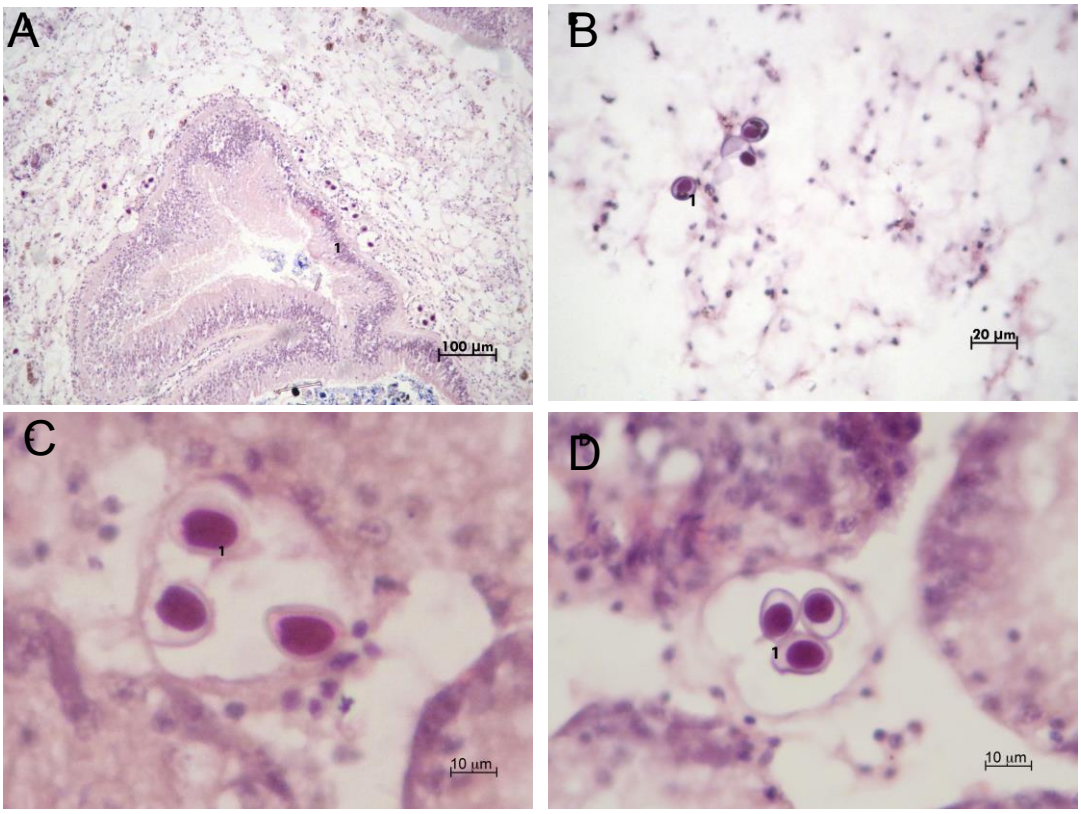


Figura 32. Microfotografías de estructuras que se asemejan a parásitos. En A) y B) se observan incluidos en el tejido conjuntivo. En C) y D) se observan en el espacio intertubular de la glándula digestiva. En A) ostión colectado en Términos, Camp., en B) C) y D) ostiones colectados en Machona, Tab. Tinción H-E.

Lesiones tisulares en relación al área de colecta

El análisis tisular en los túbulos y tejidos de sostén permitió observar células café, secreciones eosinófilas, inflamaciones, hemocitos, parásitos, atrofias en epitelios y tejido conectivo, cicatrizaciones, fibrosis, granulomas, hiperplasia e hipertrofia así como displasia. Las respuestas histopatológicas fueron registradas en los ostiones de siguientes lugares de colecta (de mayor a menor prevalencia):

Terminos, Campeche > Machona, Tab. > Pueblo Viejo > Tamiahua > Alvarado, Ver.

Cabe destacar que las lesiones reversibles (no letales) fueron observadas en los cinco lugares de colecta y solo los organismos de Términos y Machona presentaron lesiones progresivas que comprometen el estado fisiológico de los organismos.

Ostiones colectados en Machona, Tabasco

Solo en ostiones colectados en Machona se observaron fibras que rodean a núcleos con una tinción eosinófila conformando granulomas, cerca al tejido conjuntivo que rodea el epitelio del canal alimentario. Estos granulomas se encuentran unidos a la membrana basal del epitelio del estómago y del intestino (Fig.33). También se presentaron secreciones eosinófilas en el epitelio del intestino. Más del 50% de los ostiones presentaron tejido conjuntivo atrofiado y más del 90% tuvieron inflamaciones.

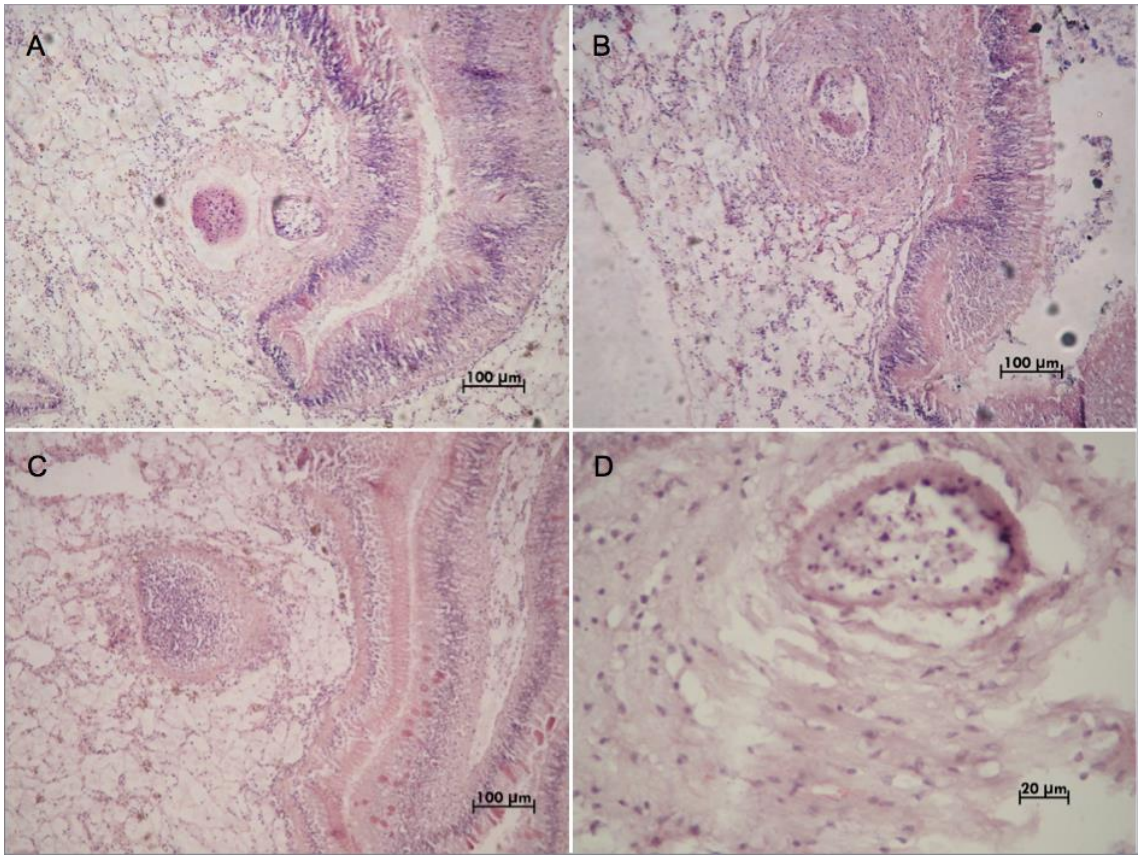


Figura 33. En A) y B) se aprecian fibras que rodean a núcleos con una tinción eosinófila conformando granulomas dentro del tejido conjuntivo. En C) y D) muestran granulomas que se encuentran unidos a la membrana basal del epitelio del estómago y del saco del estilete. Ostiones colectados en Machona, Tab. Tinción H-E.

Ostiones colectados en Laguna de Términos, Campeche

Estos organismos presentaron severas lesiones posiblemente irreversibles, ya que los túbulos digestivos se transformaron, perdiendo su estructura redonda a formas elongadas rodeadas por una doble membrana sin células epiteliales. Se observó también una doble membrana rodeando un cúmulo de núcleos que fueron irregulares e hipercromáticos agrupados en círculos. Otro grupo de esos núcleos presentó secreciones eosinófilas. El tejido conjuntivo atrofiado que rodea estas estructuras mostró una gran cantidad de células café (Fig. 34).

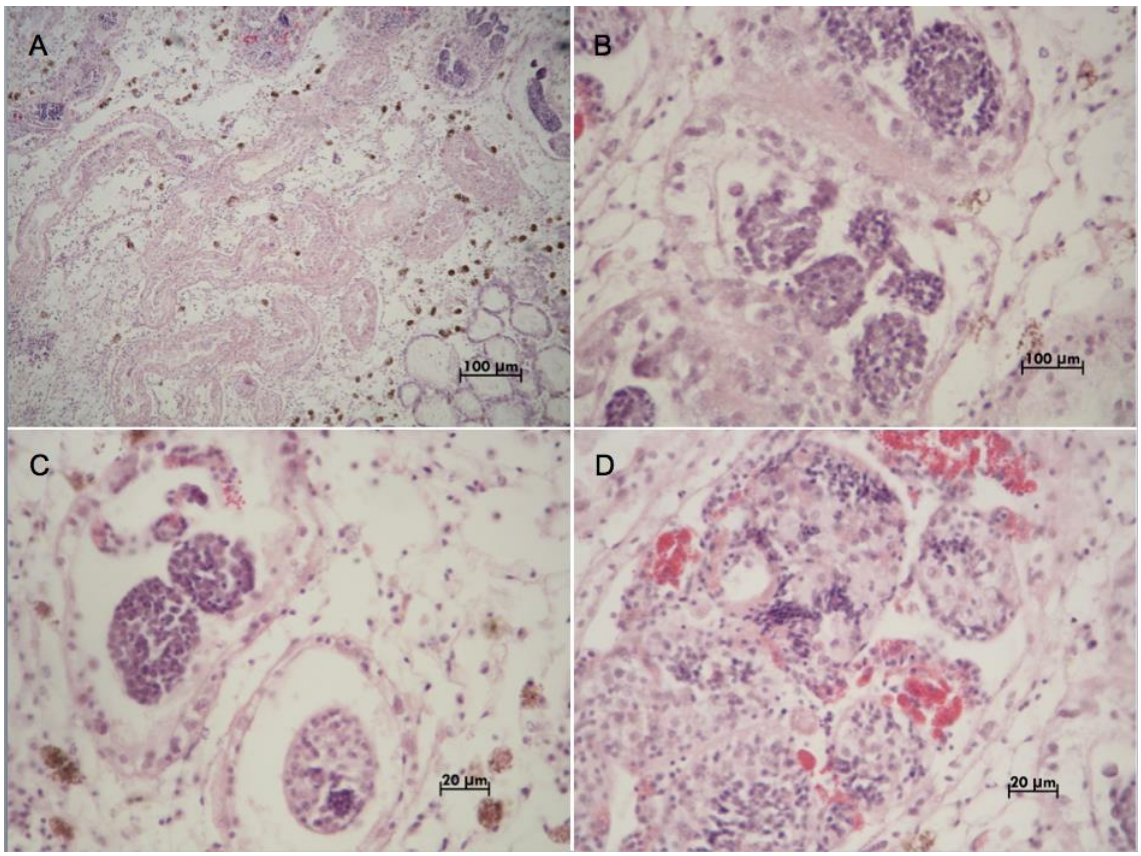


Figura 34. Lesión posiblemente irreversible, en A) y B) se aprecia el cambio de la estructura redonda a formas elongadas rodeadas con una doble membrana sin células epiteliales. En C) y D) se observa una doble membrana rodeando un cúmulo de núcleos irregulares hipercromáticos. Ostiones colectados en Términos, Camp. Tinción H-E.

Las secreciones son un mecanismo de respuesta biológico frecuentemente observado en los organismos estudiados. La producción de secreciones se asocia a un mecanismo primario de defensa que se observó de manera muy clara en los diferentes epitelios que recubren los túbulos de la glándula digestiva (Fig. 35).

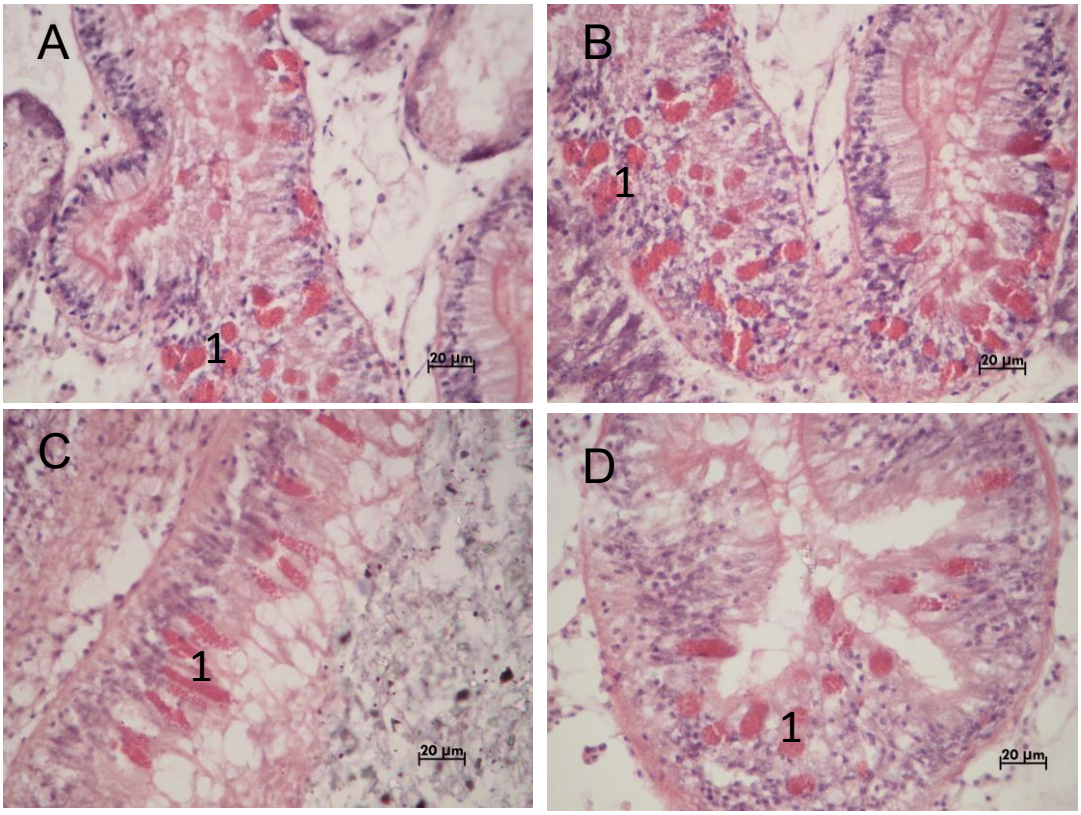


Figura 35. En A), B) y D) se observan secreciones eosinófilas (1) en el epitelio que recubren los túbulos de la glándula digestiva y en C) en el epitelio del saco del estilete. Ostiones colectados en Machona, Tab. Tinción H-E.

Caracteres histoquímicos.

Las técnicas histoquímicas de PAS y Masson permitieron hacer las siguientes observaciones en el canal alimentario: El epitelio del esófago y el estómago fueron fuertemente positivos para la tinción de PAS, en tanto que el epitelio del intestino y glándula digestiva fueron moderadamente positivos. Está tinción permitió observar la membrana basal integra de los tubulos así como los cuerpos basales de los cilios. Las células mucosas y la membrana basal mostraron una reacción PAS positiva color magenta, lo que indica la presencia de mucopolisacáridos neutros y/o glicoproteínas

(glicoproteínas y glicofosfolípidos que forma el glucocálix) como elementos tisulares propios de esta región (Fig. 36).

