

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



EFEECTO DE LOS METALES Cd, Cr, Pb Y SUS MEZCLAS EN LA
ALMEJA CATARINA *Argopecten ventricosus*
(Sowerby, 1842), (Bivalvia, Pectinidae)

RECEBIDO EN LA SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
EL 15 DE JUNIO DE 2001
A LAS 10:00 HORAS
D.F.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS
P R E S E N T A :
ALMA SOCORRO SOBRINO FIGUEROA

RESUMEN

En este trabajo se realizó una evaluación del efecto de los metales Cd, Cr, Pb y sus mezclas (1:1) sobre larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* debido a que no existen estudios de tipo ecotoxicológicos con esta especie.

Se realizaron bioensayos con recambios de agua con duración máxima de 30 días. Se determinó la Concentración letal 50 (CL₅₀), las unidades tóxicas, el tipo de interacción de las mezclas y su grado de magnificación. Asimismo se evaluó el efecto de estos metales sobre algunos procesos fisiológicos como la fijación de larvas, el crecimiento en juveniles, las tasas de consumo de oxígeno, excreción y filtración, se calculó la relación O:N como índice de estrés y la bioacumulación en juveniles y adultos. También se evaluaron 4 biomarcadores: Constitución de la glándula digestiva, daño oxidativo (lipoperoxidación), daño genético e histopatología.

La toxicidad de los metales y sus mezclas con base en las CL₅₀ (96 horas) fue (de mayor a menor toxicidad):

Larvas: Cd > Cd + Pb > Cd + Cr > Cd + Cr + Pb > Pb > Cr > Cr + Pb

Juveniles: Cd + Cr + Pb > Cd > Cr + Pb > Cd + Pb > Pb > Cd + Cr + Pb

Adultos: Cd + Cr > Cd > Cd + Pb > Cd + Cr + Pb > Cr > Cr + Pb > Pb

La interacción observada en las mezclas con cadmio fue de potenciación, su grado de magnificación varió entre 1 a 2 veces.

Se observó una reducción en el número de larvas que se fijaron al sustrato del 72% al 94% en las pruebas con cadmio, asimismo hubo un decremento del 30% al 60% en el crecimiento de juveniles expuestos a este metal.

Se detectó un aumento de la tasa de respiración a las 24 horas de exposición a cadmio y plomo, pero a mayor tiempo de tratamiento ocurrió un decremento de la misma. La relación O:N tuvo un valor por debajo de 9, que indicó que los organismos estuvieron en estado de estrés alto. Concentraciones de cadmio de 0.11 mg/l inhibió en un 50% la tasa de filtración.

La bioacumulación de metales en juveniles y adultos sometidos a condiciones experimentales fue: Cd > Pb > Cr, mientras que la observada en condiciones naturales fue: Pb > Cd > Cr.

La constitución de la glándula digestiva, varió, observándose movilización de proteínas, carbohidratos y lípidos de un 21% a 95% en tan solo 4 días. Los niveles de lipoperoxidación registrados en los tejidos de la branquia y glándula digestiva aumentaron conforme se incrementó el tiempo de exposición de los metales cadmio y plomo. El cromo, cadmio y la mezcla Cd + Cr + Pb tuvieron efectos genotóxicos. En la evaluación histopatológica se detectó daño severo (atrofia) en los tejidos de la branquia y de la glándula digestiva de los organismos expuestos a cadmio, este daño se incrementó con el tiempo de exposición y parece ser el responsable de la muerte de los especímenes.

A. ventricosus es más sensible a los metales probados en comparación con otras especies tales como el ostión japonés, *A. irradians* y nauplios de *Artemia* sp. (NMX-AA-110-1995). Asimismo las concentraciones de metales con efectos letales y nocivos sobre los procesos fisiológicos obtenidas en este estudio, se encuentran entre diez a mil veces por arriba a las registradas en las aguas de los sistemas costeros del Pacífico mexicano y en la Ensenada de La Paz. Pero si se observó alteraciones en la fijación de larvas y en el crecimiento de estos organismos con concentraciones inferiores a 50 µg/l que están presentes en algunos sistemas costeros del Pacífico mexicano.

ABSTRACT

Argopecten ventricosus is a shellfish specie very adequate for to be utilized as centinell organism in environmental monitoring and xenobiotyc toxicologycal studies. Due that there are no previous ecotoxicologycal studies on this specie, an evaluation of the effect of cadmium, chromium and lead on larvae, juveniles and adults of this species, was undertaken.

A series of bioessays with water changes, lasting 168 hours to 30 day, with each metal and its mixtures in 1:1 proportion, were made. With the gathered data, the lethal concentration 50 (CL50), the toxic units, the type of interaction between the mixtures and its magnification level, were computed. At the same time the effect of these xenobiotycs on some physiological processes as larvae fixation, juvenile growth, respiration, excretion and filtration rates, the relation O:N (as stress indicator), and their bioaccumulation in juveniles and adults, was evaluated. Also, an evaluation of four biomarkers was made: digestive glandulae, lipid peroxidation (damage due to free radicals), histopathology, and genetic damage (genotoxicity).

During the lethality bioessays, the toxicity of each metal and their mixtures on basis of CL₅₀ (96 hrs.) was as follow:

Larvae Cd > Cd + Pb > Cd + Cr > Cd+Cr+Pb > Pb > Cr > Cr+Pb

Juveniles Cd+Cr+Pb > Cd > Cr+Pb > Cd++Pb > Pb > Cd+Cr > Cr

Adults Cd+Cr > Cd > Cd+Pb > Cd+Cr+Pb > Cr > Cr+Pb > Pb

In most of cases the observed interaction in the mixtures was potentiation. The magnification level of the metals effect, ranged from 1 to 2 times, and those with cadmium were the more toxic. The evaluation tests on larvae fixation revealed a decrease of this process from 94 to 72% in specimens exposed to metals in comparison with those non-exposed. An increase of breathing rate at an exposition of 24 hours was observed and with another increase of exposition time, this process decreasead. The O:N relation was below 9 in most of the tests, and this could be due to high stress levels. The effect of 0.11 mg/l cadmium concentration reduces 50% the filtration rate. Also, the metals bioaccumulation in juveniles and adults was: Cd >Pb>Cr. As a comparison, the metal bioaccumulation in specimens under normal conditions is:

Pb>Cd>Cr. It was observed a great protein, carbohydrates and lipids mobilization of the digestive glandulae: from 21% to 95% in only four days. During the lipid peroxidation evaluation, the gill and digestive glandulae level of damage rise in relation to metal exposition time. The genetic damage evaluation showed cadmium, chromium and the mixture of Cd + Cr + Pb were the more genotoxical agents. The histopathological study revealed severe damage (atrophia) in gill and digestive glandulae. In cadmium exposed specimens, such a damage is increased with time and seems to be responsible of organisms death.

This shellfish specie is more sensitive to the metals tested in comparison with other species, as the japanese oyster, *Argopecten irradian* and *Artemia* naupliae (NMX-AA-110-1995). The use of this naupliae as indicators of toxicity level of the effluents discharged to the coastal zone, is included in the Norma Oficial Mexicana but, as it was already mentioned, the *A. ventricosus* larvae are more sensitive than *Artemia* naupliae. The metals concentrations with deletereous and lethal effects on the physiological studies carried on, are from 10 to 10,000 times over the normal measurements recorded in Mexican Pacific coastal systems and in Ensenada de La Paz. In some systems of the Pacific of Mexico, certain non-normal situations on larvae fixation and individual growth were detected, in relationship with 50 µg/l metals concentrations.

INDICE

CAPITULO 1 MARCO CONCEPTUAL	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	7
1.3 Justificación.....	14
1.4 Objetivo general.....	15
1.5 Objetivos particulares.....	15
1.6 Hipótesis.....	15
CAPITULO 2 MÉTODOS PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LOS METALES Y SUS MEZCLAS EN <i>Argopecten ventricosus</i>	16
2.1 Inducción en el laboratorio para la obtención de larvas de almeja catarina.....	17
2.2 Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre larvas de <i>A. ventricosus</i>	19
2.3 Supervivencia de larvas veliger y pediveliger de <i>A. ventricosus</i>	21
2.4 Fijación de larvas pediveliger.....	24
2.5 Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i>	24
2.6 Evaluación de la tasa de crecimiento de juveniles expuestos a metales tóxicos.....	25
2.7 Supervivencia de juveniles y adultos de almeja expuestos a metales	

2.9 Evaluación de la tasa de excreción de juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i> expuestos a metales tóxicos.....	32
2.10 Cálculo de la relación O:N en las pruebas con juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i> expuestos a metales tóxicos.....	32
2.11 Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre la tasa de aclaramiento.....	33
2.12 Evaluación de la bioacumulación de metales.....	34
2.13 Evaluación de biomarcadores.....	39
2.13.1 Composición química de la glándula digestiva.....	41
2.13.2 Determinación de los niveles de lipoperoxidación en glándula digestiva y branquia.....	42
2.13.3 Evaluación de daño genético en el tejido de la branquia.....	43
2.13.4 Evaluación de cambios histológicos (histopatología).....	45
2.14 Análisis estadístico.....	47
CAPITULO 3 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE EFECTOS DE LOS METALES CADMIO, CROMO, PLOMO Y SUS MEZCLAS SOBRE LARVAS, JUVENILES Y ADULTOS DE ALMEJA CATARINA.....	48
3.1 Efectos en la supervivencia de las larvas, juveniles y adultos de almeja catarina.....	48
3.2 Efectos en la fijación de larvas pediveliger.....	60
3.3 Efectos en el crecimiento de juveniles de <i>A. ventricosus</i>.....	63
3.4 Efectos en el comportamiento de adultos de <i>A. ventricosus</i>.....	66
3.4.1 Movimientos de escape.....	66

3.4.2	Apertura máxima de valvas.....	66
3.4.3	Velocidad en el cierre de valvas.....	67
3.5	Efectos en la tasa de consumo de oxígeno en juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i>.....	68
3.6	Efectos en la tasa de excreción de NH₃-N de juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i>.....	75
3.7	Efectos en la relación O:N de juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i>	80
3.7	Efectos en la Tasa de aclaramiento de juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i>.....	85
3.9	Bioacumulación de metales en juveniles y adultos de <i>A. ventricosus</i>.....	90
3.9.1	Bioacumulación de metales en exposiciones agudas.....	90
3.9.2	Bioacumulación de metales en exposiciones crónicas.....	94
3.9.3	Bioacumulación de metales en ambientes naturales.....	97
3.9.4	Cinética de acumulación de metales tóxicos.....	100
3.9.5	Cinética de acumulación y depuración de metales.....	103
3.10	Evaluación de biomarcadores.....	109
3.10.1	Composición química de la glándula digestiva.....	109
3.10.2	Evaluación de la lipoperoxidación (LIPOX) en branquia y glándula digestiva de la <i>A. ventricosus</i>.....	115
3.10.3	Evaluación de daño genético en branquia.....	118
3.10.4	Evaluación de histopatología.....	122
CAPITULO 4	DISCUSION.....	131
4.1	Efectos de los metales y sus mezclas sobre la supervivencia	

de larvas, juveniles y adultos de almeja catarina.....	132
4.2 Efectos de los metales y sus mezclas en la fisiología de larvas, juveniles y adultos de almeja catarina.....	136
4.3 Bioacumulación de metales en juveniles y adultos de almeja catarina.....	145
4.4 Efectos de los metales y sus mezclas en los biomarcadores.....	153
5 CONCLUSIONES.....	158
6 Literatura citada.....	162

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Condiciones en las que se realizaron los bioensayos con *Argopecten ventricosus* expuesta a metales tóxicos.
- Tabla 2. Concentraciones de metales utilizadas en los bioensayos con larvas juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.
- Tabla 3. Comparación de las concentraciones de metales (mg/l y $\mu\text{g/g}$) en la muestra de referencia del CENAM y la muestra de referencia del Laboratorio de Contaminación (UAMI).
- Tabla 4. CL_{50} (Concentración Letal 50 a 96 horas) obtenidas en las pruebas con larvas veliger "D", larvas pediveliger, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* expuestas a los metales cadmio, cromo, plomo y sus mezclas.
- Tabla 5. CL_{50} (Concentración Letal 50) a las 24, 48 y 72 horas obtenidas en las pruebas con larvas "D" y pediveliger de *Argopecten ventricosus* expuestas a los metales y sus mezclas.
- Tabla 6. Diferencias entre las CL_{50} (96 horas), calculadas con los datos obtenidos en los bioensayos con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos.
- Tabla 7. Razón de potencia de la toxicidad de los metales a que fueron expuestos las larvas, juveniles y adultos de *A. ventricosus*.
- Tabla 8. Constantes de las ecuaciones de regresión para la determinación de la CL_{50} a diferentes tiempos, obtenidas de los bioensayos agudos realizados con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.

- Tabla 9. Análisis de covarianza de las pendientes de las curvas de mortalidad (tiempo vs. CL₅₀) calculadas en las pruebas con larvas, juveniles y adultos de *A. ventricosus*.
- Tabla 10. CL₅₀ asintóticas (Concentración en la cual no ocurren decesos después que perecieron los organismos sensibles), obtenidas experimentalmente en los bioensayos agudos con larvas, juveniles y adultos de *A. ventricosus* expuestos a metales y sus mezclas.
- Tabla 11. TL₅₀ (Tiempo Letal 50) calculado para cada concentración de metal probada en los bioensayos con larvas juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.
- Tabla 12. Unidades tóxicas, tipo de interacción y grado de magnificación del efecto observado en las pruebas con mezclas de metales, sobre larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.
- Tabla 13. Comparación entre las CL₅₀ a 96 horas y sus intervalos de confianza, obtenidos en las pruebas con los metales y la mezcla Cd + Cr + Pb, en los bioensayos realizados con *A. ventricosus*
- Tabla 14. CE₁₀₀ (Concentración efectiva 100) y CE₅₀ (Concentración efectiva 50) obtenidas en las pruebas donde se determinó la tasa de respiración de juveniles de *A. ventricosus*.
- Tabla 15. CE₅₀ (concentración efectiva 50) en la cual se reduce en un 50% la tasa de filtración en comparación con el testigo, determinada en los experimentos con juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*. expuestos a los metales.
- Tabla 16. Concentraciones promedio de metales presentes en los tejidos de adultos de *Argopecten ventricosus* y sus factores de bioacumulación.

- Tabla 17. Concentraciones promedio de metales tóxicos presentes en los tejidos de adultos de almeja catarina y sus factores de bioacumulación del experimento realizado con las mezclas de metales.
- Tabla 18. Concentraciones promedio de metales tóxicos presentes en los tejidos de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a los xenobióticos durante 30 días y sus factores de bioacumulación.
- Tabla 19. Concentración de los metales cadmio, cromo y plomo, presentes en el agua ($\mu\text{g/l}$) y organismos ($\mu\text{g/g}$) procedentes del vivero de Pichilingue, de Bahía Concepción y de los estanque de cultivo del CICIMAR-IPN
- Tabla 20. Tasa de incorporación (K_{i0}) y tasa de depuración (K_{de}) de metales obtenidas en los bioensayos agudos con juveniles de *Argopecten ventricosus*.
- Tabla 21. Tasa de incorporación (K_{i0}) y tasa de depuración (K_{de}) de metales obtenidas en los bioensayos agudos con *Argopecten ventricosus*.
- Tabla 22. Vida media biológica de los metales y la tasa de depuración obtenidos en los bioensayos subletales con juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a cadmio, cromo y plomo.
- Tabla 23. Lipoperoxidación en tejido de branquia y glándula digestiva de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos y sus mezclas.
- Tabla 24. Lipoperoxidación en tejido de branquia y glándula digestiva de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestas a metales tóxicos.
- Tabla 25. Valores del índice branquial y porcentaje de células con daño genético registrados en los experimentos con adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos.

Tabla 26. CL₅₀ (Concentración letal 50) observadas en organismos marinos.

Tabla 27. Concentración media de metales ($\mu\text{g/g}$) en tejidos de moluscos del Pacífico Mexicano.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Localización del vivero donde se cultivan las almejas catarinas (*Argopecten ventricosus*), que forma parte de las instalaciones de la Unidad Pichilingue de la UABCS.
- Figura 2. Larvas veliger "D" de *Argopecten ventricosus* de aproximadamente 96 mm de altura y de 8 días de edad.
- Figura 3. Sistema de acuarios acondicionados para la realización de los bioensayos con adultos de la almeja catarina.
- Figura 4. Dispositivo construido para realizar las evaluaciones de consumo de oxígeno.
- Figura 5. Evaluación de daño genético con la técnica de electroforesis unicelular.
- Figura 6. Metodología utilizada para la evaluación del efecto de los metales tóxicos en larvas, juveniles y adultos de almeja catarina
- Figura 7. Porcentaje de larvas que se fijaron al sustrato en las pruebas donde se expusieron a concentraciones agudas de los metales Cd, Cr, y Pb.
- Figura 8. Porcentaje de larvas que se fijaron al sustrato en las pruebas donde se expusieron a concentraciones subletales de los metales Cd, Cr y Pb.
- Figura 9. Porcentaje de larvas de almeja catarina que se fijaron al sustrato, en las pruebas donde se expusieron a las mezclas de metales.
- Figura 10. Tasa de crecimiento (mm/día) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos.
- Figura 11. Peso seco (mg) de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos.

Figura 13. Tasa de consumo de oxígeno (ml O₂/h/g) de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. A) cadmio. B) cromo C) plomo.

Figura 14. Tasa de respiración (ml O₂/h/g) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas.

Figura 15. Tasa de respiración (ml O₂/h/g) de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas.

Figura 16. Tasa de respiración (ml O₂/h/g) de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales tóxicos.

Figura 17. Tasa de excreción de NH₃-N de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos durante 24 horas. a) cadmio. b) cromo. c) plomo.

Figura 18. Tasa de excreción de NH₃-N en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas.

Figura 19. Tasa de excreción de NH₃-N de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. a) cadmio. b) cromo. c) plomo.

Figura 20. Tasa de excreción de NH₃-N en adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas.

Figura 21. Índice O:N obtenido en bioensayos con juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos durante 24 horas.

Figura 22. Índice O:N obtenido en bioensayos con juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a las mezclas de metales tóxicos durante 24 horas.

Figura 23. Índice O:N obtenido en bioensayos con adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. a) cadmio. b) cromo. c) plomo.

- Figura 24. Índice O:N obtenido en bioensayos con adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a las mezclas de metales tóxicos. a) Mezclas Cd + Cr, Cd + Pb y Cr + Pb. b) Mezcla Cd + Cr + Pb.
- Figura 25. Tasa de aclaramiento (tasa de filtración) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. a) cadmio. b) cromo. c) plomo.
- Figura 26. Tasa de aclaramiento (tasa de filtración) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a las mezclas de metales tóxicos. a) Cd + Cr. b) Cd + Pb. c) Cr + Pb. d) Cd + Cr + Pb.
- Figura 27. Curvas de bioacumulación y de depuración de metales calculadas con los datos obtenidos en los bioensayos subletales con juveniles de almeja catarina expuestos a metales.
- Figura 28. Niveles de proteínas, carbohidratos y lípidos en la glándula digestiva de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a concentraciones agudas de metales y sus mezclas.
- Figura 29. Niveles de proteínas, carbohidratos y lípidos en la glándula digestiva de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos en concentraciones agudas.
- Figura 30. Concentración de: 1) proteínas, 2) carbohidratos, 3) lípidos de la glándula digestiva de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a concentraciones subletales de metales tóxicos y de la mezcla Cd + Cr + Pb (mix).
- Figura 31. Porcentaje de células con daño genético y longitud de las caudas de cometa (μm), en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos (0.35 mg/l Cd, 5 mg/l Cr y 3 mg/l Pb).

Figura 32. Porcentaje de células con daño genético y longitud de las caudas de cometa (μm), en adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos (0.5 mg/l Cd, 8.5 mg/l Cr, y 6.5 mg/l Pb).

Figura 33. Daño en el tejido de la branquia de almejas catarinas expuestas a cadmio (0.75 mg/l).

Figura 34. Daño en glándula digestiva ocasionado por la exposición a cadmio.

Figura 35. Daño en el tejido del manto por exposición a cadmio.

Figura 36. Necrosis en el manto ocasionado por exposición a plomo.

Figura 37. Tejido del intestino mostrando aumento en el número y tamaño de vacuolas y perdida de epitelio ciliar ocasionados por exposición a plomo.

Figura 38. Presencia de cuerpos cafés en los ctenidios de la branquia de organismos expuestos a plomo (0.187 mg/l).

Figura 39. Daño en la branquia por la exposición a la mezcla Cd + Pb (1.5 mg/l).

Figura 40. Presencia de concreciones en el riñón de los organismos expuestos a la mezcla Cd + Pb (0.37 mg/l).

GLOSARIO

Aclimatación. Acostumbrar a los organismos a diferentes condiciones ambientales tales como temperatura, luz y calidad del agua.

Antagonismo. La toxicidad de la mezcla de tóxicos o compuestos es menor a la observada con cada uno de los xenobióticos por separado.

Bioacumulación. Término que describe el proceso mediante el cual los organismos acuáticos incorporan compuestos tóxicos en sus tejidos.

Bioensayo. Es una prueba con un tejido, organismo o grupo de organismos vivos que se usan para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa cuyo efecto se desconoce.

Concentración letal 50 (CL₅₀). Concentración del tóxico que produce la muerte del 50% de los organismos expuestos en un bioensayo. Generalmente se determina a 96 horas.

Concentración efectiva 50 (CE₅₀). Concentración del tóxico que produce una respuesta específica, ya sea aumento o disminución de alguna tasa metabólica.

Concentración letal 50 asintótica. Concentración de tóxico en la cual la CL₅₀ llega a una constante por un tiempo de exposición prolongado.

Depuración. Proceso en el cual se elimina algún compuesto de los tejidos de los organismos por medio de mecanismos fisiológicos.

Descamación. Desprendimiento de células del epitelio superficial debido a necrosis o procesos degenerativos .

Exposición. Es el contacto entre el xenobiótico y los organismos.

Factor de bioacumulación. En un valor (sin unidades) que describe el grado en el cual un químico se encuentra acumulado en los tejidos de los organismos, en comparación con su concentración en el agua.

Necrosis. Muerte de células o de tejido, en organismos vivos.

Partes por billón (ppb). Unidad de un químico, generalmente expresado en masa, por 1,000,000,000 (10^9) unidades del medio, por ejemplo agua u organismos (tejidos). Para agua comúnmente se usa $\mu\text{g/l}$, y para tejidos $\mu\text{g/kg}$ ó ng/g .

Partes por millón (ppm). Unidad de un químico usualmente expresada en masa por 1,000,000 (10^6) unidades del medio por ejemplo agua o organismo (tejidos), en los cuales esta contenido. Para agua generalmente se usa mg/l o $\mu\text{g/ml}$ y para tejidos mg/kg o $\mu\text{g/g}$.

Respuesta. Medición del efecto biológico del material probado. En las pruebas de toxicidad aguda esta respuesta es la muerte de los organismos.

Subletal. Concentraciones de un tóxico que son menores a la CL_{50} , no ocasionan la muerte de los organismos pero pueden causar alteraciones en su fisiología.

Testigo. Organismos que no son sometidos a la exposición de algún tóxico o material de prueba, pero si al agua de dilución y a las condiciones ambientales prevaletientes durante el desarrollo de un bioensayo.

Toxicidad. Efectos adversos que causan en un organismo los contaminantes. La toxicidad es el resultado de la concentración del material de prueba y del tiempo de exposición.

Toxicidad aguda. Efecto letal, u otro tipo de efecto producido en un tiempo relativamente corto, usualmente dentro de 4 días para peces y

macroinvertebrados y periodos más cortos (2 días) para organismos pequeños o larvas.

Toxicidad crónica. Efectos a largo plazo que pueden estar relacionados con cambios a nivel fisiológico que se ven reflejados en disminución en el crecimiento o en alteraciones en las funciones como respiración, excreción filtración etc.

Vida media. Tiempo que tiene que transcurrir para reducir la mitad de la concentración de xenobiótico de los tejidos de los organismos , por procesos como transporte, degradación o depuración.

Xenobiótico. Compuestos químicos que no forman parte de los sistemas biológicos, y son capaces de causar efectos deletéreos.



Sola dosis fecit venenum

(Theophrastus Bombastus von Hohenheim)

CAPITULO 1 MARCO CONCEPTUAL

1.1 Introducción

En nuestro país el desarrollo de las actividades industriales, agrícolas, petroleras, portuarias, turísticas y el aumento de los asentamientos humanos en la zona marítima han generado en las últimas décadas, problemas en los sistemas acuáticos ya que éstos se han convertido en receptores de todo tipo de desechos, los cuales alteran el balance natural de los ecosistemas y contribuyen a la degradación de los ambientes .

Las sustancias tóxicas vertidas a los sistemas costeros se pueden analizar desde dos puntos de vista: el primero en relación al deterioro de la calidad del sistema y el segundo en función a la supervivencia de los organismos nativos.

Los compuestos tóxicos (xenobióticos) actúan sobre las especies a corto, mediano o largo plazo dependiendo de su naturaleza y concentración. Los efectos a corto plazo se manifiestan en la eliminación de una o varias poblaciones del ecosistema, generalmente las más sensibles.

Asimismo a mediano y largo plazo los organismos sufren alteraciones a nivel bioquímico y fisiológico que no involucran la muerte de éstos (Gadner, 1975; Brungs, *et al.*, 1978), pero si afectan de manera adversa e irreversible su estado de salud, perdiendo su capacidad de sobrevivir o reproducirse, aumentando su susceptibilidad a agentes patógenos y parásitos, o disminuyendo su resistencia a situaciones de estrés (Dillon y Lynch, 1981).

Un xenobiótico es cualquier sustancia ajena al organismo, que al interactuar con él, le ocasiona un daño. Ejemplos de este tipo de compuestos son los COPS (compuestos orgánicos persistentes) y los metales tóxicos.

Los estudios acerca de los efectos nocivos de los metales sobre los organismos acuáticos comenzaron a desarrollarse a principios del siglo XX. Inicialmente, las pruebas de toxicidad se realizaron con organismos de agua dulce y la primera publicación al respecto data de 1917, que es el resultado de un experimento en el cual se evaluó el efecto tóxico del cadmio, cobre y plomo sobre peces del género *Carassius* (citado en Doudoroff y Katz, 1953).

El concepto de toxicidad indica la propiedad de una sustancia que al penetrar en el organismo le causa daño. El efecto más evidente y evaluado en los estudios de toxicidad es la letalidad, que es una respuesta drástica a la exposición a xenobióticos, aunque es patente que las concentraciones de los compuestos que se evalúan en estas pruebas de laboratorio, son muy superiores a las que se presentan en el ambiente natural (entre 10 a 1000 veces más altas), pero son indicativas de los efectos máximos que podrían causar los agentes tóxicos sobre los organismos (FAO, 1982; 1986; APHA, 1994; Albores, 1996).

En cambio, cuando la exposición se efectúa a largo plazo con dosis pequeñas del agente tóxico, el organismo es capaz de sobrevivir aunque aparecen alteraciones fisiológicas que no le causan la muerte pero si modifican su estado de "salud".

La toxicología acuática estudia desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo los efectos tóxicos de los compuestos químicos xenobióticos o naturales sobre los

organismos acuáticos. Los efectos tóxicos incluyen desde letalidad hasta cambios fisiológicos que alteran las condiciones del organismo, considerando las vías de entrada, el tiempo de residencia en el organismo, los mecanismos de eliminación, así como la interacción del agente tóxico con las células, tejidos y órganos (Rand y Petrocelli, 1985).

En los organismos marinos los compuestos tóxicos penetran al interior de su cuerpo por dos medios: agua y alimento. Las vías de entrada de estos xenobióticos son la vía respiratoria, por ingestión junto con las partículas alimenticias y por el contacto del agua con tejidos, como el manto.

En invertebrados, las partículas alimenticias son asimiladas intracelularmente, donde la digestión de éstas por los lisosomas juega un papel predominante en el proceso de solubilización de los metales que están atrapados en el material ingerido. Posteriormente los metales son transportados a todo el organismo, siendo la hemolinfa el medio de transporte, por medio de las células sanguíneas (hemocitos) o por proteínas transportadoras (metaloproteína) (Robinson y Ryan, 1988).

La distribución y almacenamiento de metales en los individuos, está en función de sus características (carga eléctrica, estado o número de oxidación etc.) y de cual es su órgano blanco, es decir el órgano donde el metal se deposita de modo preferencial. En general, estos xenobióticos se acumulan en los órganos respiratorios, digestivos, excretores y en menor proporción en músculo, gónada y concha (Cunningham, 1979; Carmichael *et al.*, 1979; Carmichael y Fowler, 1981).

Los efectos nocivos de los metales ocurren cuando los procesos de desintoxicación en el organismo no son capaces de compensar la toma de materiales del medio ambiente, lo cual origina una saturación, que a su vez trae como consecuencia cambios y alteraciones en los sistemas de regulación de iones y, posteriormente, en modificación de los procesos fisiológicos normales. Existen dos tipos de efectos de los metales tóxicos sobre los organismos:

1. De tipo somático. En este caso se alteran una o más funciones del organismo como resultado de exposiciones agudas o crónicas. Este tipo de efectos involucran cambios a nivel bioquímico, fisiológico y de comportamiento.
2. De tipo germinal. Los metales afectan las funciones reproductoras, provocando la disminución en la viabilidad de los gametos, desarrollo embrionario anormal que ocasiona alteraciones morfológicas o fisiológicas en los individuos (efectos teratogénicos), reduciendo sus expectativas de supervivencia (Ramade, 1989).

Los efectos de tipo somático involucran respuestas fisiológicas como consecuencia de la interacción tóxico-organismo. En algunos estudios realizados con moluscos se ha observado que las alteraciones en la alimentación, así como cambios repentinos en algunos procesos fisiológicos, tales como las velocidades de filtración, crecimiento y respiración son buenos indicadores de la calidad del agua (Bayne *et al.*, 1979; Bryan, 1976; Cumninghan, 1979).

Actualmente existen varios índices que se utilizan como un reflejo de las respuestas a un contaminante específico y que proporcionan una medida del grado de alteración fisiológica. A tales índices se les denomina indicadores biológicos.

Los indicadores biológicos o biomarcadores se definen como señales identificables (evaluación de cambios en fluidos corporales, células y tejidos) que proporcionan advertencias tempranas del daño provocado por contaminantes (Koeman, 1991).

Los biomarcadores determinan las respuestas a los agentes tóxicos a nivel subcelular y celular, que podrían desencadenar efectos indeseables sobre la fisiología de los organismos. Ejemplos de estas señales son los daños en procesos enzimáticos o la formación de productos derivados por el metabolismo del xenobiótico, los cuales son indicadores de que el organismo tuvo contacto con el contaminante. Además la interacción del xenobiótico y los organismos puede provocar un deterioro en su estado de "salud". Ejemplos de lo anterior son la formación de aductos de DNA, presencia de tumores y necrosis de los tejidos (Foster *et al.*, 1992; Gardner y Pruell, 1987; Hebert y Zahn, 1990).

La ventaja de utilizar las respuestas fisiológicas como índices de estrés originadas por la exposición a contaminantes, radica en el hecho de que es posible la detección, en sus primeras fases, de daño biológico potencial en organismos que habitan en áreas impactadas. Aunque se debería poder discriminar entre las respuestas ocasionadas por el efecto de contaminantes y las originadas por causas ambientales (Barrett y Rosemberg, 1981).

Las investigaciones acerca de los metales tóxicos en los sistemas del Pacífico mexicano son limitadas, si se comparan con las realizadas en el Golfo de México y en otras partes del mundo. Se han realizado estudios de la presencia y niveles de

metales en aguas y sedimentos de algunos lugares localizados en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sinaloa y Oaxaca (Páez-Osuna y Osuna-López, 1987; Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1990; 1991; Botello *et al.*, 1994; Villanueva y Botello, 1998; Shumilin *et al.*, 2001).

En cuanto a su orden de magnitud con respecto a las concentraciones registradas (de mayor a menor), los metales presentes en las aguas y sedimentos de los sistemas del Pacífico mexicano son: (Botello *et al.*, 1994; Villanueva y Botello):

$Cr > Pb > Cd.$

El cromo es moderadamente tóxico para los organismos marinos, afecta la glándula digestiva, riñón y bazo (Moore, 1991), además es genotóxico en su forma de Cr^{+6} (hexavalente). Se considera que es carcinógeno, debido a que induce la formación de sitios de rotura en la cadena del ADN. También produce aberraciones cromosómicas (Gauglhofer y Bianchi, 1991).

El plomo reduce la capacidad reproductora de los organismos, inhibe la actividad de la Na-K ATPasa, altera el funcionamiento de los sistemas de reparación del ADN, causa aberraciones cromosómicas, incrementa la producción de radicales libres y es neurotóxico (USEPA, 1989; Ewers y Schlikoter, 1991).

El cadmio provoca necrosis en el epitelio branquial (Kluytmans *et al.*, 1988), altera la permeabilidad en la membrana de los lisosomas y la función de algunas enzimas vitales. También existen evidencias de que el cadmio es genotóxico debido a que inhibe los sistemas de reparación del ADN y forma aductos uniéndose a la adenina y purina (Moore, 1991; Stoepler, 1991).

1.2 Antecedentes

Los moluscos bivalvos poseen características para considerarlos como modelos adecuados en los estudios con contaminantes, ya que reflejan los niveles ambientales de xenobióticos presentes en los ecosistemas estuarinos y marinos. Asimismo, el hecho de que sean sésiles, fáciles de obtener, de amplia distribución geográfica y con una longevidad relativamente larga, los hace candidatos para ser considerados como especies bioindicadoras u organismos centinelas (Phillips, 1977; Goldberg *et al.*, 1983; Phillips y Segar 1986).

Programas de vigilancia a nivel mundial (Mussel watch), se han venido desarrollando desde hace más de 21 años, utilizando moluscos como bioindicadores de la presencia de contaminantes en los ambientes, preferentemente se han utilizado organismos del género *Mytilus* (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*) para este propósito. Este tipo de investigaciones se han desarrollado en diferentes países como Estados Unidos, Canadá, Hong Kong, Australia, Tailandia, Inglaterra, Francia, España, Noruega y Finlandia (Rainbow, 1995).

En México desde 1987 se han realizado trabajos de monitoreo utilizando como organismos centinela a los mejillones *Mytilus californianus* y *Modiolus capax*, tanto en el Golfo de California, como en la costa occidental de la península de Baja California (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1990; 1999).

Asimismo, varias especies de ostiones del género *Crassostrea* han sido consideradas como indicadoras de las concentraciones de metales presentes en los

sistemas costeros del Golfo de México y del Pacífico mexicano (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1991; Botello *et al.*, 1992; 1994; Villanueva y Botello, 1998;).

Los niveles de metales detectados en los ostiones del género *Crassostrea* procedentes del Golfo de México, fueron de acuerdo a su orden de magnitud (Villanueva y Botello, 1998): $Cd > Cr > Pb$.

La concentración promedio de cadmio en los tejidos de estos organismos fue de $4.67 \pm 1.76 \mu\text{g/g}$, mientras que los niveles de cromo estuvieron en el orden de $3.7 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$, en tanto que los de plomo fueron de $2.7 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ (Botello *et al.*, 1994; Villanueva y Botello, 1998).

En los mejillones y ostiones que habitan los litorales del Pacífico mexicano, se detectaron los siguientes metales de acuerdo a su orden de magnitud (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1991; 1999; Villanueva y Botello, 1998): $Cd > Pb > Cr$.

Los niveles promedio de cadmio en los tejidos de estos organismos fueron de $21.79 \pm 22.49 \mu\text{g/g}$, de plomo $2.59 \pm 4.04 \mu\text{g/g}$ y de cromo $0.63 \pm 0.37 \mu\text{g/g}$.

De todo lo anterior, es claro que en nuestro país no se han desarrollado estudios integrales en lo referente a una evaluación de la presencia y niveles de metales tóxicos y que de modo simultáneo, se determinen los efectos de estos xenobióticos sobre los organismos bajo consideración.

A diferencia de otras sustancias tóxicas, algunos metales son parte esencial de los seres vivos, ya que intervienen en los procesos catalíticos que ocurren dentro de las células (Lehninger, 1975).

Los efectos de los metales tóxicos sobre los organismos se caracterizan por alterar una amplia variedad de sistemas enzimáticos presentes en los compartimientos intracelulares. Las magnitudes de estas manifestaciones tienen una relación directa con la concentraciones de los metales, asimismo las perturbaciones a nivel celular se reflejan en alteraciones de los procesos fisiológicos (Lenhinger, 1975).

Se han realizado estudios utilizando como modelos a diversas especies de ostiones, almejas y mejillones, en los cuales se ha observado que los metales producen efectos cuya gravedad está en función de la concentración del metal y del tiempo de exposición.

Martin *et al.*, (1981) observaron que al exponer embriones de ostiones y mejillones a concentraciones de 1.2 mg/l de cadmio, 4.5 mg/l de cromo y 0.89 mg/l de plomo, se detectaron anomalías en 50% de las larvas de estos organismos, además de que su viabilidad disminuyó desde 30% hasta 80%.

Se han detectado alteraciones en algunas tasas metabólicas como respuesta a la exposición de metales. Ejemplo de esto son los estudios realizados por Lin *et al.*, (1993), quienes expusieron al ostión japonés (*Crassostrea gigas*) a diferentes concentraciones de cadmio y cromo, observando un decremento en la tasa de filtración de estos organismos en relación al aumento en la concentración de metal. Un hecho similar fue observado por Abraham *et al.*, (1986) en el bivalvo *Villorita cyprinoides* expuesto a cadmio y plomo.

Cheung *et al.*, (1995) determinaron que los metales cadmio y cromo provocan un decremento en la tasa respiratoria de *Perna viridis*, aunque también causan un

aumento en su tasa de excreción. Langston, (1990) observó que al reducirse la estabilidad de la membrana de los lisosomas por efecto del cadmio, se alteran funciones como la tasa de crecimiento y de filtración de los mejillones *Mytilus edulis*. En individuos de esta misma especie, expuestos al cobre Grace y Gainey, (1987) observaron una disminución tanto de su ritmo cardiaco, como de su tasa de filtración.

Los estudios de histopatología realizados con moluscos son escasos en comparación con los verificados con peces (Gadner y Pruell, 1987; Overstreet, 1988;). A pesar de esta situación, se conoce relativamente bien que los tejidos que sufren daños ocasionados por la exposición a metales pesados, pertenecen a los siguientes órganos: branquia, glándula digestiva y riñón.

Carmichael y Fowler, (1981) observaron en almejas del Golfo de México *Argopecten irradians*, expuestas a concentraciones de cadmio superiores a 0.5 mg/l, que las células renales manifestaban degeneración del citoplasma, aumento de vacuolas y de concreciones en las membranas basales, siendo estas estructuras el sitio de depósito del metal. Burbidge *et al.*, (1993) detectaron en mejillones (*Mytilus edulis*) que fueron expuestos al zinc, daños en los túbulos de la glándula digestiva, con evidente necrosis y reducción tisular; la branquia también manifestó signos de daño y degeneración. Asimismo, Bowmer *et al.*, (1994) notaron que el bivalvo intermareal *Cerastoderma edule* expuesto a metales pesados, presentes en las cenizas originadas por la combustión de carbón, presentó lesiones en la glándula digestiva que se relacionaban con la mortalidad de estos organismos.

Finalmente Gold- Bouchot *et al.*, (1995) encontraron alteraciones en el tejido de la branquia (edema y hiperplasia de células epiteliales), tubo digestivo (inflamación y necrosis de membrana basal) y divertículos digestivos (necrosis y aumento de hemocitos) en ostiones (*Crassostrea virginica*) expuestos a cadmio.

Se conocen alrededor de 300 especies de almejas pertenecientes a la Familia Pectinidae que se localizan en todos los mares tropicales, subtropicales y templados del océano mundial (Mottet, 1979). Aunque 30 de ellas se encuentran en el litoral del Pacífico mexicano (Keen, 1971), solo tres son consideradas de importancia económica: *Argopecten ventricosus* (la almeja catarina), *Euvola vogdesi* (almeja voladora) y *Lyropecten subnodosus* (almeja mano de león) (Holguín, 1976; Baqueiro *et al.*, 1982).

La almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) es un recurso pesquero importante en el estado de Baja California Sur, ya que en ésta entidad se pesca el 95% de la producción nacional. Hace 30 años su consumo era local aunque, posteriormente, en la década de 70's el producto se comercializó a mayor escala. Desde entonces la producción de estos moluscos ha disminuido de 86% a 16 % (Secretaría de Pesca, 1988; Semarnap, 1999). La causa de este decremento se atribuye únicamente a la sobreexplotación, ya que no existen estudios de carácter ambiental para conocer otras causas probables que pudieran haber originado el abatimiento de los bancos.

Argopecten ventricosus se distribuye desde Isla de Cedros, Baja California y Golfo de California hasta el norte de Perú (Keen, 1971). Habitan generalmente en aguas someras de lagunas, ensenadas y bahías protegidas, sobre fondos lodosos o arenosos, en ocasiones están asociadas a macroalgas o pastos marinos y se

alimentan de partículas que atrapan por filtración, en la interfase sedimento-agua. Ambas condiciones hacen que estos organismos sean idóneos para considerarlos como posibles "centinelas" o bioindicadores en estudios de monitoreo ambiental.

Las investigaciones realizadas con esta especie se han dirigido principalmente a aspectos de su anatomía, fisiología, crecimiento, reproducción, desarrollo y, desde luego, a su cultivo (v.gr.; Silva-Loera, 1986; Cáceres-Martínez *et al.*, 1987; Hernández y Singh, 1988; Avilés-Quevedo, 1990; Cáceres-Martínez y Rodríguez-Jaramillo, 1990; Chávez y Cáceres-Martínez, 1992; Carmona y Ramírez, 1994; Villalejo, 1992; Signoret *et al.*, 1996; Monsalvo-Spenser *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1997; Sicart, 1999), sin embargo y hasta la fecha, los estudios sobre el efecto de metales tóxicos sobre estos organismos son prácticamente nulos.

Desde la década de 60's en otros países se han realizado estudios sobre el efecto y la acumulación de xenobióticos en pectínidos, observándose que concentran metales en sus tejidos eficientemente, en comparación con otros moluscos como los mejillones (Brooks y Rumsby, 1965; Vattuone *et al.*, 1976). Este hecho es importante debido a que, como se mencionó anteriormente, muchas especies de almejas son objeto de pesquerías comerciales. También se ha observado que los pectínidos concentran cadmio más eficientemente que otros moluscos. Este hecho fue indicado por Brooks y Rumsby, (1965) para *Pecten novae-zelandie* y por Palmer y Rand, (1977) para *Placopecten* sp. Topping, (1973) detectó concentraciones elevadas de cadmio en *Pecten maximus*, asimismo Bryan, (1973) también encontró concentraciones elevadas

de cadmio en esta especie en comparación con los valores registrados para *Chlamys opercularis*.

Pesch *et al.*, (1979) realizaron un trabajo experimental con almejas del Atlántico (*Argopecten irradians*) exponiéndolas a concentraciones subletales de cadmio durante 3 semanas. Al término de este período, registraron un aumento de 250% en la concentración de metal en los tejidos de los especímenes expuestos en comparación con el testigo.

Nelson, (1976) realizó pruebas de letalidad con esta misma especie de almeja, para determinar su respuesta ante la presencia de metales tóxicos y evidenció que el orden de sensibilidad a los metales probados, de acuerdo a su toxicidad fue: Ag > Hg > Cd > As. Por su parte, Pesch *et al.*, (1979) detectaron en ensayos de letalidad, que el desprendimiento del biso precede a la muerte de las almejas del Atlántico que habían sido expuestas a concentraciones elevadas de cobre y cadmio.

Pesch y Stewart, (1980) observaron inhibición en el crecimiento de juveniles de almeja del Atlántico, expuestos a concentraciones de 0.6 a 1 mg/l de cadmio durante 20 días y también notaron, que en concentraciones de 1.31 mg/l del metal la tasa de crecimiento se redujo un 50%.

Finalmente, Carmichael y Fowler, (1981) detectaron que el cadmio se acumula principalmente en el riñón de las almejas del Atlántico y causa lesiones en este órgano.

1.3 Justificación

En nuestro país no se han realizado estudios de tipo integral sobre la presencia y efecto de contaminantes en los sistemas costeros, a pesar de que el grado de contaminación se ha incrementado a la par con el desarrollo de los asentamientos humanos y de las actividades portuarias, turísticas, industriales, agropecuarias y petroleras. La mayoría de las ciudades situadas en la zona costera carecen de la infraestructura adecuada para conducir, tratar y disponer de sus aguas residuales y no se han realizado estudios sistematizados para conocer la composición de los desechos que se vierten a los sistemas acuáticos.

En México, son escasos los estudios ecotoxicológicos realizados con moluscos y en el caso de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) son inexistentes, a pesar de que es una especie de importancia económica.

La información generada en esta línea de investigación es útil para la implementación de medidas en el manejo adecuado de las especies, garantizar su permanencia en el medio natural y continuar con las políticas del "Desarrollo sustentable" con la protección de los organismos susceptibles de sufrir daños por la presencia de compuestos tóxicos en su entorno ambiental.

Por todo lo anterior, en este estudio se pretende evaluar el efecto de los metales tóxicos más abundantes en los sistemas del Pacífico mexicano cadmio, cromo, plomo y sus mezclas sobre larvas, juveniles y adultos de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) con objeto de determinar la secuela que tales xenobióticos tienen a través de biomarcadores de exposición y de efecto.

1.4 Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición aguda y subletal de los metales cadmio, cromo, plomo y sus mezclas sobre la almeja catarina en diferentes etapas de su desarrollo (larvas, juveniles y adultos).

1.5 Objetivos particulares

1. Determinar las respuestas de la almeja catarina en pruebas de exposición aguda y subletal a los metales y sus mezclas a través de parámetros fisiológicos: fijación de larvas, crecimiento, supervivencia, tasas de respiración, excreción y filtración, determinación del grado de estrés y bioacumulación.
2. Evaluar la respuesta de los juveniles y adultos de almeja catarina expuestos a los metales y sus mezclas por medio de biomarcadores: composición química de la glándula digestiva, lipoperoxidación, daño en el ADN e histopatología.
3. Determinar el tipo de interacción de las mezclas de metales (aditividad, potenciación y antagonismo) y el grado de magnificación de su efecto.

1.6 Hipótesis

Sí los niveles de los xenobióticos presentes en el medio ambiente tienen efectos nocivos sobre las almejas catarinas (*Argopecten ventricosus*), entonces estos efectos se verían reflejados en la fisiología de estos organismos.

CAPITULO 2 MÉTODOS PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LOS METALES Y SUS MEZCLAS EN *Argopecten ventricosus*

Los organismos que se utilizaron para realizar este estudio fueron donados por el Laboratorio de Cultivo de Moluscos, de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Las almejas se encontraban en el "Parque de Cultivo" o "vivero", que se localiza en una ensenada aledaña al Puerto de Pichilingue cercana a las instalaciones de la UABCS, en jaulas suspendidas por medio de flotadores a una profundidad no mayor a 4 metros (Figura 1).

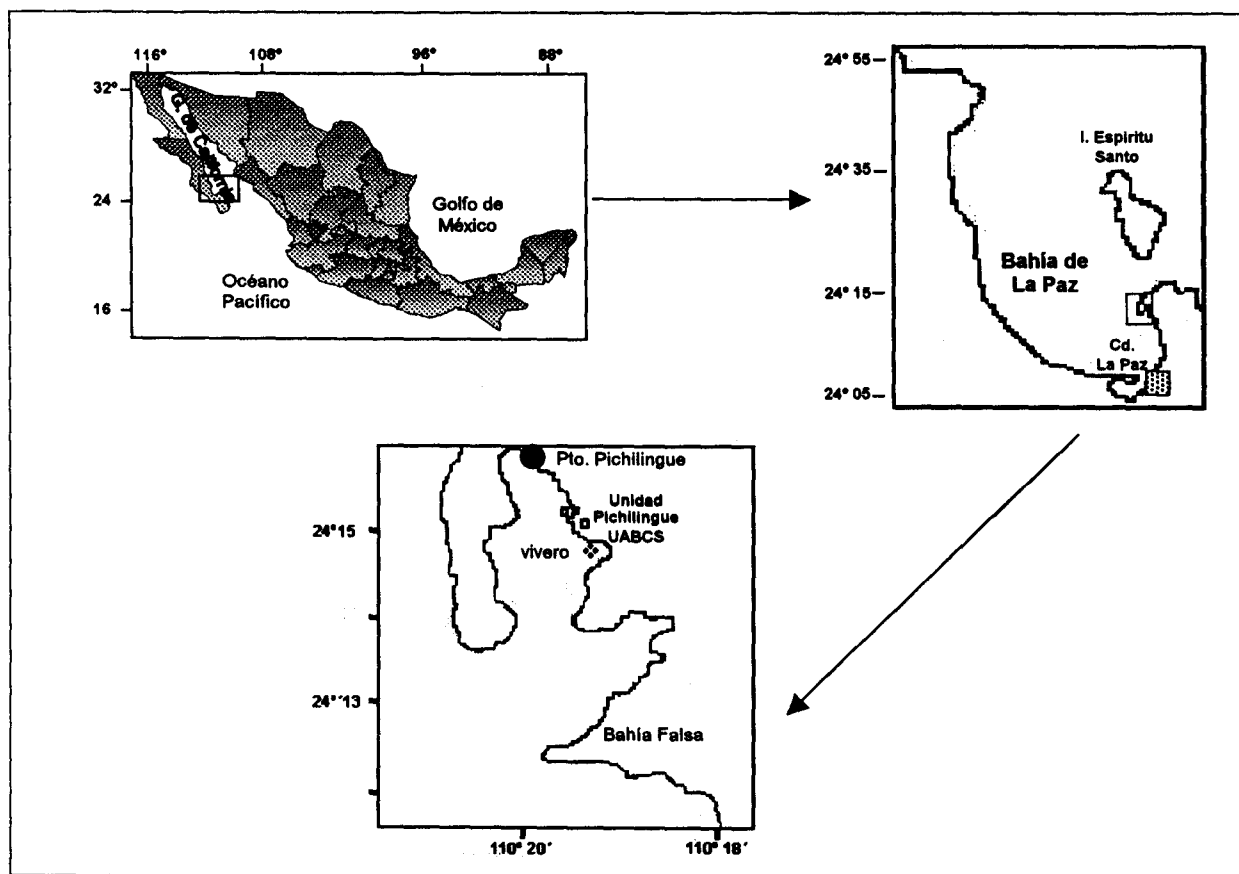


Figura 1. Localización del vivero donde se cultivan las almejas catarinas (*Argopecten ventricosus*), que forma parte de las instalaciones de la U. Pichilingue de la UABCS.

