

**Evaluación de la
toxicidad de sedimentos
contaminados con
diésel y biodiésel
utilizando crustáceos de
importancia ecológica
en el Golfo de México**
Tesis que presenta

Alma Diana Arellano Mondragón
Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Energía y Medio Ambiente)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALALA

POSGRADO EN ENERGÍA Y MEDIO
AMBIENTE

Evaluación de la toxicidad de sedimentos contaminados con diésel y biodiésel utilizando crustáceos de importancia ecológica en el Golfo de México

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
(ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)

PRESENTA:

Ingeniera en Tecnología Ambiental Alma Diana Arellano Mondragón

DIRECTORA:

Dra. Patricia Ramírez Romero

ASESORES:

Dra. Guadalupe Barrera Escorcía

Dra. Xenia Mena Espino

México D.F., 7 de Diciembre del 2017

“Es deber de todo
hombre devolverle
al mundo, al menos,
el equivalente a lo
que ha tomado de
él”

Albert Einstein
(1879-1955)

Agradecimientos

La Maestría en Ciencias (Energía y Medio Ambiente) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio 003893; por lo que agradece la beca recibida, a través del convenio No. 376308 para el desarrollo de esta tesis.

Esta tesis fue desarrollada gracias al apoyo recibido de los proyectos: *Estudio Ecotoxicológico de la zona costera del Golfo de México: Fase II* (convenio UAM/INECC-CONABIO No.14712085) y del proyecto *Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental* aprobado por la D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (2010-2018).

Agradecimientos Personales

A *Dios* por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida; por los triunfos, los momentos difíciles y por proveerme de todo lo necesario para salir adelante.

A *mis padres* por darme su apoyo incondicional, por tenerme toda la paciencia del mundo y apoyarme en los momentos difíciles, por todos esos sacrificios y esfuerzos que hicieron para educarme y formar a la persona que ahora soy. Pero sobre todo por estar compartiendo otro momento importante de mi vida, los amo con todo mi corazón.

A *mis hermanas* por todas esas noches de desvelo y esas tazas de café que hacían más ameno el trabajo de investigación, por sus consejos y su apoyo en todo este proceso. También a mi hermano *Braulio* por siempre preocuparse y estar al pendiente de su hermana mayor, todos ustedes son la motivación que necesito para seguir adelante.

A *mis abuelas, tíos y primos* que siempre estuvieron motivándome y presionándome para concluir este proyecto, por sus consejos, sus porras y su cariño incondicional.

A *mis amigos*, porque gracias a su experiencia me brindaron los mejores consejos y palabras de apoyo a todo momento, en especial a mi amigas Sonia, Alma Delia, Katy, Margarita y Diana que siempre estuvieron al pendiente de todo mi desarrollo profesional.

Un agradecimiento profundo las *Doctoras* Patricia Ramírez Romero, Guadalupe Barrera Escorcía y Xenia Mena Espino que gracias a su sabiduría estuvieron guiándome y asesorándome a lo largo de esta etapa. Muchas gracias por ayudarme a lograr esta meta en mi vida profesional.

Al *INECC* por las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo experimental que se realizó dentro del laboratorio de Bioensayos, el cual estuvo bajo la dirección de la M. en C. Alma Delia Nava Montes.

De igual manera a mis compañeros del *laboratorio de Ecotoxicología* por abrirme sus puertas, y brindarme todas las facilidades y consejos durante el trabajo experimental del proyecto.

Un agradecimiento especial al *Dr. Manuel Ortiz Touzet* de la Facultad de Diversidad Animal

en la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo brindado para la identificación taxonómica de los organismos.

De ante mano muchas gracias a todos ya que fueron una pieza muy importante para que este proyecto concluyera.