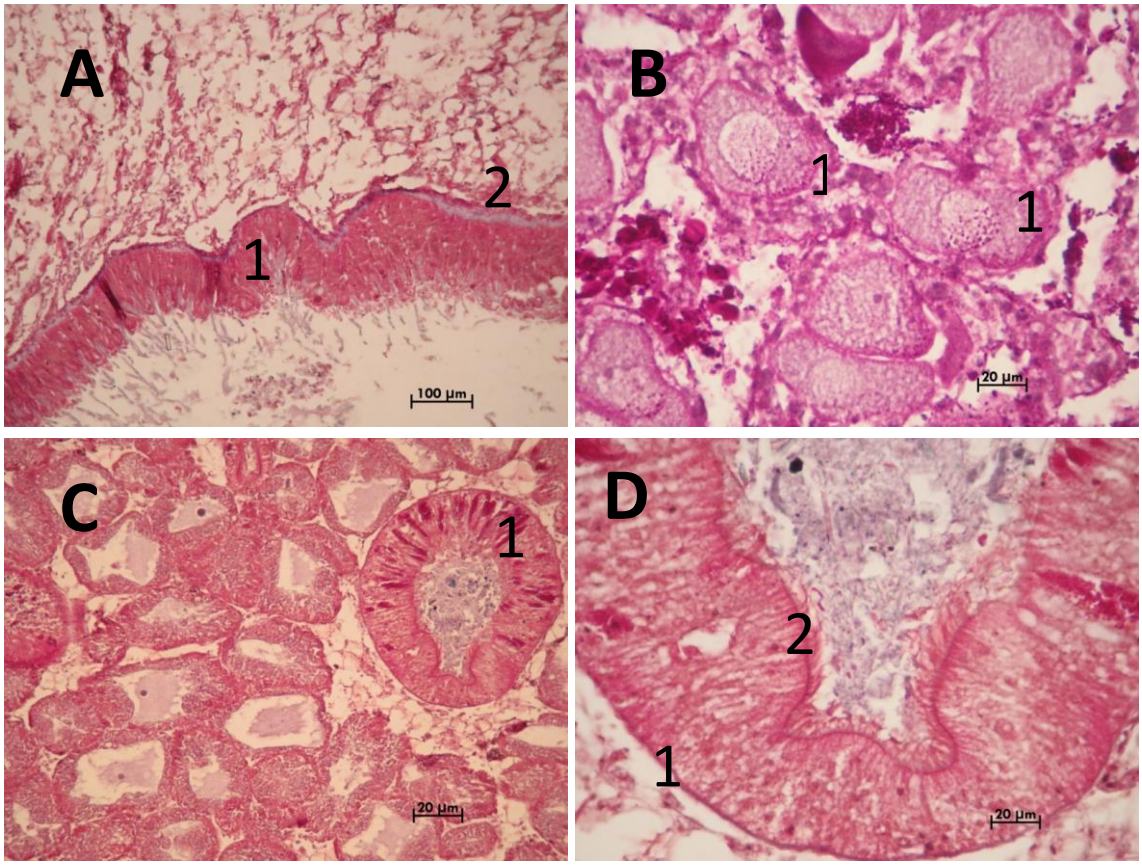


Figura 36. Microfotografía mostrando la reacción de Schiff en A) PAS positivo en el epitelio (1), la membrana basal (2). En B) se aprecia reacción positiva en los ovocitos maduros (1). En C) se observa la reacción PAS positiva en túbulos digestivos, en epitelio (1). En D) la membrana basal (1) y cuerpos basales de los cilios (2) mostraron la presencia de mucopolisacáridos neutros.

Con la tinción de Masson se diferenciaron secreciones, teñidas de color verde pálido, muy cerca de la membrana basal y dentro del tejido conjuntivo que indican probablemente la presencia de mucopolisacáridos ácidos. También en color verde pálido se observaron espacios entre el epitelio, que sugieren la presencia de células mucosas. En la membrana basal se observó un color azul intenso manifestándose el colágeno. En algunos túbulos en fase de absorción se observaron dos tipos celulares unos de color verde intenso y otros de color rosa (Fig. 37).

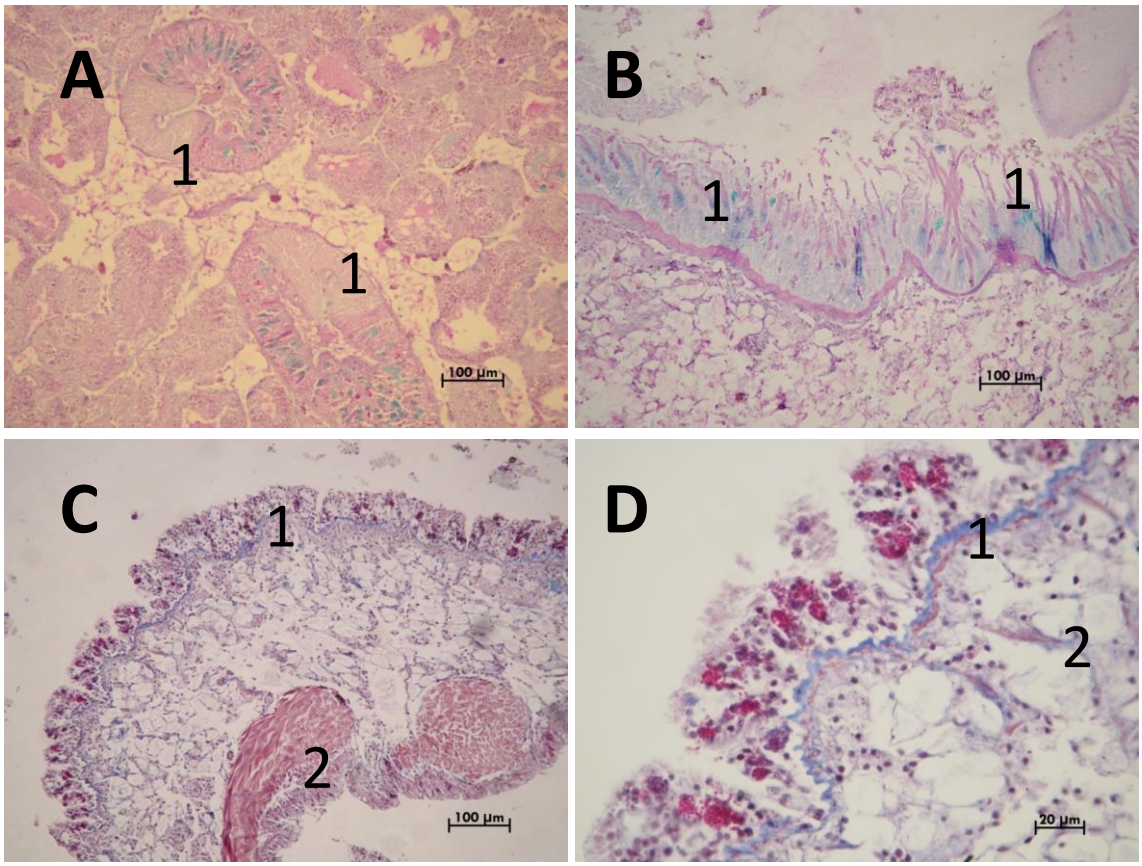


Figura 37. Tinción de Masson. En A) túbulos digestivos (1), se observan secreciones eosinófilas y otras de color verde. En B) se aprecian secreciones que parecen ser mucoides de color verde (1). En C) colágeno de color azul fuerte de la membrana basal (1) y fibras musculares de color rojo (2). En D) la membrana basal (1) se apreció fuertemente teñida en color azul y en el tejido conjuntivo algunas fibras están teñidas de color azul lo que puede evidenciar fibras de colágena (2).

Las técnicas histológicas e histopatológicas permitieron realizar la descripción morfológica de los tejidos del ostión. Fue característico el tejido epitelial con la presencia de secreciones eosinófilas, así como la presencia de epitelio liso y rugoso el cual se pliega para incrementar la superficie de absorción. En el epitelio liso se ha reportado la presencia de secreción de glucocálix, lo cual representa un mecanismo de protección; en tanto que, el epitelio rugoso manifiesta un aumento en la superficie de absorción (Karp, 2009).

La digestión incluye un proceso extracelular, en el estómago, mientras que en la glándula digestiva es un proceso intra y extracelular (Morton, 1983). La glándula digestiva presentó numerosos túbulos digestivos globulares y elongados. Se reconocieron cuando menos tres apariencias con respecto a la disposición del epitelio de revestimiento hacia la luz de los túbulos; la primera en la que existen túbulos que no presentan epitelio o en los cuales está atrofiado; la segunda en la que no se observan

cilios y la tercera que mostró túbulos con una parte ciliada y otra no ciliada. En la parte no ciliada se observó alimento y secreciones eosinófilas, lo que sugiere que está activa la función de digestión intracelular. Por otra parte, la región ciliada funciona coordinadamente generando el movimiento del alimento hacia la región no ciliada y en esta no se observaron secreciones eosinófilas. Una función análoga de las células basófilas responsables de la síntesis y excreción de enzimas para la digestión extracelular y la función de las células digestivas es llevar a cabo la digestión intracelular (Owen, 1972). La membrana basal fina de los túbulos es importante ya que funciona como un filtro fisiológico y su pérdida implica irregularidades funcionales (Karp, 2009). En algunos ejemplares la membrana basal estuvo engrosada con apariencia fibrosa, aislando al tubo digestivo del tejido conjuntivo que lo nutre. Las células epiteliales que revisten los túbulos digestivos no presentaban alteraciones.

Algunas respuestas tisulares se han postulado como resultado del estrés ambiental, considerándose algunas incluso como lesiones histopatológicas, entre estas se registraron: abundancia de células café, secreciones eosinófilas, inflamaciones focales y difusas, altas concentraciones de hemocitos, parásitos, atrofia de epitelios y atrofia de tejido conjuntivo, cicatrizaciones, fibrosis de membrana basal, granulomas, hiperplasia e hipertrofia y displasia. Algunas de estas lesiones ya han sido reportadas en estos organismos (Guzmán-García et al., 2009).

En los tejidos del ostión *C. virginica* analizados se observaron las células café que variaron en tamaño y color en el tejido conectivo. El color de las células fue oscuro, estas tuvieron forma granular y fueron más frecuentes en los organismos analizados, mientras las que mostraron un color café-amarillo hialino también de forma granular, fueron menos frecuentes en los animales. Se considera que estas últimas son células café jóvenes. Ambos tipos de células café se incrementan cuando existen procesos de inflamación. Se observó también que hubo incidencia de las respuestas inflamatorias asociadas a la presencia de las células café (Zaroogian & Yevich, 1994).

La respuesta inflamatoria ocurre después de una invasión patógena y/o daño celular, como una reacción de defensa del tejido hospedero (Cone, 2001) y representan una respuesta funcional inmune del organismo (Muller, 2003). El conocimiento de los patrones morfogenéticos involucrados en la respuesta inflamatoria de los moluscos, no solamente tiene un valor descriptivo y comparativo que es útil para entender el mecanismo fundamental de la respuesta tisular del daño, sino también tiene relevancia en los diagnósticos ecotoxicológicos (Canesi et al., 2006).

En la morfología de las inflamaciones observadas, la ruptura del tejido conectivo, se considera una inflamación de tipo focal, en la que hay una invasión de hemocitos en el tejido dañado; la observación de hemocitos en estos focos de inflamación fue difícil debido a que no existe un atlas que ilustre claramente el aspecto de estas células especializadas, por lo que existe poca familiarización para su reconocimiento en el microscopio.

Los moluscos poseen una inmunidad innata que involucra efectos celulares y humorales, los hemocitos (también llamados inmunocitos) son células efectoras en la inflamación (Ottaviani, 2006). Los inmunocitos desempeñan la función de fagocitosis de partículas extrañas, y de patógenos biológicos (bacterias y parásitos) (Ottaviani, 2011). Hay dos tipos de inmunocitos los hialinocitos y los granulocitos, estos últimos son los que presentan actividad fagocítica (De Vico & Carella, 2012).

Estas células especializadas, los hemocitos presentaron un aspecto de agregados nucleares envueltos en una membrana gelatinosa, y fueron localizados en el tejido conectivo interfolicular e intertubular; si bien, aún es necesario describir la diferenciación de los hemocitos. Los efectos adversos en el sistema inmune de los moluscos pueden ser generados por una variedad de compuestos y factores ambientales, por lo que las respuestas observadas en los organismos analizados no pueden atribuirse a un solo factor (Watermann et al., 2008). Sin embargo, aunque se desconoce el origen de estas lesiones, se puede afirmar que son evidencias de estrés ambiental. Las poblaciones naturales y cultivadas de *C. virginica* en el Golfo de México, en los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche, han sido afectadas por una amplia variedad de enfermedades parasitarias y factores diversos entre los que se mencionan contaminantes (Gullian-Klanian et al., 2008; Aguirre-Macedo et al., 2007) y diferentes parásitos (incluyendo bacterias, virus, protozoarios y metazoarios) que han sido identificados en las poblaciones ostrícolas (Aguirre-Macedo et al., 2007). En la presente investigación no se realizaron pruebas de identificación parasitaria, pero se observaron inclusiones que sugieren la presencia de *Nematopsis* y *Perkinsus marinus.*

Otro tipo de respuesta tisular observado fue el engrosamiento de la membrana basal, así como de lo que aparenta ser una doble membrana basal en los túbulos de la glándula digestiva. Existen pocos datos al respecto en moluscos, no se han documentado resultados similares. Sin embargo, en vertebrados, el engrosamiento de la membrana basal implica cambios en colágeno y músculo liso asociados a diagnósticos de cirrosis (Wulff, 2004). Los granulomas en el tejido conjuntivo tomaron la apariencia de fibras que rodeaban a lo que parecen ser enquistamientos o nódulos hasta llegar a una encapsulación. Este tipo de formaciones se observó en el tejido conjuntivo.

También se observó la formación de tejido de granulación en la zona lesionada del tejido conjuntivo debido a la proliferación de fibroblastos jóvenes. Se ha registrado que a medida que pasa el tiempo, desde la lesión el tejido fibroso se colageniza y de manera gradual constituye un muro alrededor de la lesión (Rubin & Farber, 1992). Esta reacción de tejido granuloso es la base de la respuesta inflamatoria crónica; primero rodea, para luego canalizar y bloquear el irritante encapsulándolo, lo que permite que las células fagocíticas, las enzimas y las células inmunológicas específicas se pongan en contacto con el agente irritante. En ocasiones los elementos del tejido fibroso logran la reparación cuando se ha eliminado el irritante (Kim et al., 2006).

Los cambios patológicos más evidentes fueron hiperplasia e hipertrofia de los túbulos digestivos que son cambios progresivos que posiblemente se presentan al mismo tiempo y avanzan hasta presentar una displasia, que es una variación en tamaño y forma celular caracterizada por el agrandamiento, irregularidad e hipercromasia de los núcleos y una distribución desordenada irregular (Mumford, 2007). Estas lesiones fueron de baja incidencia y solo se observaron en las muestras de Campeche.

Con la tinción de PAS se observó el epitelio y las membranas basales; presencia de glucógeno en el tejido conjuntivo (Eble 1969). También la tinción de PAS permitió corroborar la presencia de la membrana basal de los epitelios y los cuerpos parabasales de los cilios así como diferenciar la región ciliada de los túbulos de la glándula digestiva.

La tinción de Masson evidenció, en el tejido conectivo, la presencia de colágeno como fibras no continuas, mientras que en la membrana basal se observó como una fibra continua o una línea de color azul intenso. En vertebrados, con esta técnica se ha reportado la presencia del incremento de colágeno en la membrana basal (Wulff, 2004).

En los túbulos de la glándula digestiva se diferenciaron dos tipos de células, las denominadas basófilas y las digestivas. Se ha señalado que las células digestivas tienen digestión intracelular y las basófilas digestión extracelular (Owen, 1972) De ahí las diferencias en su tinción.

Las respuestas tisulares observadas representan biomarcadores de efecto. Los biomarcadores de efecto se definen como respuestas fisiológicas de daño subletal ante la incapacidad de los organismos ante el agente estresor. En términos tisulares, existen lesiones de tipo reversible y progresivo, las reversibles implican cambios derivados de la hipofunción de las células y tejidos, en tanto que, las lesiones progresivas implican cambios hiperfuncionales de los órganos en sus actividades fisiológicas (Takashima & Hibiya, 1995). Nuestros resultados sugieren que: las células café, secreciones eosinófilas; las inflamaciones focales y los hemocitos son respuestas tisulares asociadas con los mecanismos de excreción, de activación celular y de tipo humoral (Figueras, 2007). Mientras que: la presencia de parásitos, la atrofia de los tejidos, las cicatrizaciones, la fibrosis y los granulomas observados en los organismos analizados, pueden asociarse con lesiones de tipo reversible y progresivo. La hiperplasia e hipertrofia y la displasia representan lesiones focales de daño que se generan ante la incapacidad del organismo o célula por evitarlo, ya que los mecanismos de protección y reparación no fueron eficientes y pueden generar un daño local o sistémico, que pueden comprometer la vida del organismo (Sander, 1990).