Cada tres meses durante un periodo de tres años se recolectaron manualmente organismos del vivero, se tomaron muestras de agua y se evaluó *in situ* la salinidad y temperatura. Los especímenes y las muestras de agua se transportaron en hieleras de plástico al laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN, lugar donde se desarrolló la parte experimental de esta investigación.

2.1 Inducción en el laboratorio para la obtención de larvas de almeja catarina

Organismos reproductores de *A. ventricosus* provenientes del vivero de Pichilingue o del Puerto San Carlos, localizado en Bahía Magdalena B.C.S., se recolectaron y fueron transportados a las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Moluscos de la UABCS.

En el laboratorio se realizó una inspección visual para seleccionar a los individuos "maduros" (con gónada evidente) y aquéllos que tenían esa condición se sometieron a estimulación térmica para inducir el desove. Este proceso denominado por Lossanoff y Davis (1963), como "choque térmico", consiste en variar de forma alternada la temperatura del agua donde se encuentran los organismos de 18 °C hasta 27 °C.

Después de la inducción, 14 ± 2 organismos se colocaron en canastas de plástico (denominadas canastas Nestier), mismas que se sumergieron en tanques de fibra de vidrio con capacidad para 1500 litros, con agua marina filtrada (15, 10, 5 y 1 μm) e irradiada con luz ultravioleta (UV).

A las 12 ± 2 horas después de la estimulación se retiraron los reproductores de los tanques de cultivo. Los procesos de desove, la fecundación, el desarrollo del primer

estadio larval (trocófora) y del segundo (larvas veliger "D") se verificaron en las primeras 18 horas después del choque térmico.

Las larvas que se encontraban en estadios de veliger "D" (85 a 96 μm de altura) (Figura 2), se concentraron por medio de una malla de 50 micras a un volumen de 1 litro. Se tomó 1 ml de esta suspensión para realizar un conteo por quintuplicado en una cámara Sedgwick-Rafter, para determinar el número de larvas presentes.

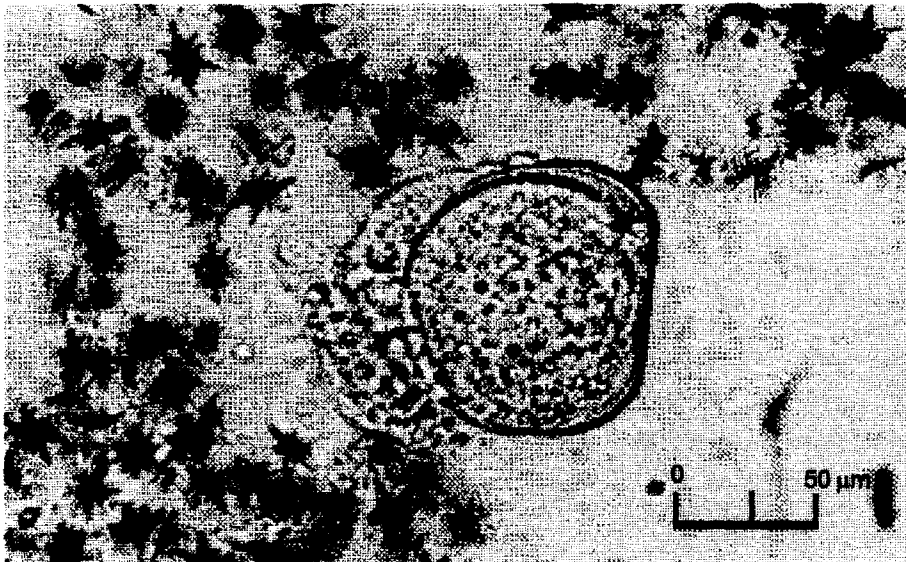


Figura 2. Larvas veliger "D" de *Argopecten ventricosus* de aproximadamente 96 μm de altura y de 8 días de edad.

Posteriormente las larvas "D" se colocaron en estanques de 500 litros de capacidad, llenos con agua marina filtrada e irradiada con luz UV, a una densidad de 5 larvas/ml. Se mantuvieron a 36 ‰, 23 ± 2 °C y con suministro diario de alimento, que

consistió en una mezcla de microalgas (*Isocrysis galbana*. y *Chaetoceros calcitrans*), a densidades de 80,000 a 120,000 cel/ml.

Parte de las larvas "D" obtenidas, se transportaron al laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN, donde permanecieron de 2 a 4 días en aclimatación (APHA, 1994), en las siguientes condiciones: 36 ‰, 20 ± 2 °C y burbujeo constante. Asimismo se les alimentó diariamente con una mezcla de las microalgas *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. a una densidad de 300,000 a 800,000 cel/ml, cultivadas con medio F/2 Guillard (Stein, 1973).

Otra parte de la cohorte se mantuvo en las instalaciones de Pichilingue durante un periodo máximo de 21 días, hasta que alcanzaron el estadio de pediveliger (con mancha ocular; 200 a 350 µm de altura). Al llegar a este estado, las larvas se transportaron al laboratorio del CICIMAR para iniciar la etapa de aclimatación (2 días) y posteriormente efectuar los bioensayos.

En el periodo de aclimatación y durante el desarrollo de los experimentos, los parámetros ambientales fueron análogos a los que se registraron en los sitios donde se recolectaron a los organismos (Tabla 1).

2.2 Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre larvas de *A. ventricosus*

Los efectos de los metales sobre las larvas de almeja catarina se evaluaron en bioensayos con recambios de agua. Se realizaron un total de 6 pruebas: 3 con larvas veliger "D" de 8 ± 2 días de edad y 3 con larvas pediveliger de 18 ± 2 días de edad. Se utilizaron en total 2800 larvas.

Tabla 1. Condiciones en las que se realizaron los bioensayos con *Argopecten ventricosus* expuesta a metales tóxicos.

ESTADIO	TIPO DE BIOENSAYO	DURACIÓN HORAS.	CONCENTRACIONES PROBADAS	ORGANISMOS POR CONCENTRACION	TEMP ° C SAL. % pH	EVALUACIONES REALIZADAS
Larvas Veliger D (8 días) 84 – 90 µm	Con recambio de agua a 48 h	168	5 por quintuplicado y un testigo	200 ± 10	21±1°C, 36 ±1‰ 7.98 ± 0.56	Letalidad CL ₅₀
Larvas Pediveliger (20 días) 176 –200 µm	Con recambio de agua a 48 h	72	4 por triplicado y un testigo	300 ± 7	21 ± 1°C, 36±1‰ 7.98 ± 0.56	Fijación de las larvas
Juveniles (3-4 meses) 5-10 mm	Con recambio de agua a 48 h	168	5 por triplicado y un testigo	30 ± 30	20 ±1°C, 36 ±1 ‰ 7.99 ± 0.13	Letalidad (CL ₅₀), Respiración-excreción, Tasa de filtración, relación O:N, Bioacumulación
	Con recambio de agua a 48 h	168	2 por triplicado y un testigo	60	20 ±1°C, 36 ±1 ‰ 7.99 ± 0.13	Lipoperoxidación, daño genético Comp. Quím. g. Digestiva
	Con recambio de agua a 48 h	30 días	3 por triplicado y un testigo	60	20 ±1°C, 36 ±1 ‰ 8.02 ± 0.13	Crecimiento, bioacumulación
	Con recambio de agua a 96 h	180 días	3 por triplicado y un testigo	40	20 ±1°C, 36 ±1 ‰ 7.99 ± 0.13	Bioacumulación
Adultos 38 - 50 mm (12- 14 meses)	Con recambio de agua a 48 h	168	5 con replica y un testigo	10 ± 8	20 ±1°C, 36 ±1 ‰ 7.99 ± 0.1	Letalidad (CL ₅₀), respiración-excreción Relación O:N, tasa de filtración Bioacumulación
	Con recambio de agua a 48 h	168	2 por triplicado y un testigo	24	20 ±1°C, 36 ±1 ‰ 7.84 ± 0.34	Lipoperoxidación, daño genético Histopatología Comp. Quím. g. Digestiva
	Con recambio de agua a 96 h	180 días	3 por triplicado y un testigo	25	20±1°C , 36 ±1 ‰ 7.84 ± 0.34	Bioacumulación

Los metales fueron suministrados en los experimentos por medio de soluciones patrón, que fueron preparadas a partir de las siguientes sales: CdCl_2 , (Baker, pureza 99%), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merk, 99.5%) y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Baker 99%). Las disoluciones se prepararon con agua deionizada, siguiendo las recomendaciones de APHA (1994) y FAO (1982, 1986). Las concentraciones de las soluciones patrón se comprobaron por espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Perkin Elmer mod. 3100 en flama, siguiendo los métodos descritos por AWWA, 1968; APHA, (1994) y ASTM, (1994).

2.3 Supervivencia de larvas veliger y pediveliger de *A. ventricosus*

Para evaluar el efecto tóxico de los metales cadmio, cromo, plomo y sus mezclas sobre la supervivencia de las larvas veliger ("D") y pediveliger de almeja catarina, se efectuaron 4 microbioensayos, siguiendo las recomendaciones de Hunt *et al.*, (1998). Se utilizaron placas multipozos, cada pozo con un volumen de 3 ml. En estas pruebas se realizaron recambios de agua cada 24 horas, para mantener constante la concentración de los metales. Se probaron 4 concentraciones de metal por quintuplicado además de un testigo (Tabla 2).

Posteriormente se realizaron bioensayos con las siguientes mezclas de metales, en proporción 1:1 Cd + Cr, Cd + Pb, Cr + Pb y Cd + Cr + Pb, se probaron 4 concentraciones de cada mezcla, además de un testigo por quintuplicado. (Tabla 2).

Cada 24 horas se evaluó la supervivencia de los organismos para cada concentración de metal o mezcla por medio de observaciones directas con la ayuda de un microscopio de disección (Olympus).

Tabla 2. Concentraciones de metales utilizadas en los bioensayos con larvas juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.

Evaluación	METALES (mg/l)			MEZCLAS DE METALES (mg/l)			
	Cadmio	Cromo	Plomo	Cd + Cr	Cd + Pb	Cr + Pb	Cd + Cr + Pb
Letalidad (L)	2.5, 0.625, 0.156 y 0.039	2.5, 0.625, 0.156 y 0.039.	2.5, 0.625, 0.156 y 0.039.	2.5, 0.62, 0.15 y 0.067	2.5, 0.62, 0.15 y 0.067	2.5, 0.62, 0.15 y 0.067	2.5, 0.62, 0.15 y 0.067
Letalidad (J)	2.5, 1.25, 0.62, 0.31 y 0.156	10, 5, 2.5 1.25 y 0.62	4.5, 2.25, 1.12, 0.56 y 0.28	1, 0.5, 0.125 y 0.062	1, 0.5, 0.125 y 0.062	1, 0.5, 0.125 y 0.062	1, 0.5, 0.125 y 0.062
Letalidad (A)	2, 0.5, 0.125, 0.031 y 0.0075	12, 3, 0.78, 0.19 y 0.048	10, 5, 1.25 y 0.62	4, 1.0, 0.25 y 0.06,	6, 1.5, 0.37 y 0.093	6, 1.5, 0.37 y 0.093	3, 1.5, 0.75, 0.375 y 0.093
Fijación de larvas	2.5, 1.25, 0.31 y 0.07	2.5, 1.25, 0.31 y 0.07	2.5, 1.25, 0.31 y 0.07	2.5, 1.25, 0.7 y 0.39	2.5, 1.25, 0.7 y 0.39	2.5, 1.25, 0.7 y 0.39	2.5, 1.25, 0.7 y 0.39
Crecimiento (J)	10, 1, 0.1 y 0.01	10, 1, 0.1 y 0.01	10, 1, 0.1 y 0.01	nr	nr	nr	10, 1, 0.1 y 0.01
Consumo de O ₂ Excreción de NH ₃ -N, tasa de aclaramiento y bioacumulación (J)	2.5, 1.25, 0.62, 0.31 y 0.156	10, 5, 2.5 1.25 y 0.62	4.5, 2.25, 1.12, 0.56 y 0.28	2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125	2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125	2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125	1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.062
Consumo de O ₂ Excreción de NH ₃ -N, tasa de aclaramiento y bioacumulación (A)	2, 0.5, 0.125, 0.031 y 0.0075	12, 3, 0.78, 0.19 y 0.048	10, 5, 1.25 y 0.62	4, 1.0, 0.25 y 0.06,	6, 1.5, 0.37 y 0.093	6, 1.5, 0.37 y 0.093	3, 1.5, 0.75, 0.375 y 0.093
Bioacumulación subletal (J)	0.2, 0.05 y 0.02	0.33 y 0.032	0.75 y 0.187	nr	nr	nr	nr
Biomarcadores (J)	0.35 (aguda) 0.02 (subletal)	5.0 (aguda) 0.05 (subletal)	3.0 (aguda) 0.05 (subletal)	5.35	3.35	8	8.35, 3.0 (agudas) 0.120 (subletal)
Biomarcadores (A)	0.5	8.5	6.5	9.0	7.0	15.0	3.0, 0.6
Histopatología	0.75, 0.18 y 0.046	nr	0.75, 0.18 y 0.046	nr	1.5, 0.37 y 0.09	nr	nr

La muerte de los especímenes se determinó de acuerdo a los criterios establecidos por FAO (1982; 1986).

Con los datos obtenidos, se determinó la CL₅₀ (Concentración Letal 50) a 24, 48 y 72 horas, por medio del método Probit (Finney, 1971).

En los bioensayos con mezclas de metales se evaluó su tipo de interacción (antagonismo, aditividad o potenciación), por medio del cálculo de las unidades tóxicas propuesto por Sprague y Ramsay (1965) utilizando la siguiente relación:

$$U.T. = \frac{[A]_{\text{metal}}}{A_{CL50}} + \frac{[B]_{\text{metal}}}{B_{CL50}} + \dots \quad (1)$$

Donde

U.T. = Unidades tóxicas.

[A]_{metal} = Concentración del metal A en la mezcla (mg/l).

A_{CL50} = Valor de CL₅₀ a 96 horas del metal A (mg/l).

[B]_{metal} = Concentración del metal B en la mezcla (mg/l).

B_{CL50} = Valor de CL₅₀ a 96 horas del metal B (mg/l).

El factor de magnificación (F.M.), que indica el número de veces que se incrementa el efecto tóxico de las mezclas cuya interacción fue de potenciación, se evaluó con la relación propuesta por Marking (1977).

$$F.M. = \frac{1}{U.T.} \quad (2)$$

Donde

U.T. = Unidades tóxicas.

2.4 Fijación de larvas pediveliger

El efecto de los metales sobre la fijación de las larvas al sustrato se evaluó mediante un bioensayo, en el cual se probaron 4 concentraciones de cada metal y de las mezclas por triplicado (Tabla 2). Se utilizaron un total de 300 organismos por concentración.

El experimento se realizó en cristalizadores de vidrio Pyrex con capacidad de 400 ml. En el fondo de éstos se colocaron sustratos, consistentes en placas delgadas de vidrio (Roosenburg *et al.*, 1980), las cuales se revisaron cada 24 horas con ayuda de un microscopio de disección (Olympus). Se efectuó un conteo del número de organismos adheridos a las placas, para determinar los porcentajes de especímenes fijos y no fijos a las 24, 48 y 72 horas (Roosenburg *et al.*, 1980).

Con los datos obtenidos se determinó la CE_{50} (Concentración Efectiva 50) que es la concentración de metal, donde se observó una disminución del 50% en la fijación de larvas en comparación con el testigo.

Las condiciones que prevalecieron durante este experimento se resumen en la Tabla 1.

2.5 Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre juveniles y adultos de *A. ventricosus*

Para evaluar el efecto tóxico de los metales y sus mezclas sobre juveniles y adultos se realizaron 7 bioensayos con juveniles de 3 a 4 meses de edad y 10 experimentos con adultos de 12 a 14 meses de edad.

Se utilizaron un total de 756 juveniles y 621 adultos para la realización de los diferentes experimentos.

2.6 Evaluación de la tasa de crecimiento de juveniles expuestos a metales tóxicos

En pruebas con juveniles de 3 ± 0.5 mm de altura, expuestos a los metales Cd, Cr, Pb y la mezcla Cd + Cr + Pb, durante 30 días, se evaluó el efecto de estos xenobióticos sobre su crecimiento.

Se probaron 3 concentraciones de cada metal y de la mezcla Cd + Cr + Pb además de un testigo sin tóxico, por triplicado (Tabla 2). Se expusieron 60 organismos en cada concentración. Durante el experimento, las almejas fueron alimentadas diariamente con una mezcla de microalgas *Tetraselmis* sp. *Chaetoceros* sp, con una densidad de $600,000 \pm 150,000$ (Avilés-Quevedo, 1990).

Al inicio y término del experimento los especímenes se midieron para determinar su altura, con un microscopio de disección provisto de una reglilla graduada y calibrada en μm (Olympus).

La tasa de crecimiento se calculó mediante la relación propuesta por Stromgren (1982):

$$\text{T.C.} = \frac{h_{\text{final}} - h_{\text{inicial}}}{\text{Tiempo}} \quad (3)$$

Donde

T.C. = Tasa de crecimiento (mm/día).

h_{final} = Altura de los organismos en el tiempo final de observación (mm).

h_{inicial} = Altura de los organismos al inicio del experimento (mm).

Tiempo = Días.

El aumento de la biomasa de los juveniles, se determinó por la diferencia del peso seco de los especímenes al inicio y al final del experimento.

Treinta organismos de cada tratamiento, fueron extraídos de su concha y se pesaron en una balanza analítica (Mettler, mod. Toledo, ag2-45 de ± 0.01 mg) para determinar su peso húmedo. Posteriormente se colocaron en una caja Petri y se secaron en un horno a 60 - 70 °C por un lapso de 12 horas o hasta alcanzar peso constante. Después las muestras se colocaron en un desecador durante una hora e inmediatamente se pesaron para determinar tanto el peso seco como su porcentaje de humedad.

Con los datos obtenidos se determinó la CE_{50} (Concentración Efectiva 50), que es la concentración de metal donde se observó una disminución del 50% en la tasa de crecimiento en comparación con el testigo.

Las condiciones que prevalecieron durante el desarrollo de esta prueba se resumen en la Tabla 1.

2.7 Supervivencia de juveniles y adultos de almeja expuestos a metales tóxicos

Las pruebas de letalidad o de intoxicación aguda se llevaron a cabo con juveniles de 3 a 10 mm de altura y adultos de 40 a 50 mm de altura.

Se efectuaron bioensayos con recambios de agua cada 48 horas, siguiendo los

experimento para evitar la evaporación del agua y la variación de los niveles del metal.

Se probaron 5 concentraciones de los metales y sus mezclas por triplicado, además de un testigo sin tóxico y otro sin organismos (Tabla 2). Se colocaron 10 juveniles por recipiente. El tiempo de duración de las pruebas fue de 168 horas.

Los experimentos con adultos se realizaron en acuarios de 12 litros de capacidad en donde se colocaron de 5 a 6 organismos por acuario (Figura 3). Se probaron 5 concentraciones de los metales y sus mezclas por duplicado, además de un testigo sin tóxico y otro sin organismos (Tabla 2). Estas pruebas tuvieron una duración de 168 horas.

El agua marina que se utilizó en todos los bioensayos, fue filtrada (5 y 1 μm) e irradiada con luz UV.

Cada 48 horas se evaluaron los siguientes parámetros en ambos experimentos: niveles de metales en el agua, por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica (AA Perkin Elmer mod. 3100), concentración de oxígeno con un oxímetro (Cole Palmer Mod. 5946-55), pH con un potenciometro (Orion Mod.520A), salinidad con refractómetro (Makko), temperatura con termómetro de 0.1 °C de precisión y concentración de amonio, según el método descrito por Lind (1985).

Además cada 24 horas se registró la supervivencia de los organismos en cada prueba.

Con los datos de supervivencia y mortalidad se determinó la CL_{50} a 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, por el método Probit (Finney, 1971), utilizando el programa para computador "TOXIC" (Amin 1994, com. pers.).

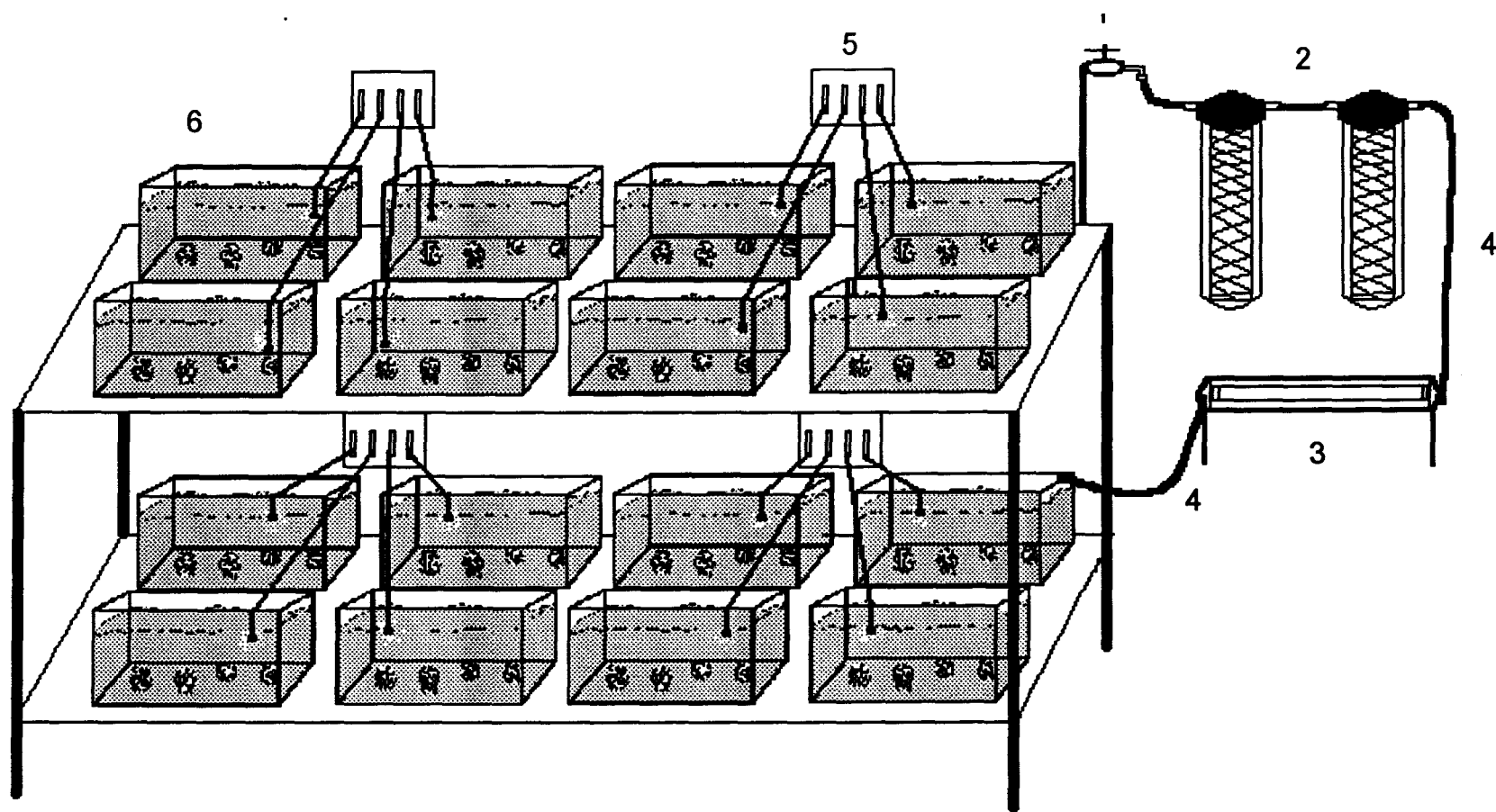


Figura 3. Sistema de acuarios acondicionados para la realización de los bioensayos con adultos de la almeja catarina.
 1) Toma de agua. 2) Sistema de filtros (20 y 1 μm). 3) Lampara de luz ultravioleta. 4) Manguera. 5) Tomas de aire.
 6) Acuario de 15 litros de capacidad.

El TL₅₀ (Tiempo Letal 50) que por definición, es el tiempo que tardan en morir el 50% de los organismos expuestos a cada una de las concentraciones de metales probadas, se calculó también por medio del método Probit (Finney, *op. cit.*).

La CL₅₀ asintótica, que se define como la concentración en la cual la CL₅₀ se aproxima a una constante teórica, en la que ya no ocurren más muertes, se obtuvo experimentalmente entre las 120 y 168 horas de observación (FAO, 1982; 1986).

La Razón de Potencia, que compara la toxicidad de un metal con respecto a otro, al analizar sus CL₅₀, se calculó con la relación descrita por Ahsanullah *et al.*, (1981):

$$\text{R.P.} = \frac{A_{\text{CL}_{50}}}{B_{\text{CL}_{50}}} \quad (4)$$

Donde

R.P. = Razón de potencia.

$A_{\text{CL}_{50}}$ = CL₅₀ del metal A (mg/l).

$B_{\text{CL}_{50}}$ = CL₅₀ del metal B (mg/l).

Las curvas de mortalidad obtenidas se ajustan al modelo potencial negativo y fueron calculadas con la relación:

$$y = ax^b \quad (5)$$

Donde

y = CL₅₀ (mg/l).

2.8 Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno en juveniles y adultos de *A. ventricosus*

La tasa de consumo de oxígeno se determinó siguiendo las recomendaciones de Barber y Blake (1985), mediante cámaras cerradas (sistemas estáticos) de volumen conocido, las cuales contenían en disolución la concentración de metal a que fueron expuestos los organismos. Los niveles de oxígeno al inicio ($[O_2 \text{ ini}]$) y al final ($[O_2 \text{ fi}]$) del tiempo de permanencia de los especímenes en estos dispositivos, se determinaron mediante un oxímetro de 0.1 ppm de lectura mínima, con corrección para salinidad.

En los bioensayos con juveniles se colocaron 10 organismos en recipientes de 400 ml de capacidad y se realizaron 3 mediciones, con un lapso de 2 horas entre cada medición (Tabla 2).

En los experimentos con adultos se utilizaron cámaras de 1 litro de volumen, se colocó un organismo por cámara (Figura 4). Se hicieron de 3 a 4 registros con un lapso de 1 hora entre cada uno.

Para determinar el consumo de oxígeno se aplicó la relación descrita por Cech, (1990):

$$\text{Consumo de } O_2 = \frac{([O_2 \text{ fi}] - [O_2 \text{ ini}]) V}{\text{Tiempo}} \quad (6)$$

Donde

$([O_2 \text{ fi}])$ = Concentración de oxígeno (mg/l) al final del tiempo de observación.

Los valores de consumo de oxígeno se corrigieron con los datos obtenidos en la cámara sin organismos.

La tasa de consumo de oxígeno se obtuvo al normalizar el consumo de oxígeno con el peso seco de las almejas y se expresó en $\text{ml O}_2/\text{h/g}$ (peso seco).

Además, se determinó la CE_{100} (Concentración Efectiva 100) que es la concentración de metal en la cual se observó un aumento del 100% en la tasa de consumo de oxígeno y la CE_{50} (Concentración Efectiva 50) que es la concentración de metal en la cual disminuye el 50% la tasa de consumo, en comparación con lo observado en el testigo.

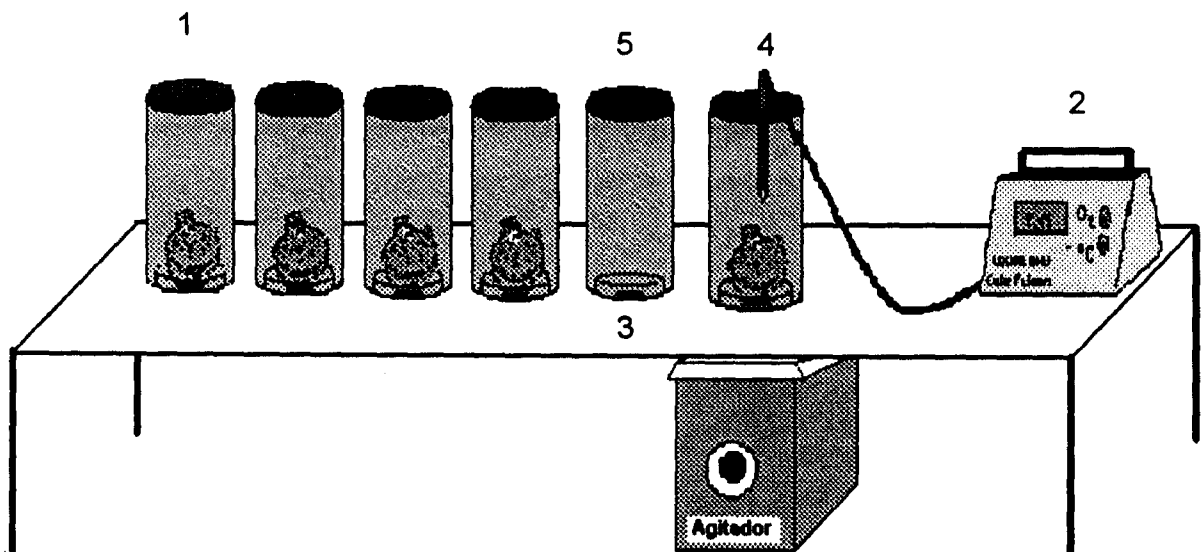


Figura 4. Dispositivo construido para realizar las evaluaciones de consumo de oxígeno: 1) cámara hermética; 2) Oxímetro; 3) agitador magnético; 4) Electrodo para la lectura de oxígeno; 5) cámara testigo sin organismos.

2.9 Evaluación de la tasa de excreción de juveniles y adultos de *A. ventricosus* expuestos a metales tóxicos

La tasa de excreción se evaluó paralelamente en los bioensayos donde se hicieron las determinaciones del consumo de oxígeno.

En las cámaras herméticas se determinó el contenido de $\text{NH}_3\text{-N}$ en el agua al inicio y término de los experimentos.

Se tomaron muestras de 50 ml, se fijaron con fenol 5% (0.5 ml) y se almacenaron a 5 °C hasta el momento de realizar las determinaciones.

Posteriormente se analizaron alícuotas de 10 ml por duplicado, mediante la microtécnica descrita por Solórzano, modificada por Lind (1985) (ver anexo 1).

Los valores de excreción de amonio se corrigieron con los datos obtenidos en la cámara control sin organismos y normalizados con el peso seco de las almejas, para obtener la tasa de excreción de $\text{NH}_3\text{-N}$ y se expresaron en $\mu\text{g NH}_3\text{-N /h/g}$ (peso seco).

2.10 Cálculo de la relación O:N en las pruebas con juveniles y adultos de almeja catarina expuestos a metales tóxicos

La relación O:N se calculó con base en los equivalentes atómicos del oxígeno y del nitrógeno, según lo recomendado por Bayne *et al.*, (1976), es decir, se divide el valor de consumo de oxígeno entre 16 y el de excreción de $\text{NH}_3\text{-N}$ entre 14.

Los datos obtenidos en las pruebas donde se evaluó la tasa de consumo de

2.11 Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre la tasa de aclaramiento

La tasa de aclaramiento (tasa de filtración) se estimó de manera indirecta por medio de la remoción de partículas (microalgas *Chaetoceros* sp.), de una suspensión con volumen y densidad conocidas. Se usó un inóculo de 498,079 cel/ml, mismo que se determinó como el más adecuado en pruebas preliminares, ya que no se observó la formación de pseudoheces (Griffiths y King, 1979).

Tanto juveniles como adultos se expusieron a 5 concentraciones de metal y un testigo por triplicado (Tabla 2), además de una cámara sin organismos que se utilizó para determinar el porcentaje de sedimentación de las microalgas.

Durante el desarrollo de estos experimentos los organismos fueron alimentados para evitar problemas de estrés por falta de alimento.

Las pruebas con juveniles se realizaron en recipientes de 400 ml de capacidad, con burbujeo constante, donde se colocaron 20 organismos. Después de aplicar el inóculo de microalgas, se tomaron muestras (10 ml, por duplicado) cada hora hasta obtener 3 alícuotas las cuales se fijaron con formalina al 5%, para ser analizadas posteriormente.

Los experimentos con adultos se hicieron en cámaras de 1 litro de volumen, con burbujeo constante, donde se colocó un organismo por cámara. Se tomaron muestras cada hora después de que se adicionó el inóculo de microalgas, hasta obtener 4

El cálculo de la tasa de filtración se hizo mediante la ecuación de Griffiths y King (1979).

$$T. A. = \frac{V \times (\ln [C_i] - \ln [C_f])}{t} \quad (7)$$

Donde

T. A. = Tasa de aclaramiento (l/h).

V = Volumen de la cámara (litros).

C_i = Concentración inicial de células (células/l).

C_f = Concentración final de células (células/l).

T = Tiempo (horas).

También se calculó la CE_{100} (la concentración efectiva 100) que es la concentración de metal donde la tasa de filtración aumenta 100% en comparación con el testigo y la CE_{50} (Concentración efectiva 50) donde se observó una disminución del 50% en la tasa de filtración.

2.12 Evaluación de la bioacumulación de metales

La concentración de metales en los organismos se determinó con la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, siguiendo los procedimientos descritos por Parker, C.R. (1972), Bertini *et al.*, (1976), Hamilton, (1980), IAEA (1984), APHA (1994) y ASTM, (1994). La evaluación se realizó con muestras compuestas de entre

Una alícuota de 250 mg de la muestra, previamente desecada y pulverizada se colocó en un vaso de teflón de 100 ml de capacidad y se digirió con 10 ml de HNO₃ (Baker, grado de pureza 98%) en un horno de microondas, marca CEM mod. MDS-81D (IAEA, 1984; APHA 1994; ASTM, 1994) (Anexo 1).

Las soluciones obtenidas en las digestiones, se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian mod. Spectraa-20 en flama con una mezcla de aire-acetileno en proporción 10:2 para el análisis de cadmio y plomo y de 6:4 para la determinación de cromo.

Junto con las alícuotas también se procesó una muestra de referencia del CENAM (Centro Nacional de Metrología) y una muestra de organismo (almeja) a la que se le agregaron concentraciones conocidas de estándares de metales (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las concentraciones de metales (mg/l y µg/g) en la muestra de referencia del CENAM y la muestra de referencia del Laboratorio de Contaminación (UAMI).

MUESTRAS DE REFERENCIA	METALES		
	Cd	Cr	Pb
CENAM (mg/l)	1.49 ± 0.5	3.9 ± 0.14	4.17 ± 0.14
Valor obtenido en el laboratorio	1.43 ± 0.32	4.01 ± 0.2	4.08 ± 0.02

El factor de bioacumulación (F.B.) se determinó con los valores de metales presentes en los tejidos de los organismos, mediante la relación descrita por Spacie y Hamelink (1985).

$$F.B. = \frac{[\text{metal}] \text{ en el organismo (ppm)}}{[\text{metal}] \text{ en el agua (ppm)}} \quad (8)$$

Donde

F.B. = Factor de bioacumulación.

[metal] en el organismo = Concentración de metal presente en el organismo ($\mu\text{g/g}$)

[metal] en el agua = Concentración de metal presente en el agua ($\mu\text{g/ml}$).

Con los datos obtenidos en las pruebas con las mezclas de xenobióticos, se calcularon las ecuaciones que describen la acumulación de los metales en los organismos, en las diferentes combinaciones, mediante el siguiente modelo de correlación múltiple:

$$y' = a + by_1x_1 + by_2x_2 + by_3x_3 \quad (9)$$

Donde

X1 = Concentración de cadmio en el organismo ($\mu\text{g/g}$).

X2 = Concentración de cromo en el organismo ($\mu\text{g/g}$).

X3 = Concentración de plomo en el organismo ($\mu\text{g/g}$).

a = Constante (ordenada al origen).

b = Constante (pendiente de cada recta).

El cálculo de las ecuaciones se realizó con el programa Statistica versión 5.

La cinética de acumulación de los metales se calculó mediante el modelo de compartimientos simples, propuesto por Spacie y Hamelink (1985), en el cual se infiere que la toma del metal del agua es la única variable de entrada (no se alimentan a los especímenes) y se asume también, que es directamente proporcional a las concentraciones de exposición.

La tasa de eliminación se supone que es directamente proporcional a la concentración de metal presente en el organismo y el volumen del compartimiento se mantiene constante (no hay crecimiento). Para este caso la tasa de variación de la concentración de metal dentro del organismo, se puede establecer mediante la siguiente relación:

$$\frac{dC}{dt} = \text{incorporación} - \text{pérdida} = k_{to}C_w - k_d C \quad (10)$$

Donde

C_w = Concentración del químico en el agua ($\mu\text{g/ml}$).

C = Concentración del químico en el organismo ($\mu\text{g/g}$).

k_{to} = tasa de incorporación del metal.

k_d = tasa de depuración.

t = tiempo (días).

La tasa de depuración (K_d) se calculó mediante la ecuación descrita por Spacie y Hamelink (1985):

$$C = C_{ss} [1 - e^{-k_d t}] \quad (11)$$

Donde

C = Concentración de metal en el organismo ($\mu\text{g/g}$).

C_{ss} = Concentración de metal en el organismo en la fase de equilibrio (fase estacionaria) ($\mu\text{g/g}$).

k_d = Tasa de depuración.

t = Tiempo (horas).

La depuración de los metales se puede definir en términos de la vida media biológica, que es el tiempo requerido para que la mitad del metal acumulado sea eliminado como resultado de los procesos fisiológicos.

Para la determinación de la vida media de los metales, se realizó un bioensayo con juveniles de 8 ± 1.5 mm de altura, los cuales fueron expuestos a 2 concentraciones de metales además de un testigo (Tabla 2). El tiempo de exposición fue de 10 días. Durante la etapa de intoxicación cada 24 horas se recolectaron 5 almejas por tratamiento, para evaluar los niveles de metales que acumularon en sus tejidos.

Al finalizar el tiempo de intoxicación, los organismos supervivientes se colocaron en acuarios con agua libre de metal y permanecieron en estas condiciones durante 10 días. Durante esta etapa se tomaron 5 especímenes cada 24 días, para posteriormente

realizar una determinación de las concentraciones de metales en ellos. Las muestras de tejidos digeridas fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica.

Con los datos obtenidos se calculó la vida media de los metales, mediante el procedimiento descrito por Renfro (1973), que consiste en realizar la regresión lineal siguiente:

$$\log y = a + bx \quad (12)$$

Donde

y = Concentración de metal en el organismo (%)

x = Tiempo (días).

a = Ordenada al origen.

b = Pendiente.

El valor de la pendiente se sustituyó en la ecuación:

$$V_{1/2} = \frac{\log 2}{b} \quad (13)$$

Donde

$V_{1/2}$ = Vida media (días).

2.13 Evaluación de biomarcadores

Se efectuaron 4 bioensayos para determinar el efecto de los metales y sus mezclas en 4 tipos de biomarcadores: 1) constitución química de la glándula digestiva;

concentración aguda de metal y de la mezcla Cd + Cr + Pb (cercanas a las CL₅₀) durante 168 horas (Tabla 2).

Para la evaluación de composición química de la glándula digestiva se tomaron muestras a las 24 y 168 horas en las pruebas con los metales y a las 24 y 96 horas en los experimentos con las mezclas. La determinación de los niveles de lipoperoxidación se hizo a 24, 96 y 168 horas de iniciado el bioensayo. El daño genético se evaluó a las 96 horas de exposición únicamente. Se analizaron de 6-8 especímenes por tratamiento.

El segundo ensayo se realizó con juveniles que fueron expuestos a concentraciones subletales (Tabla 2) de metales y de la mezcla Cd + Cr + Pb, durante 15 días, para determinar las variaciones en la composición de la glándula digestiva. a las 24 horas y 15 días de iniciada la prueba.

El tercero se efectuó con adultos de almeja los cuales fueron expuestos a los metales y sus mezclas durante 144 horas (Tabla 2). Para la determinación de la composición química de la glándula digestiva, se tomaron muestras a las 24 y 144 horas en las pruebas con metales, y a las 24 y 96 horas en los experimentos con las mezclas de xenobióticos. Los niveles de lipoperoxidación y el grado de daño genético se evaluaron a las 24 y 144 horas de exposición, se tomaron 6-8 individuos por tratamiento para realizar los análisis.

Los organismos tomados de los experimentos, fueron extraídos de su concha y

Tris (0.1 M pH 7.8) con un homogenizador de teflón, en cama de hielo. Posteriormente se tomaron alícuotas de los homogenizados para realizar los análisis correspondientes.

2.13.1 Composición química de la glándula digestiva

Los niveles de proteínas, carbohidratos y lípidos de la glándula digestiva de organismos expuestos y no expuestos a los metales se determinaron con las siguientes técnicas:

Las proteínas totales se cuantificaron en alícuotas de 500 μ l del homogenizado, con el método descrito por Lowry *et al.*, (1951) y modificado por Malara y Charra (1972a). La determinación se realizó por triplicado. El estándar de proteína utilizado fue albúmina de bovino cristalizada (Sigma). Las lecturas de absorbancia de las muestras experimentales y de los estándares se realizaron en un espectrofotómetro marca Beckman DU-640 a una longitud de onda de 750 nm (Anexo 1).

Los carbohidratos se evaluaron en submuestras de 300 μ l con la técnica de Dubois *et al.*, (1956) y modificada por Malara y Charra (1972b). Se utilizó glucosa anhidra (Sigma) para preparar los estándares. La evaluación se realizó por triplicado. Las lecturas de densidad óptica se realizaron en las longitudes de onda de 490 y 600 nm con un espectrofotómetro marca Beckman DU-640 (Anexo 1).

La concentración de proteínas y carbohidratos presentes en las muestras se calcularon a través de una relación lineal, obtenida de las lecturas de densidad óptica de las soluciones patrón de concentración conocida. Los resultados se expresaron como μ g/ml de proteína ó μ g/ml de carbohidratos.

La determinación de los lípidos totales se realizó con 300 μ l del homogenizado, siguiendo el método gravimétrico descrito por Bligh y Dyer, (1959). Consiste en la extracción de estos compuestos con una mezcla de solventes: diclorometano, etanol y agua, en proporción 10:5:2 a temperatura baja (< 8 °C). El análisis se hizo por duplicado. El contenido de lípidos se obtuvo con el peso de los viales de teflón que contenían las muestras, después de evaporar los solventes, en una microbalanza mediante la cual se determinó la concentración de lípidos en μ g/ml.

Los valores de proteínas, carbohidratos y lípidos se normalizaron con el peso de los tejidos para expresarlos en porcentaje del peso seco del tejido, o en μ g/g. (de peso seco).

2.13.2 Determinación de niveles de lipoperoxidación en glándula digestiva y branquia

La formación y el efecto de radicales libres originados por la acción de los metales, se evaluó por medio de la técnica desarrollada por Buege y Aust (1978). Este análisis se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico para identificar la presencia de malondealdehídos (MDA) que son el producto de la actividad de los radicales libres sobre las membranas.

Se tomaron alícuotas de 1 ml de los homogenizados de la branquia y de la glándula digestiva y se incubaron a 90 °C con una mezcla de ácido tiobarbitúrico (15%), ácido tricloroacético (0.375%) y ácido clorhídrico (0.25 M) durante 20 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron (150 rpm) y se analizaron en un espectrofotómetro a 535 nm.

Para el cálculo de la concentración de MDA presente en la muestra se utilizó la fórmula de Buege y Aust (*op. cit.*):

$$C = \frac{A}{\epsilon P} \quad (14)$$

Donde

C = Concentración de MDA (nM de MDA).

A = Absorbancia de la muestra.

ϵ = Coeficiente de extinción 1.56×10^5 M/cm.

P = Grosor de la fotocelda (1 cm).

Los valores obtenidos se expresaron en nM de MDA/g. (peso seco)

2.13.3 Evaluación de daño genético en el tejido de la branquia.

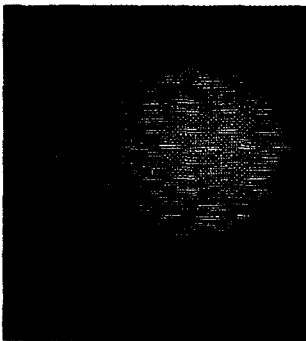
El daño genético en las células del tejido de la branquia se evaluó con la técnica de electroforesis unicelular conocida también como ensayo cometa (Singh *et al.*, 1988).

Este método consiste en la evaluación de la integridad del material genético de una muestra de por lo menos 100 células, las cuales se lisan bajo condiciones alcalinas y con los núcleos se realiza una electroforesis. La migración del núcleo forma una cauda similar a la cola de un cometa, con el material genético dañado. La longitud de la cauda o cola de cometa es proporcional al grado de daño que tiene la célula (Figura 4).

disgregado se tomaron 20 μ l, colocándose sobre una capa de agarosa soportada en un portaobjetos esmerilado.

Los portaobjetos con las muestras (dos por cada organismo) se colocaron en una solución (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% Tritón X100 y 10% DMSO), para romper las células y obtener los núcleos. Después los portaobjetos se colocaron en la cámara de electroforesis y se les agregó buffer (10 N NaOH, 200 mN NaCl). La duración de la electroforesis fue de 20 minutos, a 25 voltios y 300 amperios. Al término de este proceso, las laminillas con las muestras se tiñeron con 75 μ l de bromuro de etidio y se analizaron en un microscopio de epifluorescencia con un filtro de 560 nm.

Se evaluó la frecuencia de núcleos con y sin cauda, así como el tamaño de las caudas en una muestra de 100 núcleos. Se aplicó la prueba estadística de "t" de student, para determinar la existencia de diferencia entre los lotes de células expuestas al genotóxico y las no expuestas.



A



B

Figura 5. Evaluación de daño genético con la técnica de Electroforesis unicelular. A) núcleo sin daño; B) núcleo con daño genético, se observa el desarrollo de la cauda o cola de cometa.

Con el peso de la branquia se determinó el Índice de Tejido Branquial (ITB) mediante la relación:

$$\text{I.T.B.} = \frac{\text{Peso de la branquia}}{\text{Peso del organismo}} \times 100 \quad (15)$$

2.13.4 Evaluación de cambios histológicos (Histopatología)

Para la evaluación histológica, se tomaron muestras de organismos (2 por concentración) a las 24, 96, 144 y 192 horas de iniciado un experimento donde se probaron tres concentraciones de cadmio y plomo por duplicado, que equivalen a las CL₂₅, CL₁₀ y CL₅ (Tabla 2). Con la mezcla Cd + Pb se probaron las concentraciones que corresponden a las CL₅₀, CL₂₂ y CL₅ (Tabla 2).

Los ejemplares se fijaron con formalina al 10% durante 24 horas y después se cambiaron a alcohol etílico al 70%.

Posteriormente las muestras se lavaron en agua corriente durante 1 hora y se deshidrataron con alcohol etílico de concentraciones graduales en un procesador de tejidos, luego se incluyeron en parafina. Los bloques se cortaron en un microtomo de rotación para obtener cortes histológicos de 3-5 micras de espesor.

Las muestras de tejido se montaron sobre portaobjetos y posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina (NOAA, 1983; Martoja y Person, 1970;).

METODO

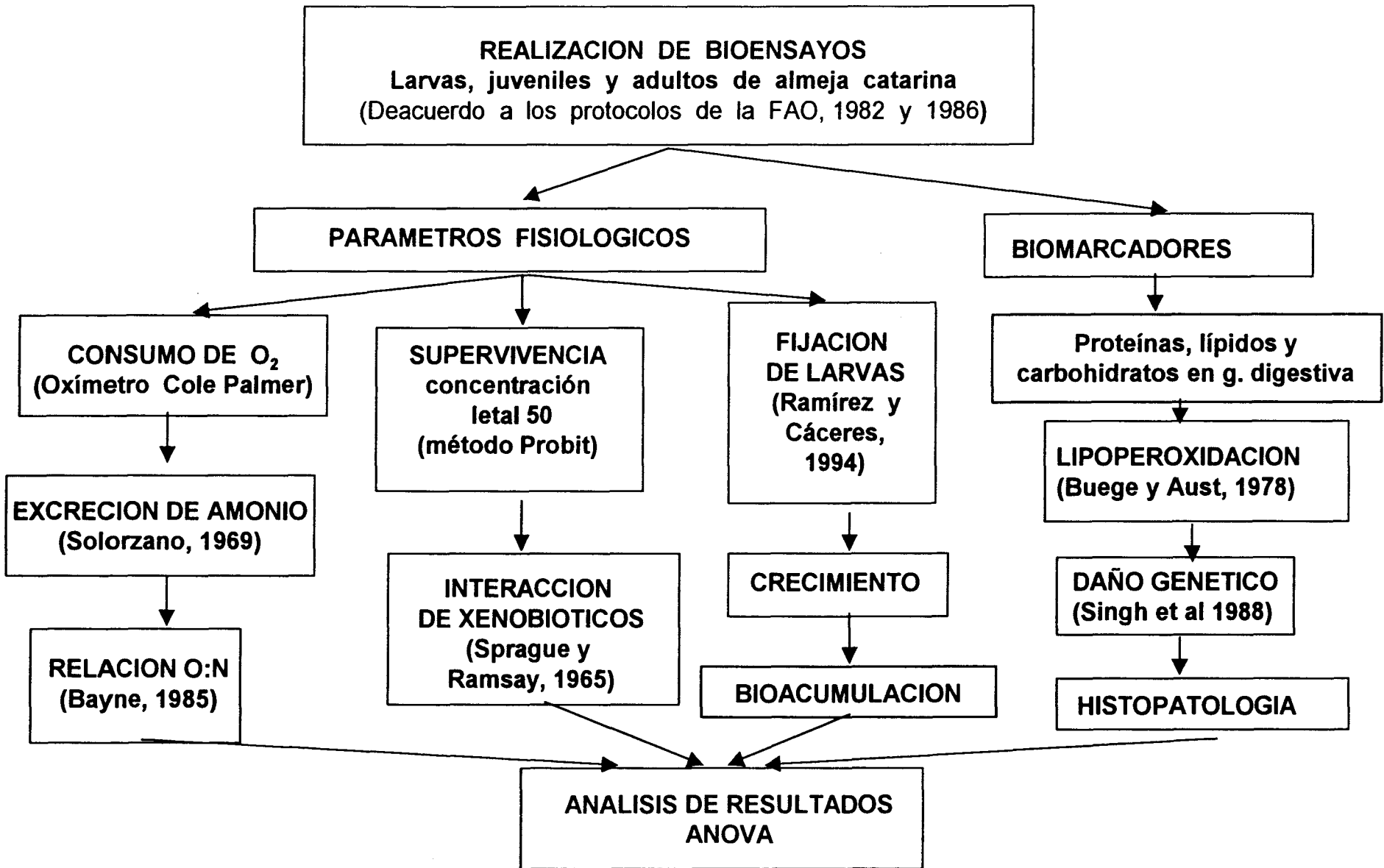


Figura 6. Metodología utilizada para la evaluación del efecto de los metales tóxicos en larvas juveniles y adultos de almeja *Catarina Argopecten ventricosus*.