Comité tutorial

Director:

Patricia Ramírez Romero. Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Co-asesor:

Guadalupe Barrera Escorcía. Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Co-asesor:

Xenia Mena Espino. Departamento de Procesos e Hidráulica. División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

El jurado designado por la

Comisión Académica del Posgrado en Energía y Medio Ambiente

de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

ALMA DIANA ARELLANO MONDRAGON

El día 7 de diciembre de 2017

Miembros del Jurado

Dra. Xóchitl Guzmán García

Presidente

M. en C. Lucía Salazar Coria

Secretario

Dra. Xenia Mena Espino

Vocal

Índice

Resumen	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
Capítulo 1	18
Antecedentes	18
Crustáceos	18
Biomarcadores.....	20
Estabilidad lisosomal.....	20
Estrés metabólico	22
Nado contra corriente	23
Biodiésel.....	23
Diésel.....	24
Justificación	25
Capítulo 2	27
Hipótesis	27
Capítulo 3.	28
Objetivos.	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares.....	28
Capítulo 4	28
Metodología	29
Colecta de organismos y sedimentos	29
Mantenimiento de los organismos en el laboratorio.	31
Preparación del sedimento	31
Bioensayo	34
Medición de estabilidad lisosomal	36
Estrés metabólico	37
Resistencia al nado contra corriente.....	42
Análisis Estadístico.	43
Capítulo 5	43
Resultados	43
Estabilidad lisosomal.....	43

Consumo de oxígeno de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel.	47
Excreción nitrogenada en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel.	53
Relación O:N.....	55
Relación O:N en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel.....	55
Relación O:N en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel.	56
Nado contra corriente	58
Discusión.....	61
Estabilidad lisosomal.....	61
Consumo de Oxígeno	65
Excreción nitrogenada.....	67
Relación O:N.....	69
Nado contra corriente	71
Capítulo 6	74
Conclusiones	74
Recomendaciones y/o perspectivas	76
Referencias	77
Anexos	83

Resumen

Año con año la demanda energética aumenta considerablemente a causa del crecimiento demográfico y del desarrollo económico, esto nos lleva a utilizar fuentes de energía alternas como lo es el biodiésel el cual está considerado como un combustible alternativo y limpio. Por esta razón es importante investigar la ecotoxicología de éste producto para entender el impacto que podría causar a organismos de importancia ecológica en el Golfo de México. El objetivo fue conocer el efecto provocado por la exposición a sedimentos contaminados con diésel y biodiesel en juveniles de *Macrobrachium sp.*, utilizando diferentes biomarcadores de efecto a nivel celular y fisiológico. Los crustáceos y el sedimento fueron colectados en el estero del Rio Tecolutla Veracruz, el sedimento fue procesado y contaminado a diferentes concentraciones de diésel (D 3%, D 6.25%, D 12.5% y D 25%) y biodiésel (B 12.5%, B 25% y B 50%). Se realizó un bioensayo subcrónico el cual tuvo una duración de 21 días evaluando la estabilidad de la membrana lisosomal, el estrés metabólico y el nado contra corriente de los organismos los días 7, 14 y 21 de exposición. En la determinación de la estabilidad lisosomal se observó un buen estado de salud en los organismos al inicio del bioensayo obteniendo un Tiempo de Retención de Rojo Neutro de 180 min, las concentraciones con menor Tiempo de Retención fueron B 50% y D 25% con un promedio de 45 minutos al día 21 de exposición. Se evaluó el impacto del estrés metabólico a través de la relación O:N, donde la mayoría de las concentraciones presentaron un consumo de proteínas y lípidos como sustrato energético y el tratamiento control mostró un metabolismo en equilibrio. En la evaluación del nado contra corriente, el promedio de resistencia de los organismos control fue de 29 min durante las cuatro mediciones; mientras que al día 14 los expuestos a B 50% y D 25% mostraron un promedio de resistencia de tres minutos, se concluye que si bien ambos combustibles provocan un efecto tóxico, se necesita el doble de la cantidad de biodiésel para que el efecto sea similar al del diésel.