Las respuestas tisulares constituyen evidencias para la generación del diagnóstico (Manterola & Zavando, 2009). Los mecanismos de excreción, de activación celular y de tipo humoral (células café, secreciones, inflamaciones y presencia de hemocitos) fueron evidentes en los ostiones colectados de las cinco lagunas costeras. Con respecto a los

hemocitos, su frecuencia fue menor en ostiones colectados en las Lagunas de Términos y Machona, sugiriendo menor actividad de los mecanismos de protección. Las respuestas fisiológicas derivadas de la presencia de parásitos, atrofia de tejidos y cicatrizaciones fueron más frecuentes en ostiones provenientes de Términos y Machona, así mismo las lesiones de daño letal como la atrofia, granulomas hiperplasia y displasia, se encontraron en ostiones extraídos de estos cuerpos lagunares. Los datos sugieren que los ostiones colectados en Términos y Machona tienen mecanismos de defensa activos y presentan lesiones subletales y progresivas que comprometen el estado fisiológico de los organismos. En contraste, los ostiones provenientes de Pueblo Viejo, Tamiahua y Alvarado sólo presentan respuestas donde los mecanismos de reparación están activos. Por lo tanto, en términos generales la prevalencia de lesiones en los ostiones, por lugar de colecta fue:

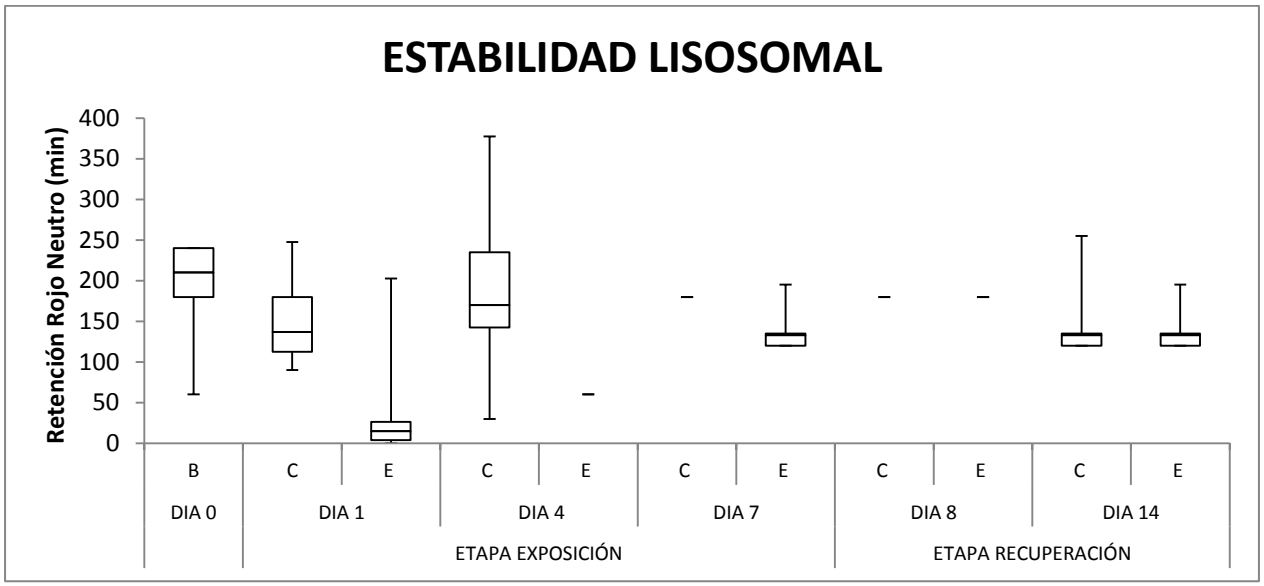
Terminos, Campeche > Machona, Tab. > Pueblo Viejo > Tamiahua > Alvarado, Ver.

Los resultados sugieren que las estructuras analizadas y las técnicas aplicadas pueden ser utilizadas como una herramienta de diagnóstico de la estructura tisular.

BIOENSAYO.

Estabilidad lisosomal.

Como se puede observar en la Figura 38, tan solo después de 24 h de haber comenzado el experimento (día 1), los organismos expuestos a la FSG muestran un menor tiempo de RRN; situación que se repite a las 96 h (día 4) y a las 168 h (día 7), con lo que se pudo observar, como ya ha sido comentado en la literatura especializada, que este biomarcador es de utilidad para evaluar los efectos de la exposición a hidrocarburos del petróleo y otros contaminantes (Fernley et.al, 2000; Nasci et.al, 1998). En la fase de recuperación se puede observar que tan solo 24 h después de haber sido cambiados a agua limpia los ostiones mostraron una recuperación en el tiempo de RRN, situación que continúa, aunque con datos con una mayor dispersión en el séptimo día de esta fase. Así, la estabilidad lisosomal demostró su utilidad para detectar efectos, tanto positivos como negativos, en la salud de los organismos en un corto plazo (24 h).



B= Organismo sin exponer (blanco)
C= Organismo sin exponer (exposición)
E= Organismos expuestos al contaminante (exposición)

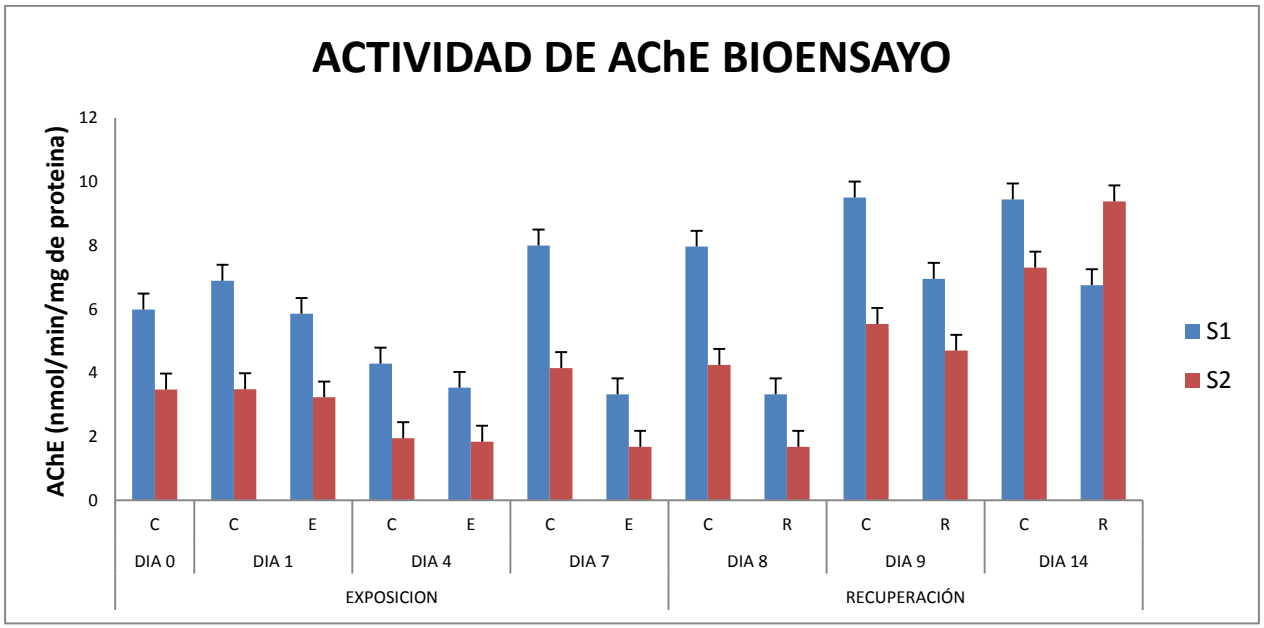
Figura 38. Estabilidad Lisosomal de ostiones expuestos a la FSG.

Acetil-colinesterasa

La actividad de la AChE, en los organismos expuestos a la FSG mantiene su expresión sin diferencias con los controles a las 24 h, pero también a las 96h. No es, si no hasta el muestreo de las 168 h (7días) donde se pueden observar diferencias significativas entre el grupo control y el expuesto a la FSG (Fig. 39).

En la etapa de recuperación los organismos que estuvieron expuestos a la FSG siguen mostrando efectos negativos, presentando valores de actividad de la AChE menores que los del grupo control. Esta diferencia disminuye en el muestreo de las 96 h y es imperceptible en el muestreo de las 168 h, donde ya no se puede apreciar una diferencia significativa entre los animales expuestos y los controles.

De estos resultados es claro la actividad de la AChE es un buen biomarcador, que responde en plazos cortos a los efectos de los hidrocarburos del petróleo, lo cual ha sido observado en otros estudios (Bocquené et al., 2004; Ribeiro et al., 1999; Stien et al., 1998 y Payne et al. 1996).



C= Organismo sin exponer (control)
E= Organismo expuesto al contaminante (expuesto)
R= organismo expuesto al contaminante en proceso de recuperación

Figura 39. Actividad de AChE de ostiones expuestos a la FSG.

Ensayo Cometa.

Como se puede observar en la Figura 40 la longitud de la cauda de los cometas de los organismos expuestos a la FSG no presentó diferencias significativas con las de los ostiones en el grupo control en ninguno de los tiempos de muestreo de ambas fases del bioensayo. Esta situación nos permitió observar que el ensayo cometa no es un biomarcador con el que se puedan valorar los efectos de un derrame de hidrocarburos en el corto plazo (siete días). Sin embargo para evaluaciones ambientales en programas de monitoreo ha demostrado su utilidad para identificar sitios con problemas de contaminación que representan un riesgo para la salud de los organismos. En el caso de este bioensayo podemos observar que los mecanismos de reparación del ADN están en suficiente buena condición para que no se observen diferencias en el corto plazo. Así, no recomendamos que se elimine el uso de este biomarcador en los programas de monitoreo, pero sí que se tenga cuidado de cuando se evalúa, es decir, que se entienda que el ensayo cometa es útil para evaluar daño y recuperación de los organismos en el mediano y largo plazo.

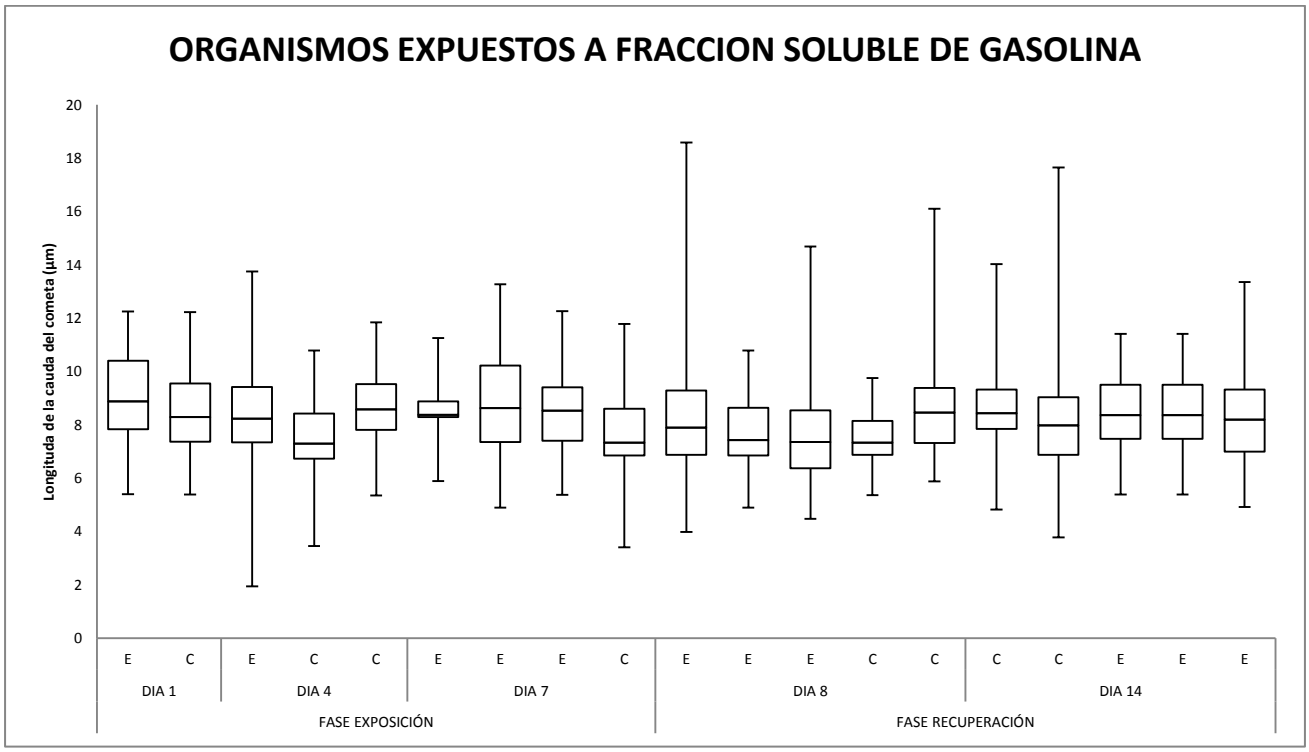


Figura 40. Longitud de la cauda de los cometas de ostiones expuestos a la FSG.

ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN OSTIONES Y SEDIMENTOS.

Metales

Las concentraciones de metales registradas en sedimento y en ostión se indican en la tabla 10. El Cd estuvo por debajo del límite de detección del equipo en el sedimento; el Ba, el Cr y el Pb tampoco pudieron ser registrados en el ostión.

Tabla 10. Concentraciones de metales en sedimento y ostión de las cinco lagunas analizadas (µg/Kg en base seca).

Sedimento	Hg	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	V
Pueblo Viejo	0.472	18.966	0.007	0.036	<LD	0.020	0.012	11.451	0.014	0.017	0.032
Tamiahua	0.083	17.724	0.004	0.034	<LD	0.020	0.004	9.098	0.011	0.005	0.032
Alvarado	0.102	15.301	0.004	0.029	<LD	0.018	0.004	8.884	0.011	0.005	0.026
Carmen-Machona	0.137	53.202	0.006	0.059	<LD	0.091	0.011	47.478	0.068	0.008	0.032
Términos	0.045	1.567	0.003	0.016	<LD	0.015	<LD	1.267	0.004	0.004	0.005
Promedio	0.168	21.352	0.005	0.035		0.033	0.006	15.636	0.021	0.008	0.025
Desviación estándar	0.173	19.114	0.002	0.015		0.033	0.005	18.209	0.026	0.005	0.011

Ostión	Hg	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	V
Pueblo Viejo	0.759	<LD	1.501	<LD	24.393	<LD	2045.904	<LD	1.781	<LD	<LD
Tamiahua	0.258	107.91	1.466	<LD	5.791	<LD	142.192	262.149	1.782	<LD	<LD
Alvarado	0.411	174.56	1.425	<LD	25.030	<LD	1055.600	365.829	2.145	<LD	1.037
Carmen-Machona	0.184	124.42	1.058	<LD	<LD	<LD	186.070	428.947	3.205	<LD	1.048
Términos	0.057	<LD	1.015	<LD	<LD	<LD	10.093	<LD	3.095	<LD	1.002
Promedio	0.334	81.38	1.293		11.043		687.972	211.385	2.402		0.617
Desviación estándar	0.270	78.23	0.236		12.702		864.354	201.947	0.700		0.564
FBC	2.0	3.8	263.9				113666.2	13.5	112.0		24.4

< LD, por debajo del límite de detección del aparato; números en verde: valores mínimos; números en rojo: valores máximos.

Las concentraciones más bajas de todos los metales en el sedimento y el ostión se registraron en la laguna de Términos. Las más elevadas de Hg, As y Cu en Pueblo Viejo, y de Fe, Ni y V en Carmen-Machona.

Así mismo, el sedimento de Pueblo Viejo mostró las concentraciones más elevadas de Pb y V, y Carmen-Machona de Al, Ba y Cr.

Alvarado mostró las concentraciones más elevadas de Al y Cd en ostión.

Las concentraciones obtenidas fueron comparadas con registros de estudios previos realizados en la costa del Golfo de México (Botello et al., 1996; Orozco-Barajas et al., 2014; Barrera-Escorcia, 2011). El Hg del sedimento de la laguna de Pueblo Viejo mostró valores de más del doble que los registrados en la plataforma del Golfo y fueron 17 veces superiores a los antes registrados en la zona costera. A pesar de esto, en ostión la concentración determinada (0.759 µg/Kg) no rebasó el límite aceptable para este metal (0.5 mg/Kg, NOM 242-SSA1-2009) en mariscos para consumo humano.

Por otro lado, las concentraciones de Cd en ostión fueron hasta cinco veces superiores a los registros previos y rebasó el límite aceptable (0.5 mg/Kg) en Pueblo Viejo y Alvarado. Los contenidos de Cu en ostión se observaron hasta 13 veces superiores a los previamente registrados. Los metales cuyas concentraciones en sedimento se consideraron similares e incluso inferiores a las registradas en estudios previos fueron: Al, Ba, Cr, Cu, Fe y V; y en el caso del ostión: Hg, Cr, Fe, Ni y Pb.