2.14 Análisis estadístico

A los resultados obtenidos en cada una de las pruebas descritas anteriormente se les aplicó un análisis exploratorio de datos con la prueba de Kolmogorov – Smirnov para probar normalidad. En función de los resultados obtenidos con este examen se determinó la aplicación de un método paramétrico o no paramétrico de análisis (Zar, 1996; Sokal y Rohlf, 1969).

Los datos de los experimentos donde se evaluó la fijación de las larvas, la tasa de crecimiento, la tasa de consumo de oxígeno, la tasa de excreción de NH₃-N y evaluación de la relación O:N, cumplieron con los requisitos de normalidad, y fueron analizados con las prueba de ANOVA (análisis de varianza) y posteriormente se realizó una comparación múltiple con la prueba de Tukey, para evaluar la significancia estadística de las diferencias encontradas entre el testigo y los diferentes tratamientos con los metales y sus mezclas (Zar, 1996; Sokal y Rohlf, 1969).

En los experimentos donde se realizó la evaluación de los biomarcadores (constitución de la glándula digestiva y lipoperoxidación) el número de observaciones es menor a 10 y, con ello, no se cumplen con los requisitos de normalidad, por esta razón se utilizó la prueba no paramétrica de Kruscal Wallis.

El cálculo de la diferencia entre las CL₅₀ obtenidas por medio del método Probit (Finney, 1971), se realizó con el estadístico descrito por APHA, (1994):

$$f_{1,2} = \text{antilog} \sqrt{(\log f_1)^2 + (\log f_2)^2}$$

Donde

CAPITULO 3 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE EFECTOS DE LOS METALES CADMIO, CROMO, PLOMO Y SUS MEZCLAS SOBRE LARVAS, JUVENILES Y ADULTOS DE *Argopecten ventricosus*

En este trabajo se realizaron 23 bioensayos para evaluar los efectos de los metales cadmio, cromo plomo y sus mezclas, sobre individuos que se encontraban en diferentes etapas dentro de su ciclo de vida.

3.1 Efectos en la supervivencia de las larvas, juveniles y adultos de almeja catarina

En la evaluación de la CL₅₀ (concentración letal 50) se observó que en la mayoría de los casos el modelo probit aplicado fue significativo ($\alpha < 0.05$) y explicó entre el 74% al 99% de la variabilidad de los valores de mortalidad obtenidos (Tabla 4).

En las pruebas con las larvas pediveliger, la CL₅₀ se calculó por el método gráfico, debido a que los datos no cumplieron con los requisitos para ser evaluados con el método probit (no se distribuyeron normalmente $\text{Chi}^2 = 50.05$, $p > 0.65$) y por esta razón no fue posible determinar los intervalos de confianza de las CL₅₀ (Tabla 5).

En los bioensayos realizados con las larvas "D" y pediveliger se determinó la CL₅₀ a las 24, 48 y 72 horas, observándose una relación directa entre mortalidad, tiempo de exposición y concentración de metal, es decir, que la mortalidad aumentó conforme se incrementó el tiempo de exposición y la concentración de metal.

Tabla 4. CL₅₀ (Concentración Letal 50 a 96 horas) obtenidas en las pruebas con larvas veliger "D", larvas pediveliger, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* expuestas a los metales cadmio, cromo, plomo y sus mezclas.

METAL	CL ₅₀ (Concentración Letal 50) mg/l											
	Larvas veliger "D"			Larvas Pediveliger			Juveniles			Adultos		
Cadmio	0.207			0.039			0.396			0.789		
Intervalo de confianza	0.089 a 0.567						0.32 a 0.47			0.56 a 1.08		
Chi ² , α, r ²	0.78	0.02	0.89				1.19,	0.007	0.78	0.63,	0.005	0.99
Cromo	1.97			2.244			3.43			9.04		
Intervalo de confianza	0.34 a 2.3						2.79 a 4.14			3.6 a 21.5		
Chi ² , α, r ²	1.4	0.002	0.96				1.9	0.003	0.95	1.34	0.009	0.83
Plomo	1.031			3.46			0.83			7.09		
Intervalo de confianza	0.23 a 2.78						0.66 a 1.04			3.6 a 26.6		
Chi ² , α, r ²	2.08	0.003	0.75				1.3	0.004	0.82	1.68	0.001	0.78
Cd + Cr	0.757			Nd			0.907			0.54		
Intervalo de confianza	0.065 a 1.45						0.25 a 2.5			0.41 a 0.7		
Chi ² , α, r ²	2.5	0.05	0.86				0.12	0.009	0.79	3.69	0.001	0.79
Cd + Pb	0.753			Nd			0.776			0.846		
Intervalo de confianza	0.58 a 1.31						0.05 a 1.06			0.66 a 1.18		
Chi ² , α, r ²	3.5	0.002	0.86				1.83	0.01	0.80	0.353	0.0001	0.97
Cr + Pb	2.291			Nd			0.505			16.06		
Intervalo de confianza	1.51 a 3.99						0.3 a 2.07			0.23 a 18.6		
Chi ² , α, r ²	0.517	0.002	0.89				0.60	0.005	0.85	0.184	0.007	0.94
Cd + Cr + Pb	0.967			0.642			0.3			1.318		
Intervalo de confianza	0.116 a 2.64						0.02 a 3.54			0.83 a 2.09		
Chi ² , α, r ²	3.4	0.05	0.92				0.765	0.01	0.89	0.741	0.003	0.91

Tabla 5. CL₅₀ (Concentración Letal 50) a las 24, 48 y 72 horas obtenidas en las pruebas con larvas "D" y pediveliger de *Argopecten ventricosus* expuestas a los metales y sus mezclas.

METAL	LARVAS "D" CL ₅₀ (mg/l)						LARVAS PEDIVELIGER CL ₅₀ (mg/l)					
	24 horas			48 horas			72 horas			24 horas	48 horas	72 horas
Cadmio	2.06			1.77			0.419			3.7	0.44	0.095
Intervalo de confianza	0.53 a 4.93			0.38 a 1.9			0.283 a 0.622			nd	nd	nd
Chi ² , α , r ²	0.58	0.02	0.91	0.69	0.0001	0.96	3.9	0.0001	0.92			
Cromo	4.8			3.9			3.47			4.56	3.2	2.6
Intervalo de confianza	3.4 a 5.8			2.6 a 7.1			1.46 a 2.9			nd	nd	nd
Chi ² , α , r ²	1.43	0.009	0.82	0.54	0.008	0.92	4.6	0.0009	0.76			
Plomo	5.4			4.35			3.54			4.4	4.0	3.6
Intervalo de confianza	3.4 a 4.8			3.8 a 5.7			1.86 a 5.6			nd	nd	nd
Chi ² , α , r ²	0.13	0.0004	0.98	0.09	0.001	0.99	0.56	0.001	0.97			
Cd + Cr	1.58			1.31			1.1			nd	nd	nd
Intervalo de confianza	0.703 a 2.75			0.219 a 2.01			0.62 a 3.17					
Chi ² , α , r ²	0.89	0.002	0.91	2.4	0.0019	0.85	4.8	0.0001	0.80			
Cd + Pb	3.45			3.45			1.9			nd	nd	nd
Intervalo de confianza	0.93 a 3.98			0.93 a 3.98			1.15 a 4.23					
Chi ² , α , r ²	0.23	0.0018	0.95	0.31	0.0001	0.99	1.58	0.0002	0.95			
Cr + Pb	4.24			4.25			3.11			nd	nd	nd
Intervalo de confianza	0.943 a 5.32			0.943 a 5.321			0.353 a 4.02					
Chi ² , α , r ²	0.84	0.001	0.92	2.02	0.0001	0.92	1.31	0.0001	0.95			
Cd + Cr + Pb	2.39			1.87			1.3			4.0	1.4	1.0
Intervalo de confianza	0.99 a 2.76			0.98 a 2.3			0.44 a 3.31			nd	nd	nd
Chi ² , α , r ²	1.003	0.0265	0.83	1.06	0.0001	0.76	1.8	0.0001	0.78			

Las larvas veliger "D", las pediveliger, los juveniles y adultos de *A. ventricosus* mostraron mayor sensibilidad al cadmio, ya que las CL₅₀ calculadas siempre fueron menores, en comparación con las que se obtuvieron en las pruebas con plomo y cromo (Tabla 5). El grado de toxicidad de estos xenobióticos, con base en su Concentración Letal 50 (CL₅₀ a 96 horas) fue (Tablas 4 y 5): Cd > Pb > Cr.

Asimismo, al comparar los valores de las CL₅₀ y de sus intervalos de confianza se observó que existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) de la toxicidad del cadmio, cromo y plomo a las 96 horas de exposición, con excepción de los efectos del cromo y plomo en las pruebas con larvas y adultos (Tabla 6).

Tabla 6. Diferencias entre las CL₅₀ (96 horas), calculadas con los datos obtenidos en los bioensayos con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos.

ESTADIO	METALES	VALOR DEL ESTADÍSTICO	VALOR CRÍTICO (P < 0.05)	DIFERENCIA
larvas	Cd vs. Cr	9.52	4.74	Significativa
larvas	Cd vs. Pb	5.02	3.24	Significativa
larvas	Cr vs. Pb	1.89	30.29	No diferencia
juveniles	Cd vs. Cr	8.58	1.30	Significativa
juveniles	Cd vs. Pb	2.10	1.33	Significativa
juveniles	Cr vs. Pb	4.07	1.35	Significativa
adultos	Cd vs. Cr	11.46	2.57	Significativa
adultos	Cd vs. Pb	8.99	2.93	Significativa
adultos	Cr vs. Pb	1.27	3.93	No diferencia

La evaluación de la razón de potencia indicó que el metal más deletéreo de los probados es el cadmio (Tabla 7).

Tabla 7. Razón de potencia de la toxicidad de los metales a que fueron expuestos las larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.

COMPARACION ENTRE METALES	LARVAS	JUVENILES	ADULTOS
Cadmio vs. Cromo	9.51	8.5	11.4
Cadmio vs. Plomo	5.01	2.1	8.9
Plomo Vs. Cromo	0.52	4	1.27

En los bioensayos con larvas "D" se observó que el cadmio fue 9 veces más tóxico que el cromo y 5 veces más que el plomo. En las pruebas con larvas pediveliger el cadmio fue 27 veces más tóxico que el cromo y 38 veces más tóxico que el plomo.

En los ensayos con juveniles el cadmio fue 8 veces más tóxico que el cromo y 2 veces más que el plomo. En los experimentos con adultos se observó que fue 11 veces más tóxico que el cromo y 9 veces más que el plomo.

Las curvas de mortalidad (Tiempo vs. CL₅₀) calculadas como resultado de las acciones de los metales sobre los organismos, se ajustaron al modelo potencial, siendo éste significativo ($\alpha < 0.05$) en todos los casos, ya que explicó entre 96 y el 99% de la

Posteriormente se realizó un análisis de covarianza para probar la hipótesis nula de igualdad de pendientes (Zar, 1996) y se compararon los valores de las pendientes de cada curva de mortalidad, con la prueba de Tukey, para conocer cual difiere de la otra. Con este análisis fue evidente que existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de mortalidad (Tabla 9).

Tabla 8. Constantes de las ecuaciones de regresión para la determinación de la CL₅₀ a diferentes tiempos, obtenidas de los bioensayos agudos realizados con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.

METAL	ESTADIO	a	b	r ²
cadmio	larvas	150810.76	- 2.9634	0.996
chromo	larvas	10223.021	- 1.8695	0.999
plomo	larvas	221824510.6	- 4.19977	0.998
cadmio	juveniles	4.78	- 0.5456	0.987
chromo	juveniles	1574.126	- 1.3244	0.992
plomo	juveniles	64069300.43	- 3.88501	0.994
cadmio	adultos	407175.51	- 2.9065	0.969

Tabla 9 . Análisis de covarianza de las pendientes de las curvas de mortalidad (tiempo vs. CL₅₀) calculadas en las pruebas agudas con larvas, juveniles y adultos de *A. ventricosus*.

METAL	X ²	XY	Y ²	N	RESIDUO SS	G. L	COMP.	Q	CONCLUSIÓN
Cd (L)	138.08	17.09	7.6	7	5.5	5	Cd / Cr	22.6	Rechaza Ho
Cr (L)	138.08	70.42	58.38	7	22.5	5	Cd / Pb	16.5	Rechaza Ho
Pb (L)	138.09	57.78	61.93	7	37.8	5	Cr / Pb	28.7	Rechaza Ho
Cd (J)	111.82	12.01	1.71	6	0.43	4	Cd / Cr	25.1	Rechaza Ho
Cr (J)	87.13	63.47	61.5	5	15.3	3	Cd / Pb	65.3	Rechaza Ho
Pb (J)	64.20	24.14	23.61	4	14.5	2	Cr / Pb	43.2	Rechaza Ho
Cd (A)	138.08	33.37	29.54	7	21.5	5	Cd / Cr	21.4	Rechaza Ho
Cr (A)	111.82	227.16	653.78	6	192.3	4	Cd / Pb	13.8	Rechaza Ho
Pb (A)	86.74	164.49	585.99	4	274.04	2	Cr / Pb	7.03	Rechaza Ho
Combinado					583.82	35			Rechaza Ho
Común	1014.07	669.97	1484.12		1041.5	37			

Valor del estadístico F = 3.4.

La CL₅₀ asintótica se obtuvo experimentalmente entre las 120 a 168 horas de exposición a los xenobióticos y sus mezclas (Tabla 10).

Tabla 10. CL₅₀ asintóticas (Concentración en la cual no ocurren decesos después que perecieron los organismos sensibles), obtenidas experimentalmente en los bioensayos agudos con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales y sus mezclas.

METAL	LARVAS		JUVENILES		ADULTOS	
	CL ₅₀ asin. (mg/L)	Tiempo (horas)	CL ₅₀ asin. (mg/L)	Tiempo (horas)	CL ₅₀ asin. (mg/L)	Tiempo (horas)
Cadmio	0.050*	144	0.341*	144	0.25*	144
Cromo	0.938*	144	2.051*	168	3.94	120
Plomo	0.193*	144	0.680*	120	3.65	120
Cd + Cr	0.312	144	0.052	144	0.44*	120
Cd + Pb	0.330	144	0.033	144	0.72	144
Cr + Pb	1.010*	168	0.216*	144	5.94*	120
Cd + Cr + Pb	0.049*	144	0.083*	120	0.76	120

En las pruebas con larvas la CL_{50} asintótica se detectó a las 144 horas de exposición a los metales, mientras que en los experimentos con juveniles se observó entre las 120 a 168 horas y en los ensayos con adultos esto sucedió entre las 120 a 144 horas. En general, las concentraciones en que ya no se presentan más decesos, después de la exposición aguda, son entre 2 a 40% menores a las CL_{50} (96 horas).

Al comparar los valores de la CL_{50} asintótica, se observó que son diferentes significativamente ($p < 0.01$) con excepción de los registrados en las pruebas con larvas y juveniles expuestos a las mezclas Cd + Cr y Cd + Pb, en adultos con los metales Pb y Cr y en las mezclas Cd + Pb y Cd + Cr + Pb.

Los valores obtenidos para la TL_{50} (Tiempo Letal 50) muestran que el tiempo promedio (horas) para que se registren decesos en las pruebas con larvas, juveniles y adultos expuestos a elevadas concentraciones de cadmio (2.5 y 1.25 mg/l) es menor (79 horas), si se compara con el que tiene que transcurrir para que se observen defunciones causadas por la exposición a los otros dos metales en concentraciones similares (119 horas para plomo y 154 horas para cromo) (Tabla 11).

Asimismo, los juveniles expuestos a concentraciones agudas de cadmio y plomo murieron antes que las larvas y los adultos. En los bioensayos donde los juveniles se expusieron al cadmio se observó que éstos expiraron a las 22 horas posteriores de iniciado el experimento, mientras que las larvas sucumbieron a las 88 horas y los adultos a las 110 horas. En los ensayos con plomo los juveniles murieron a las 70 horas de exposición, mientras que las larvas a las 106 horas y los adultos a las 179 horas

primeras 107 horas de iniciada la prueba, mientras que los adultos a las 168 horas y los juveniles a las 186 horas (Tabla 11).

Tabla 11. TL₅₀ (Tiempo Letal 50) calculado para cada concentración de metal probada en los bioensayos con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.

METAL Concentración mg/l	TL ₅₀ Tiempo Letal 50 (horas)		
	larvas	juveniles	Adultos
Cadmio			
2.5	69.56	12.012	22.8
1.25	81.019	17.18	47.54
0.62	92.96	39.19	260.5
0.2 (NOM –001-96)	111.89	410	1881
0.1 (NOM –001-96)	126.43	1207	6314
Cromo			
2.5	95.3	153.6	153.26
1.25	120.44	219	183
0.62	141.84	396.55	219.04
1.0 (NOM – 001-96)	132.5	276	193.8
0.5 (NOM – 001-96)	144.9	466.34	231.45
Plomo			
2.5	101.91	68.08	177.4
1.25	111.56	72.96	182.06
0.62	122.22	78.26	184.6
0.2 (NOM – 001-96)	111.89	410	1881

En los bioensayos con las mezclas de metales se observó, con base en el cálculo de las unidades tóxicas (Tabla 12), que la combinación más dañina tanto para larvas como para juveniles y adultos fue Cd + Cr + Pb. El tipo de interacción observada en esta mezcla fue de potenciación en los experimentos con larvas, juveniles y adultos (Tabla 12).

Tabla 12. Unidades tóxicas, tipo de interacción y grado de magnificación del efecto observado en las pruebas con mezclas de metales sobre larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*.

COMBINACIÓN DE METALES	CL ₅₀ (mg/l) 96 horas	UNIDADES TÓXICAS	TIPO DE INTERACCIÓN DE LA MEZCLA	MAGNIFICACIÓN
LARVAS				
Cd + Cr	0.757	1.922	Antagonismo	0
Cd + Pb	0.753	2.181	Antagonismo	0
Cr + Pb	2.29	1.683	Antagonismo	0
Cd + Cr + Pb	0.967	0.821	Potenciación	1X
JUVENILES				
Cd + Cr	0.901	1.269	Antagonismo	0
Cd + Pb	0.77	1.431	Antagonismo	0
Cr + Pb	0.50	0.374	Potenciación	2X
Cd + Cr + Pb	0.302	0.403	Potenciación	2X
ADULTOS				
Cd + Cr	0.543	0.371	Potenciación	2X
Cd + Pb	0.84	0.591	Potenciación	1X
Cr + Pb	16.06	2.022	Antagonismo	0
Cd + Cr + Pb	1.31	0.660	Potenciación	1X

Asimismo en las pruebas con adultos y las mezclas Cd + Cr, y Cd + Pb, su tipo de interacción fue de potenciación. En los demás casos se observó que el tipo de acción entre las combinaciones de metales fue de antagonismo (Tabla 12).

El grado de magnificación del efecto en las mezclas de metales, donde se observó que su tipo de interacción era de potenciación, varió de 1X en las pruebas con larvas y adultos a 2X en los ensayos con juveniles, todos ellos expuestos a la mezcla Cd + Cr + Pb (Tabla 12). Asimismo en los experimentos con adultos expuestos a la mezcla Cd + Cr se observó que el grado de magnificación del efecto de esta mezcla es de 2X si se compara con el detectado en las pruebas con los metales por separado.

Tabla 13 . Comparación entre las CL₅₀ a 96 horas y sus intervalos de confianza, obtenidos en las pruebas con los metales y la mezcla Cd + Cr + Pb (mix), en los bioensayos realizados con *Argopecten ventricosus*.

ESTADIO	metales	Valor del estadístico	Valor critico ($\alpha < 0.05$)	Diferencia
larvas	Cd vs. mix	4.67	7.00	No diferencia
larvas	Cr vs. mix	8.3	2.03	Significativa
larvas	Pb vs. mix	8.42	1.07	Significativa
juveniles	Cd vs. mix	1.311	11.79	No diferencia
juveniles	Cr vs. mix	11.25	9.93	Significativa
juveniles	Pb vs. mix	11.83	2.76	Significativa
adultos	Cd vs. mix	1.66	1.75	Significativa

También se observó que después de 96 horas de exposición a las mezclas cuya interacción fue de potenciación, el grado de magnificación del efecto aumenta.

Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre las CL_{50} del cadmio y de la mezcla de los tres metales, en los bioensayos realizados con larvas, juveniles y adultos (Tabla13).

3.2 Efectos en la fijación de larvas pediveliger

En los experimentos con las larvas pediveliger se observó de manera general que el número de organismos que se fijaron al sustrato fue menor en los tratamientos con los metales que en los testigos.

Se observaron diferencias significativas entre los valores registrados en los ensayos con organismos expuestos a los xenobióticos con los no expuestos a las 24, 48 y 72 horas de observación ($p < 0.05$) (Figura 7 y 8).

En concentraciones agudas de metales (0.625 a 2.5 mg/l) hubo una reducción en el número de larvas fijas al sustrato, que varió de 71% en las pruebas con cadmio, del 83% en los ensayos con cromo y del 80% en los experimentos con plomo (72 horas de exposición); pero no se observaron diferencias significativas en las respuestas evaluadas con cada uno de los metales entre sí ($p > 0.72$) (Figura 7).

En concentraciones subletales (0.039 a 0.156 mg/l) (72 horas), también se observó una reducción del porcentaje de larvas adheridas al sustrato: del 71% en las

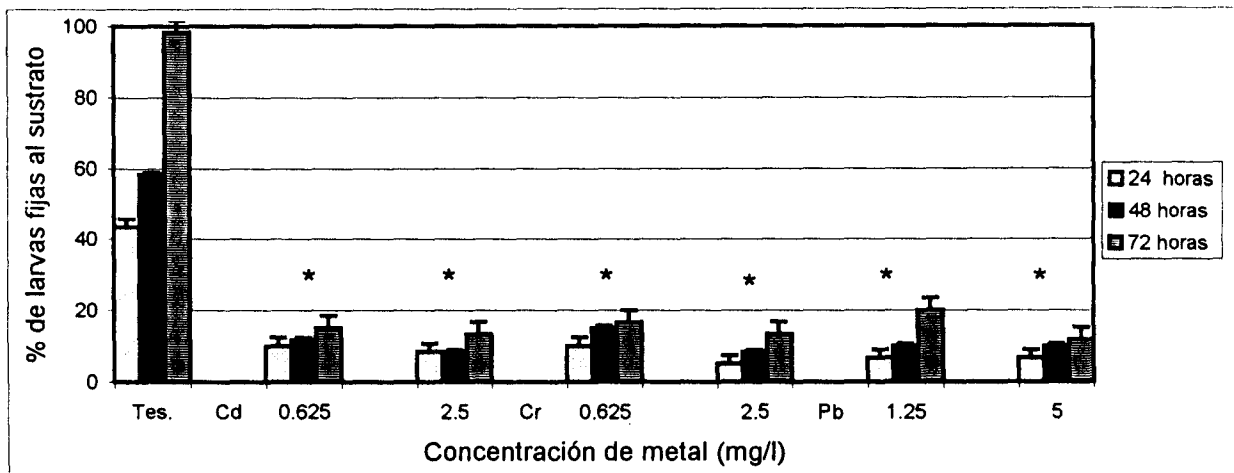


Figura 7. Porcentaje de larvas de *Argopecten ventricosus* que se fijaron al sustrato en las pruebas donde se expusieron a concentraciones agudas de los metales Cd, Cr y Pb.

*Diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con metales ($p < 0.05$).

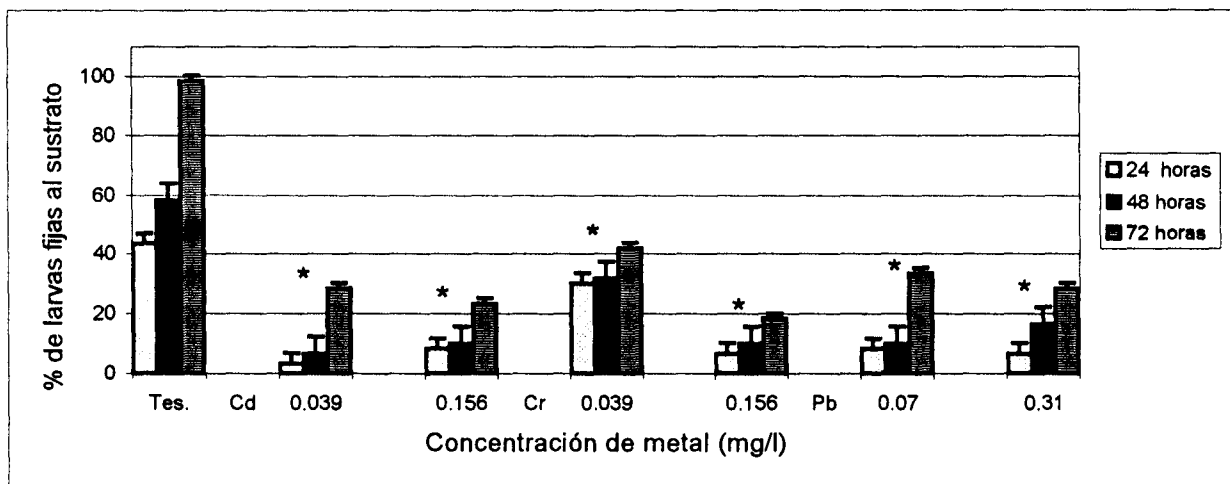


Figura 8. Porcentaje de larvas de *A. ventricosus* que se fijaron al sustrato en las pruebas donde se expusieron a concentraciones subletales de los metales Cd, Cr y Pb.

*Diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con metales. ($P < 0.05$).

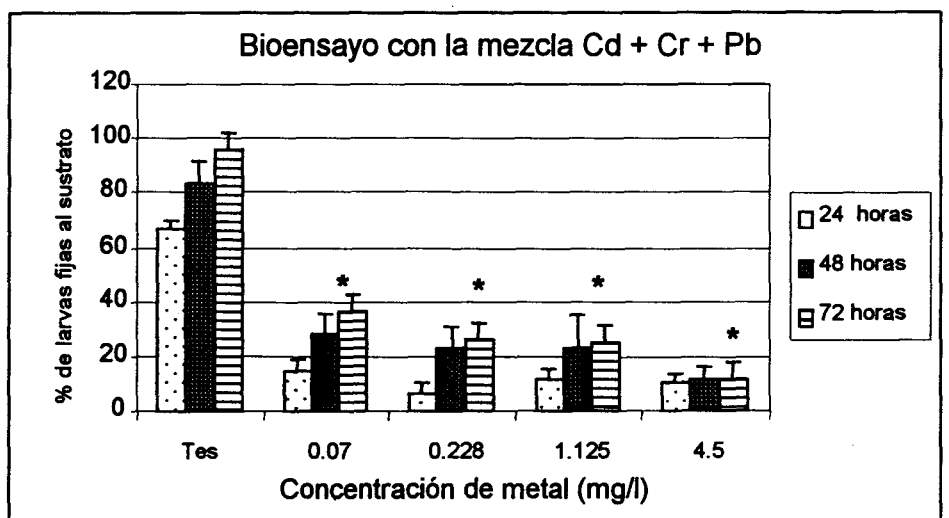
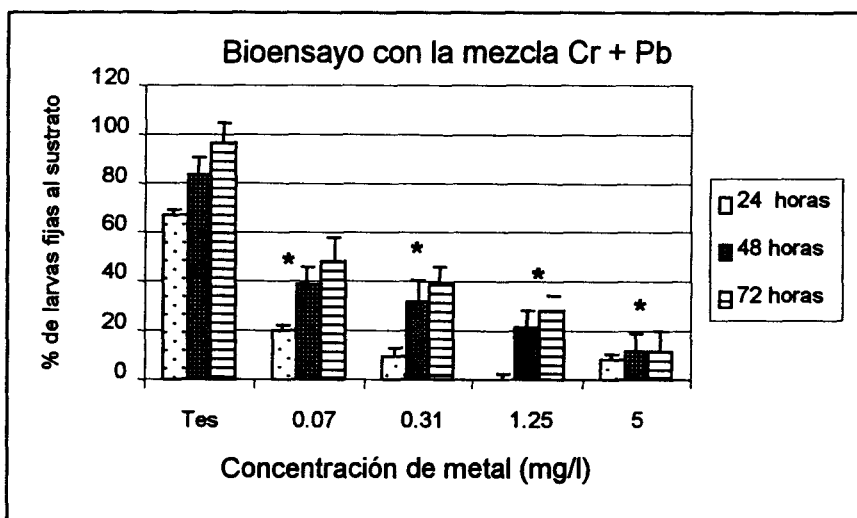
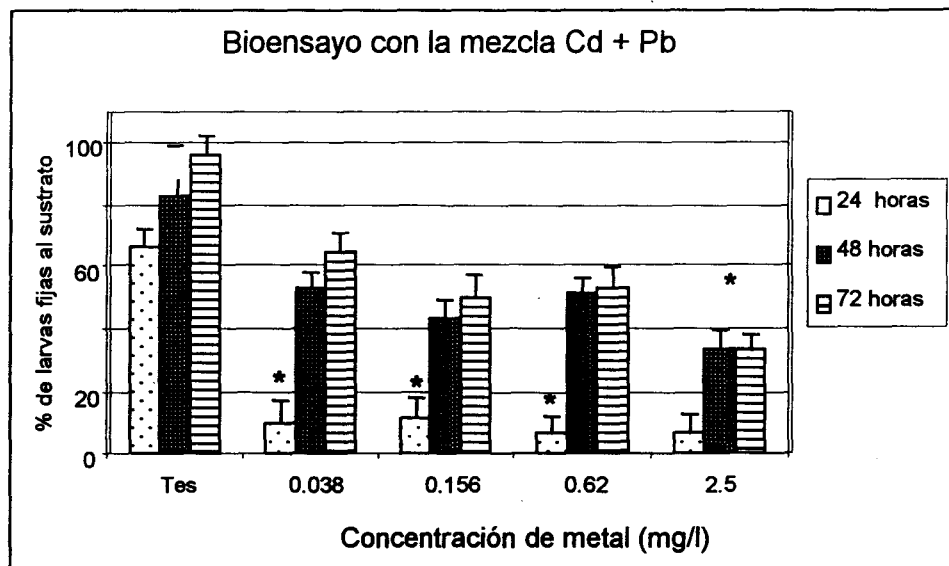
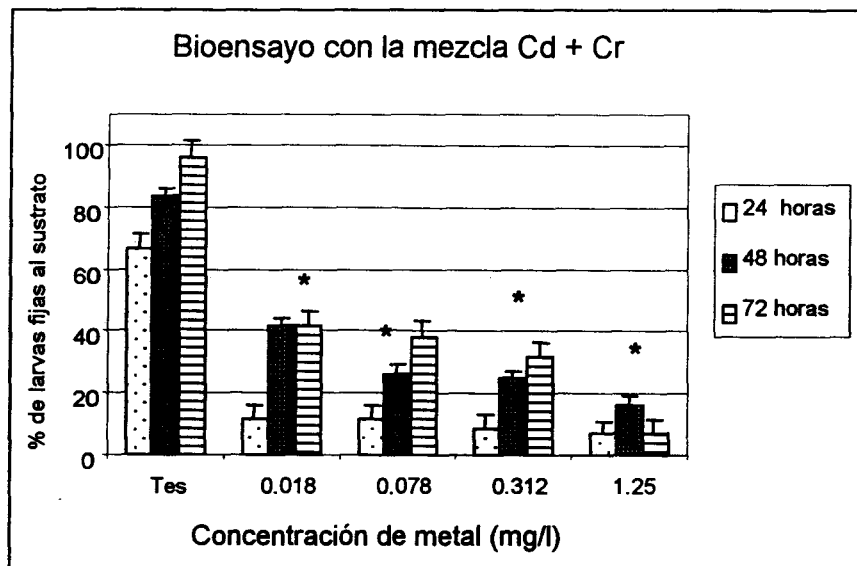


Figura 9. Porcentaje de larvas de almeja catarina que se fijaron al sustrato, en las pruebas donde se expusieron a las mezclas de metales.

•Diferencias significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$)

En todos los casos existe diferencia significativa entre las respuestas de los testigos en comparación con los diferentes tratamientos ($p < 0.05$), pero no se observó diferencia significativa en los valores obtenidos con cromo y plomo entre si (Figura 8).

En las pruebas con las mezclas de metales se detectó que existen diferencias significativas en el número de larvas que se fijaron, en las pruebas donde se expusieron a concentraciones agudas y subletales, así como en los diferentes tiempos de evaluación (24, 48 y 72 horas) ($p < 0.05$) (Figura 9).

En la mezcla Cd + Cr se observó disminución en el porcentaje de fijación de las larvas expuestas a concentraciones agudas (1.25 a 5.0 mg/l) de 93% y en concentraciones subletales (0.038 a 0.325 mg/l) del 58%. Para las combinaciones Cd + Pb, Cr + Pb y Cd + Cr + Pb se registraron decrementos en la fijación de las larvas, en concentraciones agudas del 66.7%, 71.67% y 88.4% respectivamente y en concentraciones subletales del 35%, 52% y 64%. El efecto más drástico en este proceso se observó en la pruebas con la mezclas Cd + Cr y Cd + Cr + Pb (Figura 9).

3.3 Efectos en el crecimiento de juveniles de *A. ventricosus*

Los juveniles de almeja catarina expuestos a los metales tóxicos y sus mezclas durante 30 días, tuvieron una reducción significativa ($p < 0.05$) en sus tasas de crecimiento y peso en comparación con los testigos (Figura 10).

También se detectó la existencia de diferencias significativas en las respuestas a concentraciones agudas de metal (10 y 1 mg/l) y subletales (0.1 y 0.01 mg/l) ($p < 0.01$).

En concentraciones agudas se observó una reducción del 71% en la tasa de crecimiento de los organismos expuestos a cromo, del 98% en los juveniles tratados

con plomo y del 77% con la combinación Cd + Cr + Pb (Figura 10).

En concentraciones subletales se detectó una disminución en la tasa de crecimiento del 71% en las pruebas con cadmio, de 51% en las de cromo, de 35% con plomo y de 58% con la mezcla Cd + Cr + Pb (Figura 10). Las respuestas registradas mostraron ser diferentes significativamente en todos los casos en comparación con el testigo ($p < 0.05$).

La CE_{50} (concentración de metal que causa una disminución de 50% en la tasa de crecimiento) para los organismos expuestos a cadmio fue de 0.047 mg/l, para los tratados con cromo de 0.525 mg/l, de 0.650 mg/l para las pruebas con plomo y de 0.165 mg/l para los ensayos con la mezcla Cd + Cr + Pb. El grado de efecto observado (de mayor a menor) con los diferentes metales probados, sobre el crecimiento de los juveniles de *A. ventricosus* fue:

$$Cd > Cd + Cr + Pb > Cr > Pb.$$

El peso (mg) de los organismos expuestos a los metales y sus mezclas fue menor en comparación al que alcanzaron los testigos durante los 30 días que transcurrió el bioensayo.

El promedio en la disminución del peso fue de 84% para los juveniles expuestos a cadmio, de 83% en los tratamientos con cromo, del 86% para los especimenes expuestos a la mezcla Cd + Cr + Pb y de 76% para los que estuvieron en contacto con plomo (Figura 11). En todos los casos se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo ($p < 0.05$).

Pero no hubo diferencias en las respuestas del cadmio y cromo entre si (Figura 11).

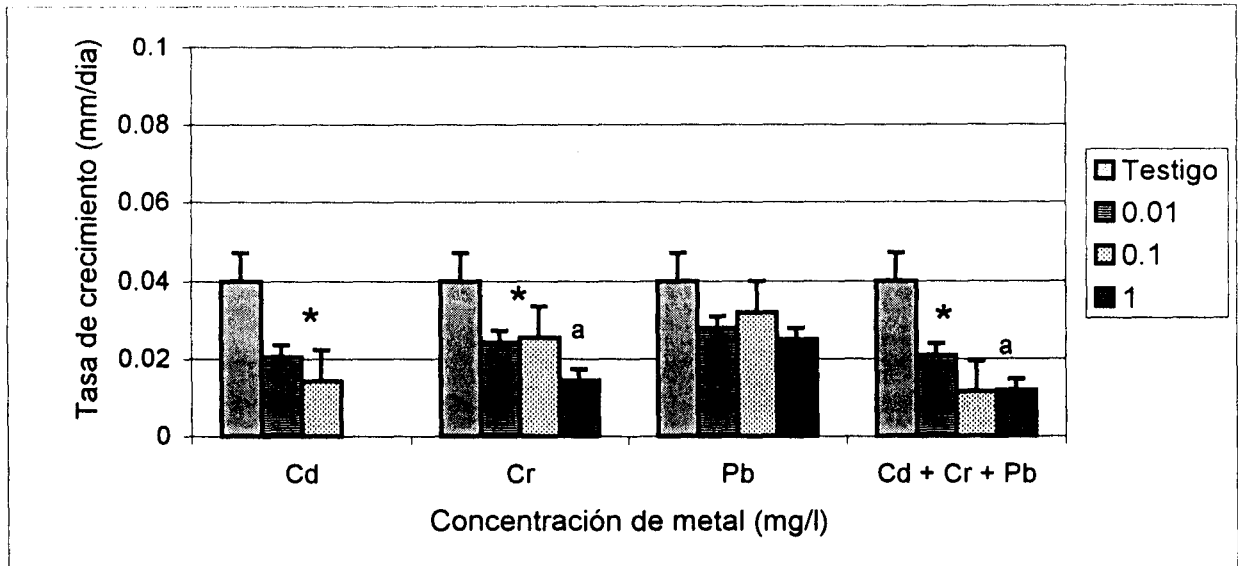


Figura 10. Tasa de crecimiento (mm/día) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. *Diferencias significativas en comparación con el testigo.

^aDiferencias significativas entre concentraciones agudas y subletales ($p < 0.05$).

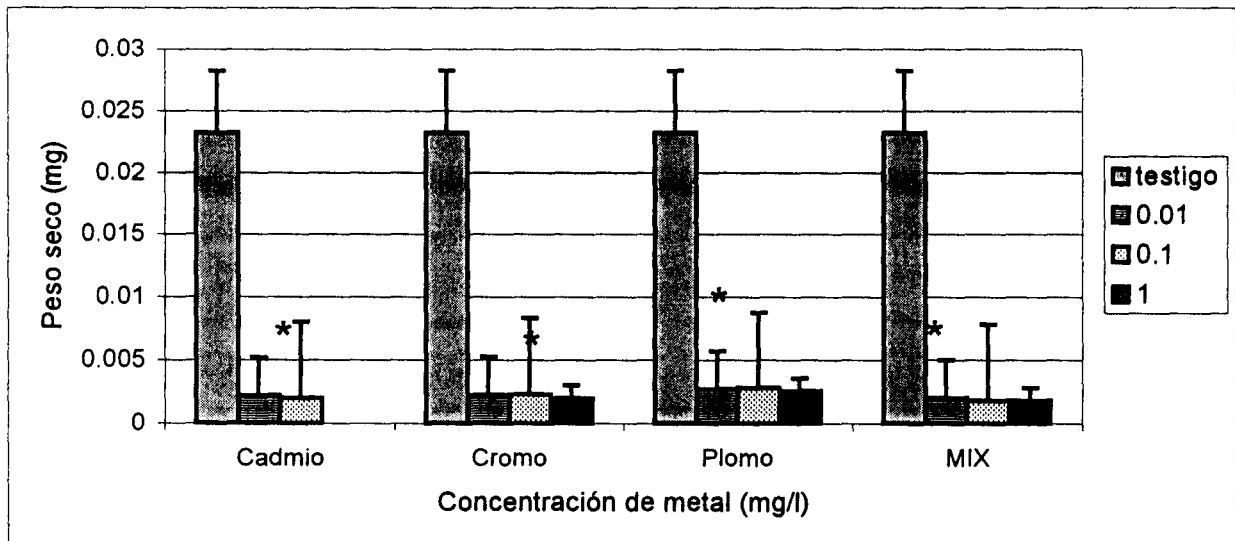


Figura 11. Peso seco (mg) de juveniles de *A. ventricosus* expuestos a metales tóxicos.

*Diferencias significativas en comparación con el testigo ($p < 0.05$).

concentraciones de 1.25 y 2.5 mg/l durante las primeras 4 horas de haberse iniciado el experimento, así como en los que fueron tratados con las mezclas Cd + Cr y Cd + Cr + Pb en las primeras 6 horas.

Esos desplazamientos cesaron después de que transcurrieron las primeras 12 horas de exposición a los xenobióticos.

3.4.2 Apertura máxima de valvas

Las almejas abren sus valvas, con lo cual se observan algunas de sus estructuras internas como las branquias, permaneciendo en esta situación de 6 a 25 segundos (Figura 12). Estos movimientos son repetitivos.

Tal comportamiento se observó en los organismos expuestos a cadmio en concentraciones de 0.62, 1.25 y 2.0 mg/l y en los tratados con cromo en concentraciones de 2.5, 5.0 y 10 mg/l.

Cabe mencionar que en las pruebas con cadmio, también se advirtió que las almejas expulsaron pequeños cangrejos que se encontraban dentro de ellas como comensales, de manera similar a una regurgitación durante las primeras horas de exposición a este metal en concentraciones de 1.25 y 2.0 mg/l.

La mayoría de los cangrejos expulsados se encontraban moribundos.



Figura 12. Cambios en el comportamiento de *Argopecten ventricosus* (abertura máxima de valvas) ocasionado por la exposición a metales tóxicos.

3.4.3 Velocidad en el cierre de valvas

El tiempo que tardan las almejas en cerrar sus valvas en respuesta a un estímulo simple, como fue tocarlas con una varilla de vidrio, se evaluó durante los bioensayos.

Los organismos expuestos a cadmio en concentraciones de 1.25 y 2.0 mg/l cierran sus valvas en un lapso similar al observado en los testigos, que fue de décimas de segundo, durante las primeras 24 horas de exposición. Posteriormente, la respuesta

de cierre de valvas fue más lenta, ya que tardan de 3 a 8 segundos para realizar esta actividad.

En las pruebas con plomo (2.5 y 5.0 mg/l) después de 96 horas de exposición, se observó un incremento en el tiempo requerido para el cierre de sus valvas, que se ubicó entre 12 y 18 segundos, en tanto que los tratados con cromo no mostraron variaciones en esta actividad, ya que el tiempo en que cerraban sus valvas fue de décimas de segundo, es decir, bastante similar al observado en los testigos.

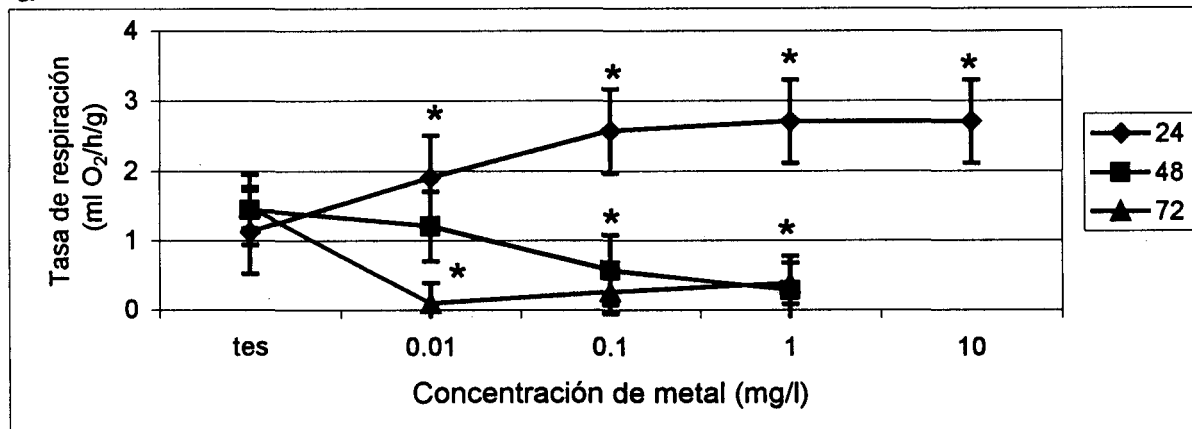
3.5 Efectos en la tasa de consumo de oxígeno de juveniles y adultos de *A. ventricosus*

La tasa de consumo de oxígeno de los juveniles expuestos a los metales aumentó significativamente ($p < 0.05$) de 100% a 220%, en comparación con el testigo a las 24 horas de exposición. Después de este tiempo se observó un decremento de 60% a las 48 horas y del 40% a las 72 horas de exposición, en las pruebas con cadmio y cromo. En los bioensayos con plomo también se detectó una disminución de 15 a 22% a las 72 horas (Figura 13).

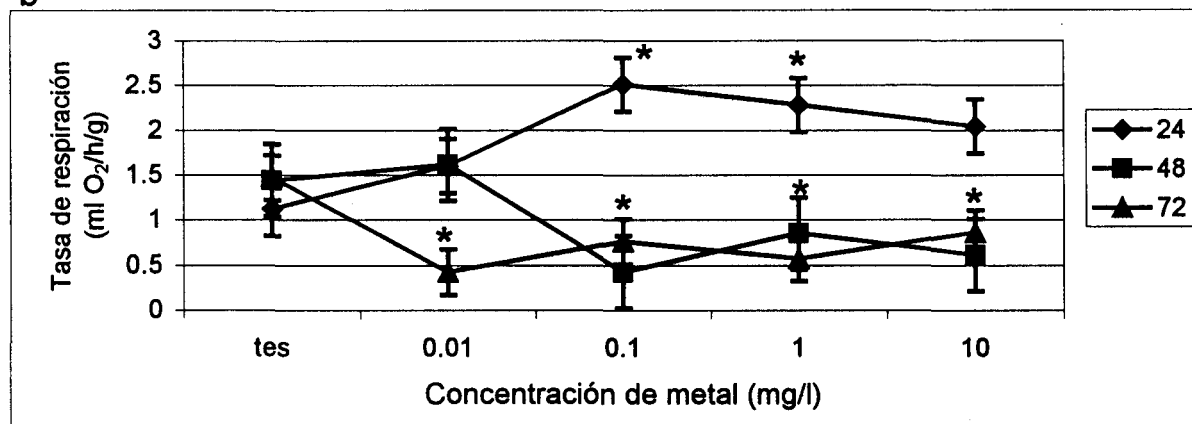
Asimismo se observó que existen diferencias significativas entre los valores registrados a las 24, 48 y 72 horas en los tratamientos con los metales en comparación con el testigo ($p < 0.05$) (Figura 13).

En las pruebas con cadmio, hubo un aumento del 100% de esta tasa en

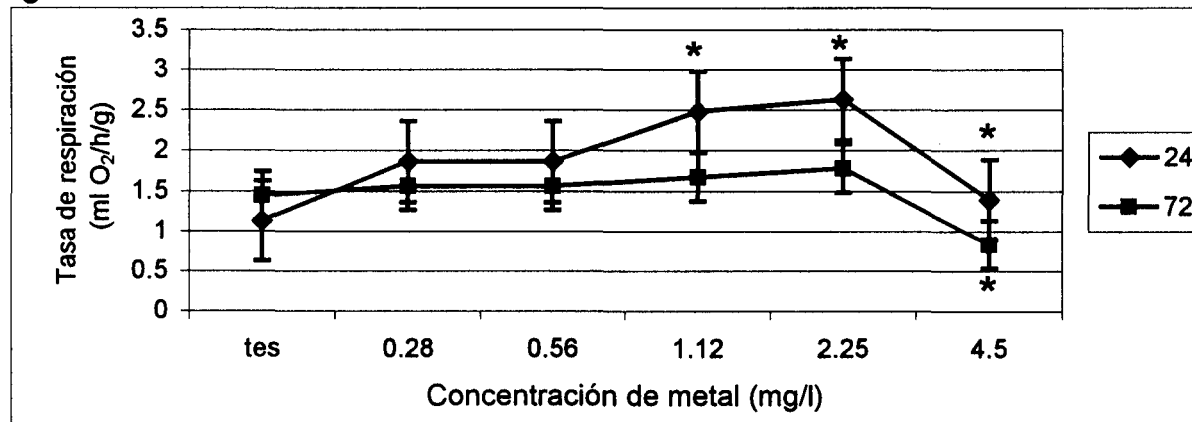
a



b



c



La tasa de consumo de oxígeno durante las pruebas con cromo aumentó a las 24 horas de exposición, en este caso la CE_{100} fue de 0.055 mg/l. A las 48 y 72 horas de tratamiento con este metal, como se mencionó previamente, se detectó un decremento, la CE_{50} a 48 horas fue de 0.711 mg/l y a 72 horas de 2.52 mg/l.

En los experimentos realizados con plomo, hubo un aumento en esta tasa a las 24 horas de exposición, la CE_{100} fue de 0.25 mg/l y a las 72 horas se observó un decremento siendo la CE_{50} de 4.5 mg/l (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de CE_{100} (Concentración efectiva 100) y CE_{50} (Concentración efectiva 50) obtenidos en las pruebas donde se determinó la tasa de respiración de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos.

METALES	CE_{100} mg/l		CE_{50} mg/l	
	24 horas	48 horas	72 horas	
cadmio	0.049	0.450	0.06	
cromo	0.055	0.711	2.52	
plomo	0.910	nd	4.50	

Mezclas	CE_{100} mg/l		CE_{50} mg/l	
	24 horas	24 horas	72 horas	
Cd + Cr	0.048	nd	nd	
Cd + Pb	nd	0.63	nd	
Cr + Pb	nd	2.21	nd	

En los bioensayos con juveniles expuestos 24 horas a las mezclas de metales, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo ($p < 0.05$), además de las respuestas a concentraciones agudas y subletales ($p < 0.05$) (Figura 14). En concentraciones superiores de la CL_{50} (2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 mg/l) hubo una disminución en la tasa de consumo de oxígeno de 20% a 44%, con excepción de la combinación Cd + Cr, en la cual se registró un aumento del 100% en concentraciones de 0.048 mg/l (CE_{100}). (Tabla 14).

En concentraciones subletales (0.125 mg/l) se observó un aumento del 10 al 300% en esta tasa, excepto en la prueba con la mezcla Cd + Pb en la que se observó una disminución del 18% (Figura 14). Para esta combinación la CE_{50} fue de 0.631 mg/l y para la Cr + Pb de 2.21 mg/l. Para la asociación Cd + Cr + Pb se detectó una disminución en esta razón a las 24 y 72 horas de exposición, del 72% en el primer caso y 47% en el segundo (Figura 14). La CE_{50} a 24 horas de tratamiento fue de 0.25 mg/l y para las 72 horas de 0.328 mg/l.