Abstract

Every year the energy demand increases significantly due to population growth and economic development, this leads us to use alternate energy sources as is biodiesel which is considered as an alternative fuel and clean. For this reason it is important to investigate the ecotoxicology of this product to understand the impact that could cause ecologically important organisms in the Golfo de Mexico. The objective was to determine the effect caused by exposure to sediment contaminated with diesel and biodiesel in juvenile *Macrobrachium sp* using different effect biomarkers to cellular and physiological level. Shellfish and sediment were collected in the estuary of the Rio Tecolutla Veracruz, the sediment was processed and contaminated to different concentrations of diesel (D 3%, D 6.25%, D 12.5% y D 25%) and biodiesel (B 12.5%, B 25% y B 50%). A subchronic bioassay was performed which it lasted 21 days evaluating the stability of the lysosomal membrane, the metabolic stress and counter-current of organisms on 7, 14 and 21 exposure. In determining the lysosomal stability a good health was observed in organisms at the beginning of the bioassay obtaining a Neutral Red Retention Time (NRRT) of 180 min, concentrations with shorter retention time were B 50% and D 25% with 45 minutes a day exposure 21. The impact of metabolic stress was evaluated through the O:N where most of the concentrations showed a consumption of proteins and lipids as an energy substrate and the control treatment showed an equilibrium metabolism. Average counter-current swimming of control organisms was 29 min for the four measurements; while on day 14, those exposed to B 50% and D 25% showed an average resistance of three minutes. It was concluded that although both fuels cause a toxic effect, it is required twice the amount of biodiesel for the effect to be similar to diesel.

Introducción

El uso de energía es básico para mejorar los niveles de bienestar de la sociedad, por esto es fundamental conocer el contexto energético mundial, en especial el petróleo y los combustibles fósiles debido a que es la principal fuente energética a corto, mediano y largo plazo. A escala mundial, los hidrocarburos aportan más de la mitad de la energía primaria consumida y específicamente el 31% del consumo energético primario global proviene del petróleo, convirtiéndose así en la fuente energética primaria con más demanda (REPSOL, 2015). Como un análisis de perspectiva la Administración de Información de Energía (por sus siglas en inglés EIA) menciona que entre 2004 y 2030 los mayores incrementos en la demanda de energía se registrarán en los países en desarrollo, donde se pronostica que la proporción mundial del consumo de energía habrá de aumentar del 46 al 58% (FAO, 2008) (Fig. 1).

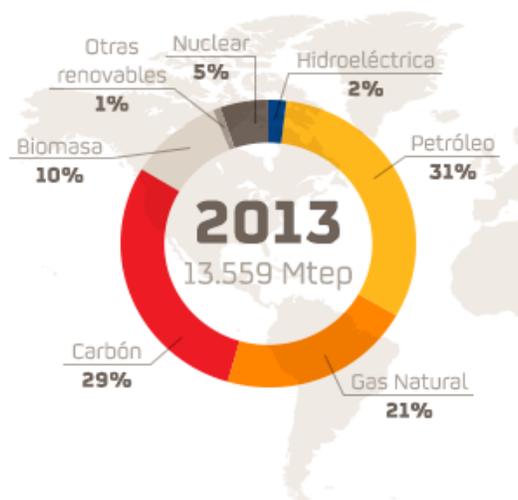


Figura 1. Demanda Mundial de Energía primaria.
Fuente: Secretaría Técnica de REPSOL (2015)

De acuerdo con la Secretaría de Energía (SENER, 2013), en la clasificación mundial de 2012 el país que sigue liderando el abasto internacional de petróleo es Arabia Saudita cubriendo

13.4% de la producción mundial. En seguida se encuentran la Federación Rusa con 12.4% y Estados Unidos con 10.3%. En contraste, México descendió dos posiciones del ranking mundial, pasando de la octava a la décima posición con el 3.4% de la producción mundial; esto se debió al alto crecimiento sostenido de la producción de Kuwait e Iraq en los dos últimos años, y al continuo descenso en la producción de los campos petroleros mexicanos.