Al comparar las concentraciones de metales en ostión de este estudio con los reportados por O'Connor (2002) para el programa de monitoreo "Mussel Watch" de los años 1996 a 1998, se observa que en general los valores de Cd y Cu de este estudio son altos y el Ni está dentro del rango reportado.

Adicionalmente se determinó el Factor de Bioconcentración (FBC), es decir la relación entre los contenidos de metales en los organismos y los del sedimento, para todos los metales en los que se tuvieron registros en ambos compartimentos ambientales; es decir que no se pudieron obtener para Ba, Cr y Pb por no haber sido detectados en el ostión, ni para el Cd ya que no se registró en los sedimentos. El FBC indicó que la acumulación de los metales varió de 2.0 para Hg a 263.9 para As, con un valor extremo de 113,666 para Cu. La cifra de acumulación del Cu es discutible por ser tan elevada y requeriría estudios más profundos para asegurar un FBC tan alto. Debido a su toxicidad, la acumulación de Hg es relevante. La acumulación de Al, As y Fe no ha sido registrada como relevante toxicológicamente en el caso del ostión, y la de Ni y V no mostró implicaciones biológicas claras, como se presenta en el análisis de los biomarcadores.

La posible asociación entre el comportamiento de los biomarcadores evaluados y los contenidos de metales en sedimento y ostión se presenta en la tabla 11.

La estabilidad lisosomal no tuvo relación con el contenido de metales en sedimento, ni con el contenido de metales en ostión. Recordemos que este parámetro se caracterizó en general como en buena condición en los ostiones de las lagunas analizadas.

Sin embargo, la actividad de la Acetilcolinesterasa (que fue baja en Pueblo Viejo y Alvarado), se encontró asociada de manera inversa con los contenidos de Hg, Cd y Cu en tejido de ostión. Todas las correlaciones observadas fueron estadísticamente relevantes ($p < 0.05$, y $r > -0.9$). Esto significa que los registros de baja actividad de esta enzima, los cuales se asocian con la menor capacidad de transmisión del impulso nervioso, se asociaron a altas concentraciones de estos tres metales en ostión.

Tabla 11. Correlación entre los biomarcadores y las concentraciones de metales en sedimento y e ostión (r).

	Estabilidad lisosomal (minutos de retención de rojo neutro)		**Actividad de Acetilcolinesterasa** (nmol/min/mg prot.)		**Daño genético** (Longitud de cauda en µm)	
Sedimento	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Hg	0.04	0.49	-0.78	-0.51	0.81	-0.57
Al	0.38	-0.26	0.12	0.39	-0.01	-0.08
As	0.24	0.21	-0.50	-0.12	0.61	-0.47
Ba	0.31	-0.12	0.04	0.27	0.00	-0.23
Cr	0.35	-0.39	0.33	0.64	-0.06	0.09
Cu	0.23	0.21	-0.43	-0.11	0.49	-0.49
Fe	0.40	-0.35	0.20	0.52	-0.00	0.03
Ni	0.39	-0.38	0.26	0.58	-0.02	0.07
Pb	0.02	0.49	-0.73	-0.44	0.80	-0.59
V	0.16	0.29	-0.39	-0.42	0.05	-0.55
Ostión						
Hg	0.18	0.42	-0.94*	-0.81	0.72	-0.47
Al	0.56	-0.53	0.05	-0.10	-0.42	0.37
As	-0.07	0.54	-0.69	-0.95*	0.15	-0.53
Cd	0.43	0.08	-0.96*	-0.91*	0.62	-0.06
Cu	0.30	0.27	-0.98*	-0.77	0.84	-0.30
Fe	0.54	-0.54	0.20	0.16	-0.43	0.31
Ni	0.23	-0.65	0.62	0.93*	-0.09	0.60
V	0.64	-0.96*	0.31	0.57	-0.03	0.95*

* Correlaciones significativas con $p < 0.05$.

El daño genético no se correlacionó con los contenidos de metales.

En el presente análisis se correlacionaron también las desviaciones estándar de los biomarcadores debido a que en ocasiones los cambios son más evidentes considerando la dispersión de los datos. Pudo observarse una correlación negativa de la desviación estándar de la estabilidad lisosomal con el contenido de V en ostión, y de la acetilcolinesterasa con el contenido de As y Cd en ostión, esto significa que los datos de ambos biomarcadores mostraron menor dispersión en los casos en que se registraron las concentraciones elevadas de estos metales. En contraste, hubo una correlación directa de la desviación estándar de la acetilcolinesterasa con el Ni, es decir mayor dispersión de datos en niveles altos de Ni en ostión. En el caso de daño genético, la única correlación significativa se obtuvo entre la mayor dispersión de datos de longitud de cauda del ADN con el mayor contenido de V en ostión, pero debido a la ausencia de otras relaciones su significado biológico es discutible. Del análisis de la dispersión de datos, la única correlación que se consideró relevante fue la observada entre la menor desviación estándar de la acetilcolinesterasa y el mayor contenido de Cd en ostión, ya que también se obtuvo una correlación similar con el promedio de los datos de este biomarcador.

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

De los 16 HAPs analizados en las muestras el acenafteno y el fluoreno presentaron concentraciones por debajo del límite de detección en sedimento y en ostión. En los organismos tampoco fueron detectados los siguientes hidrocarburos: fenantreno, antraceno, benzo (a) antraceno, criseno, benzo (k) antraceno, indeno (1, 2, 3) pireno y dibenzo antraceno. Las concentraciones detectadas en sedimento se muestran en las tablas 12 y 13, todas ellas son menores al nivel de efecto tóxico bajo (TEL) propuesto por los EUA para sedimentos (Buchman, 2008), por lo que en general se puede decir que es poco probable que estos sedimentos causen efectos tóxicos por la presencia de los HAPs cuantificados. Los contenidos se compararon con registros de estudios previamente realizados en el Golfo de México. Los registros previos de hidrocarburos en el Golfo de México tienen un intervalo amplio de valores, por lo que la mayor parte de las concentraciones detectadas se consideraron intermedias entre las registradas anteriormente, excepto en el caso del acenaftileno, cuyas concentraciones fueron elevadas respecto a las registradas en Pom Atasta (Botello et al., 1996; Orozco-Barajas et al., 2014).

Los HAPs cuyas concentraciones fueron inferiores a las de estudios previos fueron: Benzo (a) antraceno, Benzo (ghi) perileno y Dibenzo (a) antraceno. El naftaleno tuvo concentraciones mayores a las de otros hidrocarburos. Este fue detectado en Pueblo Viejo, Alvarado y Carmen-Machona. Las concentraciones de las lagunas de Tamiahua y Términos se encontraron por debajo de los límites de detección de los hidrocarburos: naftaleno, aceftileno, benzo (a) pireno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (ghi) périleno y dibenzo (a) antraceno. El fenanteno sólo se detectó en Pueblo Viejo. El antraceno sólo se detectó en Pueblo Viejo, Tamiahua y Alvarado. El fluoranteno, el pireno y el criseno se detectaron en todas las lagunas con valores bastante homogéneos.

Tabla 12. Concentraciones de HAPs en sedimento de cinco lagunas del Golfo de México (µg/Kg en base húmeda).

HAP	PV	Tm	Alv	C-M	Ter	Prom	DE	Min	Max
Naftaleno	24.17	< LD	8.14	7.56	< LD	7.98	9.87	< LD	24.17
Acenaftileno	0.24	< LD	0.18	0.24	< LD	0.13	0.12	< LD	0.24
Fenantreno	6.67	< LD	< LD	< LD	< LD				
Antraceno	1.04	0.80	0.72	< LD	< LD	0.51	0.48	< LD	1.04
Fluoranteno	5.05	4.25	5.11	4.58	4.12	4.62	0.45	4.12	5.11
Pireno	4.51	2.96	3.84	3.93	3.03	3.65	0.65	2.96	4.51
Criseno	1.92	1.10	1.19	1.39	1.11	1.34	0.34	1.10	1.92
Indeno-1,2,3-pireno	3.72	0.40	3.29	4.58	0.30	2.46	1.98	0.30	4.58
Benzo (a) antraceno	3.73	3.06	2.93	3.22	3.12	3.21	0.31	2.93	3.73
Benzo (a) pireno	1.85	< LD	1.14	1.28	< LD	0.85	0.82	< LD	1.85
Benzo (b) fluoranteno	1.23	< LD	1.81	2.03	< LD	1.01	0.97	< LD	2.03
Benzo (k) fluoranteno	2.60	< LD	1.83	1.86	< LD	1.26	1.19	< LD	2.60
Benzo (ghi) perileno	2.93	< LD	2.64	2.97	< LD	1.71	1.56	< LD	2.97
Dibenzo (a) antraceno	0.49	< LD	0.43	0.52	< LD	0.29	0.26	< LD	0.52

PV, Pueblo Viejo; Tm, Tamiahua; Alv, Alvarado; C-M, Carmen Machona; Ter, Términos; Prom, promedio; DE, desviación estándar; Min, mínimo; Max, máximo.

Tabla 13. Concentraciones de HAPs en sedimento de cinco lagunas del Golfo de México (µm/Kg en base seca).

	PV	Tm	Alv	C-M	Ter	Prom	DE	Min	Max
Naftaleno	51.48	< LD	14.32	15.81	< LD	16.32	21.05	< LD	51.48
Acenaftileno	0.51	< LD	0.33	0.50	< LD	0.26	0.25	< LD	0.51
Fenantreno	14.20	< LD	< LD	< LD	< LD				
Antraceno	2.22	1.41	1.26	< LD	< LD	0.98	0.96	< LD	2.22
Fluoranteno	10.76	7.47	9.00	9.57	5.81	8.52	1.92	5.81	10.76
Pireno	9.61	5.21	6.76	8.23	4.27	6.82	2.17	4.27	9.61
Criseno	4.09	1.93	2.10	2.90	1.56	2.52	1.01	1.56	4.09
Indeno-1,2,3-pireno	7.92	0.71	5.78	9.57	0.43	4.88	4.16	0.43	9.57
Benzo (a) antraceno	7.95	5.38	5.16	6.73	4.39	5.92	1.41	4.39	7.95
Benzo (a) pireno	3.94	< LD	2.01	2.67	< LD	1.72	1.72	< LD	3.94
Benzo (b) fluoranteno	2.62	< LD	3.19	4.25	< LD	2.01	1.93	< LD	4.25
Benzo (k) fluoranteno	5.54	< LD	3.21	3.90	< LD	2.53	2.46	< LD	5.54
Benzo (ghi) perileno	6.25	< LD	4.65	6.20	< LD	3.42	3.19	< LD	6.25
Dibenzo (a) antraceno	1.05	< LD	0.75	1.08	< LD	0.58	0.54	< LD	1.08

PV, Pueblo Viejo; Tm, Tamiahua; Alv, Alvarado; C-M, Carmen Machona; Ter, Términos; Prom, promedio; DE, desviación estándar; Min, mínimo; Max, máximo.

Los resultados de hidrocarburos en ostión se muestran en la tabla 14. Al igual que en el sedimento, los valores de naftaleno detectados en ostión fueron elevados respecto a otros hidrocarburos.

Tabla 14. Concentraciones de HAPs en ostión de cinco lagunas del Golfo de México (µm/Kg en base seca).

	PV	Tm	Alv	C-M	Ter	Prom	DE	Min	Max
Naftaleno	1.70	1.00	1.80	2.30	1.30	1.62	0.50	1.00	2.30
Acenaftileno	ND	ND	0.60	1.00	0.60	0.73	0.23	0.60	1.00
Fluoranteno	0.20	ND	ND	ND	ND				
Pireno	0.10	0.10	0.20	0.10	ND	0.12	0.05	0.10	0.20
Benzo (a) pireno	0.10	ND	ND	ND	ND				
Benzo (b) fluoranteno	ND	0.10	ND	ND	0.10	0.10		0.10	0.10
Benzo (ghi) perileno	0.10	ND	ND	ND	ND				

PV, Pueblo Viejo; Tm, Tamiahua; Alv, Alvarado; C-M, Carmen Machona; Ter, Términos; Prom, promedio; DE, desviación estándar; Min, mínimo; Max, máximo.

Los ostiones de la laguna de Pueblo Viejo fueron los únicos en que se detectaron: fluoranteno, benzo (a) pireno y benzo (ghi) perileno. El benzo (b) fluoranteno se detectó en Tamiahua y Términos solamente.

Los contenidos de HAPs en ostión no tuvieron relación alguna con los contenidos en el sedimento. Y al compararlos con lo reportado por O'Connor (2002) para el programa de monitoreo "Mussel Watch" de los años 1996 a 1998, la sumatoria de los HAPs de este proyecto es menor.

Con este número limitado de datos se obtuvo un análisis de FBC, el cual pudo determinarse únicamente con el naftaleno (0.10), el pireno (0.02) y el acenaftileno (2.74). Este último indica una tendencia a la bioacumulación, y como se mencionó anteriormente, el contenido de este hidrocarburo en sedimento se consideró elevado respecto a registros previos. Es necesario llevar a cabo un estudio en el que el número de muestras sea más amplio para corroborar este comportamiento.

Las correlaciones entre las concentraciones de hidrocarburos en sedimento y en ostión, y los biomarcadores sólo generaron dos correlaciones significativas. Nuevamente sólo la acetil colinesterasa presentó asociación, en este caso hubo una correlación inversa entre la actividad de esta enzima y el fluoranteno medido en base húmeda ($r = -0.92$); y una directa positiva respecto al benzo (b) fluoranteno medido en base seca ($r = 1.0$). Este último dato sin embargo se generó con sólo tres valores, por lo que no se considera un resultado definitivo.

CONCLUSIONES

Los parámetros físico-químicos del agua mostraron el carácter eutrófico de las cinco lagunas muestreadas en las dos etapas del presente proyecto.

La presencia de agentes tóxicos en las lagunas durante los muestreos no fue suficientemente alta para causar toxicidad aguda (Microtox), ni daño significativo en el ADN de los ostiones.

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 en ambas fases del proyecto.

La estabilidad lisosomal de los ostiones de cuatro de las cinco lagunas no presenta diferencias significativas, sin embargo los animales de Carmen Machona mostraron una mejora en su estado de salud durante la fase II del proyecto, la cual se asoció a mejores condiciones en la salinidad y el oxígeno disuelto.

La evaluación de la actividad de la AChE mostró ser un biomarcador sensible a los cambios en la condición de los ostiones al detectar una mejor condición en la fase II de este proyecto, así como en los ostiones expuestos a un período de depuración largo.

De acuerdo con la longitud de los cometas la laguna en la que los organismos presentaron menor daño en el ADN fueron Carmen Machona y Tamiahua en la etapa I del proyecto y Tamiahua y Términos en la etapa II.

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 de la glándula digestiva.

Los organismos de la laguna Carmen Machona presentaron el porcentaje más bajo de anormalidades histopatológicas en la etapa I del proyecto, mientras que los de la laguna de Alvarado en la etapa II.

Los organismos con mayor prevalencia de respuestas tisulares fueron: Términos > Machona > Pueblo Viejo > Tamiahua > Alvarado.

Los resultados de la exposición de ostiones a la FSG evidenciaron que la estabilidad lisosomal y la inhibición de la acetil-colinesterasas son biomarcadores adecuados para la evaluación de la exposición a hidrocarburos del petróleo a corto plazo, mientras que el ensayo cometa es útil para plazos más largos.

Las concentraciones más bajas de todos los metales en el sedimento y el ostión se registraron en la laguna de Términos. Las más elevadas de Hg, As y Cu en Pueblo Viejo, y de Fe, Ni y V en Carmen-Machona. Así mismo, el sedimento de Pueblo Viejo mostró las concentraciones más elevadas de Pb y V, y Carmen-Machona de Al, Ba y Cr.

Los valores de Cd y Cu en ostión de este estudio son altos y el Ni está dentro del rango reportado en el Programa de Monitoreo “Mussel Watch” para los años 1996 a 1998.

La estabilidad lisosomal no tuvo relación con el contenido de metales en sedimento, ni con el contenido de metales en ostión, pero la actividad de la Acetilcolinesterasa se encontró asociada de manera inversa con los contenidos de Hg, Cd y Cu en tejido de ostión.

Las concentraciones detectadas en sedimento son menores al nivel de efecto tóxico bajo (TEL) propuesto por los EUA para sedimentos (Buchman, 2008), por lo que en general se puede decir que es poco probable que estos sedimentos causen efectos tóxicos por la presencia de los HAPs cuantificados.

Los contenidos de HAPs en ostión no tuvieron relación alguna con los contenidos en el sedimento, y son menores que los reportados para el programa de monitoreo “Mussel Watch” de los años 1996 a 1998. Pero al menos el acenaftileno muestra un incremento respecto a estudios previos del Golfo de México.