En los bioensayos con adultos expuestos a los metales, la tasa de consumo del oxígeno se incrementó de manera significativa ($p < 0.05$), en comparación con el testigo hasta 150% a las 24 horas de iniciado el experimento. Posteriormente, a las 96 horas se observó una reducción de esta razón, que fue del 45% en las pruebas con cadmio y con los metales cromo y plomo el decremento fue de 78% y 95% respectivamente (Figura 15).

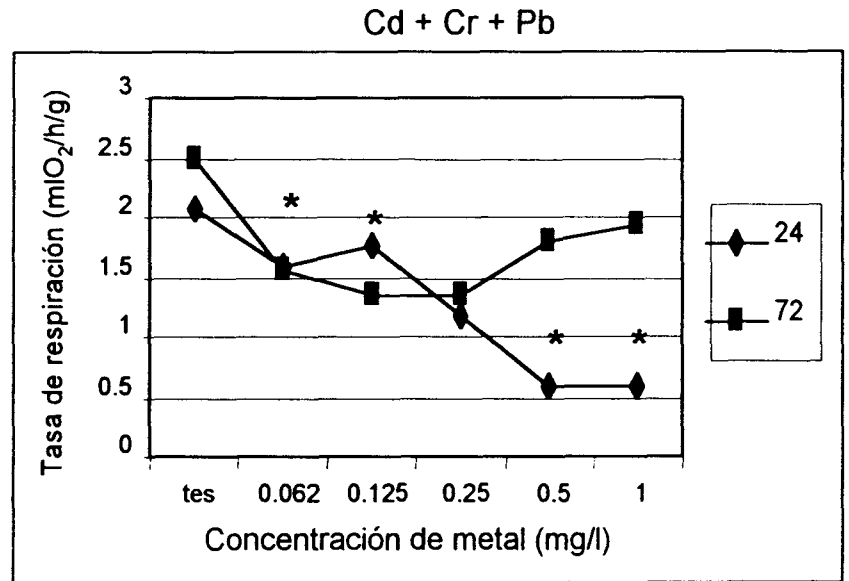
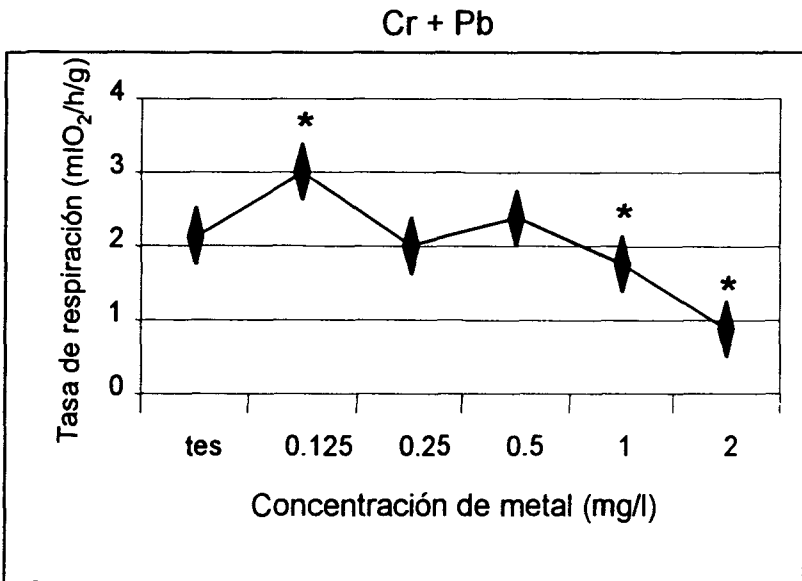
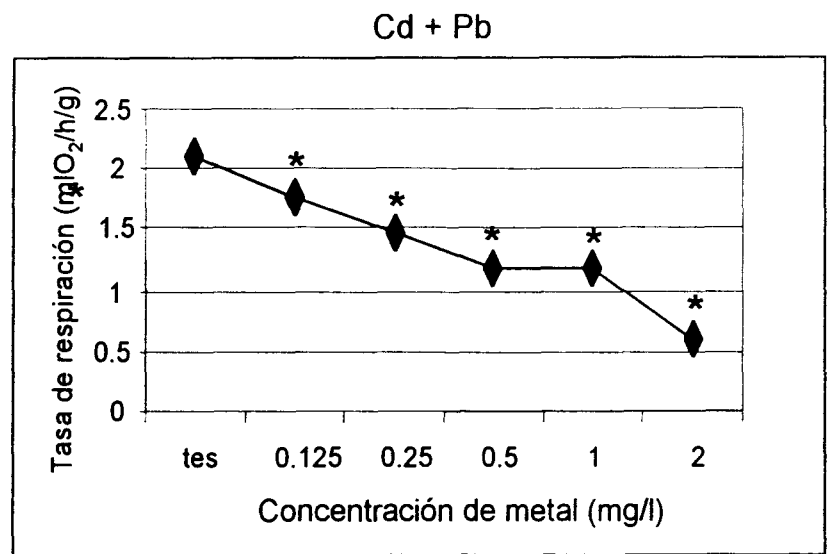
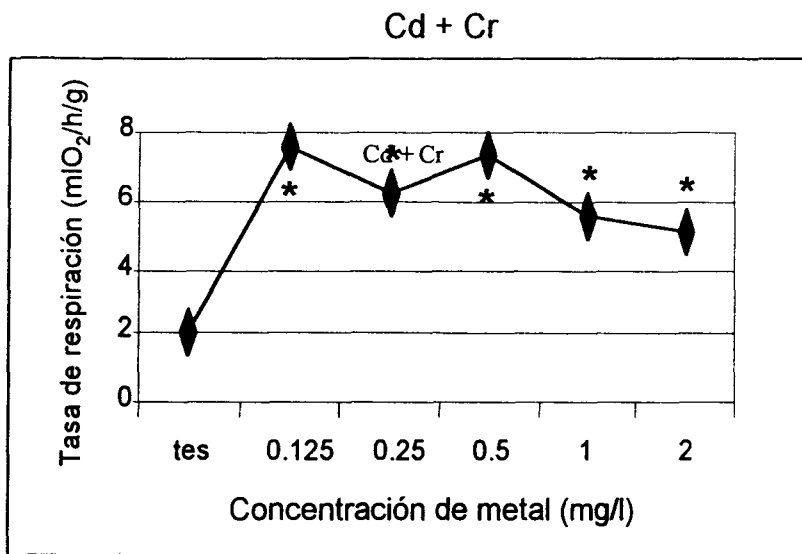


Figura 14. Tasa de respiración (ml O₂/h/g) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas. * Diferencia significativa entre el testigo y los tratamientos con la mezclas de metales (p < 0.05).

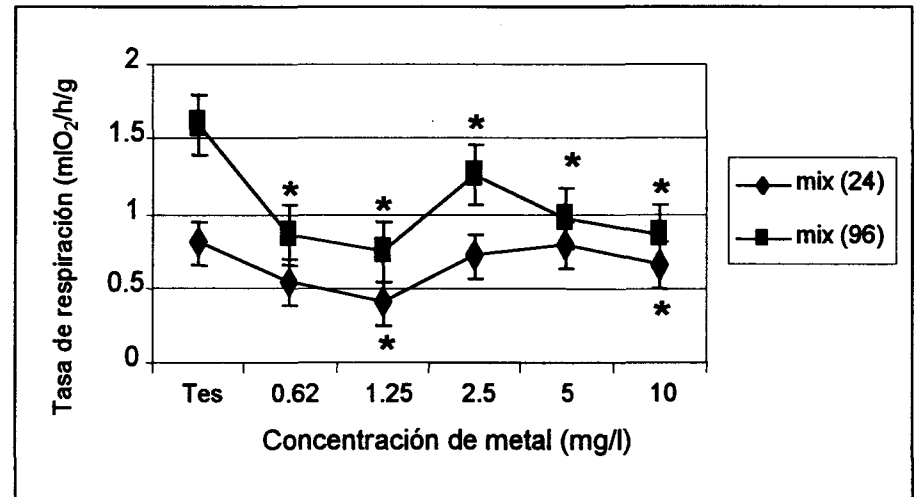
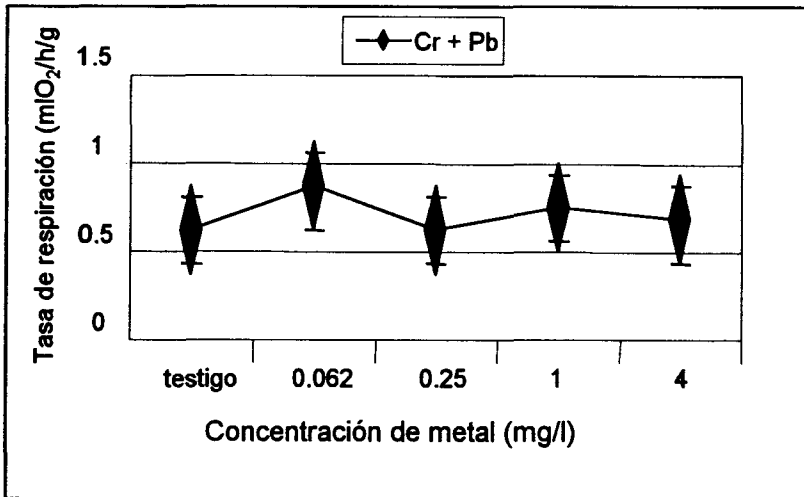
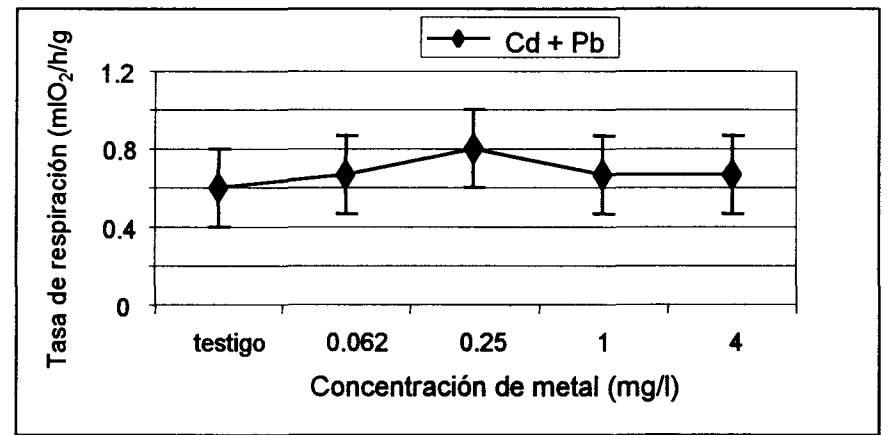
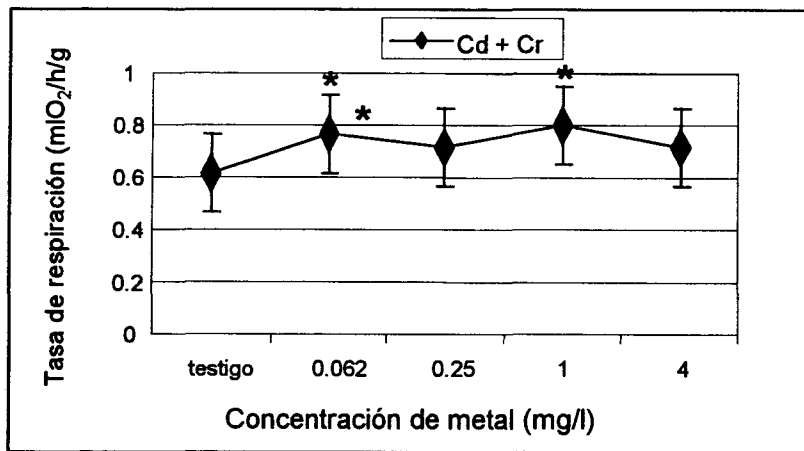


Figura 15. Tasa de respiración (ml O₂/h/g) de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas.

* Diferencias significativas en comparación con el testigo (p < 0.05).

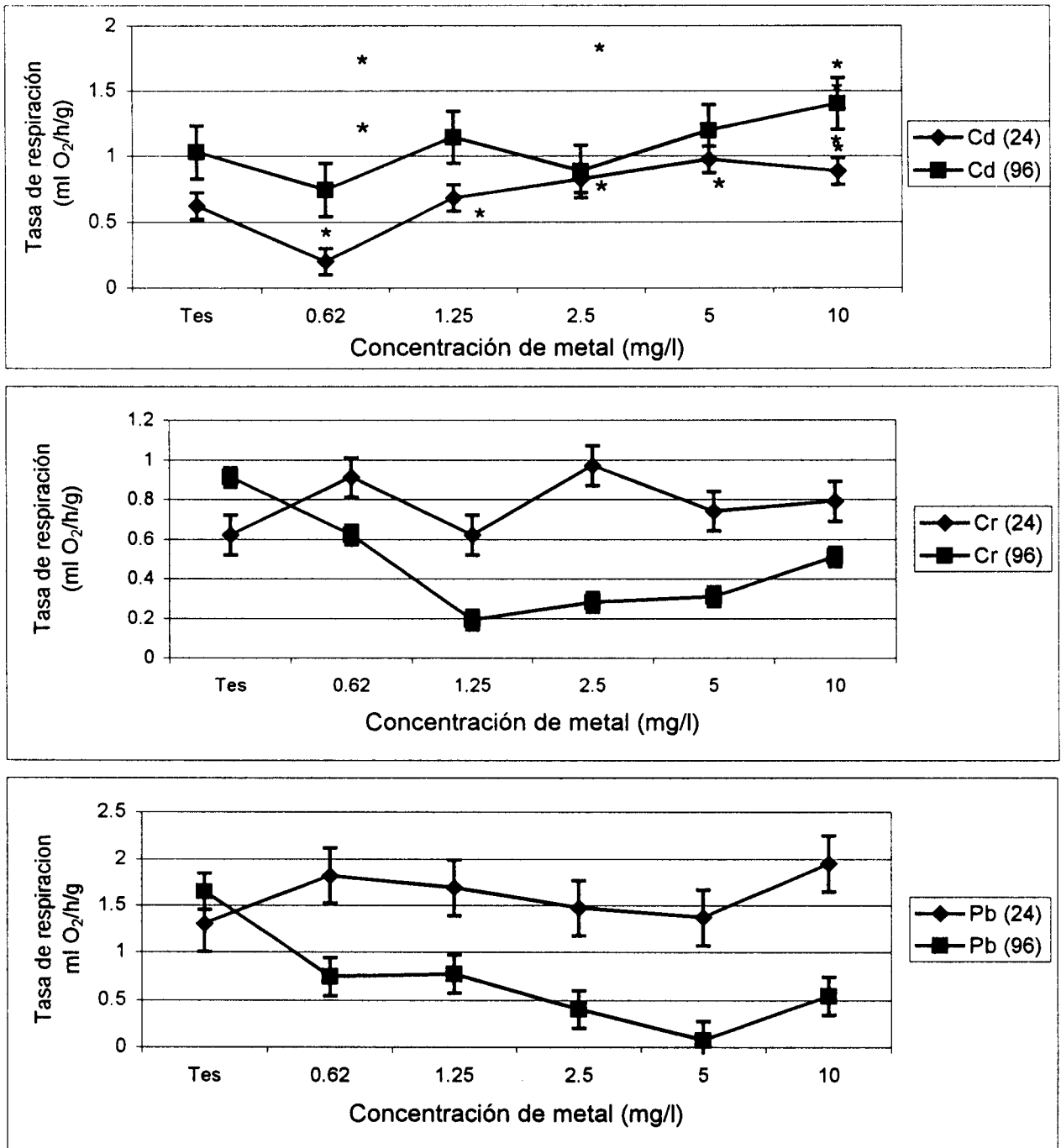


Figura 16. Tasa de respiración (ml O₂/h/g) de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales tóxicos. * Diferencias significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$).

Las CE_{50} calculadas para 96 horas de exposición a los metales fueron para las pruebas con cadmio, cromo y plomo de 0.031 mg/l para el primero, de 9.89 mg/l para el segundo y de 7.41 mg/l para el tercero (Tabla 14).

En los bioensayos con las mezclas de metales se observó un aumento de 31% en ésta tasa, durante la prueba con Cd + Cr a las 24 horas de exposición. En las combinaciones Cd + Pb y Cr + Pb no se observaron diferencias significativas, en comparación con el testigo para este tiempo de prueba ($p > 0.65$) (Figura 16).

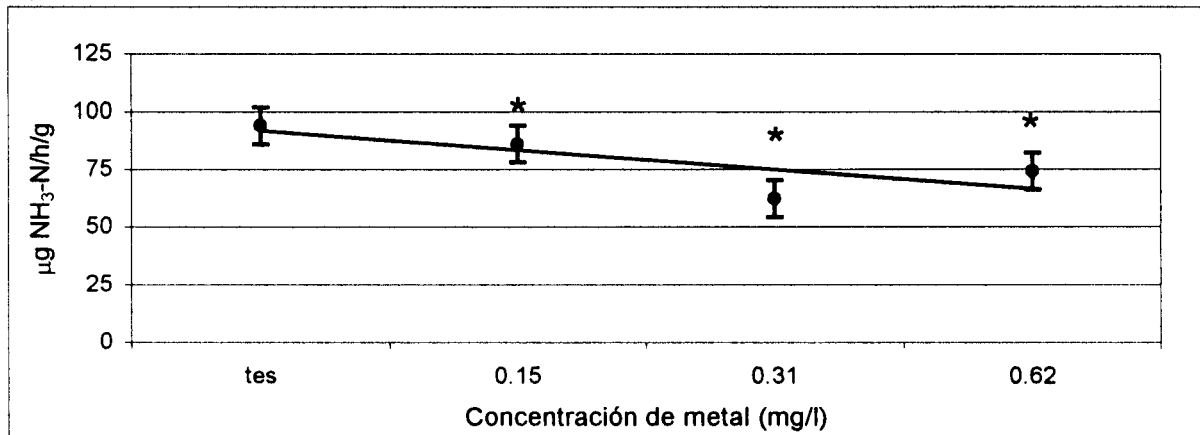
El caso contrario se detectó en la prueba con la mezcla de los tres metales, donde el consumo disminuyó hasta 50% a las 24 horas y 33% a las 96 horas de exposición, siendo diferentes significativamente con el testigo ($p < 0.05$) (Figura 16).

La CE_{50} en la que se registró una disminución del 50% en la tasa de respiración durante las pruebas con la mezcla Cd + Cr + Pb, fue de 0.375 mg/l para 24 horas de tratamiento y de 0.622 mg/l a las 96 horas de exposición.

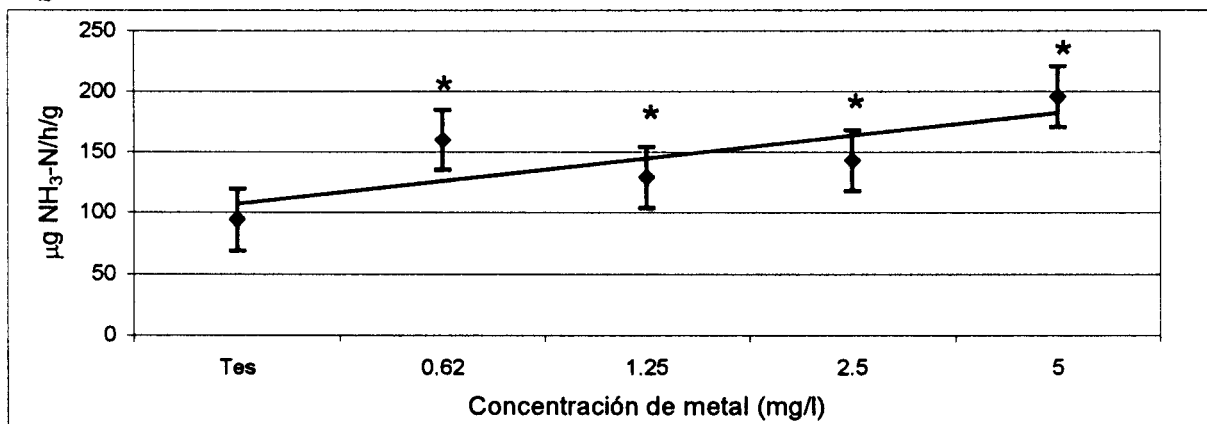
3.6 Efectos en la tasa de excreción de NH_3 -H de juveniles y adultos *A. ventricosus*

La tasa de excreción de NH_3 -H de juveniles expuestos al cromo y plomo aumentó hasta un 150% en comparación con el testigo a las 24 horas de iniciada la prueba. Las concentraciones de metal donde se registró un incremento del 50% fueron de 2.32 mg/l de cromo y 0.218 mg/l de plomo (Figura 17). El caso contrario se detectó en el experimento con cadmio donde hubo un decremento del 64% de esta razón. La CE_{50} (concentración de metal que causa una reducción del 50% de la tasa de excreción en comparación con el testigo) calculada fue de 0.389 mg/l (Figura 17).

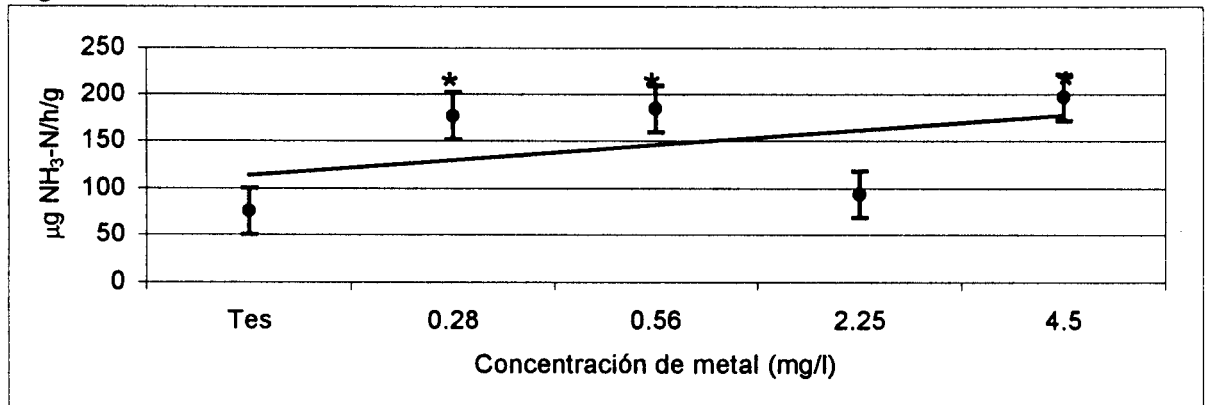
a



b



c



Los valores de los tratamientos en comparación con el testigo, fueron diferentes de modo significativo ($p < 0.005$).

La tasa de excreción aumentó hasta de 350% a 24 horas de exposición, en las pruebas con las mezclas de metales (Figura 18). Las concentraciones donde hubo un aumento del 50% de esta tasa en comparación con el testigo fueron: 0.415 mg/l, 2.5 mg/l, 0.642 mg/l y 0.776 mg/l, para las combinaciones: Cd + Cr, Cd + Pb, Cr + Pb y Cd + Cr + Pb respectivamente.

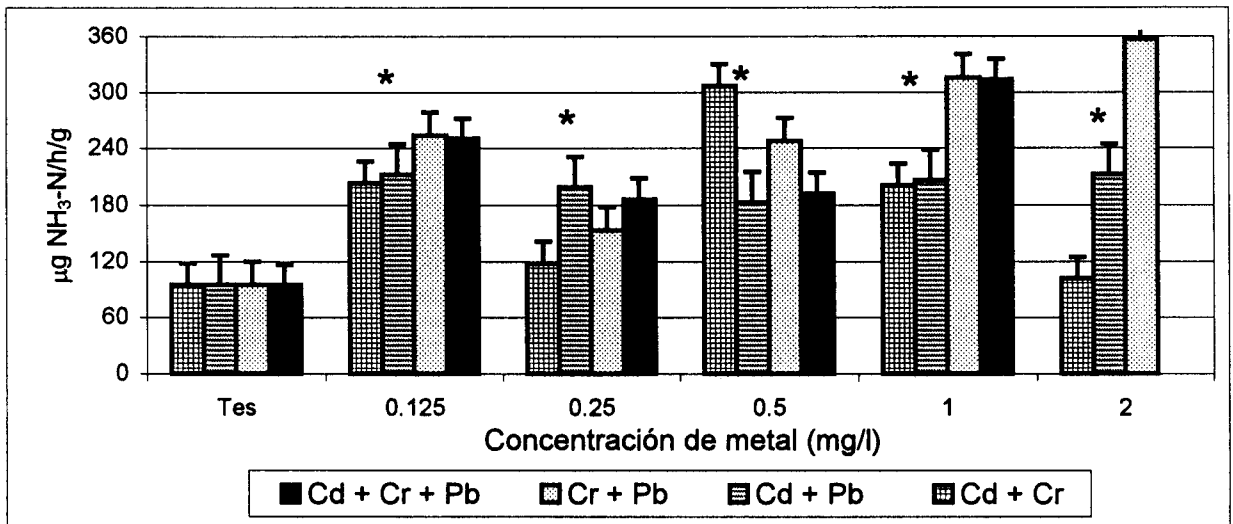


Figura 18. Tasa de excreción de NH₃-N en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas. *Diferencia significativa con el testigo ($p < 0.05$).

En las pruebas con los adultos de la especie expuestos a los metales, se observó un decremento en esta tasa a las 24 horas de exposición, con excepción de lo que ocurrió en los ensayos con cadmio, donde hubo aumento del 115% (Figura 19).

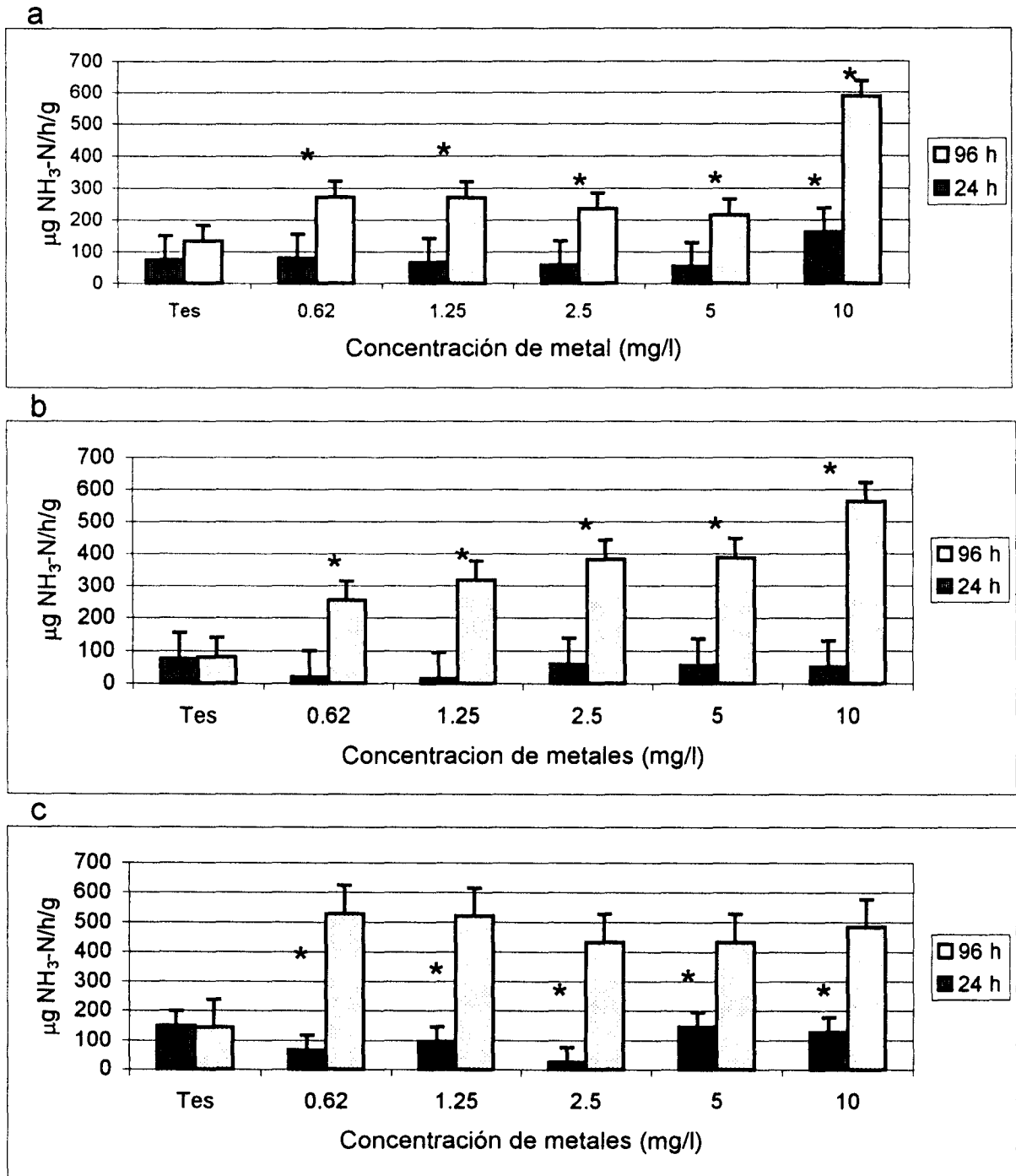


FIGURA 19. Tasa de excreción de $\text{NH}_3\text{-N}$ de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. a) cadmio. b) cromo. c) plomo.

*Diferencia significativa entre el testigo y los tratamientos con metales ($p < 0.05$).

Asimismo, los valores de los tratamientos con los metales y el testigo fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) a las 24 horas de exposición.

La CE_{50} fue de 0.389 mg/l en las pruebas con cromo y de 0.545 para los experimentos con plomo. En concentraciones de 0.808 mg/l de cadmio se observó un aumento del 50% de esta razón.

A las 96 horas de tratamiento con los xenobióticos, se registró un aumento de 40% a 700% de esta tasa (Figura 19). Las concentraciones de metal en las que se observó un aumento del 50% en la tasa de excreción fueron: 0.144 mg/l de cadmio, 0.048 mg/l de cromo y 7.85 mg/l de plomo. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores observados en los tratamientos en comparación con el testigo a las 96 horas de iniciado el bioensayo.

En las pruebas con adultos de almeja expuestos a las mezclas de metales, fue notorio un aumento en esta tasa de 80% a 200% a las 24 horas de exposición (Figura 20).

Las CE_{100} (concentración de metal que causa un aumento del 100% de la tasa de excreción en comparación con el testigo) calculadas fueron de 0.25 mg/l, 0.292 mg/l y 2.55 mg/l para las combinaciones Cd + Cr, Cd + Pb y Cr + Pb respectivamente.

En los experimentos con la mezcla Cd + Cr + Pb se detectó un aumento entre 100 a 300% de esta razón, tanto a las 24 como a las 96 horas de exposición. Las CE_{100} fueron de 0.800 mg/l a las 24 horas de tratamiento y de 0.778 mg/l a las 96 horas de exposición.

Cabe señalar que se obtuvieron diferencias significativas en todos los casos con respecto al testigo ($p < 0.01$).

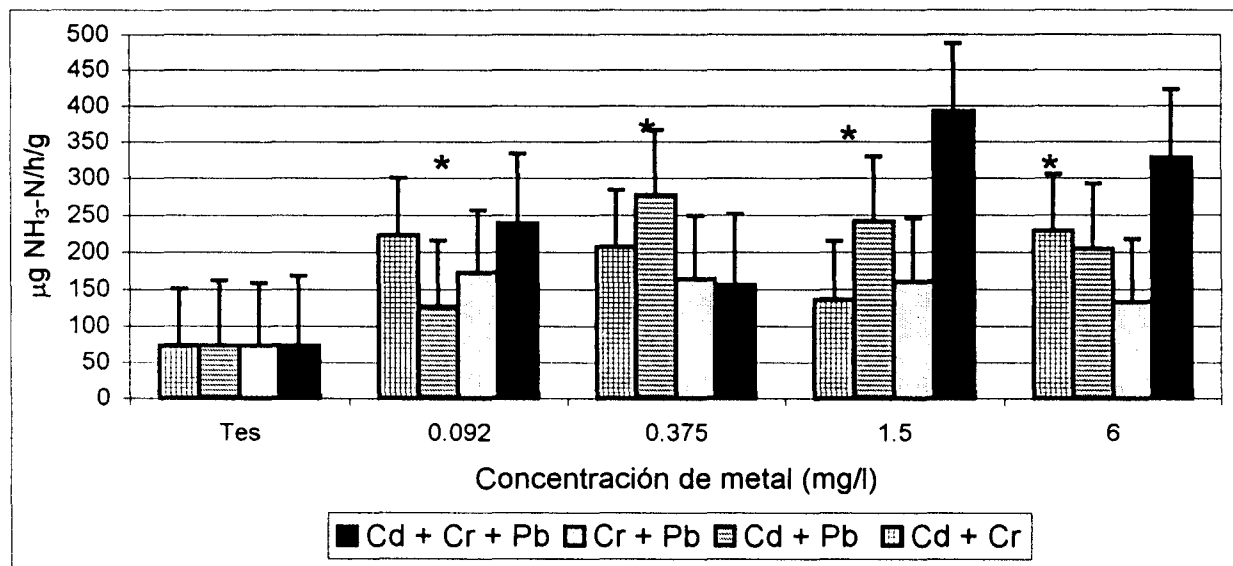


Figura 20. Tasa de excreción de NH₃-N en adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a mezclas de metales durante 24 horas. *Diferencia significativa en comparación con el testigo en todos los casos ($p < 0.05$).

3.7 Efectos en la relación O:N de juveniles y adultos de *A. ventricosus*

Los valores de la relación O:N registrados en los ensayos con juveniles expuestos a los metales durante 24 horas, oscilaron entre 6 a 37. En los experimentos con cromo se registraron las estimaciones más bajas de este índice que variaron de 6 a 16. (Figura 21). En las pruebas con cadmio la relación O:N tuvo una estimación promedio de 23 mientras que en los experimentos con cromo y plomo fueron de 12 y 23.13 respectivamente y en el testigo fue de 36.2. Asimismo, se identificaron diferencias significativas entre el testigo y los diferentes tratamientos con los metales ($p < 0.05$), con excepción de las respuestas de los organismos al cadmio y plomo en las concentraciones de 1.12 mg/l y 4.5 mg/l.

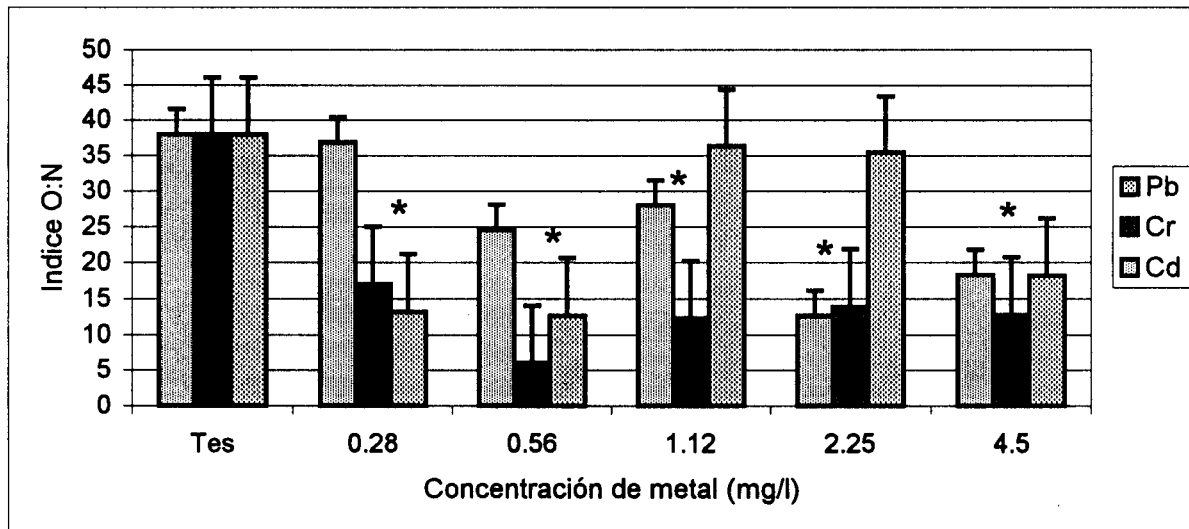


Figura 21. Índice O:N obtenido en bioensayos con juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos durante 24 horas.

*Diferencias significativas en comparación con el testigo ($p < 0.05$).

En los experimentos con juveniles expuestos a las mezclas de metales durante 24 horas, la relación O:N varió de 3 a 60 y fueron las combinaciones: Cd + Pb, Cr + Pb y Cd + Cr + Pb en las cuales se detectaron valores menores a 9, lo que podría indicar que la fuente energética en ese momento eran las proteínas. Este hecho muestra que los juveniles estuvieron en un estado de estrés alto durante el desarrollo de éstas pruebas (Figura 22).

En las concentraciones agudas de metales se obtuvieron los montos más bajos de este índice que variaron de 2 a 7, mientras que en los niveles subletales fueron de 8

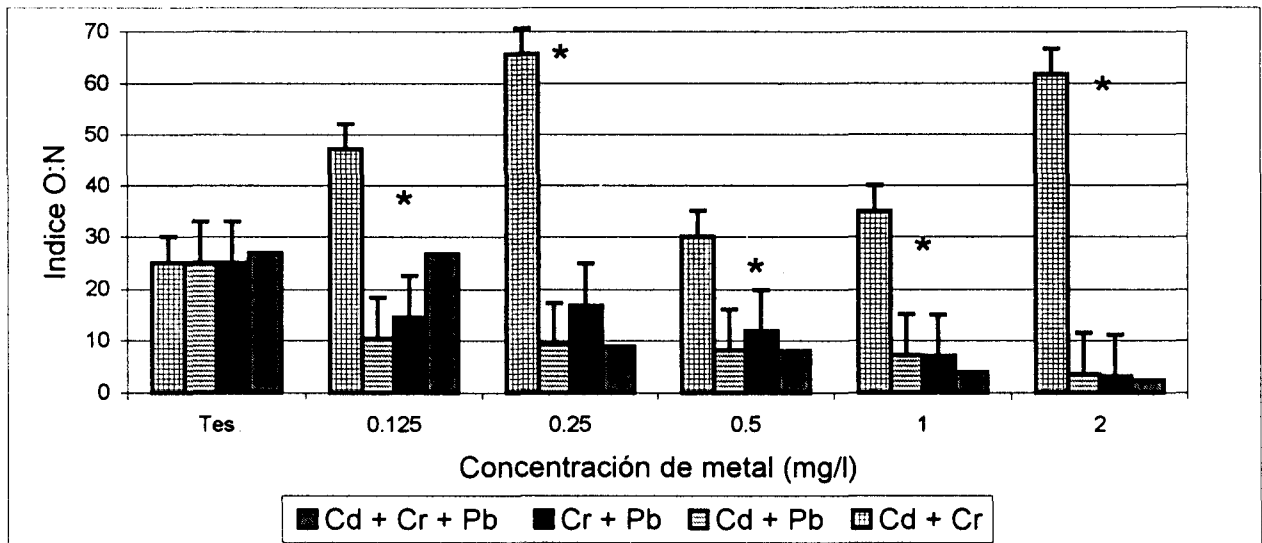
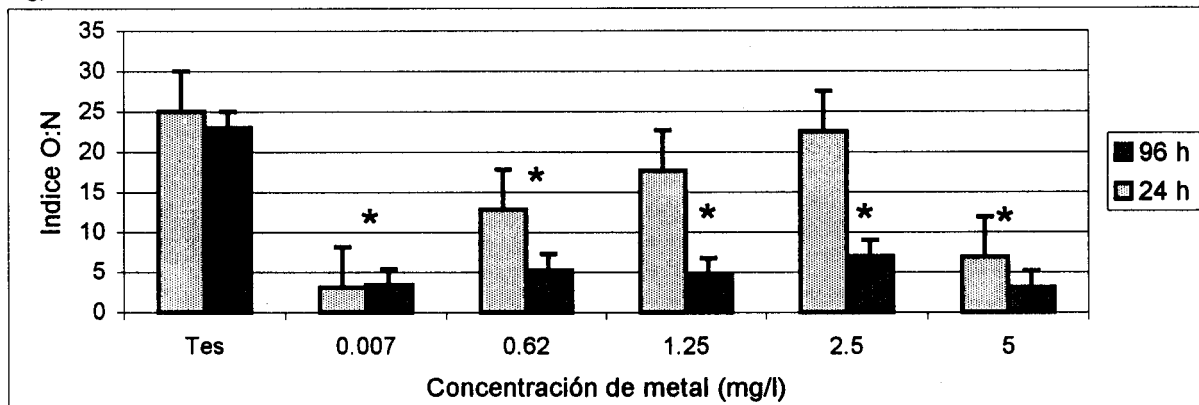


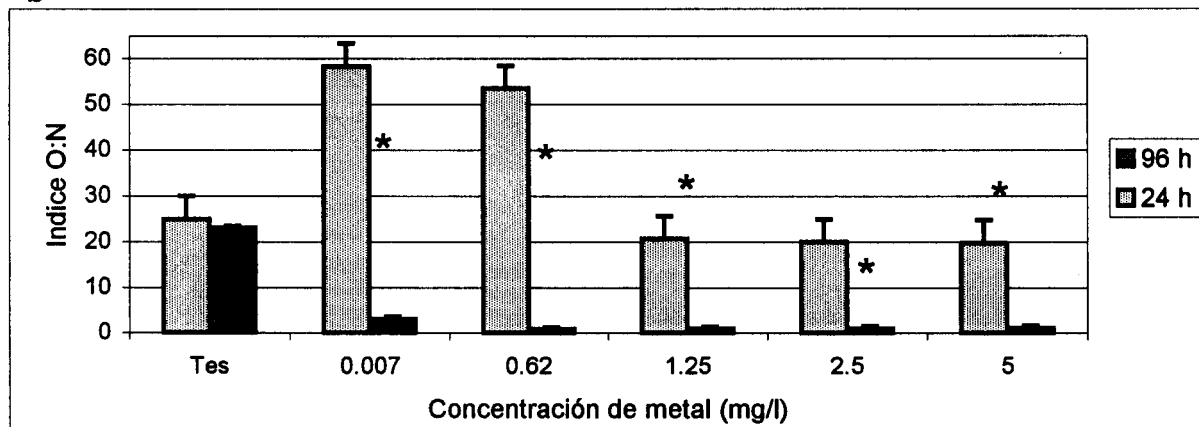
Figura 22. Índice O:N obtenido en bioensayos con juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a las mezclas de metales durante 24 horas. *Diferencias significativas con el testigo ($p < 0.05$).

En los bioensayos con adultos expuestos a los metales, se observó una reducción de la relación O:N de las 24 a las 96 horas de iniciado el experimento. A las 24 horas los valores de esta razón variaron de 6 a 72, mientras que a las 96 horas oscilaron de 3 y 1, señal inequívoca de que los organismos estuvieron en estado de estrés alto (Figura 23). En los ensayos con las mezclas de metales los valores de esta razón oscilaron entre 7 y 3, estas cifras indicaron que el grado de estrés en estas pruebas fue también alto (Figura 24). Para la combinación Cd + Cr + Pb los montos de la relación O:N fueron de 2 a 14, no observándose diferencia significativa entre los valores de 24 y 96 horas con excepción de la dosis de 0.75 y 0.375 en donde los valores se incrementaron un 20% a las 96 horas (Figura 24).

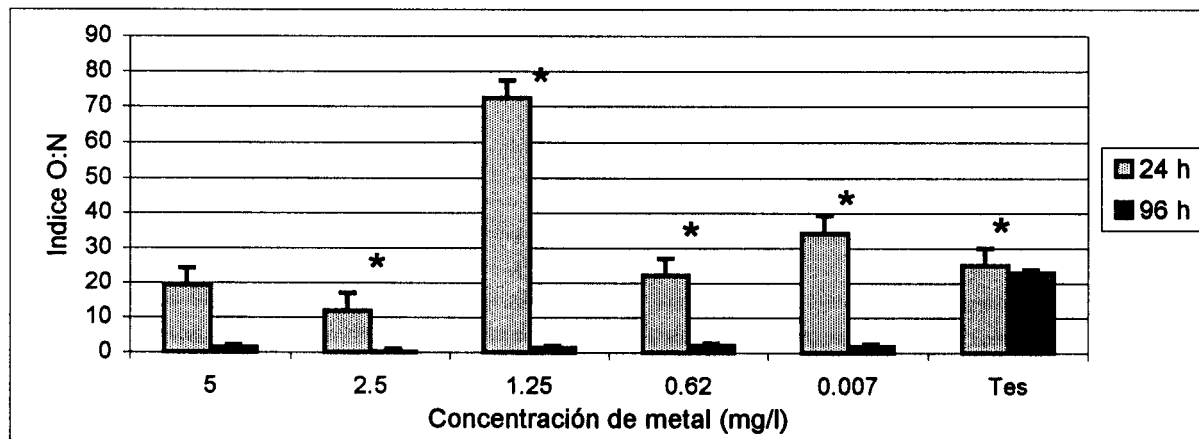
a



b



c



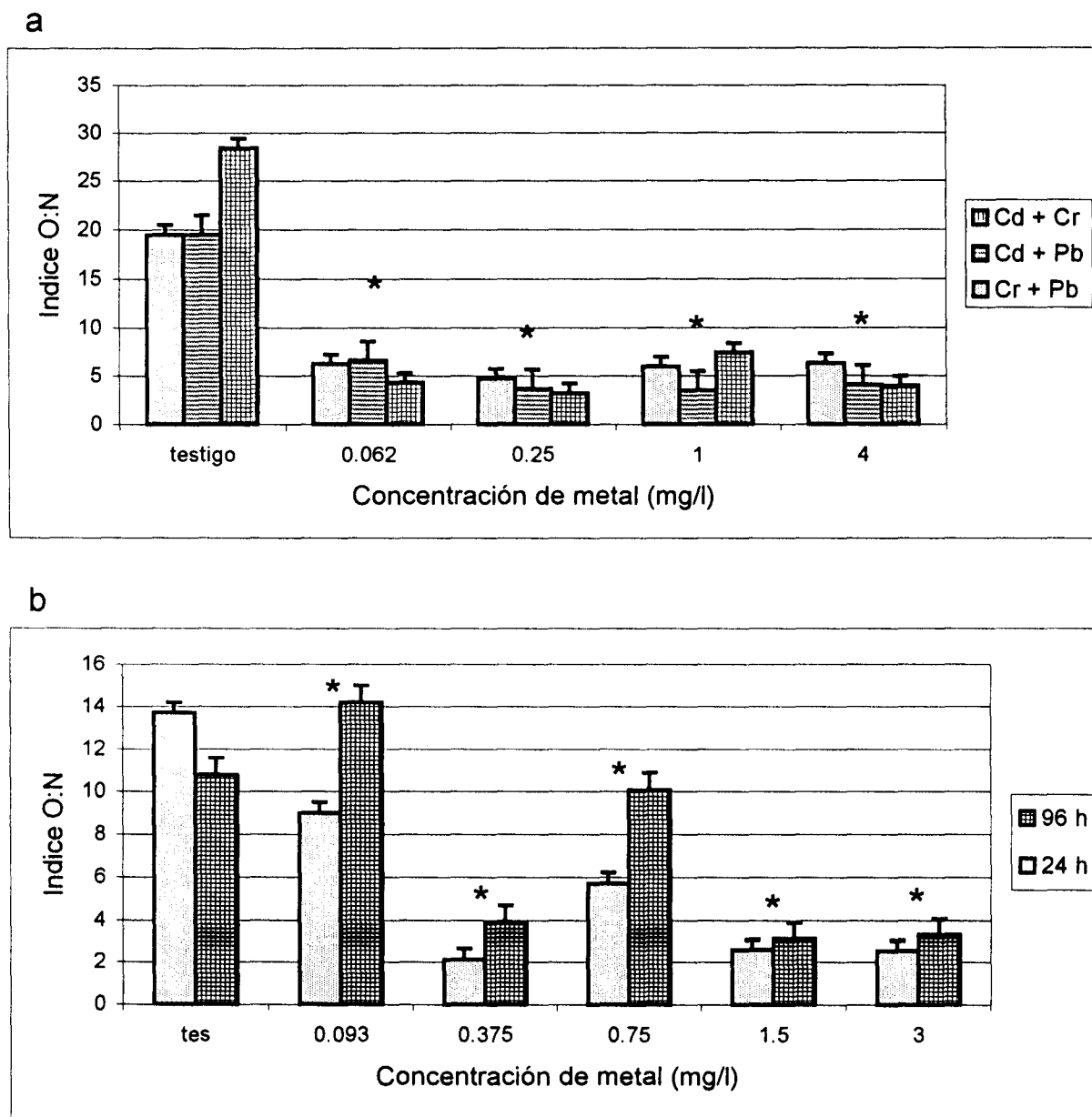


Figura 24. Índice O:N obtenido en bioensayos con adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a las mezclas de metales tóxicos. a) mezclas Cd + Cr, Cd + Pb y Cr + Pb. b) mezcla Cd + Cr + Pb.

*Diferencias significativas en comparación con el testigo ($p < 0.05$).

Se observaron diferencias significativas entre los datos obtenidos para la relación O:N de los tratamientos y los testigos, pero solo la mezcla Cd + Cr mostró diferencia significativa en comparación con las otras tres mezclas probadas ($p < 0.05$).

3.8 Efectos en la tasa de aclaramiento de juveniles y adultos de *A. ventricosus*

Los valores de la tasa de aclaramiento (tasa de filtración) registrados en las pruebas con juveniles expuestos a los metales cromo y plomo durante 24 horas, aumentaron hasta 230% en comparación con el testigo, pero en los ensayos con cadmio hubo una reducción de esta tasa de 80% (Figura 25).

Las CE_{100} (concentración de metal donde la tasa de aclaramiento aumenta un 100% en comparación con el testigo) fueron de 0.587 mg/l para los experimentos con cromo y de 1.08 mg/l para los realizados con plomo, pero como se mencionó antes en los bioensayos con cadmio hubo una disminución de un 50% en esta tasa a concentraciones de 0.31 mg/l (Tabla 15).

A las 72 horas de exposición a los xenobióticos hubo un descenso en la tasa de aclaramiento de entre 10 a 80% en las pruebas con los tres metales (Figura 25).

La CE_{50} (concentración donde se observó una disminución del 50% en la tasa de aclaramiento) fue de 0.099 mg/l en los experimentos con cadmio, de 0.62 mg/l y 2.25 en los bioensayos con cromo y plomo respectivamente (Tabla 15).