El FBC indicó que la acumulación de los metales varió de 2.0 para Hg a 263.9 para As y sólo la acetil colinesterasa presentó una correlación inversa entre la actividad de esta enzima y el fluoranteno medido en base húmeda, confirmando que este biomarcador es ideal para este tipo de estudios.

RECOMENDACIONES

Es recomendable la implementación de un programa de monitoreo para el Golfo de México en el que al menos una vez al año se cuantifiquen contaminantes de interés como lo son los hidrocarburos del petróleo y que al mismo tiempo se lleven a cabo mediciones de biomarcadores.

Es importante continuar con la aplicación de técnicas especiales e inmunohistoquímica para mejorar la interpretación de las respuestas tisulares que permitan la evaluación de la condición fisiológica de los organismos.

Como biomarcadores es recomendable seguir trabajando con la estabilidad lisosomal, la actividad de AChE y el ensayo cometa, 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 otros derivados diferentes de la gasolina Magna para cuantificar la variabilidad de los biomarcadores y su posible recuperación después de un período de depuración.

REFERENCIAS

Aguirre-Macedo, M.L., R.A. Simá-Álvarez, M.K. Román-Magaña & J.I. Guemes-Ricalde. 2007. Parasite Survey of the Eastern Oyster Crassostrea virginica in Coastal Lagoons of the Southern Gulf of Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 19: 270-279.

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.

Barrera-Escorcia G. 2011. *Efectos de los metales Cr y Cd en el ostión Crassostrea virginica. Propuesta de una nueva evaluación de riesgo para la especie*. Editorial Académica Española, U.K. 215 p.

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.

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.

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

Botello A.V., V.G. Ponce & S.A. Macko. 1996. Niveles de concentración de hidrocarburos en el Golfo de México. In: Botello, A.V., J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benitez &

D. Zarate-Lomelí (Eds.). Golfo de México. Contaminación e Impactio Ambiental: Diagnóstico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, EPOMEX, Serie Científica 5: 225-253.

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.

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.

Buchman, M., F. 2008*. NOAA Screening Quick Reference Tables*. NOAA OR&R Report 08-1. Seattle, WA, Office of Response and Restoration Division, National Oceanographic and Atmospheric Administration. 34 pp.

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.

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

Cajaraville, M.P., M.J. Bebiano, 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. *Disese 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.

Canesi, L., M. Betty, C. Ciacci, L.C. Lorusso, C. Pruzzo & G. Gallo. 2006. Cell signalling in the immune response of mussel hemocytes. *Invertebrates Survival Journal* 3: 40-49.

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.

Cone, J.B. 2001. Inflammation. *The American Journal of Surgery* 18: 558-562.

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.

De-Vico, G. & F. Carella. 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in Veterinary Science* 93: 1109-1115.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2011. NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación, México, 10 de febrero de 2011, 128 p.

Dixon, D., A. Pruski, L. Dixon & A.N. Jha. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: 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.

Eble, A.F. 1969. A histochemical demonstration of glucogen, glycogen phosphorylase and branching enzyme in the American oyster. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 59: 27-34.

Eble, F.A. & R. Scro, 1996. General Anatomy. In: Kennedy, S.V., Newell,R.I. (eds.) The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, USA p19-71.

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

Estrada-Flores, E., L. Peralta-Zamora & M.P. Rivas.1982. *Manual de técnicas histológicas*. AGT. 140 pp.

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.

Figueras, A. 2007. *Biología y cultivo del mejillon (Mytilus galloprovincialis) en Galicia*. Consejo Superior de Investigaciones científicas. Madrid, Esp. 282 pp.

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 Köeppen. 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.

Gullian-Klanian, M., J.A. Herrera-Silveira, R. Rodríguez-Canul & L. Aguirre-Macedo. 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 237-247.

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 y daño histopatológico en ostión Crassostrea virginica en condiciones de ayuno y alimentación*. Tesis de maestría. UAM-I. México. 65 pp.

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., A.V. Botello, L. Martínez-Tabche, & H. González-Márquez. 2009. Effects of heavy metal on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga lagoon, Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical* 57(4): 955-962.

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, Parsonsa 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., Hutchnson, S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella aguillarum*) 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. *Zeitschaift fur 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.

Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular*. 5º Ed. México, D.F. McGraw-Hill. 927 pp.

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

Kim, Y., E.N. Powelly, K.S. Ashton-Alcox. 2006. Histopathology analysis. In: Kim, Y., Ashton-Alcox, K.A., Powell, E.N. (Eds). *Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update*. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS. 27: 25-29 pp.

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.

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.

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 Mississipi River*. Tesis de doctorado. Iowa State University. Ames. IA. 233 pp.

Laubiert 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.

Manterola, D.C. & D. Zavando. 2009. Cómo interpretar los “Niveles de Evidencia” en los diferentes escenarios clínicos. *Revista Chilena de Cirugía* (6) 61: 582-595.

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 biomonitors: principles, concepts and applications*. Elsevier. Amsterdan, 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.

Matthew, J.J., A.H. Ringwwood, 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.

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. y 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 C.L. y 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.

Monserrat, J.M., P.E. Martínez, L. Geracitano, L. Lund Amado, C. Martinez Gaspar Martins, G. Lopes Leães Pinho, I. Soares Chaves, M. Ferreira-Cravo, J. Ventura-Lima y A. Bianchini, Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146 (1–2): 221-234.

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.

Morton, B. 1983. Aspects of the biology and functional morphology of *Iris irus* (*Bivalvia: Veneridae: tapetinae*) with a comparison of *Bassina calophylla* (*Chioninae*) In: B. Morton & D. Dudgen (eds.) *The malacofauna of Hong Kong and Southern China*. Hong Kong University Press. Hong Kong. 2: 6 - 24.

Muller, W.A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology*. 24(6): 326-333.

Mumford, S. 2007. *Fish histology and Histopathology*. Science Publishers. USA 215 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.

O'Connor, T. P. 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, 53(2), 117–143.

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.

Orozco-Barajas L., L.A. Ayala-Pérez, M.E. Morales-McDevitt. 2014. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y peces del sistema Pom-Atasta, Campeche, México. In: Botello A.V., J. Rendón von Osten, J.A. Benitez, y G. Gold-Bouchot. (Eds.). Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. UAC, UNAM, ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida: 363-382.

Ottaviani, E. 2006. Molluscan immunorecognition. *Invertebrate Survival Journal* 3: 50 - 63.

Ottaviani, E. 2011. Immunocyte: the invertebrate counterpart of the vertebrate macrophage. *Invertebrate Survival Journal* 8: 1 - 4.

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. *Science Programs Oxford* 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. Acetilcholinesterase, 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.

Ramírez Romero P., Guzmán García X, Guzmán Martínez MC, Hernández Calderas I, Trejo Ramírez JG, Torres Padilla JE, Elizalde Ramírez LG, Espejel Piña AL, Arellano López I, Ramírez Trejo V, Sierra Hernández E, Dávila M, Román Zepeda P, López Vite S, Juárez Jerónimo R, Matadamas Guzmán M y F. Muñoz Gutiérrez. 2011. Establecimiento de la línea base ecotoxicológica de la zona costera del Golfo de México. Informe Final. UAMI/SEMARNAT. 101 pp.

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 antitoxidant 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 acetycholinesterase and lactate deshydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44: 287 – 293.

Ringwood, A.H., Conners, 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.

Rubin, E. & J.L. Farber. 1992. *Patología*. Ed. Médica Panamericana. S.A. de C.V.1420 pp.

Sánchez, C. 2007. Volumen XX N. 2, Revista de Div*ulgación 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.

Sander, B., 1990. Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (eds): *Biomarkers of Enviromental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp165-192.

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.

Secretaría de Pesca (SEPESCA). 1988. Manual Técnico para la Operación de Centros Acuícolas de Producción de Ostión. SEPESCA, México, 324 p.

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 fiches 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.

Takashima, F. & T. Hibiya. 1995. *An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features.* Kodansha Ltd. Tokyo. 195 pp.

Thompson HM, Walker CH y Hardy AR. 1991. Inhibition of avian esterases by organophosphorus insecticides: problems of reactivaction 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/RAMOGE (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.

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.

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

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 Haunert. 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.

Wulff, S. 2004. *Introduction to Special Stains. From: Handbook Guide to Special Stains*. Ed. Carpinteria, CA: Dako Cytomation p.1-4.

Watermann, B., A. Thomsen, H. Kolodzey, B. Daehne, M. Meemken, U. Pijanowska & G. Liebezeit. 2008. Histopathological lesions of mollusks in the harbor of Norderney, Lower Saxony, North Sea (Germany). *Helgoland Marine Research* 62: 167-175.

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.

Zaroogian, G. & P. Yevich. 1994. The Nature and Function of the Brown Cell in Crassostrea virginica. *Marine Environmental Research*. 37: 355-373.

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, Vandepeer 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.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AChE: Acetilcolinesterasa. Enzima que hidroliza el compuesto acetilcolina.

Aductos: en el contexto de la toxicología, productos de enlaces estables entre xenobióticos moléculas endógenas, e.g. entre metabolitos PAH y ADN.

Absorción: proceso de asimilación. En el caso de personas y animales, la absorción es el proceso por el cual una sustancia entra en el cuerpo a través de ojos, piel, estómago, intestinos o pulmones (o en su caso branquias).

Adsorción: la incorporación y adhesión de un gas, un líquido o una sustancia disuelta a una fina capa de moléculas de la superficie de un sólido.

Antagonismo: con referencia a la toxicidad, cuando la toxicidad de la mezcla es menor que la suma de los toxicidades de sus componentes.

Antropogénico: Generados por las actividades del hombre..

ATPasas: Adenosin trifosfatadas.

Bioacumulación: es la acumulación de un compuesto químico ya sea directamente del medio (usualmente agua) o del consumo de alimento que contiene el compuesto.

Bioensayo: es el uso de un organismo vivo para medir la cantidad de un tóxico presente en una muestra o la toxicidad de una muestra. Esto se hace mediante la comparación de los efectos tóxicos de la muestra con los efectos observados a través de una serie gradual de las concentraciones de un estándar conocido.

Bioindicador: un organismo o un conjunto de organismos, que tienen la capacidad de responder a la variación de un determinado factor biótico o abiótico del ecosistema, de tal manera que esta respuesta quede reflejada en el cambio de valor en una o más variables de cualquier nivel de dicho organismo.

Biomagnificación: Aumento en la concentración de un compuesto químico en los organismos vivos con el paso a lo largo de una cadena alimenticia.

Biomarcador: es un cambio en una respuesta biológica, bioquímica, fisiológica o histológica medida en un sistema biológico a diferentes niveles de organización, el cual puede estar relacionado a la exposición y/o efecto de un compuesto químico o a un estresor ambiental.

Biotransformación: Conversión de un compuesto químico en uno o más productos por un mecanismo biológico (predominantemente por acción enzimática).

Carcinogénico: una sustancia capaz de causar cáncer. Los compuestos carcinógenos han sido clasificados en aquellos que son genotóxicos y aquellos que son epigenéticos (es decir, no genotóxico).

ChE (colinesterasa): término general para las enzimas que hidrolizan ésteres.

Citotoxicidad: daño o muerte celular ocasionada por un compuesto químico externo a la célula. Tal compuesto puede ser producido por los mediadores solubles del sistema inmune, o pueden ser un compuesto tóxico al cual el organismo ha sido expuesto.

Colinérgico: asociado con el neurotransmisor acetilcolina.

Contaminación: es la introducción de un agente contaminante dentro de un medio natural, causando inestabilidad, desorden y también daños en el ecosistema.

Contaminante: cualquier factor cuya presencia en un determinado ambiente y circunstancia, constituyan o desencadenen contaminación. Es la sustancia, o forma de energía que normalmente no está presente en el medio ambiente marino, al menos en los niveles que se encuentran con frecuencia y que aparentemente no causan efectos nocivos. Si la concentración se incrementa con el tiempo puede producir efectos nocivos

$EC(D)_{50}$: concentración (dosis) que causa un efecto sobre el 50% de una población.

Ecotoxicología: Ciencia dedicada al estudio de la producción de los efectos dañinos causados por sustancias que ingresan al ambiente natural, especialmente en la población, las comunidades y los ecosistemas; una parte esencial de la ecotoxicología es la evaluación del movimiento de sustancias potencialmente tóxicas a través de los compartimientos ambientales y las redes alimentarias.

Detoxicación: una reacción metabólica o la secuencia de reacciones que reduce el potencial para el efecto adverso de un xenobiótico. Tales secuencias normalmente implican un aumento de solubilidad en agua que facilita la excreción y/o la reacción de un producto reactivo con un sustrato endógeno, de tal modo que no sólo aumenta la solubilidad en agua, sino también reduce la posibilidad de interacción con macromoléculas celulares.

Disruptor endócrino: Compuesto químico que causa disturbios en el sistema endócrino ej. Como agonistas o antagonistas del receptor estrógeno.

Dosis: la cantidad total de una sustancia tóxica, drogas u otro producto químico administrado para o tomado en el organismo.

Esterasas: enzimas que hidrolizan ésteres.

Factor de bioacumulación (BAF): concentración de un compuesto químico en un animal/concentración del mismo compuesto químico en su alimento.

Factor de bioconcentración (BCF): concentración de un compuesto químico en un organismo/concentración del mismo compuesto químico en el medio ambiente.

Fugacidad: tendencia de una sustancia química para escapar de la fase en la que se encuentra a otra fase (por ejemplo, de líquido a gas).

Genotóxico: tóxico que actúa con el material genético, especialmente con el ADN.

Hidrofílico: “afinidad por el agua”. Compuestos orgánicos polares que tienden a ser atraídos por las moléculas de agua.

Hidrofóbico: “repulsión por el agua”. Compuestos orgánicos no polares que no tienen afinidad por el agua.

Inhibición: en bioquímica y toxicología, la inhibición es una reducción en la tasa de reacción enzimática, y un inhibidor es cualquier compuesto que cause tal reducción.

Inmunotoxicidad: toxicidad para el sistema inmunológico.

Inducción: con referencia a las enzimas, un aumento de actividad debido a un incremento en su concentración celular. Esto puede ser una respuesta a un xenobiótico y a menudo implica una mayor tasa de síntesis de la enzima.

K_{OW}: coeficiente de partición octanol/agua.

Lisosoma: es un orgánulo pequeño característico de células eucariotas. Su función es la digestión tanto de material endocitado (nutrientes, microorganismos, orgánulos, restos de otras células, etc.) como de material de desecho intracelular (orgánulos inservibles). La alteración de la función de las enzimas lisosomales causa enfermedades crónico-progresivas graves.

Lipofílico: “afinidad por los lípidos”. Tales compuestos orgánicos tienden a ser de baja polaridad y son hidrofóbicos.

Neurotoxicidad: este es un término general que se refiere a todos los efectos tóxicos sobre el sistema nervioso, incluyendo a los efectos tóxicos medidos como anormalidades del comportamiento.

Neurotransmisor: sustancia endógena involucrada en la transmisión de los impulsos nerviosos.

NOE(C)D: sin efecto observado concentración o dosis.

PAH: hidrocarburo aromático policíclico.

Potenciación: con referencia a la toxicidad; la situación donde la toxicidad de una combinación de compuestos es mayor que la suma de la toxicidad de sus componentes individuales.

Relación dosis-respuesta: en toxicología la relación cuantitativa entre la cantidad de un compuesto tóxico administrado o tomado y la incidencia o extensión del efecto adverso.

Sinergismo: similar a la potenciación, pero algunos autores usan el término de una manera más restringida. Así, por ejemplo cuando uno de los componentes de una mezcla, el sinergista, no cause la misma toxicidad si se aplica solo en la dosis en cuestión.

Toxicidad selectiva (selectividad): diferencia en la toxicidad que tiene un compuesto químico sobre diferentes especies, cepas, sexos, grupos de edades, etc.

Tóxico: Cualquier sustancia que administrada a un organismo vivo causa un efecto adverso.

Toxicodinámica: referente a la acción tóxica de los compuestos químicos sobre los organismos vivos.

Toxicocinética: relacionada con el destino de los compuestos químicos tóxicos en los organismos vivos, es decir, cuestiones de absorción, distribución, metabolismo, almacenamiento y excreción; factores que determinan cuánto de una forma tóxica alcanza el sitio de acción.

Xenobiótico: Un “compuesto exterior” que no tiene ningún papel en la bioquímica normal de un organismo vivo. Un compuesto endógeno “normal” para una especie puede ser un xenobiótico a otra especie.