Las respuestas observadas a las 24 y 72 horas de tratamiento son significativamente diferentes, si se comparan con el testigo y con los metales entre si, en todos los casos ($p < 0.05$).

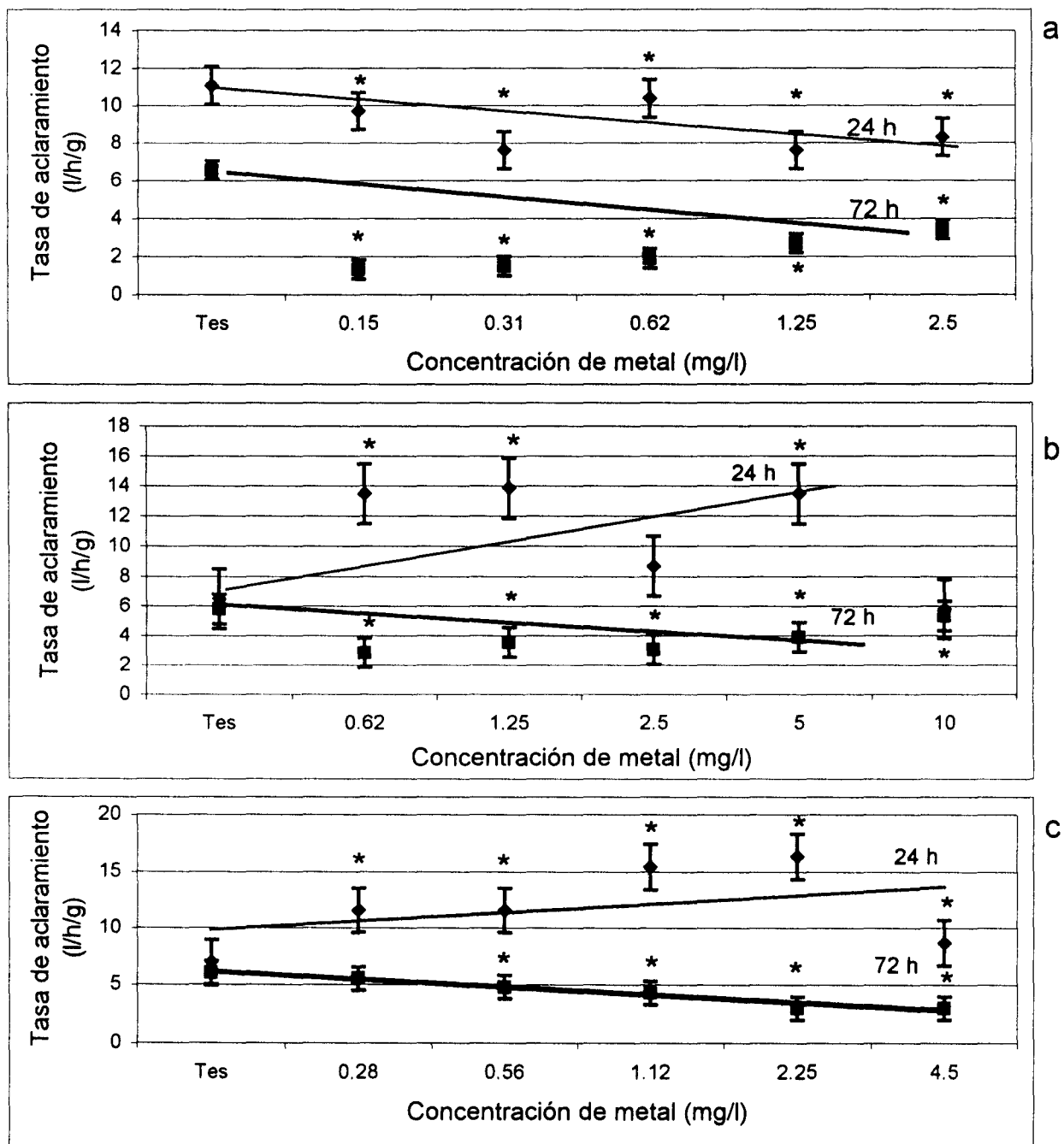


Figura 25. Tasa de aclaramiento (tasa de filtración) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos. a) cadmio. b) cromo. c) plomo. *Diferencias significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$).

Tabla 15. CE₅₀ (concentración efectiva 50) en la cual se reduce en un 50% la tasa de aclaramiento (tasa de filtración) en comparación con el testigo, determinada en los experimentos con juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus*. expuestos a metales.

METAL ESTADIO	CONCENTRACIÓN EFECTIVA 50 (CE ₅₀) mg/l		
	24 horas	72 horas	96 horas
JUVENIL			
Cadmio	0.31	0.0991	NR
Cromo	umenta	0.62	NR
Plomo	umenta	2.25	NR
Cd + Cr	0.233	NR	NR
Cd + Pb	1.87	NR	NR
Cr + Pb	Aumenta	NR	NR
Cd + Cr + Pb	0.30	2.5	NR
ADULTO			
Cadmio	0.111 ± 0.15	NR	0.016 ± 0.029
Cromo	12.0 ± 4.2	NR	6.98 ± 1.54
Plomo	6.46 ± 0.151	NR	0.866 ± 0.163
Cd + Cr	0.316 ± 0.030	NR	NR
Cd + Pb	5.45 ± 0.5	NR	NR
Cr + Pb	6.0 ± 1.2	NR	NR
Cd + Cr + Pb	1.5 ± 0.9	NR	1.23 ± 0.329

NR = no registrado

En los ensayos con juveniles expuestos a las mezclas de metales se observó una disminución de esta tasa, en comparación con el testigo de entre un 10 a un 66% a las 24 horas de exposición (Figura 26). Sin embargo, en las pruebas con la mezcla Cr + Pb se detectó un aumento en esta razón de hasta un 200%; la CE_{100} fue de 0.120 mg/l. Como se puede apreciar en la Tabla 15 la combinación Cd + Cr, es la que presentó el mayor efecto, ya que la CE_{50} calculada fue de 0.233 mg/l.

Asimismo, en los bioensayos con la mezcla Cd + Cr + Pb, se observó una disminución en esta tasa a las 24 de tratamiento, de un 22 a 66%, siendo la CE_{50} calculada de 0.300 mg/l. Mientras que a las 72 horas de exposición, se registró un decremento en esta razón de un 10 a 22% (Figura 26).

La tasa de aclaramiento de adultos expuestos a los metales fue menor entre un 14% a 70%, si se compara con la de los organismos testigos después de 24 horas de exposición.

A las 96 horas de exposición se registró un decremento en esta tasa del 80% a 43%. Con base en los valores de CE_{50} calculados, el efecto de los diferentes metales probados sobre la tasa de aclaramiento fue (de mayor a menor efecto) (Tabla 15):

$$Cd > Pb > Cr .$$

En los ensayos donde se expuso a los adultos a las diferentes mezclas de metales, también se observó una disminución en la tasa de filtración a las 24 horas de tratamiento. En la mezcla Cd + Cr la CE_{50} obtenida fue de 0.316 mg/l siendo este valor el más baja en comparación con los calculados para los experimentos con las otras combinaciones de metales (Tabla 15).

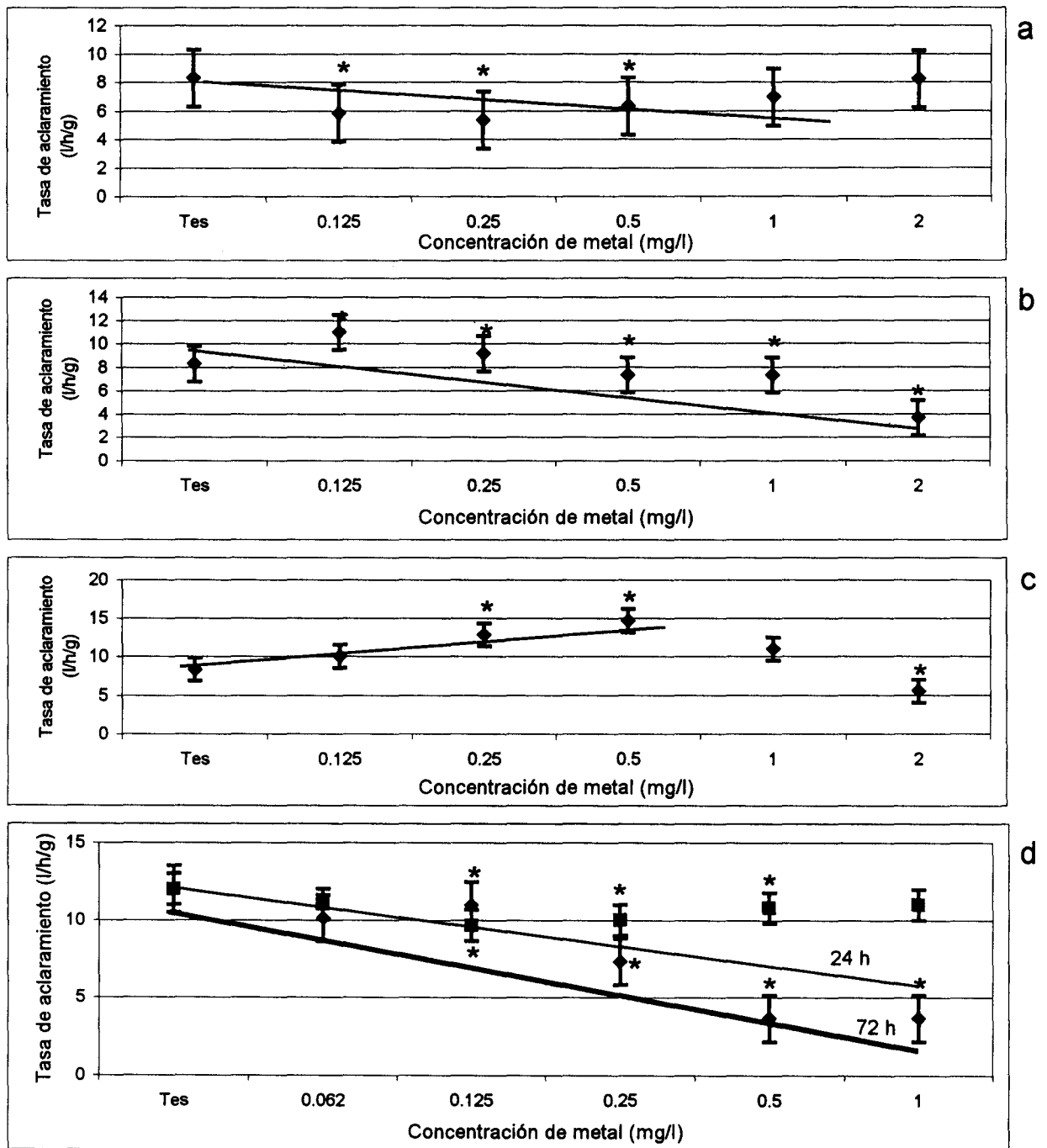


Figura 26. Tasa de aclaramiento (tasa de filtración) en juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a las mezclas de metales tóxicos. a) Cd + Cr. b) Cd + Pb. c) Cr + Pb. d) Cd + Cr + Pb. *Diferencias significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$).

En los bioensayos con la mezcla Cd + Cr + Pb se observó una disminución en esta tasa a las 24 y 96 horas de tratamiento, siendo las CE₅₀ calculadas de 1.5 mg/l y de 1.23 mg/l respectivamente. Los valores obtenidos en las pruebas con las mezclas de metales son significativamente diferentes a los obtenidos en el testigo en todos los casos ($p < 0.05$).

3.9 Bioacumulación de metales en juveniles y adultos de *A. ventricosus*

Los organismos procedentes del medio natural presentaron una concentración promedio de metales de $0.96 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$ de Cd, $< 0.20 \mu\text{g/g}$ de cromo y $1.2 \pm 0.36 \mu\text{g/g}$ de Pb en los tejidos de juveniles. En adultos se detectaron los siguientes niveles: $1.25 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ de Cd, $0.28 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ de Cr y $3.51 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ de Pb.

En el agua marina que fue utilizada para el desarrollo de los experimentos, se registraron las siguientes concentraciones de xenobióticos $0.98 \pm 0.2 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $0.76 \pm 0.21 \mu\text{g/l}$ de cromo y $4.05 \pm 0.62 \mu\text{g/l}$ de plomo. Estos niveles fueron registrados antes del inicio de los bioensayos.

3.9.1 Bioacumulación de metales en exposiciones agudas

En las pruebas con adultos de almeja catarina expuestos de manera aguda a los metales durante 144 horas (6 días), se observó claramente una relación directa entre la concentración del metal en el agua y la detectada en el organismo, es decir que conforme aumentaron los niveles de xenobióticos en el agua se encontró mayor proporción de ellos en los tejidos de los organismos (Tabla 16). Los factores de bioacumulación (F.B.) calculados en las pruebas con cadmio fueron de 351, 696 y 2410

para concentraciones 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y 0.0075 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En los ensayos de cromo de 12.6, 14 y 11.6 para concentraciones de 12 $\mu\text{g/ml}$, 3.15 $\mu\text{g/ml}$ y 0.048 $\mu\text{g/ml}$ y en los experimentos con plomo donde se probaron las concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 0.62 $\mu\text{g/ml}$ los F.B. fueron de 98, 34 y 91 respectivamente (Tabla 16).

Tabla 16. Concentraciones promedio de metales presentes en los tejidos de adultos de *Argopecten ventricosus* y sus factores de bioacumulación.

METAL	CONCENTRACION EN AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACION EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	FACTOR DE BIOACUMULACION
Cadmio	0.5 \pm 0.023	175.5 \pm 12.3	351
	0.125 \pm 0.05	87 \pm 19.4	696
	0.0075 \pm 0.0001	18.08 \pm 2.09	2410
Cromo	12 \pm 3.45	152.2 \pm 3.7	12.6
	3.15 \pm 0.89	45.4 \pm 6.3	14.4
	0.048 \pm 0.005	0.56 \pm 0.12	11.6
Plomo	10 \pm 2.1	98 \pm 23.7	98.1
	5 \pm 0.88	172.4 \pm 21.8	34.5
	0.62 \pm 0.034	57 \pm 8.9	91.4

Los niveles de metales en los tejidos de los organismos expuestos a cadmio a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y 0.0075 $\mu\text{g/ml}$, se incrementaron en

comparación con lo registrado en el testigo 140, 70 y 15 veces, respectivamente.

Mientras que en los especímenes que se mantuvieron a 12 $\mu\text{g/ml}$, 3.15 $\mu\text{g/ml}$ 0.048 $\mu\text{g/ml}$ de cromo el aumento con respecto al testigo fue de 543, 162 y 2 veces, y en concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 0.62 $\mu\text{g/ml}$ de plomo el incremento fue 279, 49 y 16 veces respectivamente (Tabla 16).

Los niveles de metal registrados en los organismos moribundos fueron: $307.8 \pm 10 \mu\text{g/g}$ en la prueba con cadmio, $152.2 \pm 3.7 \mu\text{g/g}$ para cromo y 978 ± 23.7 para plomo.

En los bioensayos con adultos expuestos a las mezclas de metales se observaron decrementos o incrementos en la concentración de metales en los tejidos de estos, en comparación con la acumulación detectada en las pruebas con los metales por separado (Tabla 17). En los experimentos con la mezcla Cd + Cr se observó un aumento en los niveles de cadmio en el tejido de los organismos del 8% en concentraciones de 2 $\mu\text{g/ml}$ de la combinación de metales, pero en las demás (0.5 y 0.031 $\mu\text{g/ml}$) se registró una reducción de los niveles de este metal en los especímenes analizados (Tabla 17).

En las pruebas con la combinación Cd + Cr + Pb se detectaron también aumentos en la acumulación de metales en comparación a lo observado en los bioensayos con los xenobióticos solos. Los niveles de cadmio en los tejidos de los organismos expuestos en las concentraciones 0.5, 0.25 y 0.0.125 $\mu\text{g/ml}$ aumentaron un 3%, 10% y 150% respectivamente, el contenido de cromo disminuyó 32% en la

Tabla 17. Concentraciones promedio de metales tóxicos presentes en los tejidos de adultos de *Argopecten ventricosus* y sus factores de bioacumulación del experimento realizado con las mezclas de metales.

METAL	CONCENTRACIÓN EN AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACIÓN EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)			FACTOR DE BIOACUMULACIÓN		
		Cd	Cr	Pb	Cd	Cr	Pb
Cd + Cr	2.0 ± 0.23	307.8 ± 23	39.2 ± 11		153.	19.6	
	0.5 ± 0.1	65.2 ± 15	15.7 ± 2.3		130.4	31.4	
	0.031 ± 0.008	63.1 ± 5.3	2.6 ± 0.56		2035	83	
Cd + Pb	3 ± 0.68	301.2 ± 34		190.9 ± 45.2	100		63
	0.75 ± 0.20	111.15 ± 17		53.5 ± 9.8	148		604
	0.046 ± 0.012	103.7 ± 22		39.6 ± 6.7	2240		861
Cr + Pb	3 ± 0.89		64.11 ± 3.5	158.6 ± 17.8		21.3	52.8
	0.75 ± 0.25		54.45 ± 10.9	157.6 ± 12.3		72.6	210
	0.046 ± 0.005		1.7 ± 0.67	12.3 ± 2.3		36.9	267.3
Cd + Pb + Cr	0.5 ± 0.087	181 ± 5.6	10.5 ± 2.3	200 ± 21.2	362	21	400
	0.25 ± 0.09	128 ± 32	7.73 ± 1.7	137 ± 6.7	513	30.9	548
	0.125 ± 0.023	131 ± 28	6.09 ± 0.98	88 ± 24.7	1051	48.7	706
	0.031 ± 0.005	23 ± 5	7.2 ± 1.67	28 ± 6.5	760	232	911.9

Las concentraciones de plomo en los tejidos de las almejas expuestas a la mezcla de los tres metales aumentaron también, si se compara con los niveles registrados en los especímenes expuestos a los metales por separado.

Estos aumentos fueron de 280%, 475%, 830% y 2000% para las concentraciones probadas de 0.5, 0.25, 0.125, 0.031 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Asimismo, la proporción promedio de acumulación en la prueba con la mezcla Cd + Cr + Pb fue: 1 : 0.068 : 0.97 para cadmio, cromo y plomo.

3.9.2 Bioacumulación de metales en exposiciones crónicas

En los tejidos de los juveniles de almeja catarina expuestos a los metales durante 30 días, se registró un aumento en la concentración de xenobióticos del orden de 800 % para las pruebas con cadmio, de 250% con cromo y de 240% con plomo en comparación con lo observado en el testigo (Tabla 18). Los valores de metales en los organismos expuestos fueron significativamente diferentes al compararlos con los testigos ($p < 0.02$).

El factor de bioacumulación (F.B.) promedio para el cadmio fue de 89.7 mientras que para plomo y cromo fueron de 11.3 y 1.9 respectivamente.

Lo anterior indica que el metal que se acumuló en mayor proporción en el cuerpo de los especímenes fue el cadmio, seguido del plomo y cromo ($\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cr}$) (Tabla 18). Asimismo, los niveles máximos registrados en los tejidos de los juveniles fueron 7.9 $\mu\text{g/g}$ de cadmio, 2.48 $\mu\text{g/g}$ de cromo y 2.9 $\mu\text{g/g}$ de plomo, en organismos expuestos a concentraciones de $0.088 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ de Cd y $1 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ de Cr y Pb (Tabla 18).

Tabla 18. Concentraciones promedio de metales presentes en los tejidos de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a los xenobióticos durante 30 días y sus factores de bioacumulación determinados.

METAL	CONCENTRACIÓN EN AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACIÓN EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	FACTOR DE BIOACUMULACIÓN
Cadmio	0.088 ± 0.03	8 ± 0.016	89.7
Cromo	1.13 ± 0.03	2.5 ± 0.022	2.19
Cromo	0.110 ± 0.05	1.24 ± 0.032	11.3
Plomo	1.0 ± 0.03	3 ± 0.19	3
Plomo	0.5 ± 0.2	0.96 ± 0.051	1.9
Cd + Cr + Pb	$0.55 \pm 0.02^*$		
Cd		5.46 ± 0.013	9.9
Cr		2.11 ± 0.23	3.8
Pb		4.38 ± 0.21	7.9
Cd + Cr + Pb	$0.088 \pm 0.025^*$		
Cd		5.66 ± 0.055	64.3
Cr		2.25 ± 0.056	25.6
Pb		1.07 ± 0.14	12
Testigo			
Cd		0.96 ± 0.13	
Cr		< 0.20	
Pb		1.2 ± 0.36	

*Concentración de cada uno de los metales que forman la mezcla.

En los bioensayos con la mezcla Cd + Cr + Pb se observó que a menor concentración de metal en el agua, los F.B. se incrementaban.

En los experimentos donde los juveniles se mantuvieron a una concentración de metales de 0.55 µg/ml, los F.B. obtenidos fueron 9.9, 3.7 y 7.8 para Cd, Cr y Pb respectivamente, mientras que en las pruebas donde los niveles de metales fueron de 0.088 µg/ml los F.B. fueron para Cd, Cr y Pb de 64.3, 25.6 y 12 . (tabla 18).

Al comparar los niveles de metales registrados en los tejidos de los organismos expuestos a la mezcla Cd + Cr + Pb (0.088 µg/ml) con los valores de los testigos se observó un aumento de 6, 11 y 1 para los metales Cd, Cr y Pb respectivamente (Tabla 18).

Además, se observaron diferencias en la bioacumulación ocurrida en los experimentos con la mezcla Cd + Cr + Pb , con respecto a lo observado en las pruebas con los metales por separado (Tabla 18). Los organismos acumularon 30% menos de cadmio en comparación con lo detectado en los ensayos con este metal por separado, en concentraciones de 0.088 µg/ml, pero se depositó un 80% más de cromo. Los niveles de plomo registradas en los tejidos de los juveniles expuestos a concentraciones de 0.5 µg/ml de la combinación de metales fueron superiores hasta un 450% en comparación a lo observado en las pruebas con este xenobiótico solo (Tabla 18).

Es evidente que la bioacumulación de los metales registrada en estos bioensayos fue (de mayor a menor): Cd > Pb > Cr.

La proporción promedio fue: 1 : 0.4 : 0.54 para cadmio, cromo y plomo respectivamente.

3.9.3 Bioacumulación de metales en ambientes naturales

Paralelamente a los trabajos efectuados en el laboratorio, se realizó una determinación de los niveles de los metales presentes en muestras de agua y organismos procedentes de ambientes naturales, en dos diferentes épocas del año, verano (julio de 1999) e invierno (diciembre de 1999).

Las muestras se recolectaron en 3 localidades: 1) Vivero de Pichilingue, 2) Bahía Concepción, B.C.S (parte central del canal de navegación). 3) Estanques de cultivo de CICIMAR (localizados en las instalaciones del Laboratorio de Biología Experimental del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).

Los organismos del vivero de Pichilingue midieron 4.63 ± 0.25 cm de altura, y su peso húmedo fue de 5.71 ± 1.055 g (1.018 ± 0.229 g peso seco), no hubo diferencias significativas entre el tamaño y peso de estos organismos ($p < 0.05$, $n = 20$). Las concentraciones promedio de los metales cadmio, cromo y plomo registradas en los tejidos de las almejas fueron de $1.25 \mu\text{g/g}$, $0.28 \mu\text{g/g}$ y $3.51 \mu\text{g/g}$ respectivamente, mientras que los niveles de estos metales en el agua fueron de $0.9 \mu\text{g/l}$ de cadmio, $2.05 \mu\text{g/l}$ de cromo y $1.07 \mu\text{g/l}$ de plomo (Tabla 19).

Los especímenes de Bahía Concepción tuvieron una talla promedio de 5.83 ± 0.32 cm de altura, su peso húmedo fue de 8.02 ± 1.85 g (2.45 ± 0.35 g peso seco) ($n = 5$). Los niveles promedio de metales detectados en sus tejidos fueron: $2.075 \mu\text{g/g}$ de cadmio, $< 0.20 \mu\text{g/g}$ de cromo y $3.55 \mu\text{g/g}$ de plomo, La muestra de agua de este lugar presentó las siguientes concentraciones promedio de cadmio, cromo y plomo: $0.89 \mu\text{g/l}$, $1.94 \mu\text{g/l}$ y $1.04 \mu\text{g/l}$ respectivamente. (Tabla 19).

Tabla 19. Concentración de los metales cadmio, cromo y plomo, presentes en el agua ($\mu\text{g/l}$) y organismos ($\mu\text{g/g}$) procedentes del vivero de Pichilingue, de Bahía Concepción y de los estanque de cultivo del CICIMAR.

Localidad Muestra	JULIO			DICIEMBRE		
	Cd	Cr	Pb	Cd	Cr	Pb
Vivero de Pichilingue						
Organismos $\mu\text{g/g}$	1.43 ± 0.16	0.34 ± 0.105	4.08 ± 0.45	1.07 ± 0.04	0.22 ± 0.05	2.94 ± 0.7
Agua $\mu\text{g/l}$	0.94 ± 0.43	2.3 ± 0.45	1.33 ± 0.51	0.86 ± 0.12	1.8 ± 0.03	0.814 ± 0.51
Bahía Concepción						
Organismos $\mu\text{g/g}$	2.68 ± 0.2	< 0.20	4.34 ± 0.06	1.47 ± 0.21	< 0.20	2.77 ± 0.58
Agua $\mu\text{g/l}$	0.812 ± 0.12	2.25 ± 0.04	1.18 ± 0.11	0.96 ± 0.08	1.64 ± 0.31	0.901 ± 0.03
CICIMAR						
Organismos $\mu\text{g/g}$	5.49 ± 0.4	0.92 ± 0.21	4.06 ± 0.77	4.42 ± 0.31	0.61 ± 0.7	2.91 ± 0.6
Agua $\mu\text{g/l}$	1.12 ± 0.08	2.04 ± 0.84	4.5 ± 0.75	0.83 ± 0.107	1.13 ± 0.21	3.61 ± 0.36

Las dimensiones de las almejas que permanecieron en los estanques de cultivo del CICIMAR fueron de 4.42 ± 0.25 cm de altura, su peso fue de 4.66 ± 0.13 g de peso húmedo (0.788 ± 0.215 g peso seco). No se observaron diferencias significativas en la altura y peso de estos especímenes ($p < 0.05$, $n = 18$). En ellos se registraron las siguientes concentraciones de los metales cadmio, cromo y plomo: $4.95 \mu\text{g/g}$, $0.77 \mu\text{g/g}$ y $3.48 \mu\text{g/g}$ respectivamente, asimismo los niveles promedio de los xenobióticos en el agua fueron: $0.97 \mu\text{g/l}$ de Cd, $1.58 \mu\text{g/l}$ de Cr y $4.05 \mu\text{g/l}$ de Pb.

Como se puede apreciar en la Tabla 19 la época del año en el que se observaron las concentraciones de metales más elevadas tanto en los organismos como en las aguas, en las tres localidades fue en verano (julio). Solo se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de plomo registradas en las dos épocas del año analizadas para los especímenes de las tres localidades ($p < 0.05$).

Las proporciones promedio de los metales acumulados en los tejidos de las almejas fueron para el vivero de Pichilingue: 1 : 0.166 : 2.57, para Bahía Concepción: 1 : 0.07 : 1.59 y en los estanques de CICIMAR: 1 : 0.143 : 0.65, para cadmio, cromo y plomo respectivamente. La bioacumulación de xenobióticos que se detectó en los organismos procedentes de los tres sitios de muestreo fue, desacuerdo a su orden de magnitud (de mayor a menor):

Pichilingue: Pb > Cd > Cr

CICIMAR: Cd > Pb > Cr

B. Concepción: Pb > Cd > Cr

Las diferencias en la bioacumulación de los metales podría deberse al hecho de que en el medio natural, la toma de algún compuesto está en función de su

disponibilidad, y es evidente que existen diferencias en la disponibilidad de los metales en los diferentes lugares estudiados, ya que esto se ve reflejado en las concentraciones de metales que se detectaron en los organismos de Pichilingue, Bahía Concepción y CICIMAR.

3.9.4 Cinética de acumulación de metales tóxicos

La acumulación de metales en los tejidos de las almejas expuestas de manera aguda siguió un modelo lineal ($p < 0.02$), el cual explicó entre un 86% a 99% de la variación de los datos. Las pendientes de estas curvas representaron la tasa de incorporación de metal (K_{to}) (Tabla 20 y 21).

En las pruebas con juveniles de almeja, se observó que la tasa de incorporación aumentó, conforme se incrementó la concentración de metal en el agua, con excepción de la K_{to} registradas en los experimentos con plomo (Tabla 20).

La tasa de incorporación (K_{to}) promedio obtenida en los experimentos con cadmio fue de 22.41, siendo esta razón 44 veces mayor en comparación a la que se detectó en las pruebas con cromo (0.506) y 1 vez por arriba a la registrada en los ensayos con plomo (21.91).

Los valores de la tasa de depuración (K_{de}) calculados en las pruebas con cromo fueron mayores en comparación a los registrados para la K_{to} , lo anterior indicó que la incorporación de este metal es menor a la eliminación del mismo (Tabla 20).

De acuerdo a los montos registrados para las tasas de incorporación (K_{to}), es obvio que el metal que ingresa con mayor rapidez al organismo es el cadmio seguido del plomo y cromo.

Tabla 20. Tasa de incorporación (K_{to}) y tasa de depuración (K_{de}) de metales obtenidas en los bioensayos agudos con juveniles de *Argopecten ventricosus*. El tiempo de exposición a los tóxicos fue de 192 horas (8 días).

METAL EN EL AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	METAL EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ día}$)	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) l* día
Cadmio			
0.75	175.57	28.67	0.3867
0.187	131.43	16.16	0.160
Cromo			
5.0	5.9	0.706	1.1554
0.2	2.5	0.306	0.221
Plomo			
0.75	165.9	18.5	0.593
0.187	189	25.32	0.3474

En los bioensayos con adultos expuestos de forma aguda a los metales se observó también que las tasas de incorporación (K_{to}) aumentaron de manera directa con la concentración de metal presente en el agua. Las K_{to} promedio calculadas fueron de 21.83 en los ensayos con cadmio y de 11.13 y 19.7 para los experimentos con cromo y plomo respectivamente (Tabla 21).

Al igual que lo ocurrido en los bioensayos con los juveniles, el cadmio es el metal que se acumuló en proporción más elevada, seguido del plomo y cromo.

Asimismo no se observó en las curvas de bioacumulación la fase de equilibrio (fase estacionaria), debido a que los organismos sucumbían antes de alcanzar este estado. Por esta razón no fue posible calcular la vida media biológica de los metales en estos experimentos.

Tabla 21. Tasa de incorporación (K_{to}) y tasa de depuración (K_{de}) de metales obtenidas en los bioensayos agudos con adultos *Argopecten ventricosus*. El tiempo de exposición fue de 144 horas (6 días).

METAL EN EL AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	METAL EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) l* día
Cadmio			
2.0	287.53	143.51	2.11
0.5	175.57	29.18	0.823
0.125	87.05	14.48	0.61
0.0075	18.08	2.93	0.49
Cromo			
12	15.22	25.37	2.166
3.15	4.54	7.56	0.69
0.19	2.85	0.475	0.198
0.048	0.56	0.092	0.174
Plomo			
10	97.8	16.3	1.83
5	172.4	28.6	0.99
2.5	136.3	22.71	0.58
0.62	56.66	9.4	0.27

3.9.5 Cinética de acumulación y depuración de metales.

La cinética de acumulación de metales observada en los bioensayos con juveniles expuestos a concentraciones subletales de xenobióticos siguió un modelo exponencial ($p < 0.05$, $r^2 > 0.86$) (Figura 27).

De manera general se advirtió que los valores de la tasa de incorporación (K_{0}) registrados en los diferentes experimentos, fueron aumentando conforme decreció la concentración de metal en el agua (Tabla 22).

El número de días para alcanzar la fase estacionaria (fase de equilibrio) en el proceso de bioacumulación fue de 32, 377 y 14 días para las concentraciones de cadmio de 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 0.050 $\mu\text{g/ml}$ y 0.020 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Para niveles de 0.33 $\mu\text{g/ml}$ y 0.032 $\mu\text{g/ml}$ de cromo de 20 y 18 días. Y para concentraciones de plomo de 0.75 $\mu\text{g/ml}$ y 0.187 $\mu\text{g/ml}$ de 12 y 52 días respectivamente (Tabla 22).

Durante el periodo de depuración se observó que entre más elevada es la concentración de metales presentes en los tejidos de los organismos, son necesarios un mayor número de días para eliminar la mitad del contenido de xenobióticos por medio de procesos fisiológicos. Como se puede apreciar en la Tabla 22, para concentraciones de 2.5 $\mu\text{g/g}$ de cadmio en los tejidos de las almejas, son necesarios 9 días para excretar la mitad de metal acumulado, mientras que para niveles de 2.1 $\mu\text{g/g}$ de cromo deben transcurrir 40 días para depurar este xenobiótico y son necesarios 8 días para la eliminación de 1.9 $\mu\text{g/g}$ de plomo.

De lo anterior resalta que el cromo es el metal que se elimina con mayor lentitud del tejido de las almejas seguido del cadmio. El plomo fue el metal que tarda el menor tiempo para ser excretado.

Tabla 22. Vida media biológica de los metales y la tasa de depuración (K_{de}) obtenidos en los bioensayos subletales con juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a cadmio, cromo y plomo. El tiempo de exposición y depuración fue de 10 días.

METAL EN EL AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	METAL EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	FASE DE ACUMULACIÓN		FASE DE DEPURACIÓN	
		TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) $\mu\text{g} * \text{g}^{-1} \text{ día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{l} * \text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{l} * \text{día}$	VIDA MEDIA (DÍAS)
Cadmio					
0.2	13.1	11.3	0.0709	- 0.0106	28
0.05	6.3	13.9	0.0061	- 0.0184	16
0.02	2.5	28.3	0.171	- 0.032	9.4
Cromo					
0.33	2.1	1.02	0.116	- 0.0075	40
0.032	1.2	7.3	0.128	0.0129	23
Plomo					
0.75	5.7	1.8	0.191	- 0.021	14
0.187	1.9	1.5	0.044	- 0.039	8

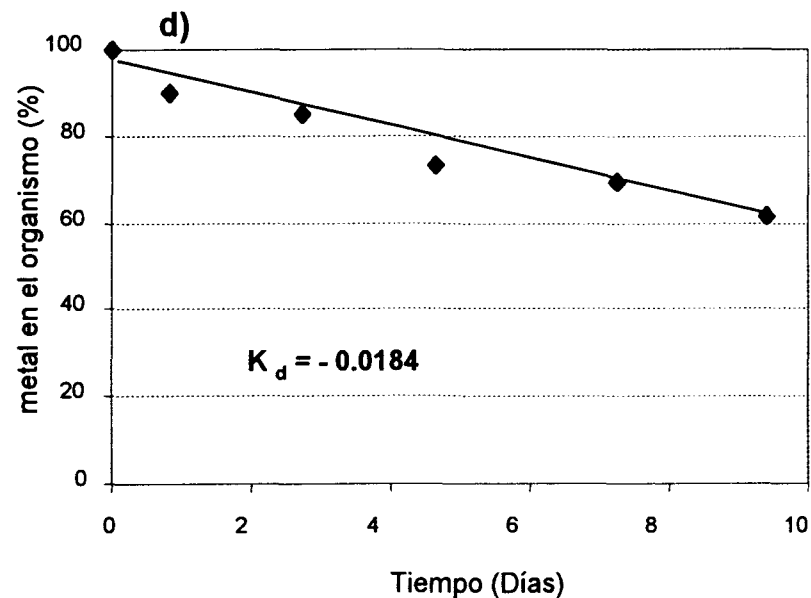
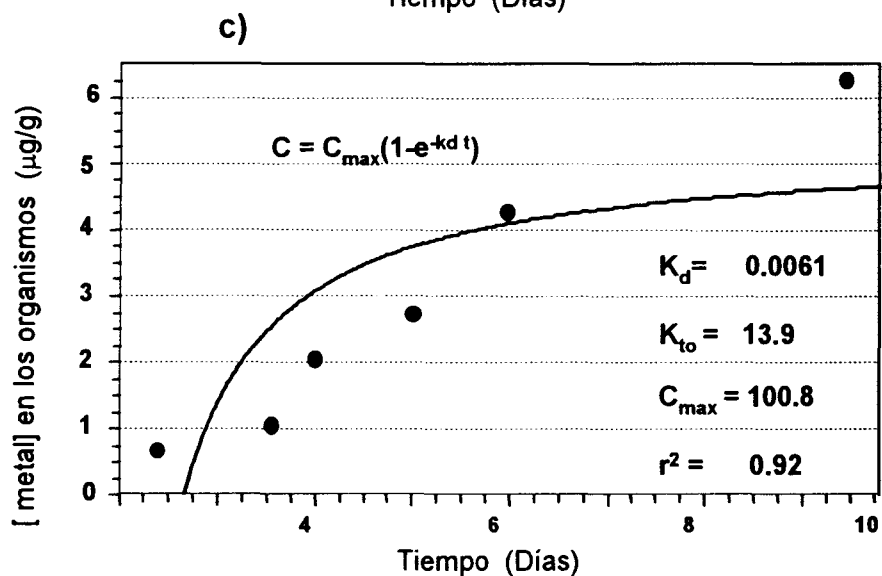
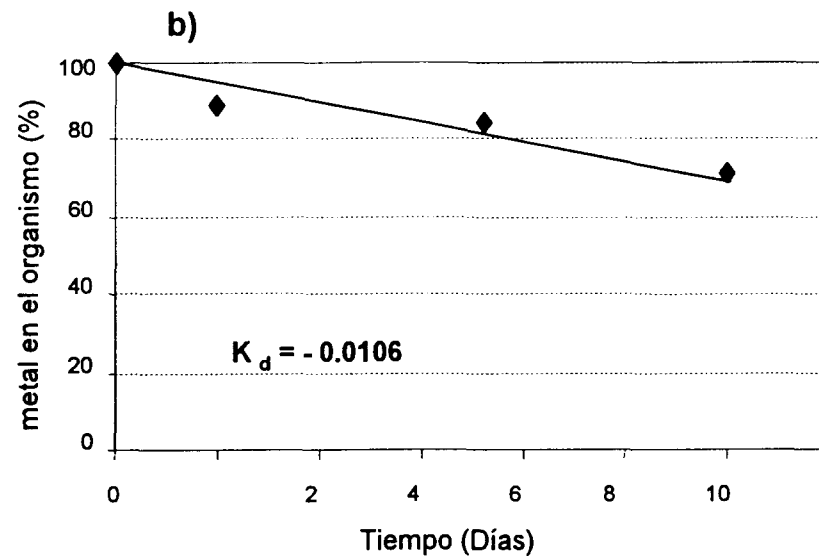
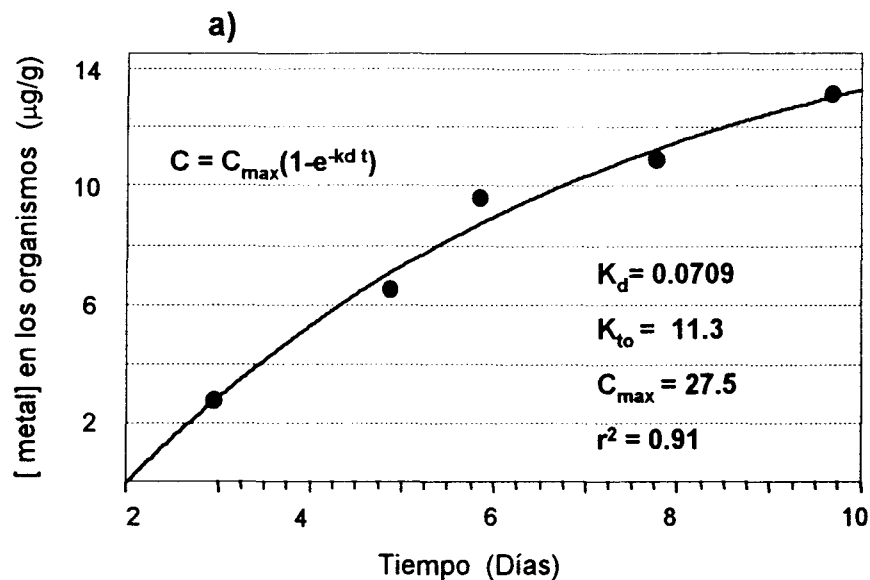


Figura 27. Curvas de bioacumulación y de depuración de metales, calculadas con los datos obtenidos en los bioensayos subletales con juveniles de almeja catarina expuestos a metales. a) Curva de bioacumulación (cadmio 0.2 mg/l). b) Depuración después del periodo de bioacumulación (cadmio 0.2 mg/l). c) Curva de bioacumulación (cadmio 0.05 mg/l). d) Depuración después del periodo de bioacumulación (cadmio 0.05 mg/l)

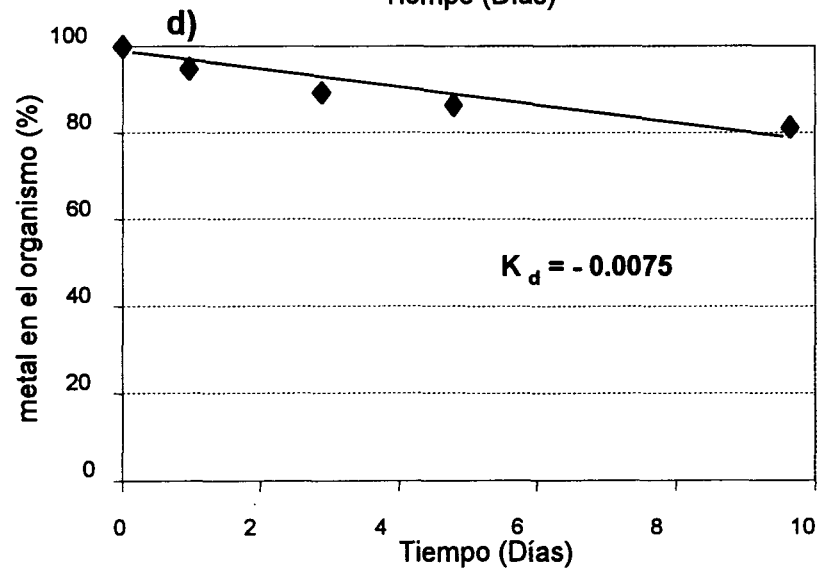
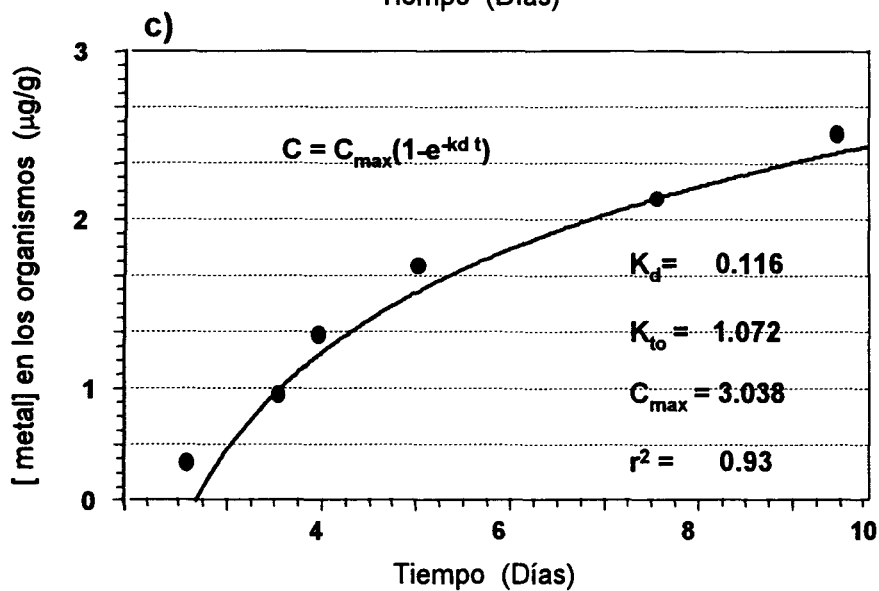
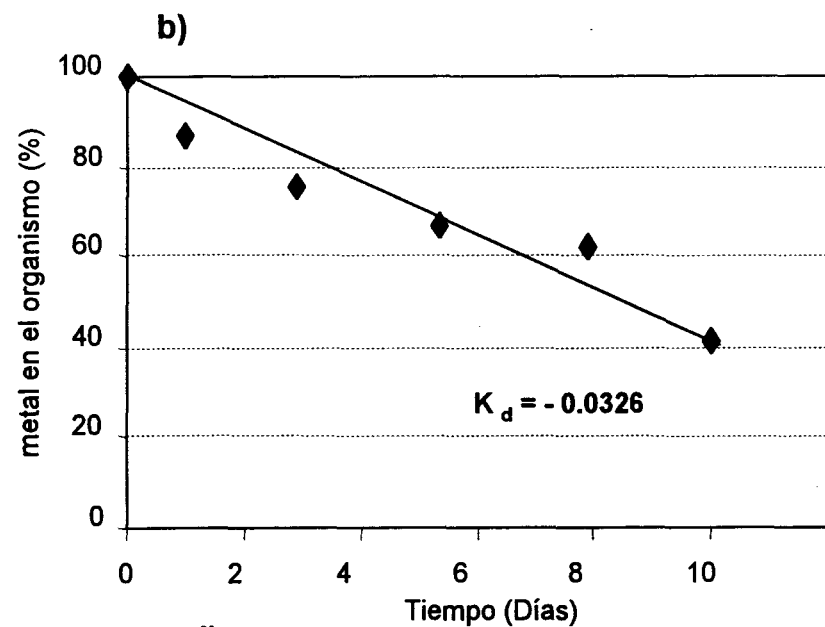
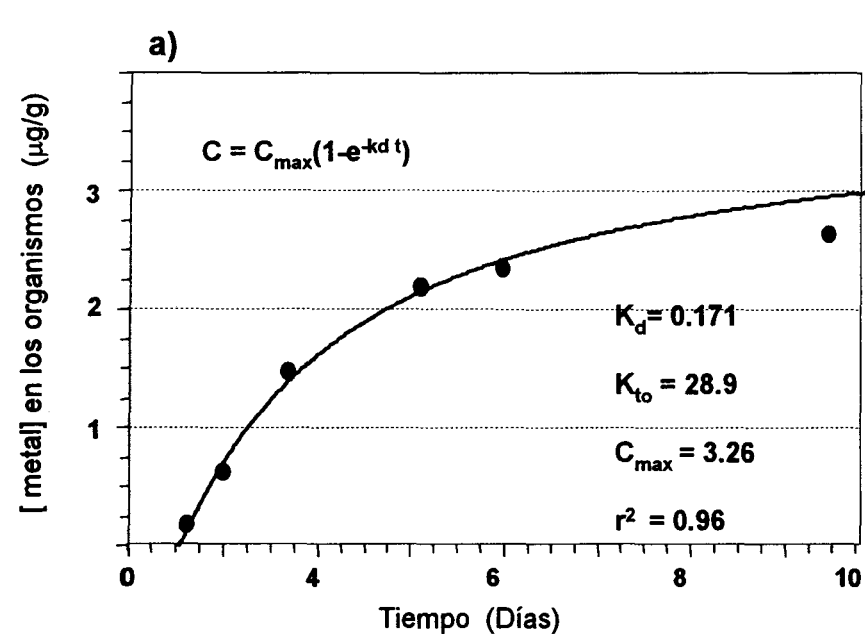


Figura 27. (continuación) a) Curva de bioacumulación (cadmio 0.02 mg/l). b) Depuración después del periodo de bioacumulación (cadmio 0.02 mg/l). c) Curva de bioacumulación (cromo 0.33 mg/l). d) Depuración después del periodo de bioacumulación (cromo 0.33 mg/l).