CREDITOS

INVESTIGADORES PARTICIPANTES

Dra. Patricia Ramírez Romero
Dra. Xóchitl Guzmán García
Dra. Guadalupe Barrera Escorcia
Dra. María del Carmen Guzmán Martínez

ESTUDIANTES PARTICIPANTES

M. en C. Silvia Cecilia Bastidas Bonilla
M. en C. Mayra Pamela Becerra Amezcua
M. en B. José Roberto Jerónimo Juárez
Biol. Irma Hernández Calderas
Ing. Amb. Laura Guadalupe Elizalde Ramírez
Hbiol. Sonia González Rebollar
Biol. Verónica Ramírez Trejo
Biol. Pedro Román, Zepeda
LCG. Meztli Matadamas-Guzmán
LCG. Felipe Muñoz-González
P. Hidrobiol. Emilio Torres Padilla
P. Hidrobiol. Diana Luna Islas

ASESORES

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

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

FASE II

Medidas morfométricas de los ostiones *C. virginica* de la laguna de Tamiahua, Veracruz.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
T1	11.5	7.5	84.0	11.0
T2	12.0	7.0	90.0	8.0
T3	11.8	6.9	86.0	7.0
T4	12.5	6.9	98.0	9.0
T5	8.9	5.7	87.0	9.0
T6	9.3	5.8	113.0	7.0
T7	8.5	5.7	92.0	6.0
T8	9.9	4.8	78.0	6.0
T9	9.5	8.0	89.0	6.5
T10	12.4	8.4	102.0	11.0
T11	11.4	7.1	94.0	10.0
T12	10.0	7.0	74.0	10.0
T13	8.4	9.0	54.0	3.0
T14	10.3	8.7	97.0	8.0
T15	9.9	7.2	73.0	8.0
T16	8.9	7.5	45.0	4.5
T17	9.0	6.4	40.0	6.0
T18	11.3	8.3	115.0	9.0
T19	9.8	7.0	69.0	7.0
T24	10.4	8.0	89.0	10.0
T25	10.0	6.5	52.0	3.0

Medidas morfométricas de los ostiones *C. virginica* de la laguna de Términos, Campeche.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
C1	7.5	3.3	42.4	1.0
C2	6.2	3.0	34.6	1.0
C3	4.6	2.7	83.9	2.0
C4	6.0	3.4		1.0
C5	6.1	2.3	33.6	0.5
C6	8.5	3.5	59.9	0.8
C7	9.2	4.7	99.9	3.0
C8	7.5	3.6		5.0
C9	7.0	3.0	85.2	3.0
C10	12.5	5.0	118.0	11.0
C11	10.5	7.5	143.0	13.0
C12	12.5	5.5	114.0	19.0
C13	9.0	6.5	137.0	11.0

Medidas morfométricas de los ostiones *C. virginica* de la laguna de Alvarado, Veracruz.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
A1	8.7	6.0	83.0	9.0
A2	8.6	6.1	77.0	10.0
A3	7.6	6.1	112.0	9.0
A4	9.2	5.4	75.0	9.0
A5	9.2	6.4	118.0	15.0
A6	7.2	5.4	139.0	19.0
A7	9.7	4.0	69.0	8.0

A8	7.5	4.8	64.0	7.0
A9	9.0	5.7	85.0	8.0
A10	7.8	5.5	81.0	8.5
A11	8.0	5.0	88.0	10.0
A12	8.9	5.1	75.0	8.0

Medidas morfométricas de los ostiones *C. virginica* de la laguna de Pueblo Viejo, Tamaulipas.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
PV1	10.5	4.5	75	8
PV2	10.5	5	122	6
PV3	12	4	102	13
PV4	10	5.5	102	5
PV5	8.5	5.5	83	7
PV6	9.5	5.5	49	5.5
PV7	9	4.5	61	6
PV8	9	6	77	4
PV9	11	4.5	60	4
PV10	11	6.5	84	7
PV11	8.5	5.5	113	9
PV12	8.6	5	81	8.9
PV13	8	5.5	79	5
PV14	10	5	89	7.5
PV15	9.5	5	71	6
PV16	8	7	72	5
PV17	9.5	5.8	89	6
PV18	13	5	93	5
PV19	9.6	5.4	66	6

Medidas morfométricas de los ostiones *C. virginica* de la laguna Carmen Machona, Tabasco.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
M1	7.5	4.5	47.0	4.0
M2	10	3.8	59.8	3.0
M3	9.8	4.6	71.0	5.0
M4	8.3	4.4	49.3	8.0
M5	8.6	4.1	42.1	4.0
M6	8	4.5	58.7	6.0
M7	9	3.8	57.9	8.0
M8	8	4.0	54.4	12.0
M9	9.8	5.5	79.3	10.0
M10	4.3	9.6	73.3	5.0
M11	4.6	9.3	71.7	5.0
M12	3.2	5.6	28.2	3.0
M13	4	5.3	28.4	2.0

Medidas morfométricas de los ostiones *C. virginica* de la laguna de Tamiahua, Veracruz, empleados para la evaluación del bioensayo.

No. Ostión	Largo (cm)	Ancho (cm)	Peso c/concha (g)	Líquido Intervalvas (mL)
1	8.2	4.4	85.0	10.0
2	7.6	4.6	65.0	7.0
3	7.3	4.7	79.0	6.0
4	10.0	6.0	93.0	6.0
5	7.2	4.6	73.0	6.0
6	9.5	6.0	86.0	5.0
7	7.3	4.8	85.0	6.0
8	8.5	4.6	73.0	6.0
9	8.5	4.4	78.0	6.0
10	9.3	4.7	83.0	8.0
11	9.2	4.6	77.0	8.0
12	8.7	4.5	70.0	6.0
14	9.0	4.5	89.0	7.0
15	8.2	4.3	85.0	5.0

16	8.0	4.6	70.0	6.0
17	7.9	3.9	52.0	5.0
18	8.7	4.6	83	6
14	9.0	4.5	89.0	7.0
19	8.4	3.5	67.0	6.0
20	7.9	3.9	69.0	10.0
21	8.6	5.7	85.0	10.0
22	8.7	4.6	73.0	7.0
23	7.5	5.9	80	9

ANEXO II. Estabilidad Lisosomal. Tiempos de Retención del Rojo Neutro.

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

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**	**180**	
A1	+	+	+	+	+	+	+	180
A1*	+	+	+	+	+	+	+	180
A2	+	+	+	+	+	+	+	180
A2*	+	+	+	+	+	+	+	180
A3	+	+	+	+	+	+	+	180
A3*	+	+	+	+	+	+	+	180
A4	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
A4*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
A5	+	+	+	+/-	+/-	-		90
A5*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
A6	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
A6*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
A7	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
A7*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
A8	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
A8*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
A9	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
A9*	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180

A10	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
A10*	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
A11	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
A11*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
A12	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
A12*	+	+	+	+	+	+/-	+/-	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

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

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**	**180**	
M1	+	+	+	+	+	+	+	180
M1*	+	+	+	+	+	+	+	180
M2	+	+	+	+	+	+	+	180
M2*	+	+	+	+	+	+	+	180
M3	+	+	+	+	+	+	+	180
M3*	+	+	+	+	+	+	+	120
M4	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
M4*	+	+	+	+	+	+	+	180
M5	+	+	+	+	+	+	+	180
M5*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
M6	+	+	+	+	+	+	+	180
M6*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
M7	+	+	+	+/-	+/-	+	+	180
M7*	+	+	+	+	+/-	-		90
M8	+	+	+	+	+	+	+/-	180
M8*	+	+	+	+	+	+	+/-	180
M9	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120

M9*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
M10	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
M10*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
M11	+	+	+	+	+/-	-	-	90
M11*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
M12	+	+	+	+/-	+	+	+	180
M12*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
M13	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
M13*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	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

Tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, de la laguna de Laguna de Términos, Campeche. Fase II.

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

T8*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T9	+	+	+	+	+/-	-		90
T9*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T10	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
T10*	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
T11	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T11*	+	+	+/-	+/-	+/-	-		90
T12	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	120
T12*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
T13	+	+	+	+/-	+/-	-		90
T13*	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	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

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

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**	**180**	
1	+	+	+	+/-	-			60
2	+	+	+	+/-	+/-	-		90
3	+	+	+	+/-	+/-	-		90
5	+	+	+/-	+/-	-			60
5*	+	+	+	+	+/-	-		90
6	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
6*	+	+/-	-				-	15
7	+	+	+	+	+/-	+/-		120
7*	+	+	+	+/-	+/-	-		90
8	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
8*	+	+	+/-	+/-	+/-	-		90
9	+	+	+	+	+	+	+	180
9*	+	+	+/-	-				30
10	+	+	+/-	+/-	-			60
10*	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180

11	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
11*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
12	+	+	+	+	+	+	+	180
12*	+	+/-	+/-	+/-	-			60
13	+	+/-	+/-	-				30
13*	+	+	+/-	+/-	+/-	-		90
14	+	+	+/-	-				30
14*	+	+	+	+	+/-	-		90
15	+	+	+	+	+	+	+	180
15*	+	+/-	+/-	-				30
16	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
16*	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
17	+	+	+	+	+	+	+	180
17*	+	+/-	-					15
18	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
18*	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
19	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180

19*	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	120
24	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
24*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
25	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	180
25*	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-		15

+ = 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

RESULTADOS ESTABILIDAD LISOSOMAL BIOENSAYO

Día 0

Para la realización del bioensayo se utilizaron organismo de la laguna de Tamiahua, Veracruz. Los datos morfológicos en promedio que se obtuvieron fueron largo 7.7 cm, ancho 4.6 cm, peso con concha 76.3 g. y liquido intervalvas 7.7 mL. Se analizaron 3 organismo con sus respectivas replicas, el tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, se muestra a continuación.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
1	+	+/-	+/-	+/-	-			60
1*	+	+	+	+	+	+	+	180
2	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
2*	+	+	+	+	+	+	+	180
3	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
3*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180

*Replica de la muestra

Día 1

Inicio de la exposición de los organismos con gasolina. Los datos morfológicos en promedio que se obtuvieron fueron largo 8.5 cm, ancho 5.2 cm, peso con concha 82 g. y liquido intervalvas 5.8 mL. Se analizaron 5 organismo con sus respectivas replicas, los organismos con la nomenclatura 4, 5 y 6 fueron los que se expusieron al contaminante y el 7 y 8 son organismos asignados como control (en ausencia de contaminante), el tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, se muestra a continuación.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
4	+/-	-						0
4*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
5	+/-	+/-	+/-	-				30
5*	+/-	-						0

6	+/-	+/-	-					15
6*	+	+/-	-					15
7	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	120
7*	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-		90
8	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
8*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180

*Replica de la muestra

Día 4

Cuarto día de exposición de los organismos con gasolina. Los datos morfológicos en promedio que se obtuvieron fueron largo 8.9 cm, ancho 4.5 cm, peso con concha 75.8 g. y liquido intervalvas 7.2 mL. Se analizaron 5 organismo con sus respectivas replicas, los primeros tres organismos fueron los que se expusieron al contaminante y el 12 y 13 fueron tomados del grupo control (en ausencia de contaminante), el tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, se muestra a continuación.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**	**180**	
9	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-		90
9*	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-		90
10	+/-	+/-	+/-	-				30
10*	+/-	+/-	-					15
11	+/-	-						0
11*	+/-	+/-	-					15
12	+/-	+/-	+	-				30
12*	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
13	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
13*	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180

*Replica de la muestra

Día 7

El séptimo día se inicio la etapa de recuperación, donde se volvieron a poner a los organismos en las mismas condiciones ambientales para el caso de los organismos expuestos. Los datos morfológicos en promedio que se obtuvieron fueron largo 8.4 cm, ancho 4.4 cm, peso con concha 75.8 g. y liquido intervalvas 5.8 mL. Se analizaron 5 organismo con sus respectivas replicas, los primeros tres organismos fueron que se encuentra en fase de recuperación después de haber sido expusieron al contaminante y el 17 y 18 fueron tomados del grupo control (en ausencia de contaminante), el tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, se muestra a continuación.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**	**180**	
14	+	+	+/-	+/-	-			60
14*	+	+	+/-	+/-	-			60
15	+	+	+/-	-				30
15*	+	+	+/-	-				30
16	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
16*	+	+	+/-	+	+/-	-		90
17	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	120
17*	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	120
18	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	180
18*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120

*Replica de la muestra

Día 8

Los datos morfológicos en promedio que se obtuvieron fueron largo 8.2 cm, ancho 4.7 cm, peso con concha 74.8 g. y liquido intervalvas 8.4 mL. Se analizaron 5 organismo con sus respectivas replicas, los primeros tres organismos son los que se encuentran en la fase de recuperación y el 22 y 23 fueron tomados del grupo control (en ausencia de contaminante), el tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, se muestra a continuación.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
19	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
19*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
20	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
20*	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
21	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
21*	+	+	+	+	+	+/-	+/-	180
22	+	+	+	+	+	+	+	180
22*	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
23	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180
23*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	180

*Replica de la muestra

Día 14

Los datos morfológicos en promedio que se obtuvieron fueron largo 8.2 cm, ancho 4.7 cm, peso con concha 74.8 g. y liquido intervalvas 8.4 mL. Se analizaron 5 organismo con sus respectivas replicas, los primeros dos organismos son los del grupo control y el 26, 27 y 28 fueron tomados del grupo de recuperación, el tiempo de retención del rojo neutro de las muestras de ostión *C. virginica*, se muestra a continuación.

No. Ostión	MINUTOS							Retención
	0	15	30	60	90	120	180	
24	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	180
24*	+	+	+	+	+/-	+/-	-	120
25	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
25*	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	120
26	+	+	+	+/-	-			60
26*	+	+	+	+/-	-			60
27	+	+	+/-	+/-	-			60
27*	+	+	+/-	+/-	-			60
28	+	+	+	+/-	-			60
28*	+	+	+	+/-	-			60

*Replica de la muestra

ANEXO III. Actividad de la Acetilcolinesterasa y Contenido de Proteínas en Glándula Digestiva.

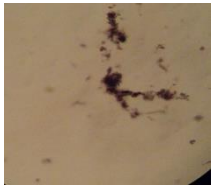
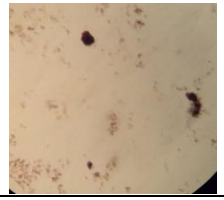
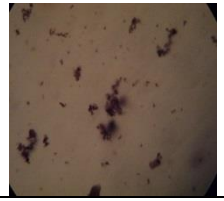
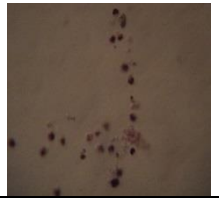
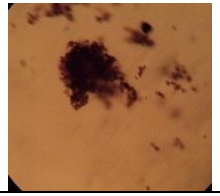
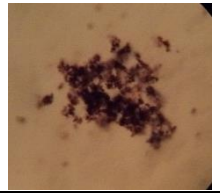
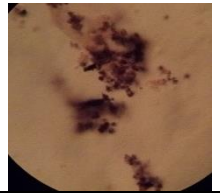
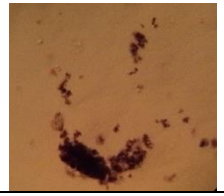
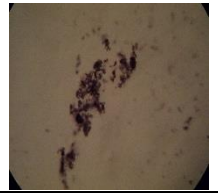
Actividad acetilcolinesterasa en glándula digestiva de Crassostrea virginica. FASE II					
	Actividad AChE			**Contenido de proteínas**	
	U/ml	U/mg proteína	U/g tejido	ug/ml	mg/g tejido
Pueblo Viejo					
Total	1.091 ± 0.026	1.713 ± 0.11	1.959 ± 0.05	0.215 ± 0.09	2.005 ± 0.04
S_1	0.410 ± 0.011	0.553 ± 0.03	0.246 ± 0.02	0.096 ± 0.05	0.796 ± 0.03
S_2	0.681 ± 0.015	1.160 ± 0.08	1.713 ± 0.03	0.119 ± 0.08	1.209 ± 0.03
Tamiahua					
Total	0.245 ± 0.04	0.385 ± 0.23	0.147 ± 0.04	0.228 ±0.45	1.869 ± 0.38
S_1	0.092 ± 0.03	0.125 ± 0.06	0.056 ± 0.03	0.089 ± 0.64	0.725 ± 0.12
S_2	0.152 ± 0.01	0.260 ± 0.17	0.092 ± 0.01	0.140 ± 0.93	1.444 ± 0.10
Laguna Alvarado					
Total	0.356± 0.03	0.764 ± 0.01	0.213 ±05	0.096 ± 0.67	0.805 ± 0.05
S_1	0.136 ± 0.05	0.356 ± 0.07	0.081 ±02	0.051 ± 0.96	0.429 ± 0.03