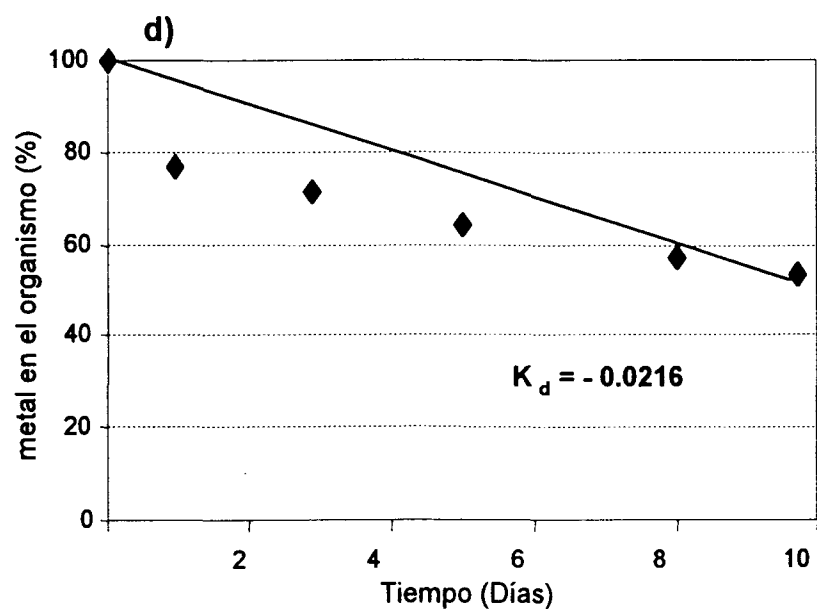
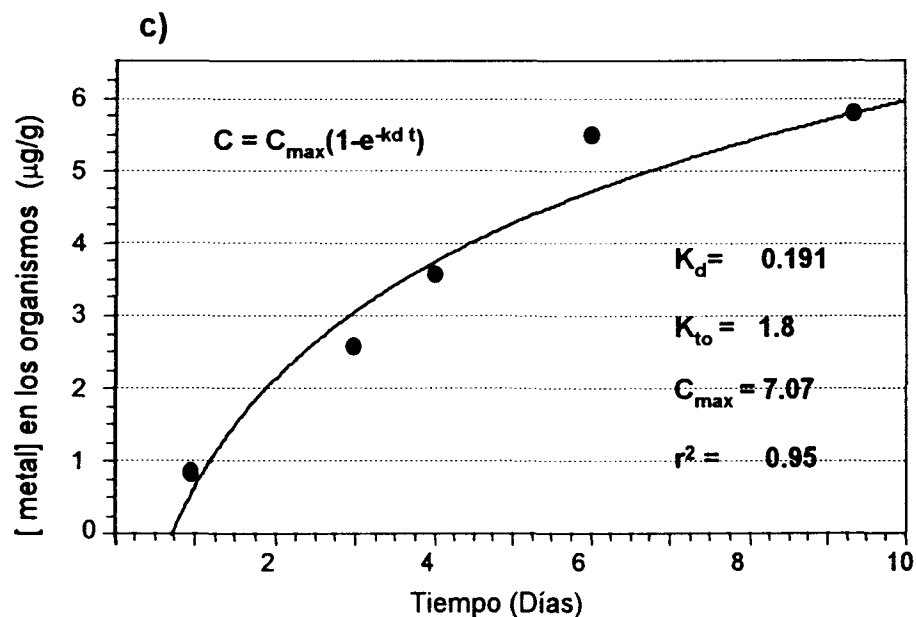
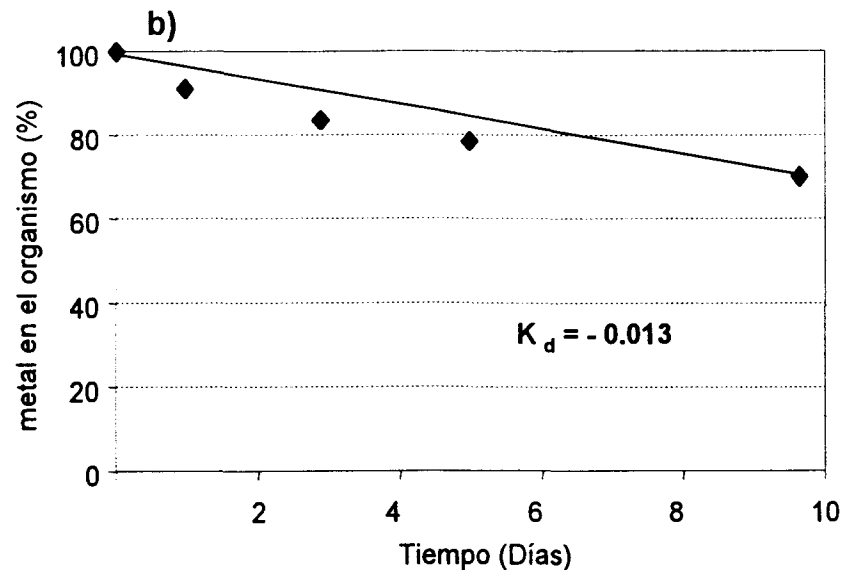
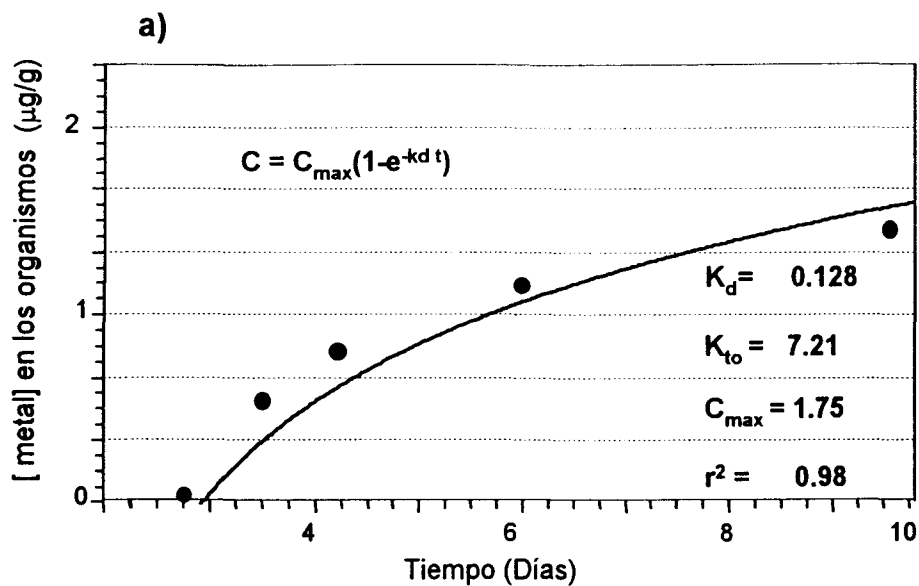


Figura 27. (continuación) a) Curva de bioacumulación (cromo 0.032 mg/l). b) Depuración después del periodo de bioacumulación (cromo 0.032 mg/l). c) Curva de bioacumulación (plomo 0.75 mg/l). d) Depuración después del periodo de bioacumulación (plomo 0.75 mg/l). 107

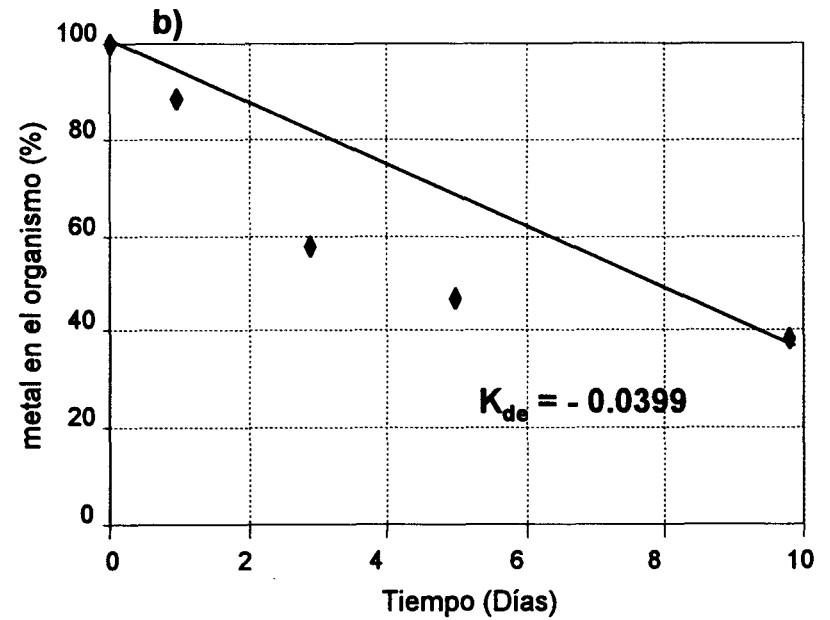
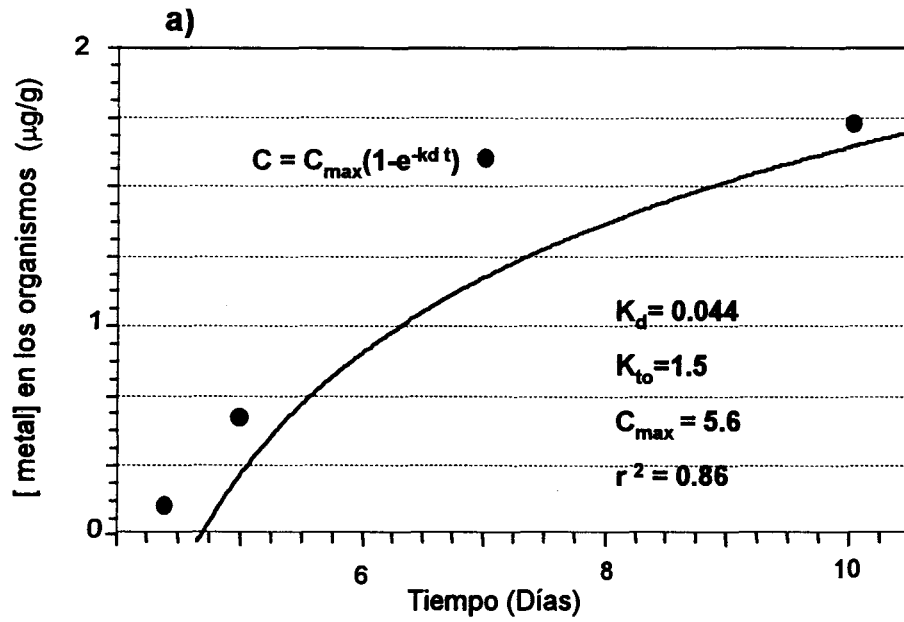


Figura 27. (continuación) a) Curva de bioacumulación (plomo 0.187 mg/l). b) Depuración después del periodo de bioacumulación (plomo 0.187 mg/l).

3.10 Evaluación de biomarcadores.

En este estudio se evaluaron 4 tipos de biomarcadores: a) Composición química de la glándula digestiva. b) Daño oxidativo por efecto de radicales libres (lipoperoxidación). c) Daño genético (genotoxicidad). d) Alteraciones en tejidos de la branquia, glándula digestiva, riñón e intestino (histopatología).

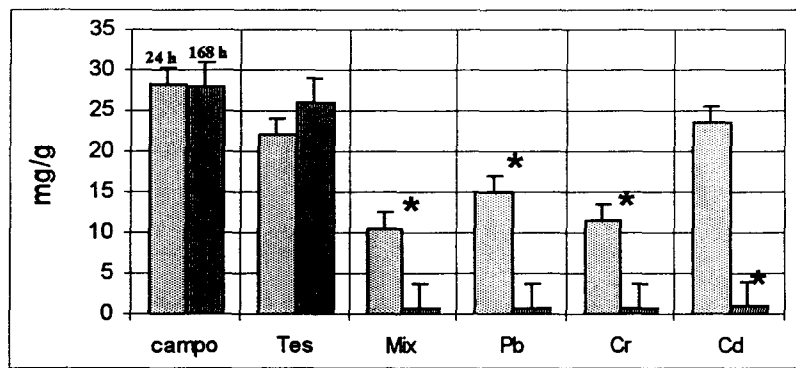
3.10.1 Composición química de la glándula digestiva

En juveniles expuestos a los metales en concentraciones de 0.35, 5.0, y 3.0 mg/l de cadmio, cromo y plomo respectivamente, durante 96 horas de tratamiento, se observó un decremento en la concentración de los componentes de la glándula digestiva de las 24 a las 96 horas de exposición (Figura 28). Cabe mencionar que las concentraciones de metales probadas son muy cercanas a las CL_{50} .

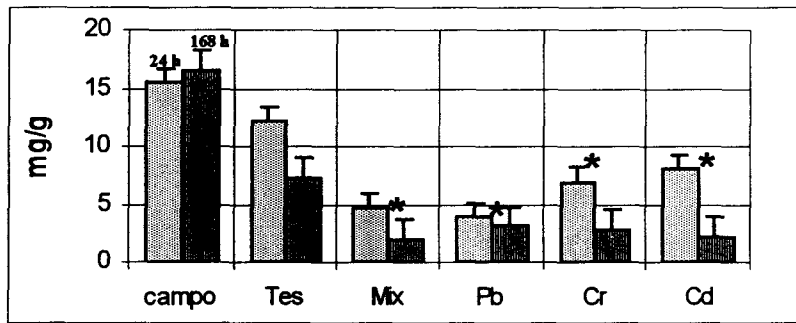
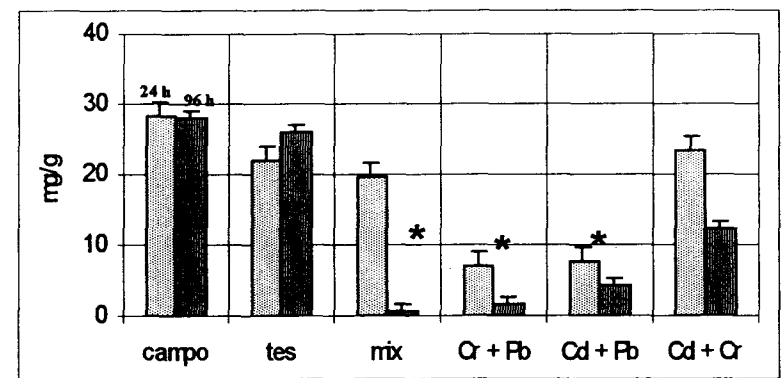
Los niveles de proteínas se redujeron hasta un 95% en las pruebas con los metales por separado (Cd, Cr y Pb). En los organismos expuestos a cadmio, también se observó una disminución del 72% en la concentración de carbohidratos, mientras que en las pruebas con los metales cromo y plomo varió de 21% a 50%.

La menor concentración de lípidos, se encontró en los organismos expuestos a plomo (Figura 28).

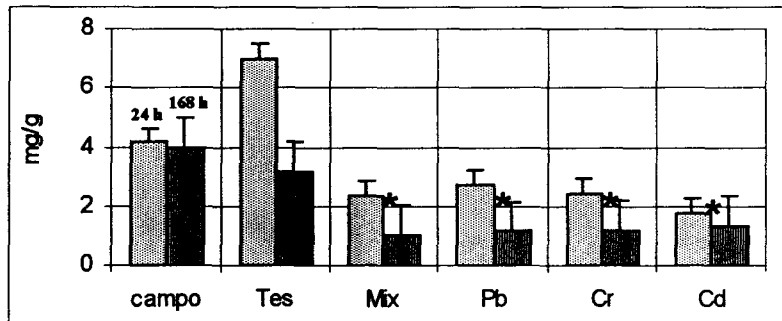
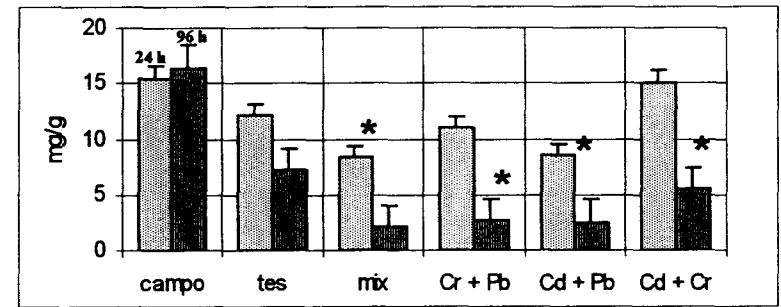
Contrariamente en el testigo se observó un aumento en la concentración de proteínas del 15%, pero una disminución en los niveles de carbohidratos y lípidos en un 13% y 11% respectivamente. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que la diferencia entre los valores del testigo en comparación con los de los tratamientos es significativa ($p < 0.034$) (Figura 28).



(1)



(2)



(3)

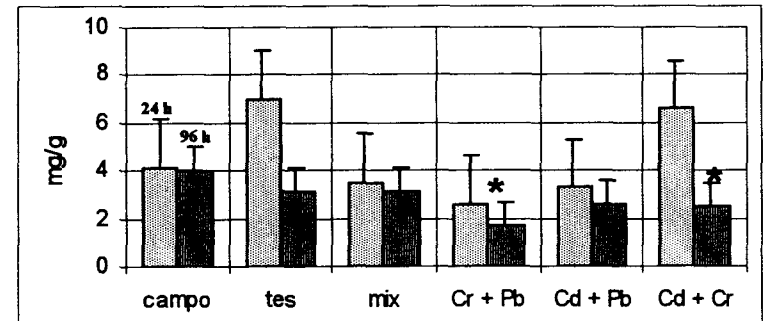


Figura 28. Niveles de proteínas (1), carbohidratos (2) y lípidos (3) en la glándula digestiva de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a concentraciones agudas de metales (Izq.) y mezclas de metales (Der.).

* Diferencias significativas con el testigo ($p < 0.05$). 110

En los bioensayos con juveniles expuestos a las mezclas de metales también se detectó un decremento promedio en la concentración de proteínas de 66%, los carbohidratos decrecieron un 71.32% en promedio y los lípidos un 36%, siendo los organismos expuestos a la mezcla de los tres metales, los que presentaron los descensos más marcados en los niveles de proteínas y carbohidratos, y la mezcla Cd + Cr de lípidos (Figura 28).

En los bioensayos con adultos hubo un decremento en los componentes de la glándula digestiva de las 24 a las 144 horas de exposición a los metales (Figura 29).

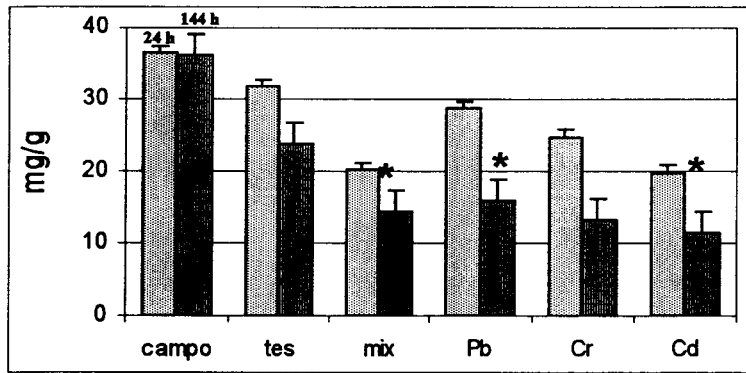
Los niveles de proteínas disminuyeron entre un 25% a 84% siendo estos valores menores, si los comparamos con los que se observaron en los ensayos con juveniles.

Los organismos expuestos a cadmio fueron los que tuvieron la reducción más marcada, en la concentración de proteínas que fue de 84%.

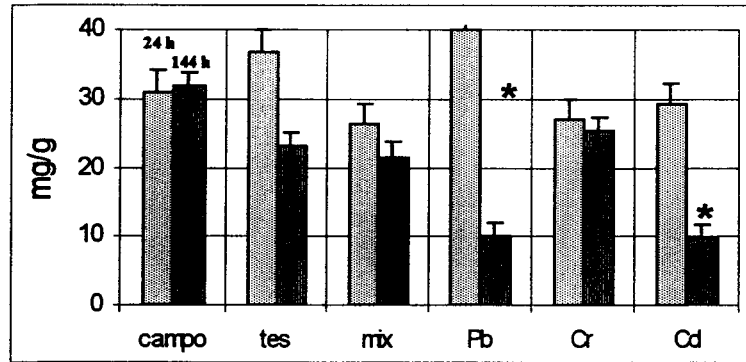
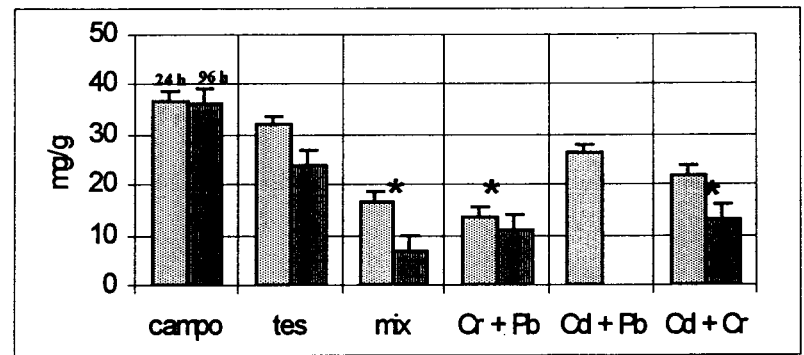
En los experimentos con plomo se detectó una disminución de 75% de carbohidratos. Para los lípidos la menor concentración de éstos se obtuvo en las pruebas con cadmio siendo el decremento del orden de 63% (Figura 29).

En las pruebas con las mezclas de metales hubo una reducción en las concentraciones de proteínas que varió de 12% a 60%, para carbohidratos de 7% a 38% y en lípidos de un 20% a 37%, siendo la mezcla Cd + Cr + Pb donde se registraron los valores más bajos de proteínas (6.59 mg/g) y carbohidratos (9.77 mg/g) (Figura 29).

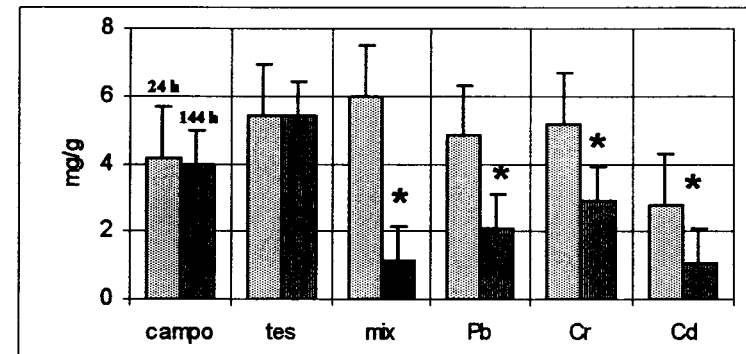
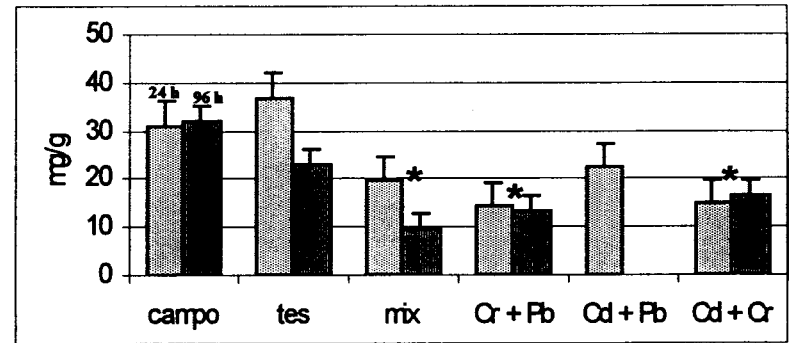
La diferencia entre los valores registrados para la concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos de los organismos testigo, fue significativa en comparación con los niveles detectados en los organismos tratados con las mezclas de metales a las 24 y 96 horas de exposición ($p < 0.045$).



(1)



(2)



(3)

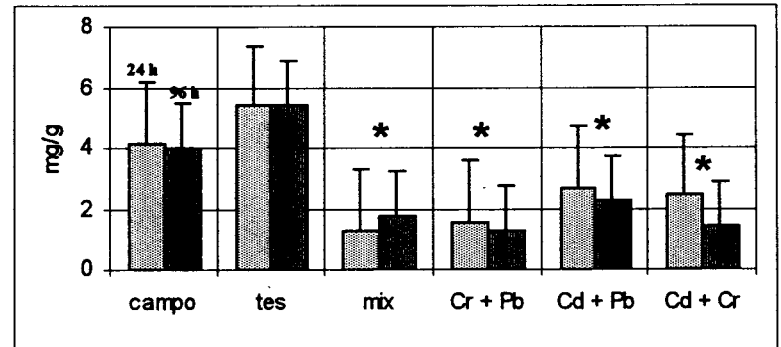


Figura 29. Niveles de proteínas (1), carbohidratos (2) y lípidos (3) en la glándula digestiva de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos en concentraciones agudas.

En los experimentos con juveniles expuestos a concentraciones subletales de metales durante 15 días, se observaron variaciones en los componentes de la glándula digestiva (Figura 30).

Los niveles de proteínas aumentaron del primer al quinceavo día en un 55% en el testigo, un 53% en las pruebas con cromo y 8.3% en los bioensayos con plomo.

Pero en los experimentos con cadmio y la mezcla Cd + Cr + Pb hubo una reducción en los contenidos de este compuesto de 8% para el primer caso y de 11% para el segundo (Figura 30).

La concentración de carbohidratos de la glándula digestiva del testigo aumentó en un 14%, mientras que en los organismos tratados con cromo se incrementó en un 10% y en los expuestos a plomo 300%. En los ensayos con cadmio y la mezcla Cd + Cr + Pb se registró un decremento de los niveles de carbohidratos de 17% y 10% respectivamente (Figura 30).

La cantidad de lípidos presentes en la glándula digestiva de los organismos expuestos a cadmio y cromo se redujo en un 5% y un 3% respectivamente.

Pero en los bioensayos con plomo y la mezcla Cd + Cr + Pb se incrementaron los niveles de lípidos de 42% para el primer caso y de 72% para el segundo. En el testigo hubo un aumento del 50% de este compuesto (Figura 30).

Las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos de la glándula digestiva de los testigos fue significativamente diferente a la de los organismos tratados con los metales ($p < 0.03$).

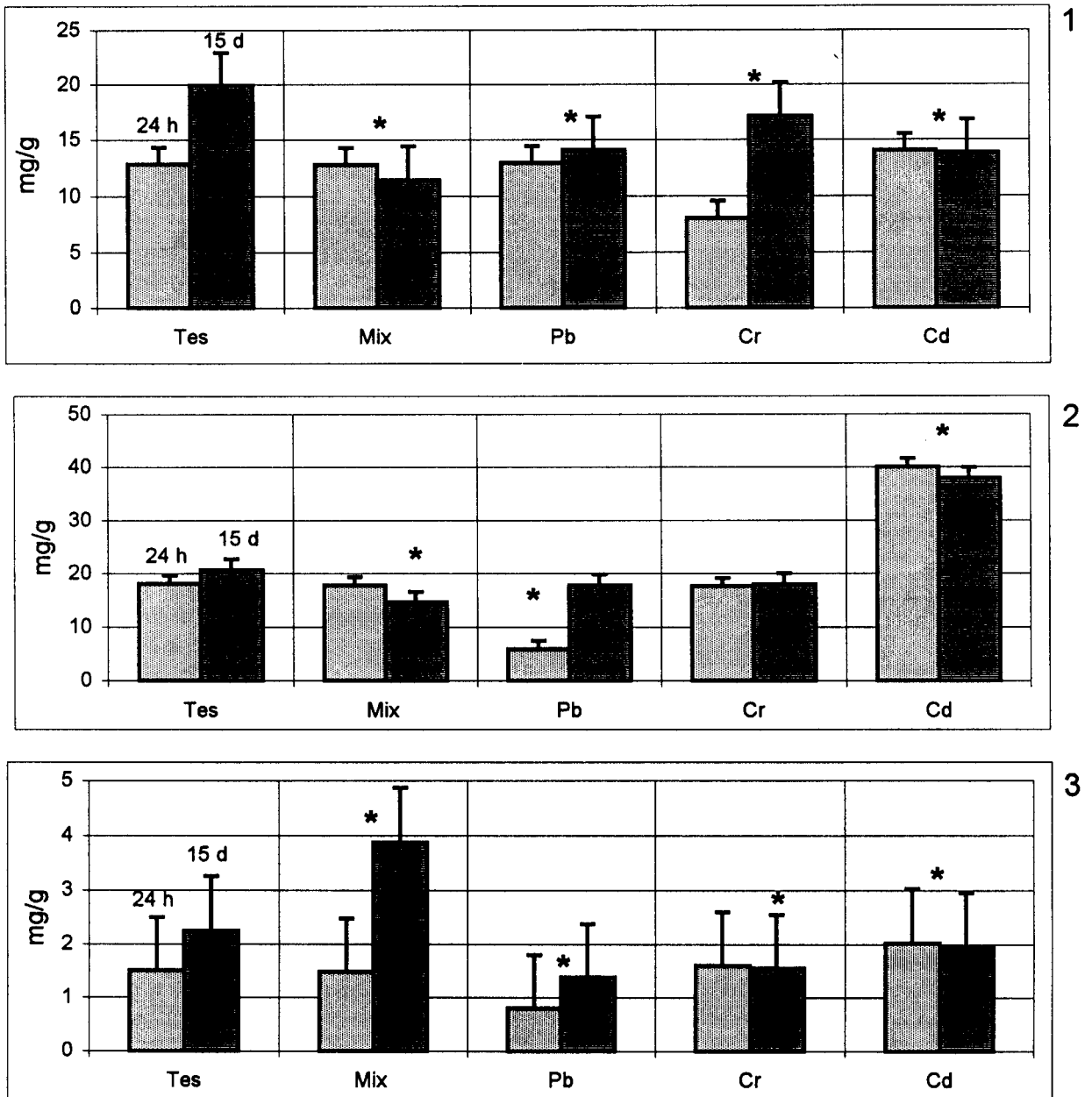


Figura 30. Concentración de: 1) proteínas, 2) carbohidratos, 3) lípidos, de la glándula digestiva de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a concentraciones subletales de metales y de la mezcla Cd + Cr + Pb (mix). *Diferencias significativas con respecto al testigo ($p < 0.03$)

3.10.2 Evaluación del efecto de radicales libres (lipoperoxidación) (Lipox) en branquia y glándula digestiva de *A. ventricosus*

Los valores de lipoperoxidación (Lipox) que reflejan los daños producidos por las radicales libres, aumentaron con el tiempo exposición a los metales de 24 a 168 horas, en las pruebas con juveniles de almeja (Tabla 23).

A 168 horas de tratamiento, los metales Cd y Cr fueron los más deletéreos para el tejido de la branquia y la glándula digestiva.

Las concentraciones de nM MDA/g registradas fueron de 92.3 en el tejido de la branquia y de 134 en la glándula digestiva de organismos que fueron expuestos a cadmio, mientras que en las pruebas con cromo los niveles de Lipox. fueron de 99.2 nM MDA/g en branquia y de 133.6 nM MDA/g en glándula digestiva. En los testigos los valores de Lipox fueron de 13.2 y 22 nM MDA/g respectivamente en estos tejidos.

Asimismo se observaron diferencias significativas entre la respuesta del testigo y de los organismos expuestos a los metales ($p < 0.05$) (Tabla 23).

Con las mezclas de metales a las 24 horas de exposición, los efectos de la radicales libres fueron de entre un 15 a 50% más altos si se comparan con a los valores registrados en las pruebas con los metales solos.

Después de 96 horas de tratamiento, en la mezcla Cd + Cr fue donde se detectaron los niveles mas elevados de Lipox en la glándula digestiva (179 nM MDA/g) y en la branquia (92.3 nM MDA/g) (Tabla 23).

Asimismo, valores de más de 100 ± 10 nM MDA/g en branquia y de 140 ± 20 nM MDA/g en glándula digestiva son indicadores de que el organismo está próximo a morir.

Tabla 23. Lipoperoxidación en tejido de branquia y glándula digestiva de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos y sus mezclas.

METAL (mg/l)	LIPOPEROXIDACION (nM MDA/g)					
	BRANQUIA			GLANDULA DIGESTIVA		
	24 h	96 h	168 h	24 h	96 h	168 h
Cadmio (0.35)	18.9 ± 6.2	44.4 ± 0.1	92.3 ± 3.7	43.3 ± 11.6	60.2 ± 13.5	134.1 ± 4.0
Cromo (5.0)	15.8 ± 2.9	31.2 ± 9.8	99.2 ± 6.8	41.2 ± 8.8	121.5 ± 14	133.6 ± 8.2
Plomo (3.0)	12.6 ± 0.9	37.7 ± 1.45	50.8 ± 2.5	46 ± 0.6	76.16 ± 17	99.7 ± 22.6
Cd (0.35) + Cr (5.0)	18.1 ± 10.2	92.3 ± 2.1	Nd	128.29 ± 23	179.02 ± 32	Nd
Cd (0.35) + Pb (3.0)	26.9 ± 1.4	Nd	Nd	81.18 ± 25.4	Nd	Nd
Cr (5.0) + Pb (3.0)	21.2 ± 4.1	42.02 ± 2.1	Nd	75.7 ± 28	169.4 ± 62	Nd
Cd (0.35) + Cr (5) + Pb (3)	28.7 ± 1.5	28.7 ± 15	89.3 ± 10	65.4 ± 20.6	125.7 ± 13	Nd
Cd (0.2) + Cr (0.2) + Pb (0.2)	21 ± 6.8	48.5 ± 2.1	37.7 ± 2.52	65.4 ± 9.4	35.5 ± 6.1	82.8 ± 2.9
Testigo	9 ± 3.1	11.3 ± 2.4	13.4 ± 0.7	24.2 ± 10.6	21.1 ± 3	22 ± 2.4
Almeja Pichilingue	4.77 ± 1	nd	6.2 ± 0.89	18.37 ± 1.98	Nd	22.8 ± 1.2

Diferencias significativa entre los tratamientos y el testigo, con excepción de plomo 24 horas ($\alpha < 0.05$).

Tabla 24. Lipoperoxidación en tejido de branquia y glándula digestiva de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestas a metales tóxicos.

METAL (mg/l)	LIPOPEROXIDACIÓN (nM MDA / g)			
	BRANQUIA		GLÁNDULA DIGESTIVA	
	24 h	144 h	24 h	144 h
Cadmio (0.5)	9.6 ± 2.6	92.43 ± 3.4	40.1 ± 9.9	148 ± 7
Cromo (8.5)	5.51 ± 0.56	14.45 ± 2.7	48 ± 2	125.21 ± 20.1
Plomo (6.5)	4.53 ± 1.31	4.3 ± 1.2	37 ± 13	116.7 ± 2.4
Cd (0.5) + Cr (8.0)	45.82 ± 2.6	112.3 ± 5	25.7 ± 4.11 ⁺	152 ± 3.4
Cd (0.5) + Pb (6.0)	7.78 ± 1.34	12.97 ± 1.31	17.9 ± 7.3	43.08 ± 3.01
Cr (8.0) + Pb (6.0)	6.78 ± 1.55	12.16 ± 0.75	21.68 ± 3.02 ⁺	37.88 ± 7.18
Cd (0.5) + Cr (8) + Pb (6)	6.64 ± 1.67	17.6 ± 3.1	29.45 ± 5	34.36 ± 3.1
Cd + Cr + Pb (0.32 c/u)	6.27 ± 2.09	5.22 ± 1.12	41.5 ± 10.5	69.06 ± 2
Testigo	2.32 ± 0.44	2.0 ± 0.12	25.7 ± 1.1	24.6 ± 5.1
Almeja Pichilingue	4.61 ± 0.87	Nd	18.37 ± 4.08	Nd

Diferencias significativa entre los tratamientos y el testigo, ($\alpha < 0.05$)

⁺ No presentan diferencia significativa en comparación con el testigo

En las pruebas con adultos de almeja catarina se observó que los metales, que tuvieron efecto oxidativo fueron el cromo sobre la glándula digestiva (125.21 nM MDA/g) y el cadmio sobre el tejido de la branquia (92.43 nM MDA/g), a las 144 horas de exposición (Tabla 24).

La mezcla de metales, donde se detectó los niveles más elevados de Lipox después de 144 horas de exposición, fue la combinación Cd + Cr con 112.3 nM MDA/g en branquia y 152.5 nM MDA/g en glándula digestiva (Tabla 24).

Los organismos procedentes del medio natural (vivero de Pichilingue) presentaron concentraciones de MDA por debajo de las obtenidas en los experimentos.

En el tejido de la branquia de estos organismos el grado de Lipox evaluado fue de 4.77 ± 0.87 , siendo este valor 20 veces menor al máximo registrado en los bioensayos, mientras que en la glándula digestiva el nivel de MDA fue de 18.37 ± 4.08 nM. siendo esta estimación 8 veces menor al máximo observado en los experimentos con los metales y las mezclas de estos.

3.10.3 Evaluación de daño genético en branquia

Los juveniles expuestos a cadmio durante 96 horas mostraron el mayor porcentaje con células con daño que fue de 91%. La longitud de los cometas observados fue de 20 a 102 μm . En las pruebas con cromo se detectó un 71% de células con daño y cometas con una longitud de hasta 112 μm (Figura 31).

Asimismo en la mezcla de los tres metales se registró un número elevado de células con daño (90.5%) y la longitud de los cometas fue de 20 a 120 μm .

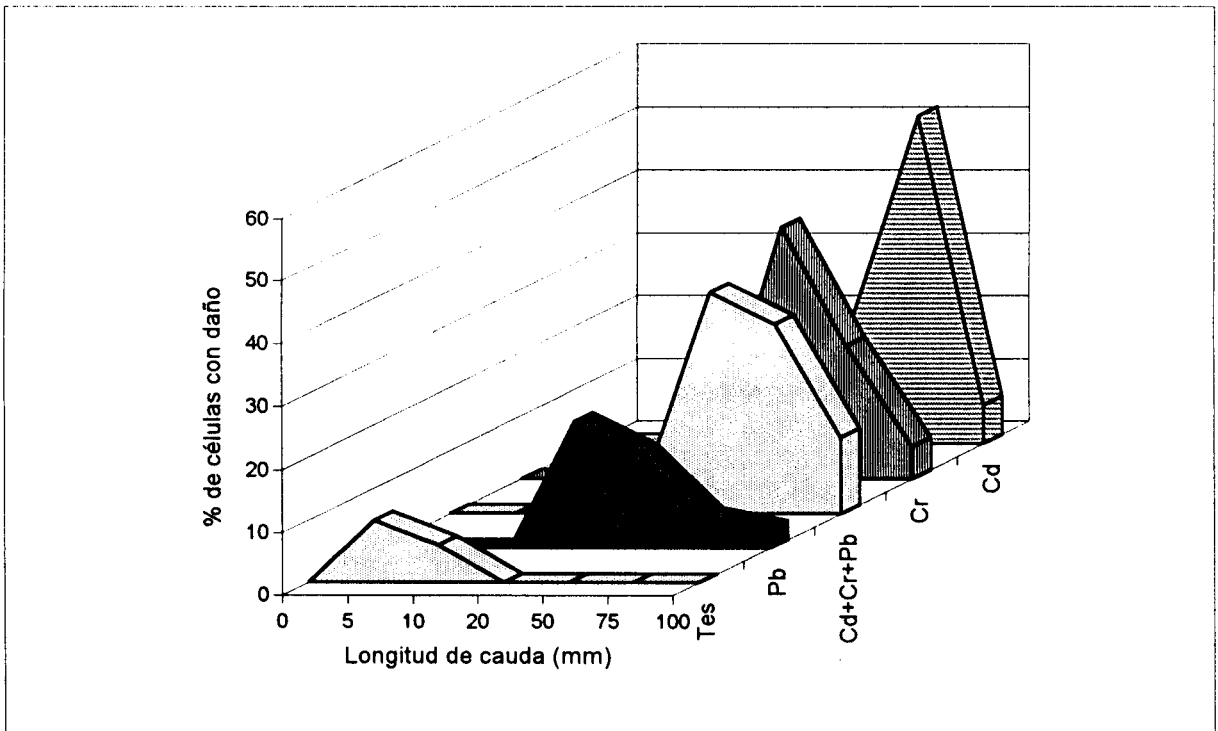


Figura 31. Porcentaje de células con daño genético y longitud de las caudas de cometa (μm), en el tejido de la branquia de juveniles de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos (0.35 mg/l Cd, 5 mg/l Cr y 3 mg/l Pb) durante 96 horas.

En el testigo se registraron caudas que variaron de 5 a 20 μm de longitud y el porcentaje de células con daño fue del 16% (Figura 31).

El metal con mayor efecto genotóxico detectado en estas pruebas fue el cadmio, seguido por la mezcla de los tres metales. El plomo mostró la menor genotoxicidad.

Asimismo se observó que existen diferencias evidentes en cuanto al número y el grado de daño de las células, pertenecientes a los diferentes tratamientos ($t = 3.87$; $p < 0.05$) en comparación con el testigo.

En los bioensayos con adultos se observó una relación directa entre el número de células con daño y el tiempo de exposición ($t = 3.12$; $\alpha = 0.05$), asimismo un aumento en el tamaño de los cometas de 24 a 144 horas de tratamiento, en las pruebas con los metales Cd, Cr, y la mezcla de los tres metales (Figura 32).

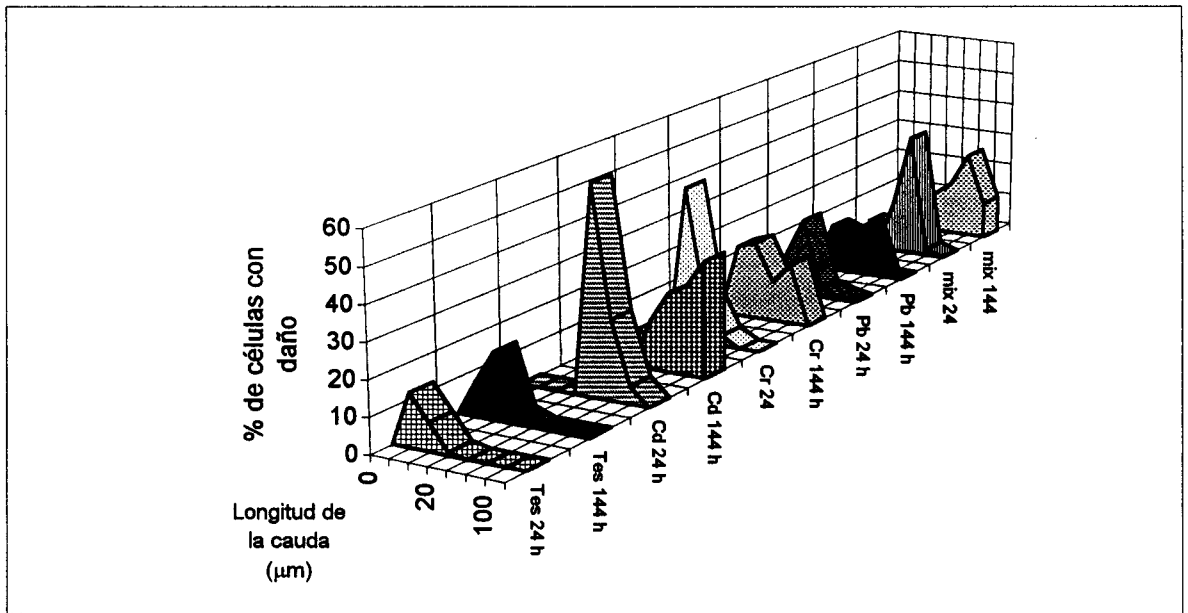


Figura 32. Porcentaje de células con daño genético y longitud de las caudas de cometa (μm) en el tejido de la branquia de adultos de *Argopecten ventricosus* expuestos a metales tóxicos (0.5 mg/l Cd, 8.5 mg/l Cr, y 6.5 mg/l Pb).

A las 144 horas los organismos tratados con cadmio presentaron un 97% de células con daño, los tratados con cromo un 74% y con plomo 42%, mientras que en el testigo solo se observó un 21% de células con daño. En general, cuando se

encontraron porcentajes de células con daño genético por arriba del 80% y con caudas de longitudes de entre 100 a 152 μm correspondieron a organismos moribundos.

La genotoxicidad de los metales observada en esta evaluación fue:

$$\text{Cd} > \text{Cr} > \text{Cd} + \text{Cr} + \text{Pb} > \text{Pb}$$

Asimismo, el Índice del tejido de la branquia (ITB) fue un buen indicador del grado de daño genético observado en los diferentes tratamientos, ya que se registró una relación inversa significativa ($r^2 = 0.958$) entre este índice y los porcentajes de células con daño genético, ya que a valores bajos del ITB correspondieron porcentajes altos de células con daño en la branquia (Tabla 25).

Tabla 25. Valores del índice del tejido de la branquia (ITB) y porcentaje de células con daño genético registrados en los experimentos con adultos de *A. ventricosus* expuestos a metales tóxicos.

Metal (mg/l)	Índice branquial (%)		Daño genético (% de células con daño)	
	24 h	144 h	24 h	144 h
Cd (0.5)	11.39	5.68	88	97
Cr (8.5)	15.57	9.69	62	74
Pb (6.5)	16.37	11.2	39	42
Cd + Cr + Pb	16.03	9.51	54	65
testigo	18.8	17.8	24	31

4.10.3 Evaluación de histopatología

Uno de los marcadores que se utiliza con mayor frecuencia en los estudios ecotoxicológicos es evaluar los cambios ocurridos en los tejidos de los organismos como resultado de la exposición a algún tóxico.

Para realizar esta evaluación se compara la apariencia de los tejidos, con el fin de determinar el grado de anormalidad de los pertenecientes a un organismo expuesto a un xenobiótico con los de uno no expuesto.

Se analizaron 245 preparaciones aproximadamente. Los organismos expuestos a cadmio (0.75 ppm) presentaron daños en la branquia consistentes en pérdida de cilios en las células apicales, descamación y atrofia de las células, y pérdida de las células de los ctenidios (Figura 33).

Esto concuerda con los resultados obtenidos en la tasa de consumo de oxígeno, ya que a partir de 48 horas de exposición a elevadas concentraciones de Cd se observó una reducción de hasta un 70% del consumo de oxígeno de los organismos ocasionado por la pérdida del tejido branquial, antes de 96 horas los organismos mueren.

Las células apicales y laterales que conforman el ctenidio (unidad funcional de las branquias) de los organismos expuestos a dosis bajas de cadmio (0.18 y 0.046 ppm) fueron significativamente más pequeñas en comparación con las del testigo ($p > 0.05$), además se observó una reducción y en algunos casos la desaparición de las células secretoras en el ctenidio.

Se detectó también daño en glándula digestiva, donde se observó reducción y pérdida de tejido de manera gradual conforme aumenta el tiempo de exposición a al metal (0.187 mg/l de cadmio a las 24, 96 y 192 horas) (Figura 34).

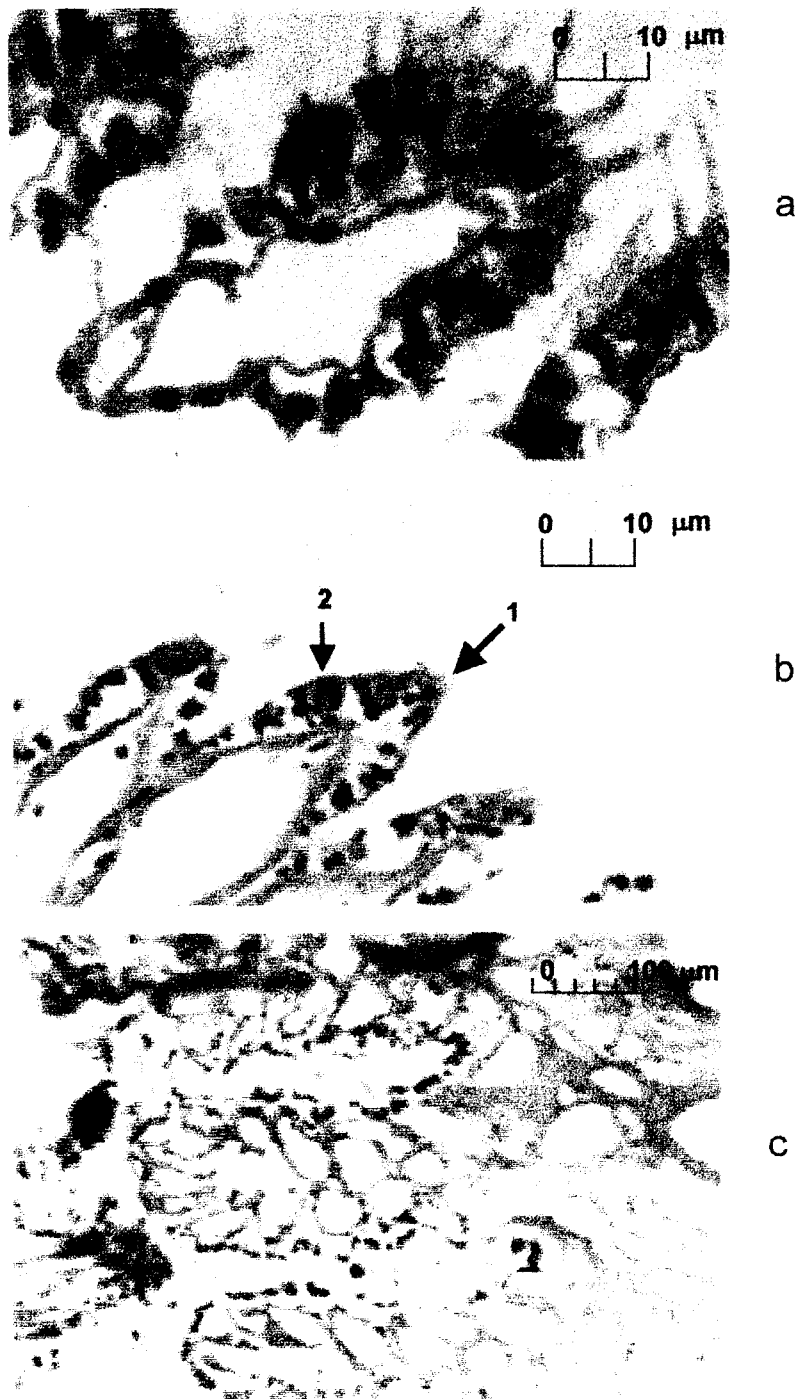


Figura 33. Daño en el tejido de la branquia de *Argopecten ventricosus* expuesta a cadmio (0.75 mg/l). a) Testigo (400 X). b) Ctenidio con pérdida de cilios



Figura 34. Daño en glándula digestiva ocasionada por la exposición a cadmio.
a) Testigo (200 X). b) Tejido de organismos expuestos a 0.187 mg/l de

El manto también presentó daños consistentes en reducción de tejido, aumento de hemocitos y áreas de pérdida de tejido (necrosis) (Figura 35).

Asimismo se observó que los organismos expuestos a las concentraciones de 0.18 y 0.046 mg/l de cadmio sobreviven después de 192 hrs.

En los tejidos de los organismos expuestos a plomo, se observaron daños en el tejido nervioso presente en los palpos y un incremento en el número de hemocitos (Figura 36). También se observó un aumento en el tamaño de las vacuolas del epitelio intestinal, y pérdida de las microvellosidades (Figura 37).

En branquia se observó pérdida de los cilios de las células apicales y la presencia de células cafés en las células laterales (Figura 38). Esas células cafés o cuerpos cafés son concreciones de materiales de desecho y se consideran como un mecanismo de autodepuración (Simkiss y Mason, 1983).

En manto se encontró también daño, consistente en pérdida de tejido y aumento de hemocitos. Los organismos expuestos a plomo, tanto a concentraciones agudas como bajas, sobrevivieron después de las 192 hrs.

Los tejidos de los organismos expuestos a la mezcla Cd + Pb mostraron alteraciones en el tejido nervioso de los palpos, se observó también pérdida de tejido en manto con aumento de hemocitos.