S_2	0.220 ± 0.01	0.471 ± 0.08	0.132 ±07	0.045 ± 0.35	0.376 ± 0.02
Actividad acetilcolinesterasa en glándula digestiva de *Crassostrea virginica.* Bioensayo con Gasolina					
Laguna Carmen Machona					
	Actividad AChE			**Contenido de proteínas**	
Total	0.400 ± 0.03	0.860 ± 0.005	0.240 ±02	0.083 ± 0.87	0.697± 0.08
	U/ml	U/mg proteína	U/g tejido	ug/ml	mg/g tejido
S_1	0.158 ± 0.04	0.341 ± 0.002	0.095 ±04	0.046 ± 0.26	0.382 ± 0.02
Tamiahua, Ver.					
S_2	0.242 ± 0.01	0.519 ± 0.006	0.145 ±01	0.038 ± 0.609	0.315 ± 0.04
Laguna de Términos					
Total	0.080 ± 0.06	0.147 ± 0.004	0.048 ± 07	0.097 ± 0.6	0.791 ± 0.06
S_1	0.036 ± 0.05	0.051 ± 0.003	0.021 ±04	0.051 ± 0.1	0.406 ± 0.07
S_2	0.044 ±0.01	0.096 ± 0.001	0.027 ± 02	0.045 ± 0.1	0.384 ± 0.01

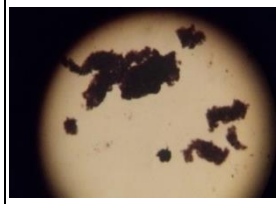
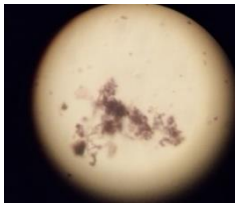
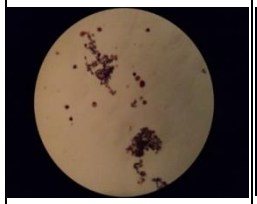
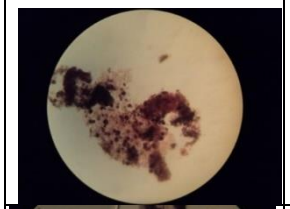
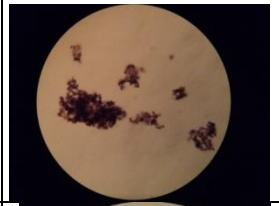
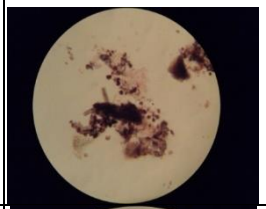
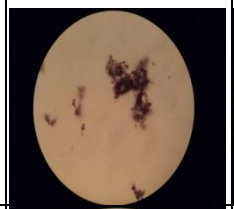
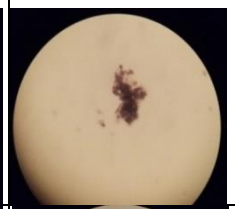
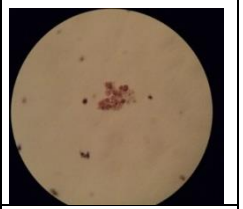
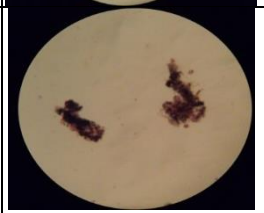
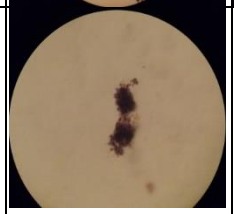
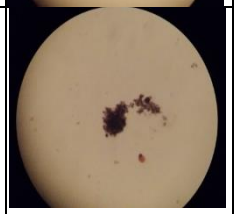
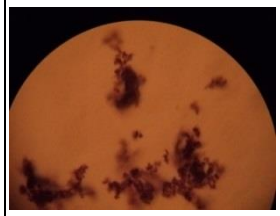
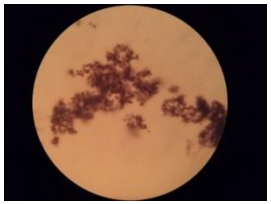
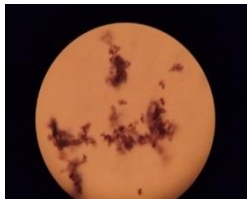
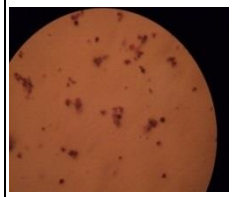
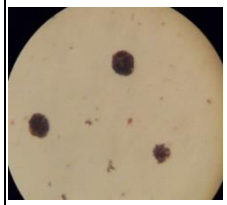
Total	0.041± 0.009	0.087 ± 0.06	0.043 ± 0.08	0.226 ± 0.03	1.863± 0.08
S_1	0.004± 0.051	0.008 ± 0.03	0.004 ± 0.01	0.132 ± 0.04	0.786 ± 0.03
S_2	0.036± 0.009	0.078 ± 0.04	0.039 ± 0.06	0.096 ± 0.07	1.077 ± 0.08

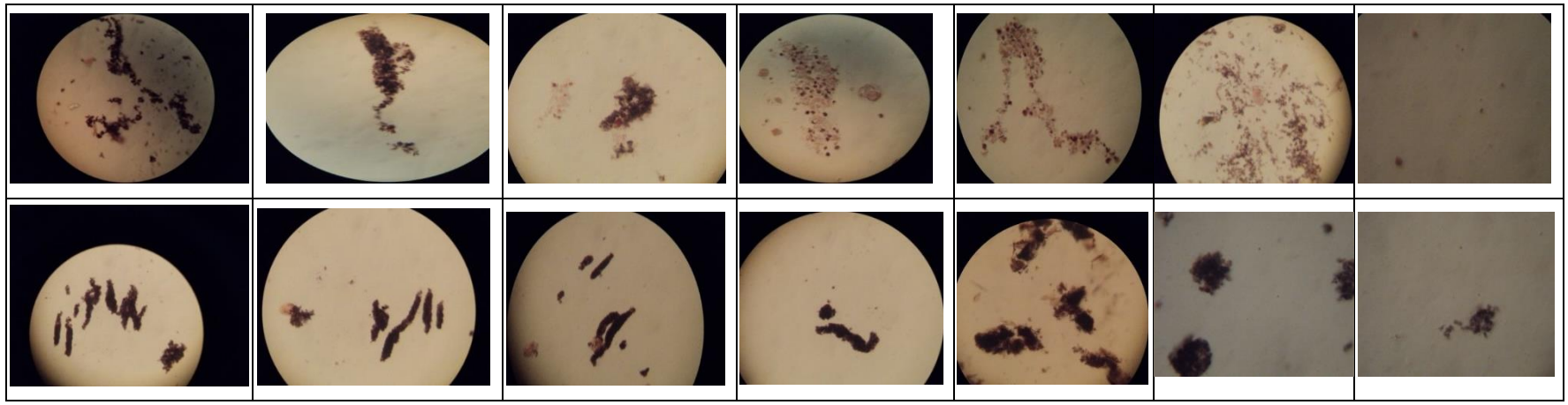
ANEXO IV. Anexo fotográfico de Estabilidad Lisosomal. Tiempos de Retención del Rojo Neutro.

Evidencia fotográfica de la retención lisosomal de Pueblo Viejo, Tamaulipas.

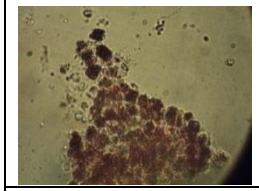
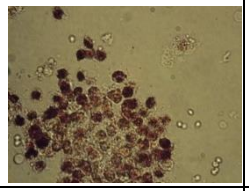
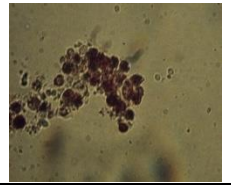
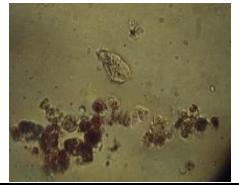
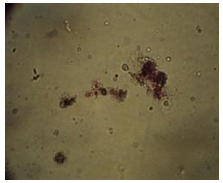
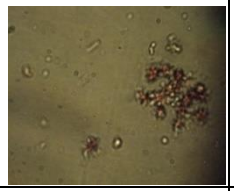
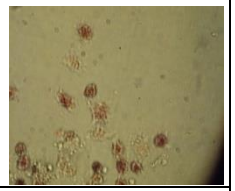
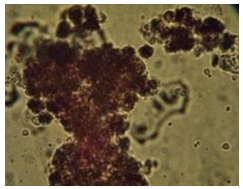
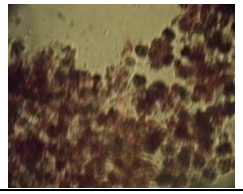
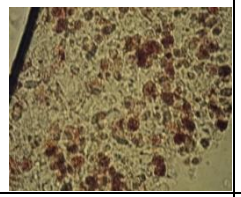
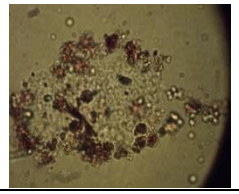
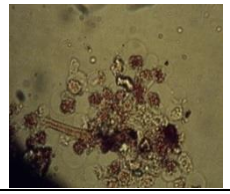
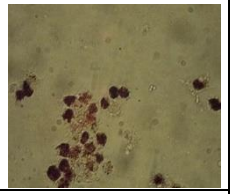
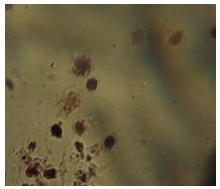
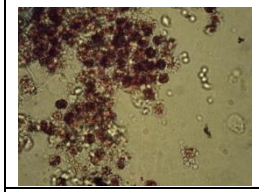
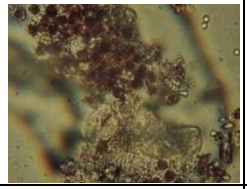
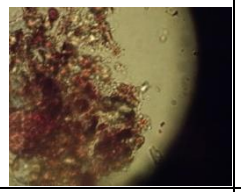
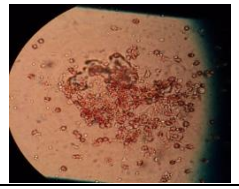
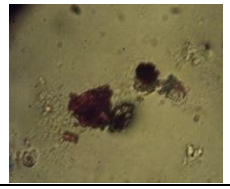
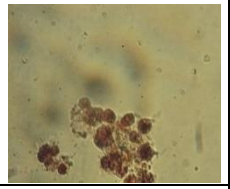
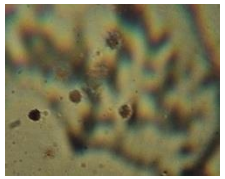
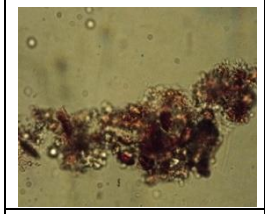
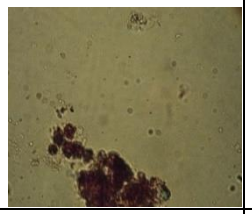
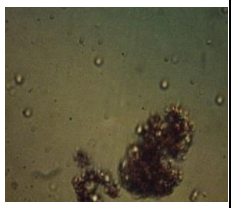
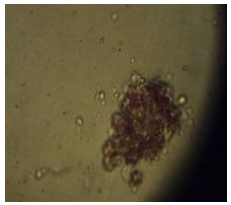
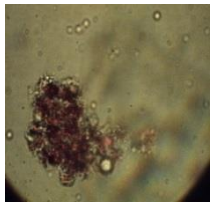
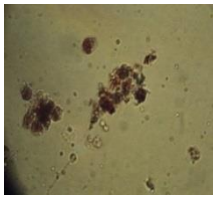
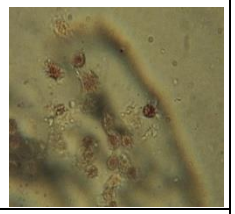
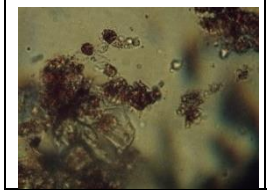
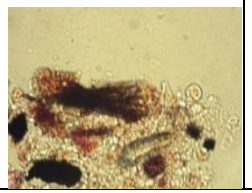
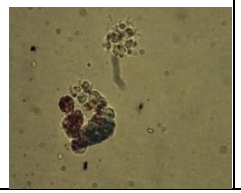
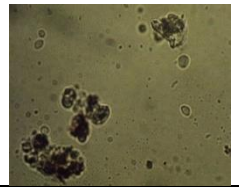
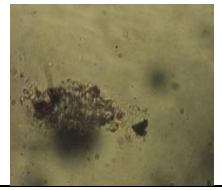
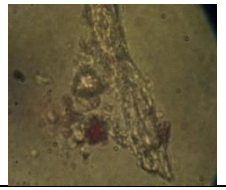
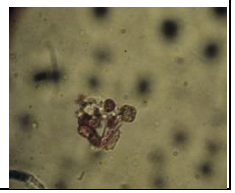
Laguna de Pueblo Viejo, Tamaulipas						
Min 0	**Min 15**	**Min 60**	**Min 90**	**Min 120**	**Min 180**	
						
						
						

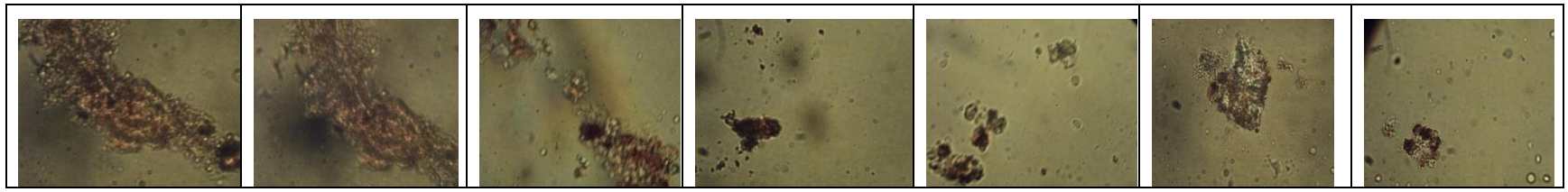
Evidencia fotográfica de lisosomas de Tamiahua, Veracruz

Laguna Tamiahua, Veracruz						
Min 0	Min 15	Min 30	Min 60	Min 90	Min 120	Min 180
						
						
						
						