En las branquias se encontró, pérdida de los cilios de las células apicales del ctenidio, y presencia de células cafés (Figura 39). En riñón se observó presencia de

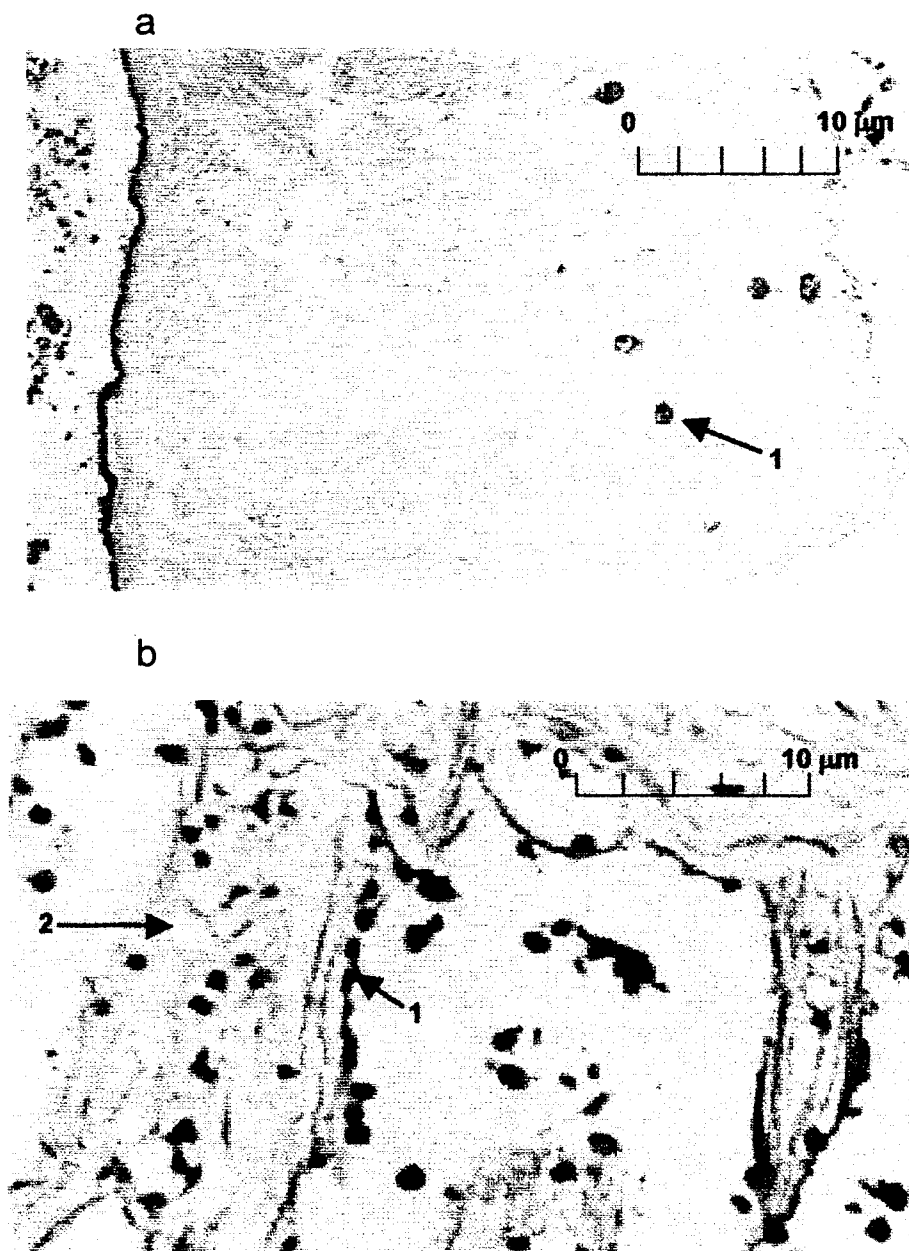


Figura 35. Daño en el tejido del manto por exposición a cadmio (0.187 mg/l).

Se observó un aumento en los granos (1) y en el número de células (2).

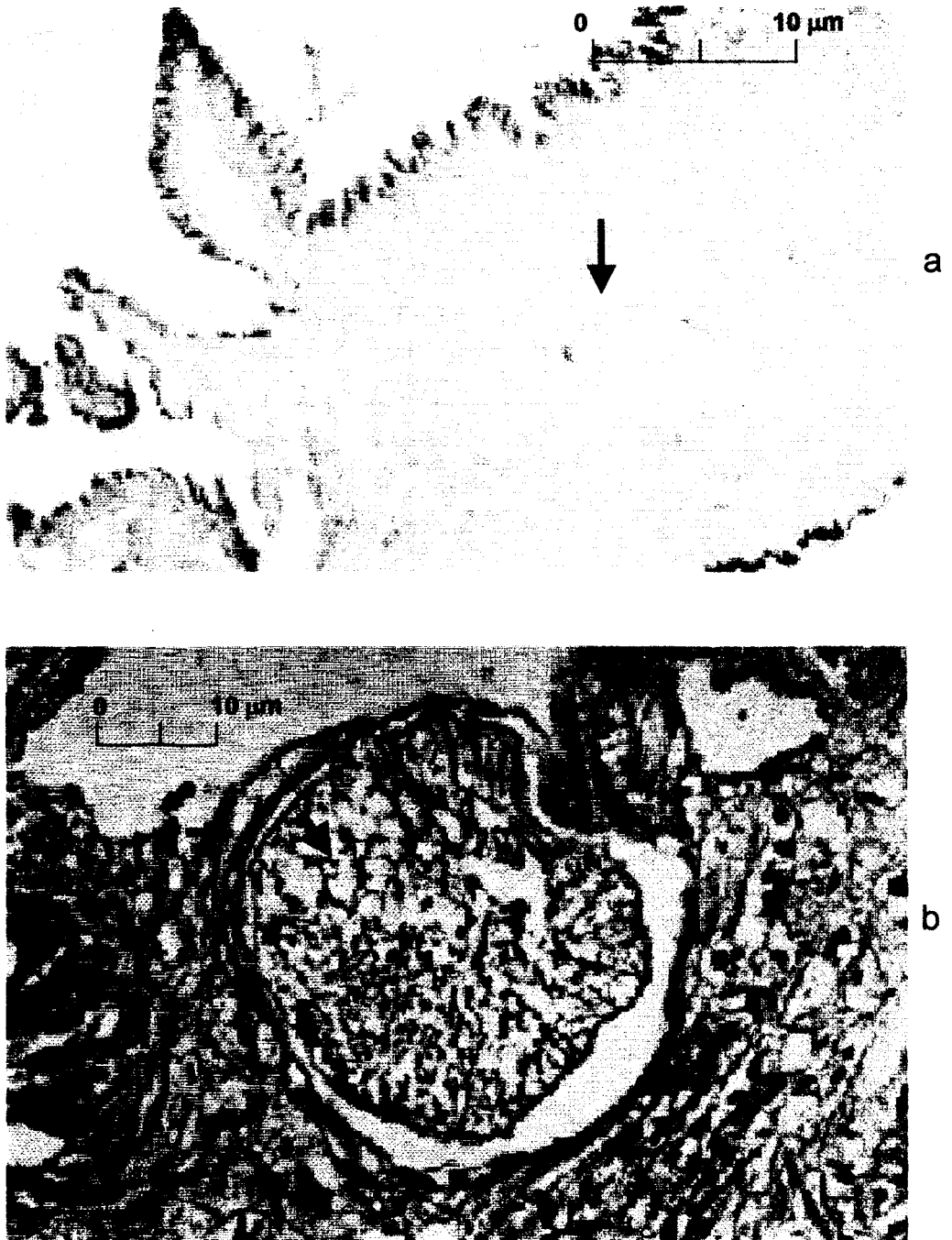
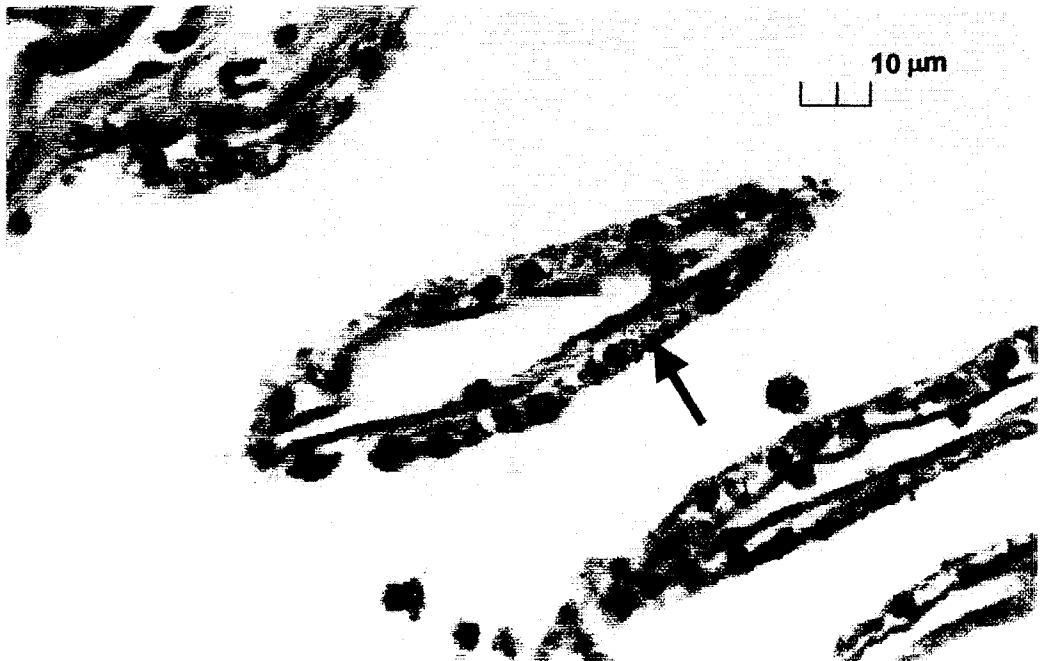
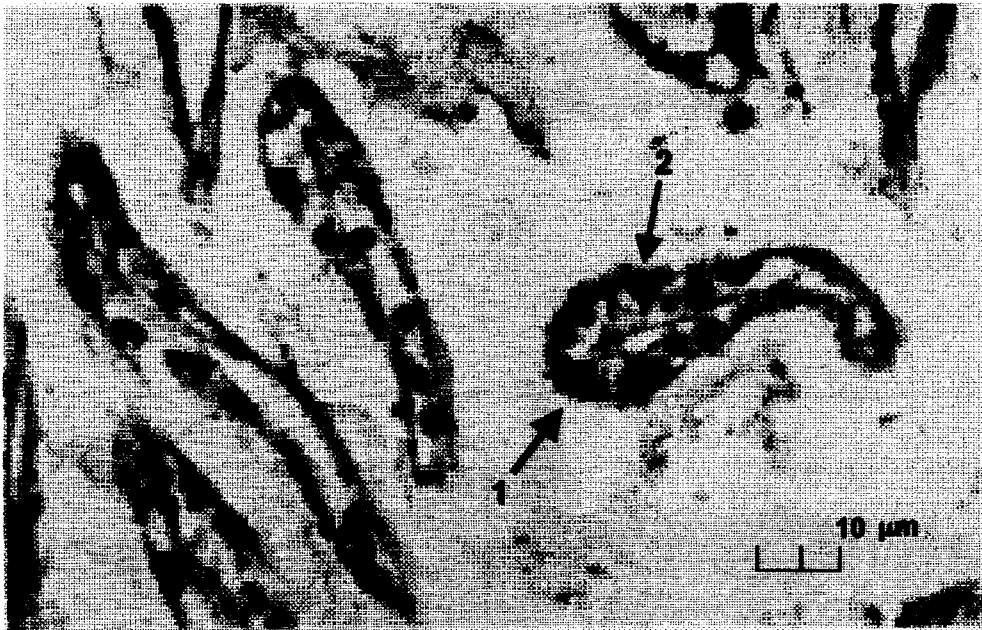


Figura 36. a) Necrosis en el manto ocasionado por exposición a plomo (0.75 mg/l) (100 X) (7-10). b) Daño a células de manto. (200 X) (7-10).

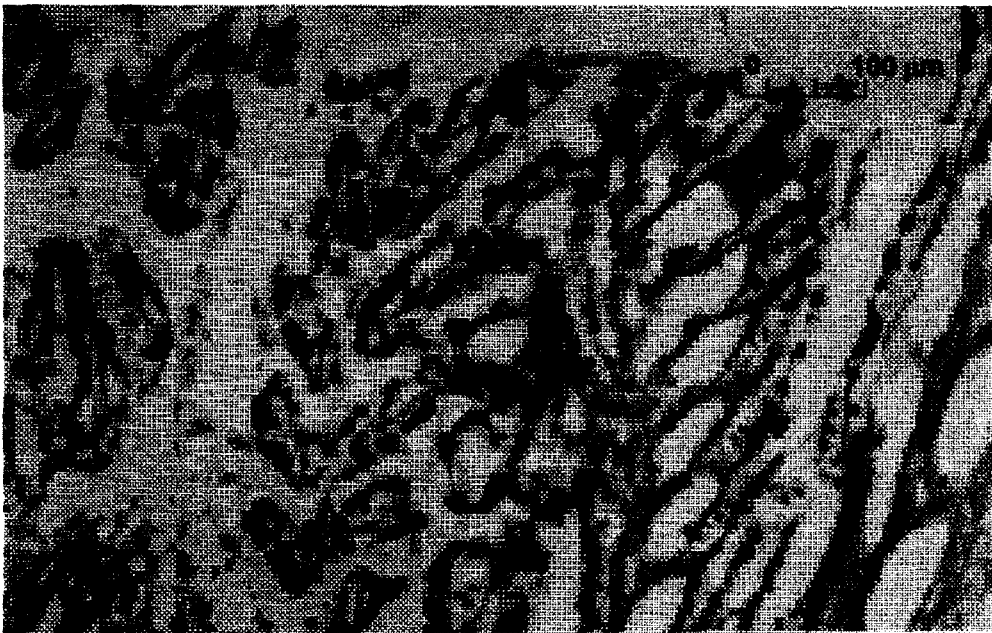


Figura 37. Tejido del intestino mostrando: a) aumento en el número y tamaño de vacuolas, b) pérdida del epitelio ciliar, ocasionados por exposición a Plomo (0.187 mg/l) (120 X).





a

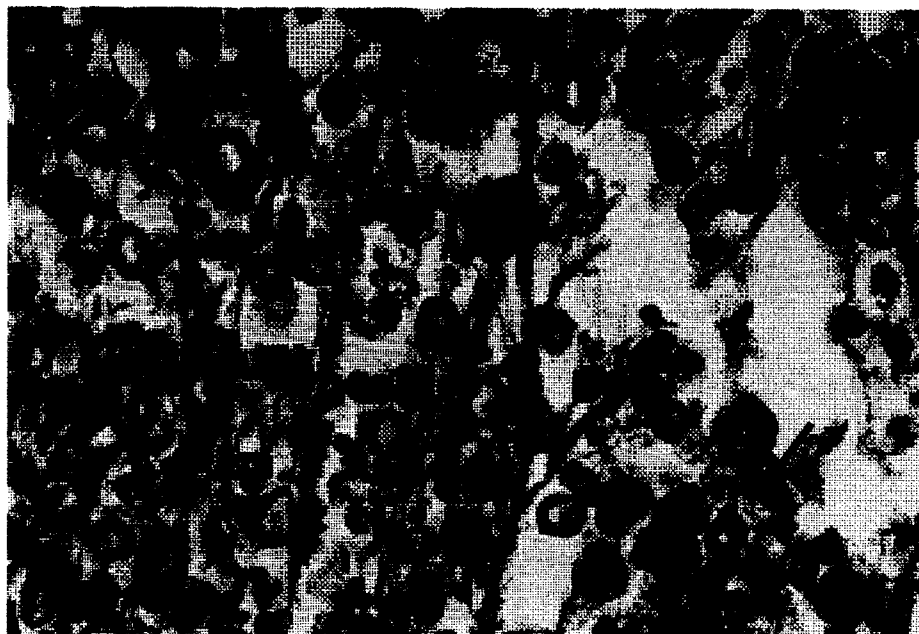


b

Figura 39. Daño en branquia por la exposición a la mezcla de Cd + Pb (1.5 mg/l). a) Se puede apreciar la pérdida de los cilios apicales (1) y la



a



b

0 10 μm

CAPITULO 4 DISCUSION

Las condiciones que prevalecieron durante la aclimatación y la realización de los bioensayos tuvieron una variación mínima en parámetros como la temperatura, salinidad y pH (Tabla 1). Esta situación es necesaria al realizar estudios de tipo toxicológicos con organismos vivos (Bayne *et al.*, 1976; 1978; 1979; Buikema *et al.*, 1982 y APHA, 1994).

Esto es importante de recalcar debido a que las respuestas observadas en las diferentes pruebas con los metales, fueron ocasionadas por los xenobióticos y no por la variaciones en otros parámetros, esto se comprobó además con el análisis estadístico que se realizó para cada prueba, donde la variación de los datos se explicaba en función al tratamiento con los metales.

Asimismo, la secreción de bisco por las almejas testigo y por organismos expuestos a concentraciones subletales de metales, hecho que ocurrió durante el desarrollo de los bioensayos, fue un indicio de que los especímenes se encontraban en condiciones de salud favorables, ya que autores como Reish y Ayers (1968), Carr y Reish, (1978) y Silva-Loera (1986), describieron este mismo suceso y consideraron que la formación de esta estructura es un buen indicador de que los organismos tenían condiciones de buena salud.

Por estas razones, las respuestas detectadas en este estudio se debieron a la exposición a los metales de prueba y no a variaciones en parámetros ambientales o

4.1 Efectos de los metales y sus mezclas sobre la supervivencia de larvas, juveniles y adultos de almeja catarina

Los niveles naturales en que se encuentran los metales tóxicos disueltos en el agua de mar, están en el orden de ppb (partes por billón) sin embargo, las concentraciones necesarias para estudiar las respuestas de los organismos expuestos a ellos es de 3 a 4 órdenes de magnitud mayor a las presentes en el medio natural. Esto se hace evidente cuando se realizan ensayos de letalidad, donde la evaluación es macroscópica y se realiza por medio de la muerte de los organismos.

En los bioensayos de letalidad aguda no se intenta reproducir las condiciones ambientales, sino más bien son un procedimiento experimental que permite conocer la sensibilidad de los organismos a un tóxico y así conocer el efecto máximo que éste produce, que es el deceso de éstos. Sin embargo, en el medio natural la exposición de tipo aguda solo ocurre cuando hay accidentes que dan como resultado el aporte de tóxicos en concentraciones elevadas, que dependiendo de la magnitud de la contingencia afecta a una o más poblaciones o al ecosistema entero. Por esta razón es importante contar con información originada de los ensayos agudos cuyo propósito es la determinación de la CL_{50} .

La información que aporta la CL_{50} es utilizada con dos fines:

- a) Para conocer la sensibilidad de la especie a diferentes xenobióticos.
- b) Para determinar las concentraciones seguras de "no efecto" para los organismos

(APHA, 1994)

En los resultados obtenidos en las pruebas de letalidad con larvas, juveniles y adultos de *Argopecten ventricosus* fue evidente que estos organismos son más sensibles a los metales probados, en comparación con otras especies (Tabla 26).

En las pruebas con cadmio, la CL₅₀ calculada para larvas de *A. ventricosus* fue de 0.207 mg/l este valor es 3 veces menor del que toleran las larvas de ostión japonés, 5 veces inferior al tolerado por las larvas de *Mercenaria mercenaria*, y 86 veces menos de lo que soportan las larvas de *Artemia* sp. (Tabla 26).

En los ensayos con juveniles de almeja catarina y cadmio se observó que el valor de CL₅₀ fue de 0.396 mg/l, siendo 45 veces menor al que toleran los nauplio de *Artemia* sp. y 3 veces menor al que resisten los juveniles de *Argopecten irradians*.

En las pruebas con adultos expuestos a cadmio se percibió que el valor de CL₅₀ fue 18 veces inferior al que toleran los ostiones (*Crassostrea virginica*), 1.8 veces más bajo que lo que toleran las almejas del Atlántico (*Argopecten irradians*) y 3.5 veces inferior al reportado para *Chromomytilus chorus*, el choro Chileno (Tabla 26)

En los experimentos con cromo la CL₅₀ para larvas de almeja catarina fue 2 veces inferior a la que toleran las larvas de ostión japonés y las larvas de la almeja del Atlántico (*A. irradians*). En adultos, la CL₅₀ detectada fue 2 veces inferior a la reportada para el ostión (*C. virginica*), 21 veces por abajo a la que tolera *Macoma balhica*, y 1.5 veces menor a la calculada para *Rangia cuneata* (Tabla 26).

La EPA (Environmental Protection Agency) en 1984 realizó un estudio para

Tabla 26. CL₅₀ (Concentración letal 50) observadas en diferentes organismos marinos.

ORGANISMO	M E T A L E S mg/l			REFERENCIA
	CADMIO	CROMO	PLOMO	
	CL ₅₀	CL ₅₀	CL ₅₀	
<i>Argopecten irradians</i>	1.0 (J)			Pesch y Stewart, 1980
	1.48 (A)			Nelson et al 1976
<i>Crassostrea gigas</i>	0.611 (L)	4.54 (L)	0.758 (L)	Martin et al 1981
<i>Crassostrea virginica</i>	14.29 (A)	18.29 (A)	2.45 (L)	Calabrese y Nelson, 1974 Barrera et al 1998
<i>Mercenaria mercenaria</i>			0.78 (L)	Calabrese y Nelson, 1974
<i>Mytillus edulis</i>	1.20 (L)	4.47 (L)	9.5 (A)	Martin et al 1981
<i>Macoma balhica</i>		190 (A)		EPA, 1984
<i>Rangia cuneata</i>		14.0 (A)		Olson y Harrel, 1973
<i>Choromytilus chorus</i>	2.8 (A)			Roman et al 1994
<i>Artemia franciscana</i>	18.0 (L)	1.9 (L)		Mance, 1987
<i>Argopecten ventricosus</i> (L)	0.207	1.97	1.039	Este estudio
<i>Argopecten ventricosus</i> (J)	0.396	3.4	0.835	Este estudio

2-12 mg/l, y el valor obtenido para los adultos de la almeja catarina se encuentra dentro de estos valores.

En los bioensayos con plomo se detectó un valor de CL_{50} para larvas de almeja catarina de 1.037 mg/l, siendo este superior entre 2 a 1.3 veces al que toleran para larvas del ostión japonés y de *Mercenaria mercenaria*. En adultos, el valor de CL_{50} fue 1.3 veces inferior al reportado para *Mytillus edulis*.

Como se mencionó antes, la toxicidad de los metales con base en sus CL_{50} fue (de mayor toxicidad a menor): Cd > Pb > Cr. Este hecho fue observado también por Martín *et al.*, (1981) en larvas de ostión japonés (*Crassostrea gigas*), y por Barrera *et al.*, (1999) en adultos de ostión del Atlántico (*C. virginica*).

Por otro lado, las CL_{50} obtenidas en los diferentes bioensayos con larvas, juveniles y adultos de la almeja catarina se encuentran entre diez a mil veces por arriba a las concentraciones de metales registradas en las aguas de los sistemas costeros del Pacífico mexicano. Pero se debe recalcar la sensibilidad de estos organismos a los metales, cuya tolerancia es menor a la que soportan las larvas de *Artemia sp.*

Dentro de la Normatividad Mexicana, la Norma Oficial Mexicana (NOM) para la descarga de aguas residuales a sistemas costeros, contempla el uso de los nauplios de *Artemia* como organismos indicadores de la toxicidad de los efluentes (NMX-AA-110-1995-SCFI).

Como se mencionó antes, *A. ventricosus* es más sensible que los nauplios

Asimismo, la NOM-ECOL-001-96, establece los límites permisibles de diversos contaminantes presentes en las aguas residuales, que se vierten a la zona costera.

Estos límites son, para los metales involucrados en este estudio:

Cd 0.1 mg/l (promedio mensual) y 0.2 mg/l (promedio diario)

Cr 0.5 mg/l (promedio mensual) y 1.0 mg/l (promedio diario)

Pb (0.2 mg/l (promedio mensual) y 0.4 mg/l (promedio diario).

Para las larvas pediveliger de *A. ventricosus* cuya CL_{50} para cadmio es de 0.207 mg/l, el criterio de la NOM de 0.2 mg/l (P.D.) sería perjudicial para ellas, si prevalecen estos niveles por más de 4 días. En juveniles de la almeja catarina se observó que la CL_{50} de la mezcla Cd + Cr + Pb es de 0.300 mg/l, (que corresponde a 0.100 mg/l de cada metal), por lo que los niveles establecidos como límites permisibles para estos metales son perjudiciales para este estadio.

Es obvio que estas concentraciones establecidas como límites permisibles sufren de una dilución al ser vertidas al medio natural, pero esto depende de la magnitud de las descargas y de su cercanía a los lugares de cultivo de esta especie.

4.2 Efectos de los metales y sus mezclas en la fisiología de larvas, juveniles y adultos de almeja catarina

En los experimentos realizados por Bayne *et al.*, (1978, 1979, 1981 y 1985) se identificó la relación directa entre el estrés ambiental y la respuesta fisiológica de los

Así mismo, Martin y Severeio (1982), observaron que existe una relación inversa entre los niveles de contaminantes y los valores de algunas funciones fisiológicas como son: la tasa de respiración, la tasa de excreción, la tasa de filtración y la tasa de crecimiento. Bajo estos conceptos, puede esperarse en los organismos expuestos a contaminantes, tengan respuestas fisiológicas diferentes de las que se observan en organismos provenientes de zonas no contaminadas o no expuestos a xenobióticos.

En las pruebas donde se evaluaron las respuestas fisiológicas de las almejas expuestas a los metales cadmio, cromo, plomo y sus mezclas, se observó que estas respuestas fueron significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$) a las que presentaron los testigos no expuestos. Asimismo se observaron diferencias significativas en las respuestas a concentraciones agudas y subletales.

La concentración subletal de un tóxico se considera que es aquella en la que se presentó una mortalidad no mayor al 10% por arriba de la que se observó en el testigo en una prueba de letalidad (Bayne *et al.*, 1981). Las concentraciones subletales son utilizadas en bioensayos en donde los efectos a evaluar son diferentes a la letalidad. En la actualidad se ha visto la necesidad de la realización de este tipo de pruebas ya que aportan información necesaria para la predicción de efectos a largo plazo como consecuencia de exposiciones crónicas (Perkins, 1989).

En las pruebas realizadas con larvas de almeja catarina, donde se evaluó el efecto de los metales sobre la fijación de larvas, se detectó que en concentraciones

Es evidente el cadmio es el que tiene el efecto más severo sobre la fijación de larvas, algo similar fue observado por Bryan (1976) en los asentamientos de las larvas del mejillón *Mytillus edulis*. La fijación de las larvas es una etapa crucial en el reclutamiento de los organismos, debido a que en este período ocurre entre un 20 a 40% de mortalidad de tipo natural (Loosanoff, 1963), por lo que es obvio el efecto que tendría si se expone a las poblaciones de almeja, ya sea naturales o cultivadas, a las CE₅₀ arriba señaladas por periodos de tiempo superiores a 1 año.

Otra de las respuestas fisiológicas evaluada en este estudio fue el aumento de tamaño de juveniles expuestos a los xenobióticos. El metal que tuvo el efecto más severo sobre la tasa de crecimiento de juveniles *A. ventricosus* fue el cadmio. La CE₅₀ donde se observó una disminución en esta tasa fue de 0.047 mg/l, de cadmio.

Wo *et al.*, (1999) Observaron un decremento del 50% en la tasa de crecimiento del gasterópodo *Nassarius festivus* expuesto a concentraciones de 0.22 mg/l de cadmio. Asimismo Stromgren (1982), detectó también una disminución en crecimiento de *Mytillus edulis* en niveles menores de 0.010 mg/l, de este metal. Mientras que Pesch y Stewart (1980) advirtieron que 1.2 mg/l de cadmio inhibió el aumento de talla de *Argopecten irradians* (almeja del Atlántico) en un 50%.

Por todo lo anterior es evidente que la concentración necesaria de Cd para inhibir la tasa de crecimiento de *A. ventricosus*, es casi un 50% y 75% inferior a la que se requiere para observar el mismo efecto en *A. irradians* y en *N. festivus* respectivamente.

Monsalvo (1998), realizó un estudio sobre el crecimiento de los juveniles de *A. ventricosus* en condiciones controladas (37 ‰ y 20 °C), obteniendo tasas de crecimiento

de 0.070 mm/día. Mientras que Avilés-Quevedo (1990) registró un valor de 0.0335 mm/día a 36 ‰ y 23 °C. En los experimentos realizados en este estudio, las tasas de crecimiento calculadas fueron de 0.020 a 0.014 mm/día en los tratamientos con cadmio, de 0.025 a 0.014 mm/día en los ensayos con cromo, de 0.032 a 0.011 mm/día en las pruebas con plomo y en las mezcla Cd + Cr + Pb la tasa de crecimiento vario de 0.02 a 0.011 mm/día.

Estos valores son sumamente inferiores a los reportados por Monsalvo (1998) y Avilés-Quevedo (1990), pero en los testigos se registraron valores de entre 0.045 a 0.065 mm/día, siendo estos montos similares los observados por estos dos autores. Cabe mencionar que durante el desarrollo de los ensayos (30 días), los organismos se alimentaron con una dieta de *Chaetoceros-Tetraselmis* (3.0×10^5), similar a la utilizada por Monsalvo (1998).

Los cambios en el comportamiento de los organismos que tienen contacto con compuestos tóxicos, rara vez son evaluados debido a que en la mayoría de los casos este tipo de estimaciones son subjetivas y las respuestas son difíciles de interpretar. La conductas de huida, movimientos erráticos y retraimiento son indicios de respuestas primarias de los organismos al tener interacción con un xenobiótico (Albores, 1996).

La conducta de escape en las almejas esta bien documentada por Mellon (1969), Moore y Truemen (1971), Bloom (1975), Wilkens (1981) y Pitcher y Butler (1987), como un medio para librarse de sus depredadores, tales como erizos, estrellas

Asimismo, la apertura máxima de valvas se ha observado en especímenes que están a punto de iniciar el desove, (Sainz, Com. Per.) y también se ha registrado en organismos que están en estado de estrés (Cáceres, Com. Per.). Como se mencionó antes, los adultos de *A. ventricosus* expuestos a cadmio y cromo presentaron este tipo de comportamiento, pero no ocurrió el desove posteriormente. Esta respuesta puede denotar un tipo de "irritación" en algunas estructuras del espécimen que provoca esta apertura de valvas.

Del mismo modo, la velocidad en el cierre de valvas esta involucrada con la salud del organismo, ya que lesiones en el músculo abductor causadas por parásitos o infecciones o alteraciones en las células sensorias localizadas en los tentáculos situados en el borde del manto, originan alteraciones en el cierre de las valvas (Beninger y Le Pennec, 1991). Posiblemente, el retardo en el cierre de valvas de los organismos tratados con tóxicos, sea indicativo de posibles daños originados por el metal al que fueron expuestos, ya que esta respuesta involucra la coordinación nerviosa.

Las almejas expuestas a plomo tuvieron alteraciones en el cierre de valvas después de 96 horas de exposición. Al revisarlas bajo el microscopio, se detectaron lesiones en los tentáculos, estas lesiones son la causa de la respuesta alterada de cierre de valvas ya que en estas estructuras se encuentran los receptores que perciben los estímulos mecánicos.

Con base en todo lo anterior, las respuestas de conducta observadas serian un

exposición hasta 3 o 4 días después. La apertura máxima de valvas y de la conducta de escape no son específicas a la exposición de metales, mientras que la velocidad de cierre de valvas si refleja un posible daño por el efecto de estos tóxicos.

La tasa de consumo de oxígeno se considera como una respuesta que está en estrecha relación con los cambios del medio ambiente y el estado fisiológico del organismo, ésta tasa es un buen indicador cuando los organismos son expuestos a algún tóxico de manera accidental o experimentalmente (Bayne *et al.*, 1976). En los bioensayos con juveniles y adultos de almeja catarina y los metales cadmio, cromo y plomo se detectó de manera general, un decremento en la tasa de respiración relacionada con el aumento del tiempo de exposición a estos metales, este mismo hecho fue observado por Cheung y Cheung (1995), cuando expuso a *Perna viridis* a concentraciones de cadmio de entre 0.15 a 1 mg/l.

En estudios previos realizados para evaluar la tasa de respiración de *A. ventricosus* en condiciones experimentales, Silva-Loera (1986) reporta valores de 0.68 ml O₂/g/h en adultos y de 1.3 ml O₂/g/h en juveniles, que se mantuvieron a 20 °C, y 36 ‰, mientras que Sicart (1999) registró montos de 2.4 a 1.24 ml O₂/g/h en juveniles mantenidos a 21 °C. La tasa de consumo de oxígeno determinada en este estudio varió de 5.6 a 0.58 ml O₂/g/h en juveniles y de 1.9 a 0.040 ml O₂/g/h en adultos, siendo estos valores sumamente diferentes a los indicados anteriormente. Cabe mencionar que los bioensayos se realizaron a temperaturas similares a los efectuados por estos investigadores (20 °C +/-2), por lo que es probable, que la exposición a los metales fue el factor responsable de la respuesta diferente de los organismos, ya que los

testigos tuvieron un consumo de oxígeno similar al calculado por Silva (*op. cit.*) y Sicart (*op. cit.*).

Los desechos nitrogenados son producto del metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas degradadas provienen de la dieta o de las reservas estructurales del organismo. La tasa de excreción también está influenciada por factores fisiológicos y ambientales y conjuntamente con la tasa de respiración son indicadoras de la condición fisiológica de un organismo o de su estado de salud (Bayne *et al.*, 1976). En las pruebas realizadas con los juveniles y adultos de *A. ventricosus* se observó un incremento de la tasa de excreción conforme aumentó el tiempo de exposición a los metales. Algo similar fue observado por Cheung y Cheung (1995) en *Perna viridis* expuesta a cadmio.

Baber y Blake (1985), midieron la tasa de excreción de amonio de *A. irradians*, en condiciones naturales encontrando valores de entre 75 a 140 μg de $\text{NH}_3/\text{g}/\text{h}$. Los valores determinados en los testigos de las pruebas realizadas en este estudio, fluctuaron de 73 y 148 μg de $\text{NH}_3/\text{g}/\text{h}$, siendo estos montos similares a los que se registrados para *A. irradians* (la almeja del Atlántico), mientras que la tasa de excreción calculada en los experimentos con los metales, aumentó hasta un 300% .

Las respuestas de los organismos a la acción de algún agente, se miden de manera aislada para posteriormente integrar estas respuestas con el fin de profundizar en la comprensión de los procesos que son los responsables de ciertos eventos

proporciona información sobre el balance entre el catabolismo de las proteínas, lípidos y carbohidratos y se considera como un índice del grado de estrés al que están sometidos los organismos (Corner y Cowey 1968; Bayne *et al* 1976; Widdows 1978).

Una tasa elevada de catabolismo de proteínas, en comparación con la degradación de carbohidratos y lípidos da como resultados un valor bajo en la relación O:N, que es indicativo de condición de estrés alto . Pero un valor alto de esta razón por lo tanto, indica la predominancia del catabolismo de carbohidratos y lípidos, lo que significa niveles de estrés bajos.

Los valores obtenidos para la relación O:N indicaron que los organismos estuvieron en estrés durante el desarrollo de los bioensayos y que hubo un aumento de este estado conforme se incrementó el tiempo de exposición a los xenobióticos. Algo semejante fue observado Bayne *et al.*, 1976, 1978, en el mejillón *Mytilus edulis* y por Cheung *et al.*, (1995) en *Perna viridis*, expuesta a cadmio.

Baber y Blake (1985) determinaron el índice O:N en ejemplares de *Argopecten irradians* en condiciones naturales, y observaron que valores superiores a 22 indicaron catabolismo de carbohidratos, entre 22 a 12 catabolismo de lípidos, y los menores a 9 de proteínas.

Los valores de esta razón, en los bioensayos con juveniles de almeja catarina expuestos a los metales y a la mezcla Cd + Cr + Pb fueron menores a 9. En adultos, los montos del índice O:N fluctuaron de 6.9 a 0.23 en las pruebas con los metales solos y 10 a 3.1 con las mezclas, después de 96 horas de exposición.

xenobióticos y la magnitud de este estado aumentó con el tiempo de exposición. Cabe mencionar que los testigos tuvieron valores del índice O:N por arriba de 20.

Por otro lado, la tasa de filtración esta íntimamente ligada con la alimentación de los organismos, por lo que alteraciones en esta actividad repercuten directamente en el aumento de peso y la talla de los especímenes. En los bioensayos realizados con la almeja catarina se detectó que la tasa de filtración disminuyó en función de los incrementos de la concentración de metal y del tiempo de exposición. Autores como Lin *et al.*, (1993) y Abraham *et al.*, (1986) observaron también un decremento en la tasa de filtración en el ostión japonés y el bivalvo *Villorita cyprinoides* expuestos a concentraciones crecientes de los metales cadmio y cromo.

Palmer (1980), midió la tasa de filtración de la almeja del Atlántico *A. irradians* en condiciones naturales, obteniendo valores 4.854 (\pm 2.258 l/h/g) en adultos de esta especie, mientras que Chipman y Hopkins (1964) y Kirby y Smith (1972) señalaron que la tasa de filtración para juveniles es de 6 l/h/g entre 21-25 °C.

Los valores obtenidos en el presente estudio para la tasa de aclaramiento variaron de 2.95 a 0.98 l/h/g para los organismos expuestos a cadmio, de 3.32 a 1.2 l/h/g con cromo, y de 4.49 a 1.13 l/h/g con plomo, en las mezclas de metales los valores variaron de 2.9 a 1.18 l/h/g, siendo estos montos mucho menores en comparación con los obtenidos por los autores citados antes. Pero los testigos tuvieron un valor promedio de 5.8 \pm 1.33, similar a lo observado por Palmer (1980).

En los bioensayos donde se evaluó el efecto de los metales y sus mezclas sobre

tiempo de exposición a los metales, siendo este hecho más evidente en los organismos expuestos al cadmio y las mezclas con este metal. Todo lo anterior indicó que la exposición a los metales causó alteraciones en los procesos fisiológicos. Las reservas de energía destinadas a procesos metabólicos tales como el crecimiento, o aumento de peso fueron utilizadas para compensar fisiológicamente el estrés originado por la presencia de las sustancias tóxicas, todo esto se traduce en un retardo en el crecimiento de estos organismos, y posiblemente en una disminución del reclutamiento de juveniles.

4.3 Bioacumulación de metales en juveniles y adultos de almeja catarina

La bioacumulación de metales ocurre cuando la tasa de incorporación del xenobiótico excede la tasa de eliminación (depuración), este es un proceso dinámico que es afectado por factores exógenos y endógenos, dentro de los factores endógenos se refieren a la edad, talla, peso y condición reproductora de los organismos, y los exógenos a las variables ambientales. Un factor exógeno que influye directamente en la toma de los metales, es la disponibilidad de los mismos.

En los bioensayos realizados en este trabajo se utilizó sales como fuente de metales, que al disociarse en el medio acuoso parte del metal queda en forma libre (disuelta). En esta forma es disponible y puede ser tomado por los organismos (Fergusson, 1982).

Debido a que dentro de los objetivos de este estudio no se estableció la

recalcar que las concentraciones de xenobióticos que se fijaron para el desarrollo de los bioensayos, se calcularon con base en sus coeficientes de solubilidad, considerando que el agua de dilución tenía una salinidad de 36 ‰, por ejemplo, el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solo es soluble en agua marina en concentraciones menores a 10 mg/l, el CdCl_2 en concentraciones menores a 25 mg/l y el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en concentraciones por debajo de 50 mg/l (Fergusson, 1982).

Las vías de entrada de los metales al organismo son: por el contacto con estructuras como el manto y las branquias, y en el alimento.

Los metales tóxicos ingresan y se acumulan en el organismo imitando el comportamiento de los elementos esenciales, de este modo ingresan y se incorporan a los tejidos, mediante los sistemas de transporte y almacenamiento de compuestos endógenos, a esta imitación de los metales tóxicos a las biomoléculas se denomina mimica molecular (Ayala-Fierro, 1999).

La bioacumulación de metales observada, en los experimentos realizados con juveniles y adultos de almeja catarina fue (de mayor a menor): $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Cr}$, siendo el cadmio el metal que penetra en mayor cantidad a los tejidos de las almejas, ya que este metal imita (mimica) el comportamiento del calcio.

Los pectínidos son acumuladores eficaces de cadmio este hecho fue observado por Vattuone *et al.*, (1976) en *Himmites* sp.; Kamimura (1980) lo detectó en *Pecten* sp.; Carmichael *et al.*, (1979) en la almeja del Atlántico y Topping (1973) en *Pecten maximus* y *Chlamys* sp.

metal en el agua, mayor concentración en los tejidos del organismo). Este mismo hecho fue observado por Watting (1983) en *Crassostrea gigas*, *C. Margaritacea*, *Perna perna* y *Choromytilus meridionalis*, expuestos todos ellos a metales tóxicos. Palmer y Rand (1977), lo observaron en organismos de *Placopecten* sp. y Palmer (1980) lo detectó también en ejemplares de *Argopecten irradians*.

Los valores máximos del factor de bioacumulación observados en los tejidos de las almejas catarinas adultas fueron de 2410 en organismos expuestos a concentraciones de 7.5 µg/L de cadmio en el agua, de 14.4 para especímenes expuestos a 3150 µg/L de cromo, y de 98 para tratados con 10,000 µg/L de plomo, el tiempo de exposición fue de 144 horas, y como se dijo anteriormente, el metal que mayormente se acumuló en el tejido de estos organismos fue el cadmio.

En el proceso de bioacumulación de metales se pueden apreciar 2 fases:

En la primera fase (fase I), la tasa de incorporación del metal es superior a la tasa de depuración, dando como resultado un aumento en la concentración de metal dentro del organismo de manera acelerada.

En la segunda fase (fase II), la tasa de toma y de depuración están en equilibrio, por lo que no se aprecia un aumento en la concentración de metal dentro del organismo. Aquí pueden ocurrir dos cosas, que el organismo mantenga estable la concentración de metal en sus tejidos sin afectar su estado de salud o que ocurra una saturación y ocurran efectos adversos en su fisiología hasta causarle la muerte (Cunningham, 1979).

En los bioensayos de exposición aguda, se identificaron solo la fase I del proceso de acumulación. La tasa de incorporación de cadmio siempre fue mayor a la

de cromo y plomo, esto se observó en las pruebas con juveniles y adultos de almeja catarina. Asimismo, los organismos llegaron a un estado de saturación muriendo posteriormente.

Las concentraciones de metales encontradas en estos organismos próximos a morir fueron de 0.3078 mg/g de cadmio, 0.1522 mg/l de cromo y 0.978 mg/g de plomo. Estas concentraciones pueden ser de utilidad cuando se realizan estudios de histopatológica, para determinar las causas posibles del deceso de los organismos.

La acumulación de metales observada en los organismos procedentes de bahía Concepción (zona central del canal de navegación), vivero de Pichilingue y de los estanques de cultivo de CICIMAR-IPN, presentaron diferencias y de acuerdo a su orden de magnitud fue (de mayor a menor):

Pichilingue: $Pb > Cd > Cr$

CICIMAR: $Cd > Pb > Cr$

B. Concepción: $Pb > Cd > Cr$

Lo anterior demuestra que en Bahía Concepción y el vivero de Pichilingue el metal que estuvo en mayor disponibilidad es el plomo. En los estanques de CICIMAR, los resultados indican que el metal más biodisponible fue el cadmio.

Debido a que no forma parte de los objetivos de este trabajo, no se puede definir con precisión las fuentes de estos xenobióticos, pero es evidente, que la zona de Pichilingue puede tener aportes de plomo por la quema de combustolio en la

Los organismos procedentes del vivero de Pichilingue, presentaron factores de bioacumulación de 1.56 para cadmio, 0.10 para cromo y de 0.44 para plomo, las concentraciones promedio presentes en sus tejidos fueron de 1.4, 0.023 y 3.6 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Mientras que los factores de bioacumulación de los organismos de Bahía Concepción fueron del orden de 3.37 y 0.39 para cadmio y plomo y las concentraciones promedio presentes en sus tejidos fueron de 2.7 y 4.22 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. En los organismos de los estanques de CICIMAR-IPN se registraron concentraciones de metales de 5.5 $\mu\text{g/g}$ de cadmio, 0.71 $\mu\text{g/g}$ de cromo y 3.29 $\mu\text{g/g}$ de plomo, siendo los factores de bioacumulación de 5.3, 0.35 y 7.32 respectivamente.

Es evidente, que los niveles de metales presentes en los organismos procedentes de los ambientes naturales fueron sumamente diferentes a los detectados en especímenes que participaron en los bioensayos de acumulación realizados en el laboratorio. Siendo los primeros entre 1500 a 2500 veces inferiores si los comparamos con los valores obtenidos en los experimentos.

Asimismo, en la Tabla 27 se observa que las concentraciones de los metales cadmio y cromo presentes en los tejidos de las almejas catarinas originarias del vivero de Pichilingue, de Bahía Concepción y del CICIMAR-IPN, son inferiores si se comparan con los niveles presentes en otros bivalvos que habitan en la costa occidental de Baja California o en el Mar de Cortés.

Sin embargo, si comparamos los niveles de metales presentes en los tejidos de las almejas de Pichilingue, Bahía Concepción y CICIMAR-IPN, con la NOM para consumo de mariscos (cadmio 0.5 $\mu\text{g/g}$ y plomo 1.0 $\mu\text{g/g}$), podemos notar que los niveles de cadmio y plomo presentes en estos organismos rebasan los límites máximos

Tabla 27. Concentración media de metales ($\mu\text{g/g}$) en tejidos de moluscos del Pacífico mexicano.

ESPECIE	LOCALIDAD	CADMIO $\mu\text{g/g}$	CROMO $\mu\text{g/g}$	PLOMO $\mu\text{g/g}$	REFERENCIA
<i>Modiolus capax</i>	Bahía de los Ángeles	27.3			Gutiérrez-Galindo <i>et al</i> 1999
<i>Modiolus modiolus</i>	Bahía Tortugas	70			Gutiérrez-Galindo <i>et al</i> 1999
<i>Mytilus californianus</i>	Bahía Tortugas	10			Gutiérrez-Galindo <i>et al</i> 1999
<i>Chione californiensis</i>	Golfo de Santa Clara	1.56	0.32		Gutiérrez-Galindo <i>et al</i> 1990
<i>Modiolus capax</i>	B. de los Ángeles	12.28	0.38		Gutiérrez-Galindo <i>et al</i> 1990
	B. San Luis Gonzaga	19.22	0.42		
<i>Mytilus californianus</i>	Punta Erendira	6.7	1.15	0.6	Reynoso y Jorajuria, 1988
	Santa Rosalía	6.64	0.9	1.03	
<i>Crassostrea gigas</i>	San Quintín	7.05			Gutiérrez-Galindo <i>et al</i> 1991
<i>Crassostrea virginica</i>	Laguna de Términos	3.7	6.7	5.8	Ponce, 1988
<i>Argopecten ventricosus</i>	Ensenada de La Paz	1.4	0.23	3.6	Este estudio
<i>Argopecten ventricosus</i>	Bahía Concepción	2.47	nd	4.2	Este estudio
<i>Argopecten ventricosus</i>	CICIMAR	5.49	0.716	3.29	Este estudio
NOM, (1993)		0.5	NR	1.0	
031-SSA1					
FDA (1983)		5.0	5.0	2.5	

NOM (1993) Norma Oficial Mexicana para consumo humano

establecidos por esta NOM, lo cual indica que no tienen la calidad para ser consumidos. Cabe mencionar que esta NOM no fija un criterio para el metal cromo.

La FDA (Food and Drugs Administration) estableció los siguientes criterios para el consumo de mariscos, el límite máximo permitido de los metales cadmio, cromo y plomo son $5.0 \mu\text{g/g}$, para el primero, de $5.0 \mu\text{g/g}$ para el segundo y de $2.5 \mu\text{g/g}$ para el tercero. Estos valores son superiores a los que están aprobados por la NOM. Con estos criterios, las almejas de Pichilingue y Bahía Concepción no rebasan los criterios establecidos para cadmio, pero si rebasan los criterios establecidos para plomo. Por todo lo anterior es evidente que se deben realizar monitoreos continuos para determinar la calidad de las almejas, en las zonas donde se realiza su explotación.

El consumo de moluscos constituye un aporte de metales potencialmente tóxicos a la dieta humana. Este hecho es importante debido a que existen reportes de daños graves en la salud debidos a la ingesta de mariscos contaminados con metales, como el caso de la enfermedad de Minamata en Japón, donde se presentaron alteraciones nerviosas entre los pescadores, que fueron atribuidas a las altas concentraciones de mercurio presentes en moluscos y peces. Otro caso fue el síndrome de ita-ita causado por cadmio (Moore, 1991).

LA FDA (Federal Drugs Administration) estableció la Rfd (oral reference dose) que es una dosis de referencia que puede ser consumida diariamente sin que exista riesgo de efectos deletéreos en la salud. Las Rfd son el resultado de largos estudios

Las Rfd de ingesta de cadmio presente en alimentos es de 0.001 mg/kg/día, para cromo (hexavalente) en insumos es de 0.003 mg/kg/día. Esta dependencia no ha fijado un valor de Rfd para el plomo (EPA-IRIS, 1987).

Asimismo la OMS (Organización Mundial de la Salud) ha establecido las dosis de "ingestión semanal tolerable" de metales presentes en alimentos para consumo de personas adultas, para el caso del cromo es de 0.21 mg/semana, 3.0 mg/semana para plomo y 0.01 mg/semana para cadmio.

Con los valores obtenidos en la determinación de los niveles de metales presentes en las almejas de Pichilingue y Bahía Concepción, se realizó un cálculo para determinar la dosis de metales que se ingieren al consumir estos mariscos. Se estimó un consumo de 900 g de almejas a la semana por medio de los indicadores evaluados por EPA (1983). El cálculo se realizó para hombres de 80 kg de peso y para mujeres de 60 kg de peso.

La concentración de metales que son ingeridos por los hombres al consumir 900 g de estos moluscos son: 0.0044 mg/kg/semana de cadmio, 0.000528 mg/kg/semana de cromo y 0.0084 mg/kg/semana de plomo. Mientras que los niveles de metales ingeridos por las mujeres son: 0.0059 mg/kg/día de cadmio, 0.702 mg/kg/semana de cromo y 0.011 mg/kg/semana de plomo.

Al comparar los valores de los metales ingeridos por hombres y mujeres con la Rfd y las dosis de ingestión semanal tolerable, es claro que el único valor que rebasa la Rfd (EPA- IRIS, 1987) es la concentración de plomo que es consumida por las mujeres.

De lo anterior, se puede recomendar que personas de 60 kg de peso o de menor peso consuman entre 600 a 750 g de almejas a la semana.

5.4 Efectos de los metales y sus mezclas en los biomarcadores

En la actualidad ha aumentado, el uso de índices bioquímicos que son utilizados para la identificación de efectos producidos por los xenobióticos, a estos índices se les denomina biomarcadores.

Un biomarcador es una señal identificable de cambios a nivel bioquímico, celular o fisiológico que proporciona indicios de daños provocados por la exposición a algún agente estresante. Como se mencionó antes en este trabajo se evaluaron cuatro tipos de biomarcadores: la composición química de la glándula digestiva, la lipoperoxidación, el daño genético de las células y lesiones por medio de análisis histopatológico.

El análisis de la composición química de estructuras como la glándula digestiva, y el músculo abductor, dan información sobre el nivel energético del organismo. La energía es almacenada en forma de lípidos, carbohidratos y proteínas, para ser movilizadas posteriormente cuando es requerida (Bayne y Newell, 1985).

Los pectínidos, al igual que todos los moluscos, muestran variaciones en el almacenamiento y utilización de sus reservas energéticas, que están ligados con sus ciclos reproductivos, por lo que variaciones en las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos internos ocurren en lapsos de tiempo de semanas a meses (Kirby-Smith, 1972). Sin embargo, cuando los organismos se encuentran sometidos a condiciones de estrés severo, se ha observado la movilización de las reservas de

energía para mantener la homeostasis, independientemente del estadio que se encuentre (Foster *et al.*, 1992).