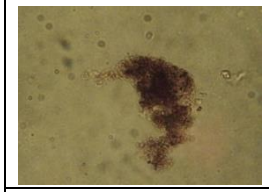
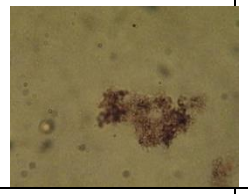
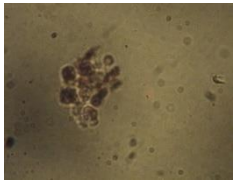
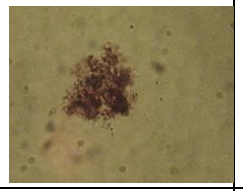
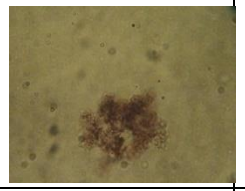
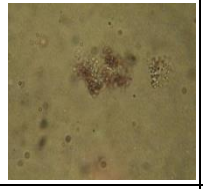
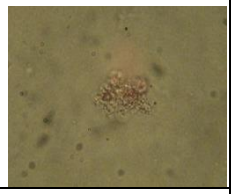
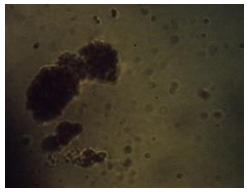
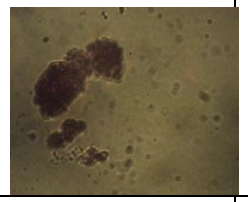
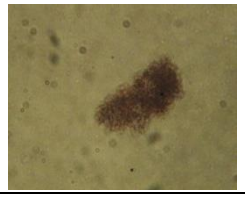
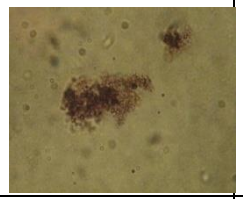
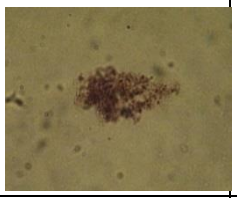
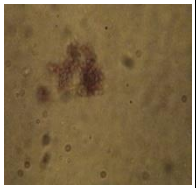
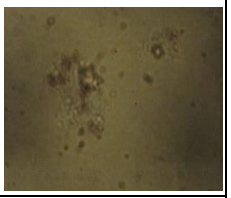
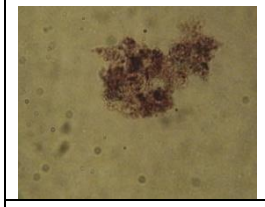
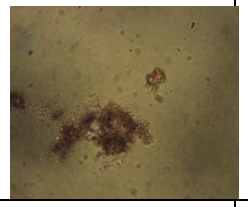
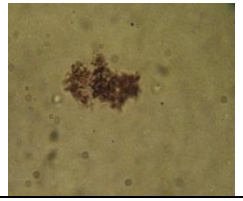
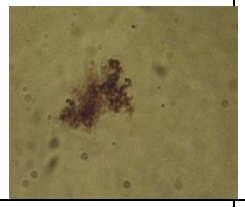
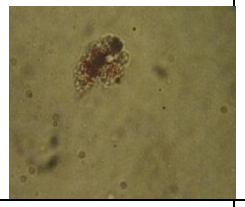
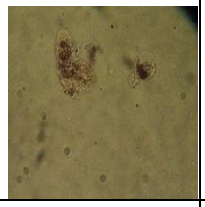
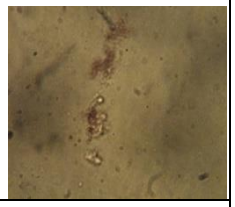
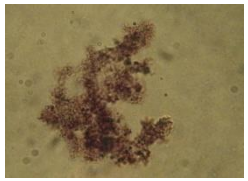
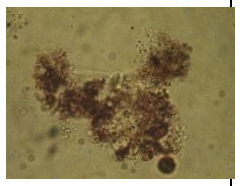
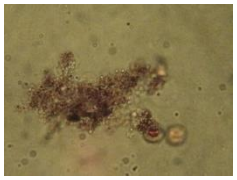
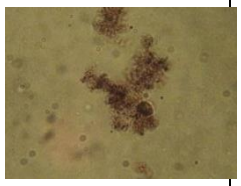
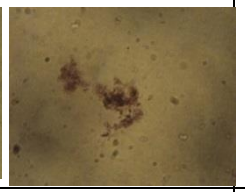
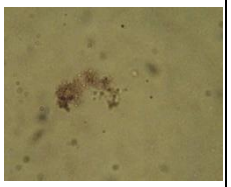
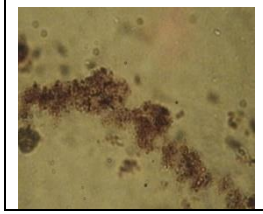
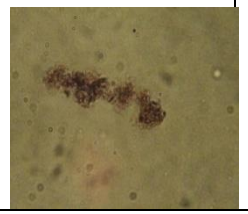
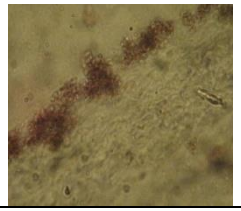
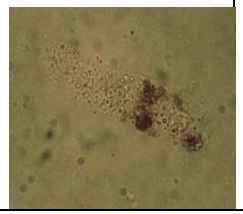
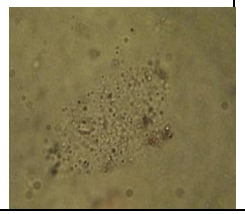
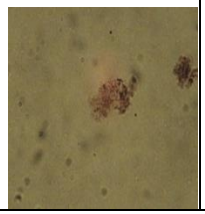


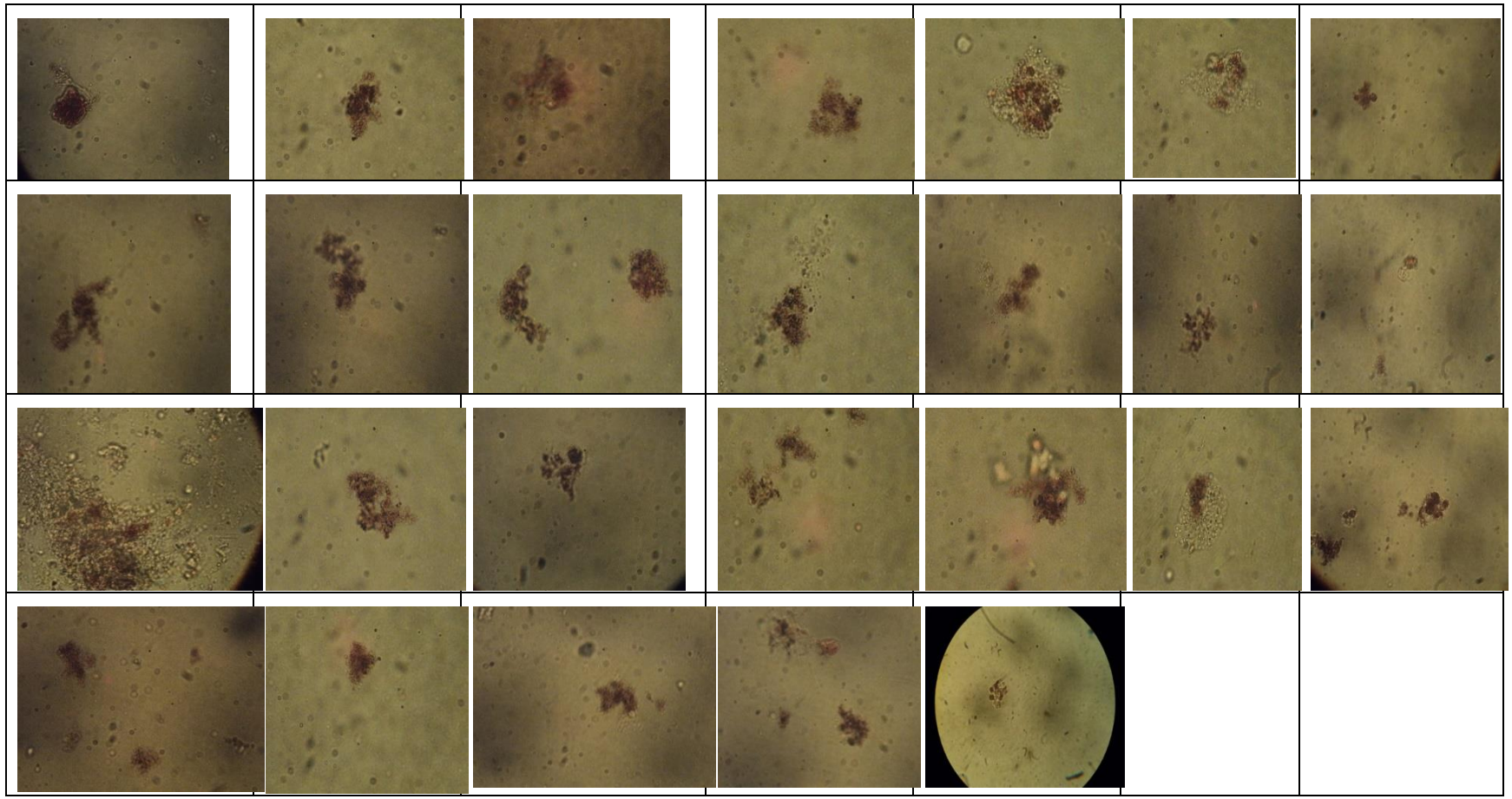
Evidencia fotográfica de lisosomas de Alvarado

ALVARADO						
Min 0	Min 15	Min 30	Min 60	Min 90	Min 120	Min 180
						
						
						
						
						

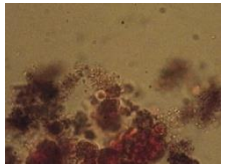
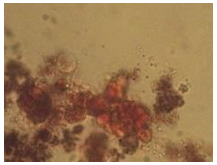
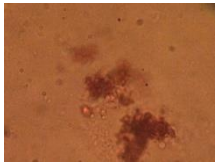
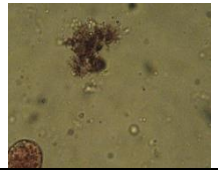
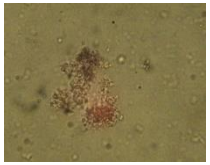
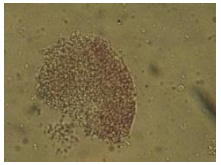
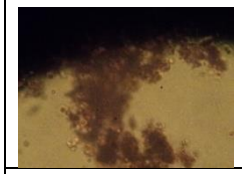
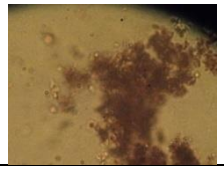
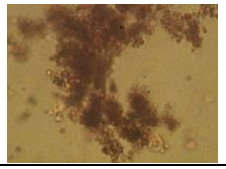
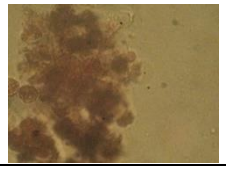
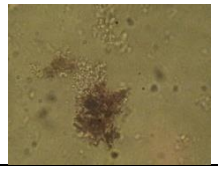
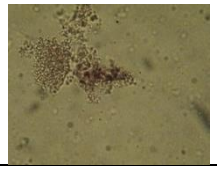
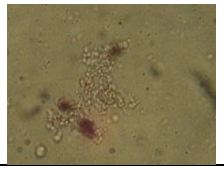
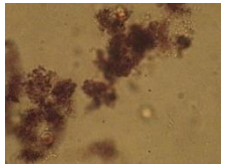
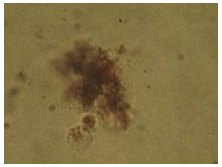
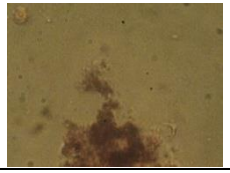
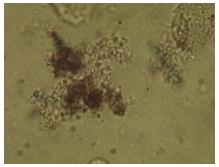
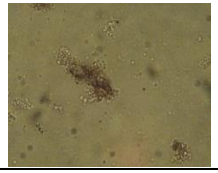
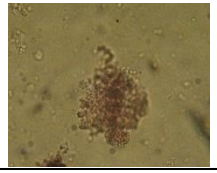
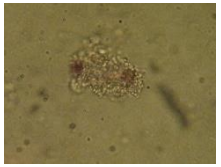
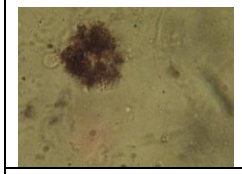
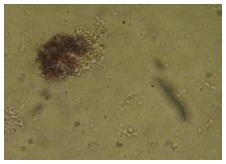
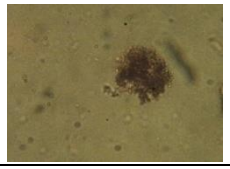
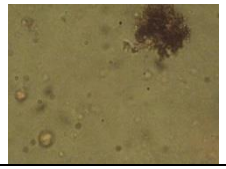
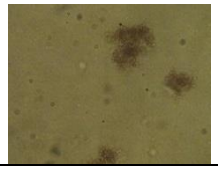
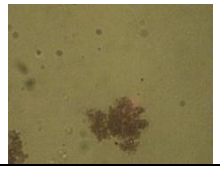
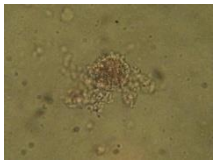
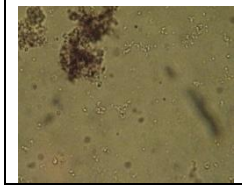
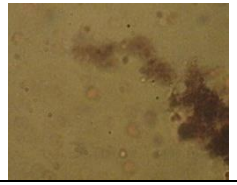
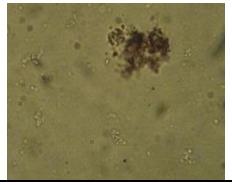
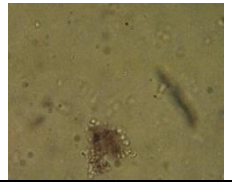
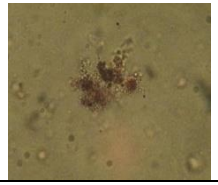
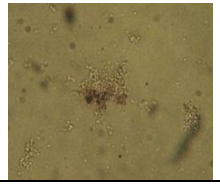
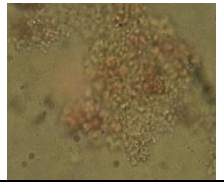


Evidencia fotografica de lisosomas de la Machona Tabasco

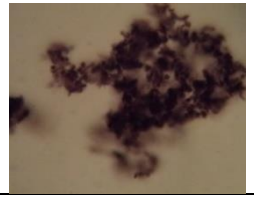
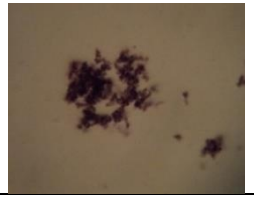
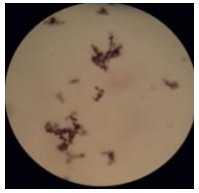
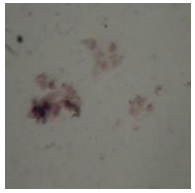
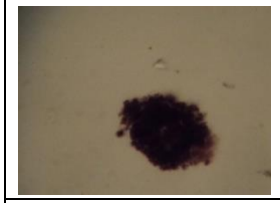
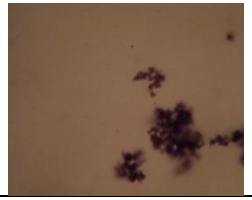
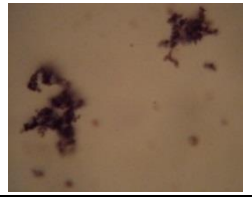
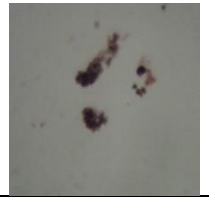
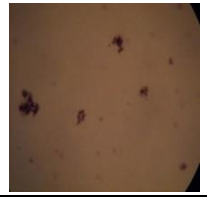
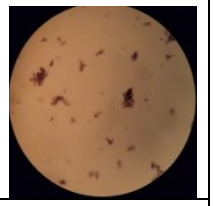
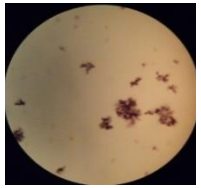
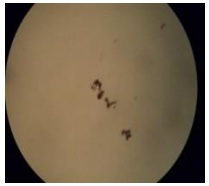
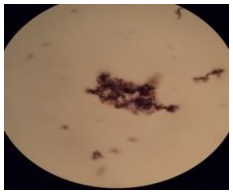
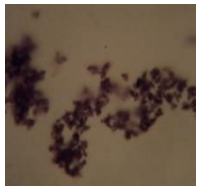
Laguna Carmen Machona, Tabasco						
Min 0	Min 15	Min 30	Min 60	Min 90	Min 120	Min 180
						
						
						
						
						

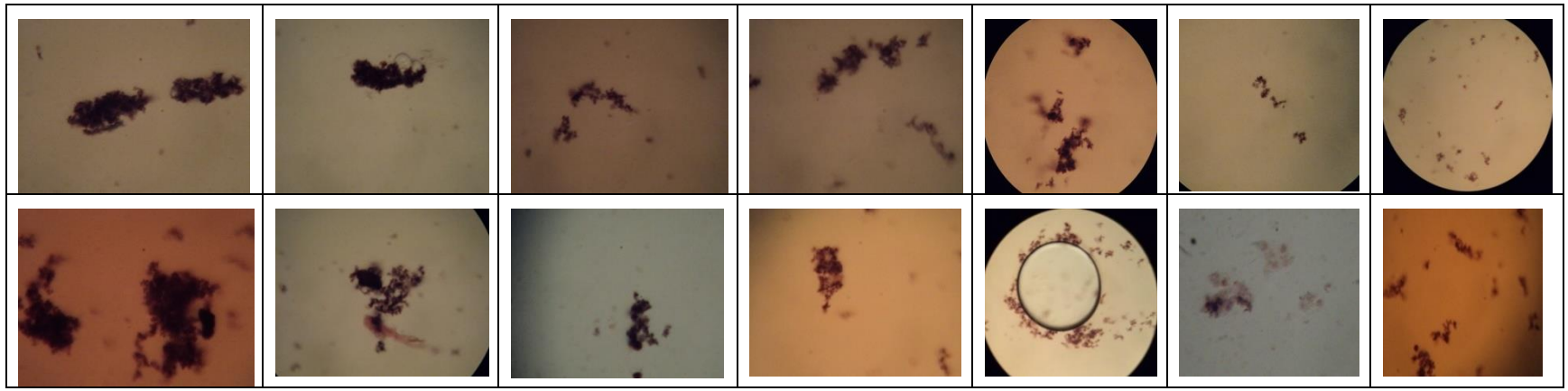


Evidencia fotografica de lisosomas, Términos Campeche

Laguna de Términos, Campeche						
Min 0	Min 15	Min 30	Min 60	Min 90	Min 120	Min 180
						
						
						
						
						

Evidencia fotográfica de la retención lisosomal del bioensayo

Laguna de Tamiahua, Veracruz						
Min 0	**Min 15**	**Min 60**	**Min 90**	**Min 120**	**Min 180**	
						
						
						
						



ANEXO V. INFORMES DE RESULTADOS DE CONCENTRACIONES DE METALES E HAPs EN SEDIMENTOS Y OSTIONES