En las pruebas realizadas en este trabajo, se observó que las almejas (juveniles y adultas) expuestas a metales presentaron niveles de estrés alto, (como anteriormente se discutió en la relación O:N), asimismo se advirtió una disminución en los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos en la glándula digestiva de estos organismos de hasta un 75% en solo 144 horas (6 días) de exposición a los xenobióticos.

Chavez, (1998) observó también disminuciones de la concentración de proteínas y carbohidratos de hasta 30% de la glándula digestiva de almejas, que se encontraban en acondicionamiento para inducir su reproducción, pero la movilización de estas reservas se realizó en 3 semanas.

Riley y Mix, (1981) y Giesy *et al.*, (1983), observaron también, el decremento en la concentración de lípidos proteínas y carbohidratos de la glándula digestiva de almejas y ostiones expuestos a xenobióticos en lapsos de tiempo de días. Cabe mencionar, que los organismos sobrevivientes de las pruebas, murieron 48 horas (2 días) después de que se observó la movilización de sus reservas energéticas.

La lipoperoxidación es un proceso, donde las radicales libres degradan los ácidos grasos presentes en las membranas biológicas, dando como resultado compuestos de hidroxiperoxi-keto-epoxi, e hidroxiderivados, por medio de una secuencia de reacciones autocatalíticas. La lipoperoxidación ocurre por la exposición a xenobióticos y a condiciones de estrés producidas por factores del medio ambiente, como la radiación UV (Halliwell y Gutteridge, 1985).

Los niveles de lipoperoxidación observados en las pruebas con las almejas y los xenobióticos, demuestran que el metal más deletéreo fue el cadmio. Asimismo se observó que el cromo induce daño oxidativo en las células de branquia y de glándula digestiva, este hecho es importante, debido a que son muy escasos los informes de este tipo de efectos en organismos marinos ocasionados por el cromo (Sridevi *et al.*, 1998). Asimismo se detectó un mayor efecto oxidativo en el tejido de glándula digestiva, que en tejido de la branquia. Algo similar, fue observado por Viarengo *et al.*, (1990) en *Mytillus galloprovincialis* expuesta a cobre durante 10 días.

En la evaluación de daño genético se observó que los metales con efectos genotóxicos son el cadmio y el cromo sobre el tejido de las branquias de la almeja catarina. González *et al.*, (1999), se percató también del efecto genotóxico del cadmio y cromo en tejido de branquia del ostión (*Crassostrea virginica*). Hebert y Zahn (1990), observaron roturas en el material genético de células de branquia del molusco *Mytillus galloprovincialis*, expuestos a aguas residuales provenientes de industrias y minas, ricas en metales como cobre, cadmio y cromo.

Los estudios de histopatología realizados con moluscos son más escasos si los comparamos con los que se han realizado en peces. Los tejidos en los que se han observado daños ocasionados por la exposición a metales pesados son: branquia, glándula digestiva y riñón.

Carmichael y Fowler (1981) observaron en almejas que habitan en el Golfo de México, que con exposiciones superiores a los 0.5 mg/l de cadmio, las células del riñón presentaban degeneración del citoplasma, aumento de vacuolización y de concreciones en las membranas basales, y que estas concreciones son ricas en este

metal. Asimismo Gold- Bouchot *et al.*, (1995) encontraron lesiones en branquia (edema y hiperplasia de células epiteliales), tubo digestivo (inflamación y necrosis de membrana basal), y divertículos digestivos (necrosis y aumento de hemocitos) en ostiones expuestos a cadmio.

En el presente estudio se observaron las siguientes patologías: Los organismos expuestos a cadmio presentaron daño en branquias consistentes en necrosis y reducción del tejido, se observó la pérdida de los cilios apicales en las células apicales de la branquia, estas estructuras tienen la función de atrapar partículas para la alimentación de los especímenes, al haber daños en estas estructuras es lógico pensar que se reduce la capacidad de alimentación de éstos.

También se observaron daños en la glándula digestiva donde hubo reducción y pérdida de tejido, alterando la capacidad de asimilación del alimento. Todo lo anterior indica que los organismos que presentan estas lesiones, pierden capacidad para la captación y asimilación del alimento. Cabe mencionar que los daños más severos se observaron en los organismos expuestos a cadmio.

Como se mencionó antes, en moluscos se han reportado daños en branquia, glándula digestiva y riñón ocasionados por la exposición a metales pesados, en este trabajo se detectaron también efectos en manto y tejido nervioso.

Es importante mencionar que en los casos en los que se observó destrucción total de tejidos como en el caso de los especímenes expuestos a 0.75 mg/l de Cd, los organismos perecieron, pero en las concentraciones menores (0.18 y 0.046 mg/l) los organismos se recuperaron y sobrevivieron. Los organismos expuestos a la mezcla Cd + Pb (0.37 y 0.09 mg/l) de metales sobrevivieron después de 192 horas (8 días) de

exposición. Asimismo se observó en los organismos expuestos a concentraciones de 50 $\mu\text{g/l}$ de metal que las alteraciones en los tejidos tales como atrofia de células de branquia y glándula digestiva, son reversibles, al desaparecer el agente estresante.

Los biomarcadores evaluados en este estudio fueron lo suficientemente sensibles para evidenciar alteraciones en los organismos expuestos a los metales hasta concentraciones de 20 $\mu\text{g/l}$, y en tiempos de exposición de 24 horas, por lo que son una buena herramienta para la realización de monitoreos en esta especie.

Por otro lado, y con base en el análisis de la información generada en este estudio, las concentraciones de metales en donde no se observaron ningún tipo de efecto (NOEC) sobre las almejas catarinas fueron:

Para cadmio de $0.020 \pm 0.005 \text{ mg/l}$

Para cromo de $0.040 \pm 0.008 \text{ mg/l}$

Para plomo de $0.060 \pm 0.010 \text{ mg/l}$

5 CONCLUSIONES

* El grado de toxicidad de los metales y sus mezclas sobre *Argopecten. ventricosus* fue, de mayor a menor efecto:

Larvas veliger Cd > Cd + Pb > Cd + Cr > Cd + Cr + Pb > Pb > Cr > Cr + Pb

Juveniles Cd + Cr + Pb > Cd > Cr + Pb > Cd + Pb > Pb > Cd + Cr > Cr

Adulto Cd + Cr > Cd > Cd + Pb > Cd + Cr + Pb > Cr > Cr + Pb > Pb

Por lo anterior es evidente que el xenobiótico más tóxico para los individuos de esta especie fue el cadmio. Estos organismos son más sensibles a dicho metal, en comparación con otras especies como *Crassostrea gigas*, juveniles y adultos de *A. irradians* y nauplios de *Artemia* sp.

* La mezcla de metales más tóxica, tanto para larvas como para juveniles y adultos de *A. ventricosus*, fue Cd + Cr + Pb y su tipo de interacción de potenciación. Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre los efectos del cadmio y los de esta combinación de xenobióticos. Este hecho podría interpretarse en el sentido de que el cadmio modula la respuesta de los organismos, en esta mezcla.

* En los organismos expuestos a Cd, Cr, Pb y sus mezclas se detectaron alteraciones en sus procesos fisiológicos. Se registraron descensos en procesos vitales como las tasas de crecimiento, de respiración y de filtración, en relación al aumento de la concentración y tiempo de exposición a estos metales, lo cual fue más patente en los especímenes expuestos al cadmio y a las mezclas que lo contienen. Estas respuestas indicaron que las reservas de energía destinadas a procesos metabólicos como el

crecimiento o el aumento de peso, se utilizan para compensar fisiológicamente el estrés originado por la presencia de las sustancias tóxicas, lo cual parece conllevar a un retardo en el crecimiento individual y probablemente en disminución en el reclutamiento de juveniles.

* La bioacumulación de metales registrada en los bioensayos con juveniles y adultos de almeja catarina fue: Cd > Pb > Cr.

La acumulación de metales en los individuos de *A. ventricosus* tuvo una relación directa con las concentraciones presentes en el ambiente, es decir, a mayor concentración de metal en el agua, mayor concentración en los tejidos del organismo. La tasa de incorporación de cadmio siempre fue mayor a la de cromo y plomo.

* La bioacumulación observada en los organismos provenientes del vivero de Pichilingue y Bahía Concepción fue: Pb > Cd > Cr, en tanto que la registrada en los especímenes obtenidos de los estanques de cultivo del CICIMAR fue: Cd > Cr > Pb. Es evidente que existen diferencias en la biodisponibilidad de éstos metales en los diferentes sitios de estudio.

* Las concentraciones de cadmio y plomo en los tejidos de las almejas procedentes del vivero de Pichilingue, CICIMAR-IPN y bahía Concepción (julio de 1999) rebasaron los criterios establecidos por la NOM (Norma Oficial Mexicana) para el consumo de organismos marinos.

-
- * En juveniles y adultos de *A. ventricosus* expuestos a los metales de forma aguda, se observó una disminución en los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos de su glándula digestiva hasta de un 75% en solo 6 días de exposición.

 - * Los niveles de lipoperoxidación obtenidos demuestran que el metal más deletéreo fue el cadmio. Asimismo se observó que el cromo induce daño oxidativo en las células de branquia y glándula digestiva.

 - * El cadmio y cromo tienen efectos genotóxicos en el tejido de la branquia de los juveniles y adultos.

 - * Los organismos expuestos al cadmio manifestaron daños en el tejido de la branquia, que consistieron en pérdida progresiva de los cilios de las células apicales del ctenidio, además de necrosis. En la glándula digestiva hubo reducción y descamación del tejido. Todo lo anterior indica que los organismos con estas lesiones pierden su capacidad respiratoria, así como para la captación y asimilación del alimento y en todo caso, mueren por asfixia o inanición.

 - * Los organismos expuestos a Cd, Cr y Pb que presentaron: niveles en la relación O:N alrededor de 9 o menor a este valor, grado de lipoperoxidación de más de 52 nM de

en 83% de sus células y con caudas de hasta 152 μm , no sobrevivieron después de 96 a 168 horas de exposición.

* Las concentraciones de los metales Cd, Cr y Pb con efectos tóxicos, se encuentran entre diez y mil veces por arriba a las registradas en los sistemas costeros del Pacífico mexicano.

* Las concentraciones de metales en las que no se observaron ningún tipo de efecto (NOEC) sobre las almejas fueron:

Para cadmio de $0.020 \pm 0.005 \text{ mg/l}$

Para cromo de $0.040 \pm 0.008 \text{ mg/l}$

Para plomo de $0.060 \pm 0.010 \text{ mg/l}$

6 LITERATURA CITADA

- Abraham, J., Salih, K. and M. J. Chacko. 1986. Effects of heavy metals on the filtration rate of bivalve *Villorita cyprinoides* (Hanley) var. *cochinensis*. *Indian. J. Mar. Sci.*, 15: 195-196.
- Ahsanullah, M., Negilski S., and M.C. Mobley. 1981. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. *Mar. Biol.*, 64: 299-304.
- Albores, A. 1996. Apuntes del curso: Efectos de xenobióticos ambientales. CINVESTAV –IPN, México D.F., 20 pp.
- APHA, A.W.W.A. y W.P.F.C., 1994. Métodos estándar para el examen de aguas y aguas de desecho. 64° Ed. Interamericana. México, 690 pp.
- ASTM (American Society for Testing and Materials), 1994. Standard test methods for elements in water by metals atomic absorption spectroscopy. USA, ASTM Committee on Standards, Philadelphia. PA, vol. 11.01.
- Avilés-Quevedo, M.A. 1990. Crecimiento de la almeja catarina (*Argopecten circularis*) en función del alimento, con anotaciones sobre su biología y desarrollo. Tesis Maestría CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., 81 pp.
- AWWA. 1968. Tentative methods for metals in water. *J. AWWA*. 6: 739-742.
- Ayala- Fierro, F. 1999. Toxicología avanzada de los metales. Apuntes de curso precongreso. *III Congreso Mexicano de Toxicología*. Cd. Obregón, Son., 23 pp.
- Baber, B.J. and N.J. Blake. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and R/Q physiological indexes. *Mar. Biol.*, 87: 13-18.

- Baqueiro, C. 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur. Delegación Federal de Pesca. B.C.S., 32 pp.
- Barrera-Escorcia, G., Wong I., Namihira, P. y S. Gonzalez. 1999. Toxicidad aguda de cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica*. *III Congreso de la Sociedad Mexicana de Toxicología*. Cd. Obregón, Son. Mex. p.18.
- Barret, W. and R. Rosemberg. 1981. Stress effect on natural ecosystems. Wiley & Sons, Chicago, pp. 123-134.
- Bayne, B.L., Widdows, J. and R.J. Thompson. 1976. Physiological integrations. In: Bayne, B.L. (Ed.) *Marine Mussel*. Cambridge University Press Cambridge, pp. 245 – 267.
- Bayne, B.L., Holland, D.L., Moore, M.N., Lowe, D.H. and J. Widdows. 1978. Further studies on the effects of stress in the adults on the eggs of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 56: 825-841.
- Bayne, B.L., Moore, M.N., Widdows, J., Livingstone, D.R. and P. Salneio. 1979. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Phil. Trans. Soc. Lond.*, 286: 563-581.
- Bayne, B.L., Clarke, B., and M.N. Moore. 1981. Some practical considerations in the measurement of pollution effects in bivalve molluscs and some possible ecological consequences. *Aquatic Toxicol.*, 1: 159-174.
- Bayne, L. and R.C. Newell, 1985. Physiological energetic of marine molluscs. In:

- Beninger, P. and M. Le Pennec. 1991. Functional anatomy of scallops. In: Shumway S.E. (Ed.) *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-223.
- Bertini, K.K., Martin, J.H. and J.M. Teal. 1976. Aids to analysis of seawater. In: Goldberg, E.D. (Ed.) *Strategies for marine pollution monitoring*. J. Wiley and Sons. Philadelphia. pp., 217-253.
- Bligh, E. G. and W.J. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem. and Physiol.*, 37: 911-917.
- Bloom, S.A. 1975. The motile escape response of a sessile prey: a sponge-scallop mutualism. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 17: 311-321.
- Botello, V. A., Ponce, V.G., Toledo, A., Díaz G. y S. Villanueva. 1992. Ecología Recursos Costeros y Contaminación en el Golfo de México. *Ciencia y Desarrollo*: 12, pp. 28-48.
- Botello, A.V., Ponce-Velez, G., Villanueva-Fragozo, S. y L.Q. Rueda. 1994. Contaminación. En: De la Lanza-Espino G. y C. Cáceres Martínez. (Eds.) *Lagunas costeras y el litoral mexicano*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., pp. 445-470.
- Bowmer, C.T., Jenner, H.A., Foekema, E. and M. Vander. 1994. The detection of chronic biological effects in the marine intertidal bivalve *Cerastoderma edule* in model ecosystem studies with pulverized fuel ash: Histopathology. *Environm. Pollut.*, 85: 191-204.

1978. Effects of pollution on freshwater fish. *J. Water Pollut. Con. Fed.*, 49: 1425-1493.
- Brooks, R.R. and M.G. Rumsby. 1965. The biogeochemistry of trace element uptake by some New Zeland bivalves *Limnol. Oceanogr.*, 10: 521-527.
- Bryan, G.W. 1973. The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L) and *Chamys opercularis* (L). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 53: 145-166.
- Bryan, G.W., 1976 Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms In: Lockwood, A.P. (Ed.) *Effects of pollutants on aquatic organisms*. Cambridge University Press, London., pp. 32-57.
- Buege, J. A. and S.D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzym.*, 51: 302-306.
- Buikema, A.L., B.R. Niederlehner and J. Cairns Jr. 1982. Biological monitoring. Part IV. Toxicity testing. In: Cairns J., Buikema J., Cherry D. and E. Herricks (Eds.). *Biological monitoring in water pollution*. Pergamon Press. New York., pp. 239-258.
- Burbidge, F. J., Macey, D.J., Webb, J. and V. Talbot. 1993. A comparison between particulate (elemental) zinc and soluble zinc uptake and effects in the mussel *Mytilus edulis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 466-472.
- Cáceres-Martínez C., Ramírez-Filippini D., y J. Chavez-Villalba. 1987. Cultivo en

- Cáceres-Martínez C. y M. Rodríguez-Jaramillo. 1990. Variaciones estacionales del índice gonádico y muscular de *Argopectan circularis* en la Ensenada de La Paz, B.C.S. *Inves. Mar. CICIMAR*, 5: 1-6.
- Calabrese A. and Nelson D. 1974. Inhibition of embryonic development of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* by heavy metals. *Bull. Environm. Conta. Toxicol.*, 11: 92-97.
- Carmichael, N.G., Squibb, K.S. and B.A. Fowler. 1979. Metals in the molluscan kidney: A comparison of two closely related species (*Argopecten*) using X-ray microanalysis and atomic absorption spectroscopy. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 36: 1149-1155.
- Carmichael N.G. and B.A. Fowler. 1981. Cadmium accumulation and toxicity in the kidney of the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Biol.*, 65: 35-43.
- Carmona, R.M. y H. Ramírez. 1994. Una aproximación metodológica a la medición de la relación entre actividad económica y la naturaleza. La almeja catarina, un caso de estudio. *Rev. Inv.. Cientif. Ser. Cienc. Mar. UABCS*, 5: 7-20.
- Carr, R.S. and D.J. Reis. 1978. The influence of water-soluble petroleum hydrocarbons on bysal thread formation. *The Veliger*, 21: 283-287.
- Cech, J.J. 1990. Respirometry. In: Schreck C.B. and P.B. Moyle. (Eds.) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA, pp. 332-362.

- Corner, E.D.S. and C.B. Cowey. 1968. Biochemical studies on the production of marine zooplankton. *Biol. Bull.*, 43: 93-426.
- Cunningham, P.A. 1979. The use bivalve molluscs in heavy metal pollution research. In: Cunningham, P.A. (Ed.) *Marine Pollution functional responses*. Academic Press, London, pp. 183-221.
- Chavez, J. E. 1998. Estudio químico-citológico de la gametogénesis inducida en *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., 63 pp.
- Chavez, J. and Cáceres-Martínez, C. 1992. Scallop culture in the northwest of Mexico. *World Aquacul.*, 23: 20-25.
- Cheung, S.G. and R.H. Cheung. 1995. Effects of heavy metals on oxygen consumption and ammonia excretion in green lipped mussel *Perna perna*. *Mar. Pollt. Bull.*, 31: 381-386
- Chipman, W.A. and J.G. Hopkins. 1964. Water filtration by the scallop *Pecten irradians* as observed with the use of radioactive plankton. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 107: 80-91
- Dillon, T. M. and M.P. Lynch. 1981. Physiological response with determinative stress in marine and estuarine organisms. In: Barrett W. and R. Rosemberg (Eds.) *Stress effect on Natural Ecosystems*. Wiley & Sons Ltd., pp. 56-134.
- Dubois, M. K., A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analyt. Chem.*, 28:

- Doudoroff P. and M. Katz. 1953 Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components in fish. *Sew. and Ind. wastes.*, 25 :12-78
- Ewers U. and H.W. Schlikoter. 1991. Lead. In: Merian E. (Ed.) *Metals and their compounds in the environment*. VCH Weinheim. New York., pp. 971-1014
- EPA 1984. Ambient water quality criteria for chromium. USEPA Cincinnati, Ohio, 99 pp.
- EPA-IRIS. 1987 Cadmium. Reference dose for chronic oral exposure RfD. WWW. Page. <http://www.epa.gov/ngispg3/iris/subst/0141.htm>
- EPA-IRIS. 1987 Chromium. Reference dose for chronic oral exposure RfD. WWW. Page. <http://www.epa.gov/ngispg3/iris/subst/0156.htm>
- FAO. 1982. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. parte 6. Ensayos de toxicidad. FAO Doc. Tec. pesca, (185): 25 pp.
- FAO. 1986. Manual of methods in aquatic environment research. Part 10. Short-term static bioassays. FAO Fisheries Technical Paper, (247): 62 pp.
- Fergusson, J.E. 1982. Inorganic Chemistry and the earth. Pergamon Press. Oxford, 345 pp.
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3 ed. Cambridge Univ. Press, London, 234 pp.
- Foster, L., Mayer, D., Vestug, M. and B. Rather. 1992. Physiological and nonspecific biomarkers In: Huggett, R., Kimerle, R., Mehrle, P.M. and H. Bergman (Eds.) *Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers. Boca Raton, pp. 5-86.
- Gadner, G.R. 1975. Chemically induced lesions in estuarine or marine teleost. In:

- Rebelin, W. and G. Migaki (Eds.) *The Pathology of fishes*. The University Wisconsin Press. pp., 657-693.
- Gadner, G.R., and R.J. Pruell. 1987. Quincy Bay study, Boston Harbor: A histopathological and chemical assessment of winter flounder, lobster and soft-shell clam, indigenous to Quincy. *Mar. Pollt. Bull.*, 23:234-256.
- Gaughhofer, J. and V. Bianchi. 1991. Chromium. In: Merian E. (Ed.) *Metals and their compounds in the environment*. VCH Weinheim. pp. 854-876.
- Giesy, J.P., Duke, C., Bingham, R. and W. Dickson. 1983. The effects of cadmium on the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Toxicol. Envirom. Chem*, 6: 259-295.
- Gold-Bouchot, G., R. Sima-Alvarez, O. Zapata-Pérez and J. Guemez-Ricalde 1995. Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the american oyster *Crassostrea virginica* from Tabasco, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.*, 31: 4-12.
- Goldberg E.D., Koide M., Hodge V., Flegal A.R., and J. Martin. 1983. U.S. Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 16: 69-93.
- Gonzales M.A. y Martínez, A. 1993. Consideraciones ambientales legales y político-administrativas en el manejo de recursos naturales renovables. Los casos de la almeja catarina y de la jojoba. Tesis de Licenciatura. UABCS. La Paz, B.C.S., 363 pp.
- González, F., Razo, C., Rodríguez L., Barrera G. y M.A. Aguilar . 1999. Ensayo cometa en tejido epitelial de la branquia de ostión expuesto a dos metales (Cd y Cr). *III Congreso Mexicano de Toxicología*. noviembre. Cd. Obregón Son. p. 24.

- Grace A. and L.C. Gainey. 1987. The effects of copper on the heart rate and filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar. Pollt. Bull.*, 18: 87-91.
- Griffiths C.L. and J.A. King. 1979. Some relationships between size, food, availability and energy balance in the ribbed mussel *Aulacomya ater*. *Mar. Biol.*, 51: 141-149.
- Gutiérrez-Galindo E., Flores, G.M., Olguín, S.G. y C.J. Villaescusa. 1990. Biodisponibilidad de metales traza en almejas y mejillones del valle agrícola de Mexicali y alto Golfo de California. *Cienc. Mar.*, 16: 1-28.
- Gutiérrez-Galindo E., Flores M.G., Pro G.R., Villaescusa C.J. y A.J. González. 1991. Metales pesados en tejido y en biodepósitos sedimentarios del ostión *Crassostrea gigas* de la zona de Cultivo de Bahía San Quintín, Baja California, México. *Inv. Mar. CICIMAR*, 6: 175-186.
- Gutiérrez-Galindo E., Villaescusa-Celaya J. y A. Arreola-Chimal. 1999. Bioacumulación de metales en mejillones de cuatro sitios selectos de la región costera de Baja California. *Cienc. Mar.*, 25: 557-578.
- Halliwell, B. and J.M. Gutteridge. 1985. Free radicals in biology and medicine. Oxford Claredon Press, London, 346 pp.
- Hamilton, E.I. 1980. The chemical laboratory and trace element analysis. In: *Element analysis of biological materials: current problems and techniques with special reference to trace elements*. Technical reports series No. 197. International

and other aquatic animals. 2. Pollution effects on DNA denaturation characteristics. *Z. Angew Zool.*, 77: 13-33.

Hernández, A. y J. Singh. 1988. Rendimientos de producción de almeja catarina a diferentes densidades de cultivo. *Rev. Lat. Acuacul. (Lima Perú)*, 36, 49-55.

Holguín Q.O. 1976. Catálogo de especies marinas de importancia comercial en Baja California Sur. S.I.C. Subsecretaría de Pesca, I.N.P. México, 118 pp.

Hunt, J.W., Anderson, B.S. and B.M. Phillips. 1998. Recent advances in microscale toxicity testing with marine molluscs. In: Well, P.G., Lee, K. and Blaise Ch., (Eds). *Microscale testing in aquatic toxicology*. CRC Press. Boca Raton, pp. 423-436.

IAEA/UNEP/FAO/IOC, 1984. Determination of total metals in marine organisms by flame atomic spectrophotometry. Reference methods in marine pollution studies, No. 11 Res. 1 UNEP, 134 pp.

Kamimura, S. 1980. Relationship between the body size of principal shellfish and the concentration of few heavy metals. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries*, 46: 79-82.

Keen, A.M. 1971. Sea shell of tropical West America. Stanford University Press. Stanford, California, 1064 pp.

Kinne O. 1975. Mechanisms of heterotrophy out put on non-utilized energy and matter excretion. In: Kinne O. (Ed.) *Marine ecology*. Wiley. London, II (1):179-210.

Kirby-Smith, W.W. 1972. Growth of the bay scallop: the influence of experimental water

- Koeman, H.J. 1991. From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 100C: 7-10.
- Langston, W.J. 1990. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. In: Furness, R.W. and P.S. Rainbow (Eds.). *Heavy metals in the marine environment*. CRC Press INC. Boca Raton, Florida, pp. 67-79.
- Lehninger, A.L. 1975. *Biochemistry*. Worth Publishers INC. New York, 1104 pp.
- Lin, W., Rice, M.A. and P.K. Chien. 1993. The differential effects of three heavy metals on particle filtration and amino acid uptake by the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.*, 12: 111-118.
- Lind, O. 1985. *Handbook of common methods in Limnology*. Kendal & Hunt. U.S., 199 pp.
- Loosanoff, V.L. and H. C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.*, 1: 1-136.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L., Farr and R. J. Raldall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. and Chem.*, 193: 265-275.
- Maeda, A., Reynoso-Granados, T., Monsalvo, P., Sicard, T., Mazon-Zuastegui, J. Hernández, O., Segovia E., and R. Morales. 1997. Suspension culture of catarina scallop *Argopecten ventricosus* (=circularis) (Sowerby II, 1842) in Bahia Magdalena, Mexico at different densities. *Aquaculture*, 158: 235-246.
- Malara, G. et R. Charra. 1972a. Dosage de protéines particulières selon la méthode de Lowry. Note de journe No. 5. Station Zoologique de Villefranche, sur Mer. 7

- Malara, G. et R. Charra. 1972b. Dosage de glucides particulaires du phytoplancton selon la méthode de Dubois. Nota interna de trabajo No. 6. Station Zoologique de Villefranche sur Mer. 7pp
- Mance, G. 1987. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. Elsevier Applied Science. London, 372 pp.
- Marking, L.L. 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In: Mayer, F.L. and J.L. Hamelink. (Ed.) *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, pp. 99-108.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billing, P. and N. Glickstein. 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas*, and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollt. Bull.*, 12: 305-308.
- Martin, M. and Severeio R. 1982. Mussel watch monitoring for the assessment of trace toxic constituents in California marine waters. *Workshop on measures of marine pollution effects*. Pansacola, Cal, 167 pp.
- Martoja, R. y M.M. Person. 1970. Técnicas de histología animal. Toray-Mason, S.A. Barcelona, España, 350 pp.
- Mellon, D. 1969. The reflex control of rhythmic motor output during swimming in the scallop. *Z. Vergl. Physiol.*, 62: 318-336
- Monsalvo-Spenser P., A. Maeda-Martínez and T. Reynoso-Granados, 1997. Reproductive maturity and spawning induction in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus* (= circularis) (Sowerby II, 1842). *J. Shellfish Res.*, 16: 67-70.

- Monsalvo, S.P. 1998. Estudios sobre el cultivo de larvas y juveniles de almeja catarina *Argopecten ventricosus (=circularis)* (Sowerby II, 1842) en el Laboratorio. Tesis de Maestría CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. 90 pp.
- Moore, J.D. and E.R. Trueman. 1971. Swimming of the scallop, *Chlamys opercularis* (L). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 6: 179-185.
- Moore, J.W. 1991. Inorganic Contaminants of Surface Water. Springer-Verlag. New York, 334 pp.
- Mottet, M.G. 1979. A review of the fishery biology and culture of scallops . State of Washington. Dept. Fisheries, Tech. Rep. No. 39, 100 pp.
- Nelson, D. A. 1976. Biological effects of heavy metals on juvenile bay scallops *Argopecten irradians* in short-term exposures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16: 275-282.
- NOAA, 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. Technical memorandum NMFS-F/NEC-25 97 pp.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993.
- Olson, K.R. and R.C. Harrel. 1973. Effects of salinity on acute toxicity of mercury copper and chromium for *Rangia cuneata*. *Contrib. Mar. Sci*, 17: 9-15.
- Overstreet, R.M. 1988. Aquatic pollution problems, southeastern U.S. coasts, histopathological indicators. *Aquatic Toxicol.*, 11:213-239
- Pález-Osuna F. y J.L. Osuna-López. 1987. Acumulación de metales pesados en Mitla:

- Argopecten irradians concentricus* (Say), and the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 45: 273-295.
- Palmer, J.B. and Rand, G.M. 1977. Trace metal concentrations in two shellfish species of commercial importance. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 18: 512-519.
- Parker, C.R. 1972. Water analysis by atomic absorption spectroscopy. Varian Techtron. Australia, 231 pp.
- Perkins, E.J. 1989. The need for sublethal studies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 286: 425-442.
- Pesch, G.G., Stewart, N.E. and C. Pesch. 1979. Cooper toxicity to the bay scallop (*Argopecten irradians*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 23: 759-765.
- Pesch, G. and E. Stewart. 1980. Cadmium toxicity of three species of estuarine invertebrates. *Mar. Environm. Res.*, 2: 145-156.
- Phillips, D.H.J. 1977. The use biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments a review. *Environm. Pollt.*, 13: 28-317.
- Phillips, D.J.H. and D.A. Segar. 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: programe design imperatives. *Mar. Pollut. Bull.*, 17:10-17.
- Pitcher, C.R. and A.J. Butler. 1987. Predation by asteroids, escape response and morphometrics of scallops with epizoic sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 112: 233-249

- Campeche, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F., 144 pp.
- Rainbow, S.P. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Poll. Bull.*, 31: 183-192.
- Ramade, F. 1989. The pollution of the hydrosphere by global contaminants and its effects on aquatic ecosystems. In: Boudou A. and F. Rybeyre (Eds.). *Aquatic ecotoxicology: Fundamental concepts and methodologies*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, pp. 152-183.
- Rand, G.M. and S.R. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation. New York., 666 pp.
- Reish, D.J. and J.L. Ayers. 1968. Studies on the *Mytilus edulis* community in Alamitos Bay, California. III. The effects of reduced dissolved oxygen and chlorinity concentrations on survival and bivalve thread production. *The Veliger*, 10: 384-388.
- Renfro, W.C. 1973. Transfer of ^{65}Zn from sediment by marine polychaete worms. *Mar. Biol.*, 21: 305-316.
- Reynoso, N.E. y A. Jorajuria. 1988. Distribución de metales pesados en la costa occidental de la península de Baja California, usando *Mytilus californianus* como organismos centinelas. *Cien. Mar.*, 14: 101-116.
- Riley, R.T. and M.C. Mix. 1981. The effects of naphthalene on glucose metabolism in the european flat oyster *Ostrea edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 70C: 13-20.

- Roman, G., Rudolph, A. y R. Ahumada. 1994. Estudio estacional de toxicidad por cadmio en *Choromytilus chorus* (Molina 1782). *Bol. Soc. Biol. Concepción Chile*, 65:23-30.
- Roosenburg, W.H., Rhoderick, J.C., Block, R.M., Kennedy, V.S., Gullans, S.R. and C. Collette. 1980. Effects of chlorine-produced oxidants on survival of larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 3 : 93-96.
- Secretaria de Pesca. 1988. Anuario estadístico de pesca 1987. México, 231 pp.
- SEMARNAP, 1999 Anuario estadístico de pesca 1998. México, 244 pp.
- Shumilin, E., Páez-Osuna, F., Green-Ruiz, C., Sapozhnikov, D., Rodriguez-Meza G., and L. Godínez-Orta. 2001. Arsenic, antimony, selenium and other trace elements in sediments of the La Paz lagoon, peninsula of Baja California, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.*, 42:174-178.
- Sicart T. 1999. Determinación de temperatura óptima para el crecimiento de *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1872). Tesis Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., 78 pp.
- Signoret-Brailovsky, G., Maeda-Martínez, A.N., Reynoso-Granados, T., Soto-Galera, E., Monsalvo-Spencer, P. and G. Valle-Meza, G. 1996. Salinity tolerance of the catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis* (Sowerby II, 1842). *J. Shellfish. Res.*, 15: 623-626.
- Silva-Loera, A.H. 1986. Efecto del tamaño corporal, tensión de oxígeno, y temperatura

- Simkiss, K. and A. Z. Mason, 1983. Metal ions: Metabolic and toxic effects In: Wilbur, K. (Ed.) *The Mollusca* Vol. 2 Environmental Biochemistry and Physiology. Academic Press. London., pp. 101-164.
- Singh, N.P., D.B. Banner, R.R., Tice, and E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exptl. Cell. Res.*, 184: 123-130.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural water by the phenol-hypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 799-801.
- Spacie, J. and L. Hamelink. 1985. Bioaccumulation. In: Rand, G.M. and S.R. Petrocelli. (Eds.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation. New York., pp. 495-523.
- Sprague, J.B. and B.A. Ramsay. 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 22: 425-432.
- Sridevi, B., Reddy, V. and L.N. Reddy. 1998. Effect of trivalent and hexavalent chromium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in freshwater field crab *Barytelphusa guerini*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61: 384-390.
- Stein J.R. 1973. Handboock of phycological methods. University Press. Cambridge, 448 pp.
- Stoepler, M. 1991. Cadmium. In: Merian E. (Ed.) *Metals and their compounds in the environment*. VCH Weinheim., pp. 803-852.

- Topping G. 1973. Heavy metals in shellfish from Scottish waters. *Aquaculture*, 1: 379-384.
- USEPA. 1989. Evaluation of the potential carcinogenicity of lead and lead compounds. US EPA/600/8-89/045A. Washington, D.C., 142 pp.
- Vattuone, G., Griggs, K.S., McIntyre, D.R., Littlepage, J.L. and F.L. Harrison . 1976. Cadmium concentrations in rock scallops in comparison with some other species. *Lawrence Livermore National Laboratory* , UCRL-5202231, U.K., 31 pp.
- Viarengo, A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore MN. and M. Orunesu. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97C: 37-42.
- Villalejo F. M. T. 1992. Aspectos reproductivos de la almeja catarina *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en Bahía Concepción, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. México., 96 pp.
- Villanueva, S.F. and A.V. Botello. 1998. Metal Pollution in Coastal Areas of Mexico. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 157: 53-94
- Wattling, H.R. 1983. Accumulation of seven metals by *Crassostrea gigas*, *C. margaritacea*, *Perna perna* and *Choromytilus meridionalis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 317-322.
- Widdows, J. 1978. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 34: 125-146.

Wo, K.T., Lam, P.K. and R.S. Wee. 1999. A comparison of growth biomarkers for assesing sublethal effects of cadmium on a marine gastropod, *Nassarius festivus*. *Mar. Pollt. Bull.*, 39: 165-173.

Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. New Jersey., 662 pp.

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE AMONIO (Lind, 1985).**A. Preparación de reactivos.****1) Fenol.**

Se pesan 50 g de fenol puro. Se disuelven en 300 ml de alcohol etílico y se aforan a 500 ml.

2) Nitroprusiato de sodio. Disolver 1 g de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua bidestilada. Aforar a 200 ml. Esta solución se almacena en frasco ámbar y es estable por 1 mes en refrigeración.**3) Reactivo alcalino.** Disolver 100 g de citrato de sodio y 5 g de hidróxido de sodio. Aforar a 500 ml con agua bidestilada. La solución se almacena en frasco ámbar y es estable por varios meses en refrigeración.**4) Hipoclorito de sodio.** Se utiliza grado reactivo.**5) Reactivo oxidante.** Esta solución debe prepararse antes de realizar la evaluación de las muestras, y la sobrante se desecha.

Se mezcla 20 ml de hipoclorito de sodio y 80 ml de reactivo alcalino.

6) Solución stock de amoniaco. Pesar 3.819 g de cloruro de amonio y secar a 100°C por varias horas. Posteriormente aforar a 1 litro con agua bidestilada, donde:

$$1 \text{ ml} = 1.00 \text{ mg NH}_3\text{-N}$$

7) Solución estándar. Se toma 1 ml de la solución stock y se afora a 100 ml con agua bidestilada. Con esta solución se prepara la curva de calibración:

ml estándar	ml agua bidestilada	Concentración NH ₃ -N (mg/l)
0	100	0
0.1	99.9	0.01
0.5	99.5	0.05
1.0	99	0.10
2.5	97.5	0.25
5.0	95	0.50
7.5	92.5	0.75
10	90	1.0
15	85	1.5

B. Análisis de blancos, estándares y muestras

1. Tomar 40 ml de muestra y fijarla con 1.6 ml de la solución de fenol. La muestra se puede almacenar a temperatura baja (4 °C) durante 15 días.
2. 10 ml de muestra se colocan en tubos de vidrio con tapón de rosca (por triplicado). Se toma también la muestra de blancos (agua bidestilada y solución de fenol) y los estándares de la curva de calibración.
3. Se agrega 0.4 ml de la solución de fenol. (Si las muestras ya fueron fijadas antes con este reactivo no agregar más fenol). Mezclar perfectamente.
4. Agregar 0.4 ml de la solución de nitroprusiato de sodio y mezclar bien (vortex).
5. Adicionar 1 ml del reactivo oxidante, mezclar perfectamente (vortex).

6. Incubar durante 1 hora en oscuridad, o hasta el desarrollo de color (azul verdoso), el color es estable por 24 horas).
7. Leer las muestras en espectrofotómetro a 640 nm con una fotocelda de cuarzo de 1 cm.

C. Cálculo de la concentración de amonio.

Se realiza una regresión lineal con los valores de la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/l) (x) vs. la absorbancia obtenida (y), para determinar las constantes de la recta de regresión (a y b).

Para conocer los valores de la muestra problema se utiliza la formula:

$$x \text{ (mg/l)} = \frac{(y - a)}{b}$$

Donde

X = concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/l) de la muestra.

y = Absorbancia de la muestra

a y b = constantes de la recta de regresión.

DETERMINACIÓN DE METALES POR AAS

(Parker, 1972 ; Bertini *et al.*, 1976; Hamilton, 1980; IAEA, 1984; CEM, 1990; APHA, 1994 y ASTM, 1994)

1. Lavado de material (según IAEA, 1984; APHA, 1994 y ASTM, 1994).

i) El material (cristalería, recipientes de plástico) se lava con jabón libre de fosfatos (EXTRAM), se enjuaga con agua corriente y posteriormente con agua destilada.

(Las bolsas de plástico solo se enjuagan con HCl (10%) y después con agua deionizada).

ii) Posteriormente, el material se coloca en remojo con una solución de HCl 2N durante 2 días, después se enjuaga con agua deionizada y se cambia a una solución de HNO₃ 2N y se deja 2 días más.

iii) Se enjuaga con agua deionizada (3 veces) y se seca. Ya seco se guarda en bolsas de plástico hasta su uso.

2. Análisis de muestras de agua marina

Las muestras de agua (100 ml), procedentes de los bioensayos, o del medio natural se filtraron y se acidificaron con HNO₃ grado reactivo (Baker) (pH = 2) y se almacenaron en frío (4 °C), para posteriormente ser procesadas.

A) Digestión abierta para la determinación de metales totales (AWWA. 1968; Parker, 1972; Bertini *et al.*, 1976; Hamilton, 1980; APHA, 1994).

i) La muestra se homogeniza perfectamente, después se toma una alícuota de 50 ml y transfiere a un vaso de precipitados (100 ml) para digestión, cubierto con un vidrio de reloj.

-
- ii) Se añade 3 ml de ácido nítrico concentrado (Baker ultrapuro) y se calienta en una placa (sobre cama de arena). Evaporar, cuidando que no hierva, hasta que queden aproximadamente de 2 a 5 ml de muestra. Enfriar a temperatura ambiente.
 - iii) Adicionar 5 ml de ácido nítrico concentrado, cubrir de nuevo con un vidrio de reloj y calentar en la placa de calentamiento (en cama de arena). Incrementar la temperatura de calentamiento hasta que exista reflujos de vapores. Continuar calentando y en caso de ser necesario, agregar mayor cantidad de ácido nítrico concentrado y continuar la digestión.
 - iv) Cuando la muestra tenga una apariencia cristalina, retirar la muestra y enfriar. Filtrar si es necesario.
 - v) Aforar la muestra a un volumen de 20 ml con agua deionizada y almacenarla en recipientes de plástico a 4 °C hasta su análisis en AAS.

Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer mod. 3100, siguiendo las recomendaciones del manual de uso del equipo. Se utilizaron estándares (Spectrum) para elaborar la curva de calibración para cada metal analizado. Se realizaron blancos de referencia con los reactivos utilizados. Se efectuaron 5 lecturas por muestra.

B) Digestión por medio de microondas para la determinación de metales totales (CEM, 1990; APHA, 1994 y ASTM, 1994).

- i) 50 ml de muestra (agua) se colocan en un vaso de teflón de 100 ml de capacidad, previamente marcado con el número de la muestra, se añade 5 ml de HNO_3 grado ultrapuro (Baker). Tapar los recipientes herméticamente.
- ii) Programar el microondas para realizar la digestión. El programa usado fue:

potencia: 50% Tiempo: 10 minutos.

iv) Al finalizar el programa, sacar los vasos del horno de microondas y enfriar a temperatura ambiente o sumergirlos en agua fría, antes de abrirlos.

v) Aforar la muestra a 50 ml con agua deionizada. Almacenarla en recipientes de plástico a 4 °C hasta su análisis por AAS.

3. Análisis de muestras de organismos.

Digestión de las muestras de tejidos de molusco por medio de microondas.

Las almejas recolectadas de los bioensayos, fueron sacadas de su concha y lavadas con agua deionizada, después se colocaron en bolsas de plástico, previamente enjuagadas con ácido HCl (10%), y se almacenaron a – 52 °C .

Posteriormente las muestras se secaron en un horno de madera a 60 °C durante 12 horas o hasta peso constante. Las muestras ya secas, se homogenizaron en un mortero de porcelana hasta obtener partículas finas, que fueron tamizadas con un filtro de 80 µm y fueron almacenadas en bolsas de plástico.

i) 250 mg de muestra, se colocan en un vaso de teflón de 100 ml de capacidad. Se agrega 5 ml de agua deionizada, y 5 ml de HNO₃ ultrapuro (Baker). Posteriormente el vaso se cierra herméticamente.

ii) Programar el microondas para realizar la digestión. El programa usado fue:

PASO	TIEMPO (minutos)	POTENCIA (%)
1	5	60
2	7	80
3	2	0
4	7	80

ii) Al finalizar el programa, sacar los vasos del horno de microondas y enfriar a temperatura ambiente o sumergirlos en agua fría, antes de abrirlos.

iv) Aforar la muestra a 20 ml con agua deionizada. Almacenarla en recipientes de plástico a 4 °C hasta su análisis por AAS.

Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian mod. SPECTRAA-20, siguiendo las recomendaciones del manual de uso del equipo. Se utilizaron estándares (Sigma y Baker) para elaborar la curva de calibración para cada metal analizado. Se realizaron blancos de referencia con los reactivos utilizados. Se realizaron 8 lecturas por muestra.

Los límites de detección del equipo fueron: 0.050 µg/g para cadmio, 0.50 µg/g para plomo y 0.20 µg/g para cromo.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS

1) Determinación de proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Malara y Charra (1972a).

A) Reactivos.

a) Reactivo de Lowry:

20 ml de reactivo alcalino (Na_2CO_3 (0.9 M) y NaOH (0.45 M) 1:1) + 1 ml CuSO_4 (0.04M) + 1 ml tartato de sodio-potasio (0.07 M).

Na_2CO_3 = 9.53 g/100ml

NaOH = 1.8 g/100 ml

CuSO_4 = 0.99 g/100ml

tartato de sodio-potasio = 1.97 g/100 ml

b) Folin diluido 1:2

B) Procesamiento de la muestra.

i) Colocar 500 μl de muestra en un tubo de ensaye con tapón de rosca (por triplicado).

ii) Agregar 1 ml de reactivo de Lowry. Agitar con vortex y esperar 10 minutos.

iii) Añadir 1 ml de reactivo de Folin. Agitar con vortex.

iv) Incubar durante hora y media en oscuridad o hasta desarrollo de color (azul) en la muestra.

e) Leer a 750 nm en el espectrofotómetro.

Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó como proteína estándar la albúmina de bovino cristalizada (Sigma).

2) Determinación de carbohidratos por el método de Dubois *et al.* (1956), modificado por Malara y Charra (1972b).

A) Reactivos

- a) Solución de Fenol al 5%
- b) Ácido sulfúrico concentrado.

B) Procesamiento de la muestra.

- i) Colocar 300 μ l de muestra en un tubo de ensaye.
- ii) Agregar 0.5 ml de Fenol. Agitar inmediatamente.
- iii) Esperar 20 minutos.
- iv) Añadir 2.5 ml de H_2SO_4 lentamente. Tapar el tubo con un tapón y mezcle.
- v) Colocar el tubo en baño de hielo hasta que se enfríe.
- vi) Calentar a 100 °C durante 20 minutos.
- vii) Colocar el tubo en baño de hielo hasta que se enfríe.
- viii) Centrifugar a 3000 r. p. m. durante 15 minutos.
- ix) Leer a 490 y 600 nm en el espectrofotómetro.
- x) Corregir la densidad óptica. $D.O. = D.O.490 - 1.5 (D.O.600 - 0.003)$.

El estándar de carbohidratos que se utilizó para elaborar la curva de calibración fue la glucosa anhidra (Sigma). El análisis se realizó por triplicado.

3) Determinación de los lípidos con el método de Bligh y Dyer (1959).

A) Reactivos.

- a) Etanol grado reactivo.
- b) Diclorometano ultrapuro (o destilado).

B) Procesamiento de la muestra.

- i) Colocar 400 μ l de muestra en un tubo de ensaye y agregar 1000 μ l de etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) y 500 μ l diclorometano (CH_2Cl_2). Agitar en vortex.
- ii) Esperar durante 10 minutos en baño de hielo a 4 °C.
- iv) Centrifugar a 3000 r. p. m. a 4 °C por 10 minutos.
- v) El sobrenadante obtenido vaciarlo a un tubo de vidrio para centrífuga (primera extracción).
- vi) Añadir al sedimento 200 μ l de agua destilada, 500 μ l de etanol y 250 μ l de diclorometano.
- vii) Esperar 10 minutos en baño de hielo a 4 °C.
- viii) Centrifugar a 3000 r.p.m. a 4 °C durante 10 minutos.
- ix) Colocar el sobrenadantes obtenido en el tubo de vidrio para centrífuga anterior (segunda extracción).
- x) Añadir al sedimento 200 μ l de agua destilada, 500 μ l de etanol y 250 μ l de diclorometano. Agitar.

- xi) Esperar durante 10 minutos a 4 °C.
- xii) Centrifugar a 3000 r. p. m. a 4 °C durante 10 minutos.
- xiii) Colocar el sobrante obtenido en el tubo de vidrio para centrífuga anterior (tercera extracción).
- xiv) Añadir al tubo de centrífuga con las tres extracciones 1000 µl de agua destilada y 1000 µl de diclorometano. Agitar.
- xv) Esperar durante 10 minutos en baño de hielo a 4 °C.
- xvi) Centrifugar a 3000 r. p. m. a 4 °C durante 10 minutos.
- xvii) En el tubo de centrifuga se forman dos capas, la superior contiene agua más metanol y la inferior diclorometano más lípidos.
- xviii) Pasar la capa inferior a un tubo de hemólisis colocado en un baño de hielo a 4 °C.
- xix) Al tubo de centrifuga añadirle 2000 µl de diclorometano.
- xx) Centrifugar a 3000 r. p. m. a 4 °C durante 10 minutos.
- xxi) Pasar la capa inferior del tubo de centrífuga al tubo de hemólisis.
- xxii) Colocar el tubo de hemólisis en un baño María a 30 °C. Evaporar el solvente con N₂.

-
- xxiii) Agregar 500 μ l de diclorometano al tubo de hemólisis, procurando lavar perfectamente las paredes del mismo. Transferir la solución a un vial de teflón previamente tarado en una microbalanza analítica.
- xxiv) Colocar el vial de teflón en una caja de Petri limpia (lavarla con jabón, agua destilada y alcohol).
- xxv) Poner la caja de Petri semiabierta en una cámara de vacío a 30 °C para evaporar el solvente. Posteriormente pesar de nuevo el vial de teflón.

El cálculo del contenido de lípidos se realiza por diferencia de pesos del vial de teflón sin muestra y con la muestra de lípidos, y se expresa en μ g/ml .

La concentración de proteínas y de carbohidratos se calcularon a través de una relación lineal ($y = mx + b$), obtenida a partir de lecturas de densidad óptica (y) de soluciones patrón de concentración conocida (x). Los resultados se expresaron como μ g/ml de proteína ó μ g/ml de carbohidratos.

FE DE ERRATAS

1) Tabla 20 (página 101) y Tabla 21 (página 102) dice:

METAL EN EL AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	METAL EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) $\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}\text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{l}^*\text{día}$
--	--	--	---

DEBE DECIR:

METAL EN EL AGUA ($\mu\text{g/ml}$)	METAL EN EL ORGANISMO ($\mu\text{g/g}$)	TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) $\text{ml/g}^*\text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{ml}^*\text{día}$
--	--	---	--

2) Tabla 22 (página 104) dice:

FASE DE ACUMULACIÓN		FASE DE DEPURACIÓN	
TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) $\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}\text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{l}^*\text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{l}^*\text{día}$	VIDA MEDIA (DÍAS)

DEBE DECIR:

FASE DE ACUMULACIÓN		FASE DE DEPURACIÓN	
TASA DE INCORPORACIÓN (K_{to}) $\text{ml/g}^*\text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{ml}^*\text{día}$	TASA DE DEPURACIÓN (K_{de}) $\text{ml}^*\text{día}$	VIDA MEDIA (DÍAS)

3) Página 148 al final del segundo párrafo dice:

...Estas concentraciones pueden ser de utilidad cuando se realizan estudios de histopatológica, para determinar las causas posibles del deceso de los organismos.

DEBE DECIR:

...Estas concentraciones pueden ser de utilidad cuando se realizan estudios de histopatología, para determinar las causas posibles del deceso de los organismos.