Por otro lado, en cuanto a productos finales, México se ha convertido en importador neto de gasolinas, diésel, turbosina, gas natural, gas licuado de petróleo (L.P.) y petroquímicos (SENER, 2013). El diésel es un hidrocarburo líquido medianamente pesado destinado al uso automotriz; el proceso de su fabricación comienza a partir de la destilación atmosférica del petróleo crudo; comprende escoger y mezclar diferentes fracciones de gasóleos con querosinas, y aceite cíclico ligero, el cual es producto del proceso de desintegración catalítica fluida (Leiva y Rodríguez, 2015). Está conformado principalmente por compuestos parafínicos, naftalénicos y aromáticos, el número de carbonos es bastante fijo y se encuentra entre el C10 y C22 (Ciria, 2007). Debido al contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos el diésel tiene un alto impacto en el medio acuático ya que los hidrocarburos persisten después de un derrame y pasan rápidamente del agua a los tejidos de los organismos (Valdez, 2009).

Ante ésta situación desde la década de los 90's las autoridades se han pronunciado a favor del fomento de las energías alternativas como medio de incrementar la seguridad del abastecimiento energético y reducir el impacto sobre el medio ambiente (Retana, 2008). Las energías alternas constituyen una alternativa importante para la demanda actual energética a nivel nacional y mundial, existen diferentes propuestas que abarcan desde energía hidroeléctrica, nuclear, biomasa, eólica, geotérmica, solar y en caso de combustibles líquidos, los biocombustibles (González *et al.*, 2008).

La producción de biocombustibles ha generado interés en varios países debido a la disminución de las reservas de combustibles fósiles, la volatilidad de los precios del petróleo,

los problemas del cambio climático, la contaminación del aire, así como una creciente demanda de combustibles en el sector del transporte, (Lozada *et al.*, 2010), específicamente en éste último punto, los biocombustibles se han perfilado como candidatos potenciales para sustituir a los combustibles derivados del petróleo (Consultada en http://rembio.org.mx/?page_id=623 el 25/11/2015).

Los biocombustibles se producen a partir de fuentes biológicas obtenidas de manera renovable a partir de restos orgánicos, procedentes de diferentes tipos de biomasa (Retana, 2008). Gracias a la existencia de tecnologías de conversión más avanzadas y eficientes, actualmente es posible obtener biocombustibles en forma sólida como el carbón vegetal, gránulos de madera y leña. Líquida como el etanol, biodiésel y el aceite de pirolisis y gaseosa como el biogás (Fig. 2) (Valdez, 2009).

El biodiésel es un combustible líquido derivado de aceites o grasas de origen vegetal o animal, se produce gracias a una reacción química denominada transesterificación, lo que significa que los gliceroles contenidos en los aceites son combinados con alcohol ante la presencia de un catalizador, dan como resultado moléculas compuestas por un ácido graso de cadena larga y un alcohol (Castro *et al.*, 2007). Es importante mencionar que, dependiendo del tipo de alcohol utilizado en la reacción, el biodiésel puede ser éster metílico (obtenido mediante el uso de metanol) o éster etílico proveniente del etanol (Cavalcante *et al.*, 2014).

El biodiésel se ha utilizado en algunos países como un sustituto para el diésel en el sector transporte (Lozada *et al.*, 2010), éste biocombustible podría ser usado en motores de combustión interna convencional, con pequeñas o sin modificaciones en motores actuales, también se podría emplear como combustible puro o mezclado con diésel, siendo estable en cualquier proporción (Castro *et al.*, 2012). El biodiésel es considerado un combustible seguro que genera menos emisiones de productos de combustión nocivos que son de fácil degradación (Khan *et al.*, 2012). El prefijo *bio* hace referencia a su naturaleza renovable y biológica en contraste con el combustible diésel tradicional derivado del petróleo.



Figura 2. Proceso de transformación de los biocombustibles. Tomado de (Valdez, 2009).

Las propiedades del diésel y biodiésel comerciales dependen tanto del proceso de fabricación como de la naturaleza de los lípidos a partir de los cuales se ha producido en el caso de este último combustible. El biodiésel tendrá características particulares en función de la naturaleza de la fuente (animal o vegetal) que lo origine, algunas de ellas son: Punto de inflamación, viscosidad, densidad, número de cetanos, residuo carbonoso, destilación, número de ácidos grasos (TAN), contenido en metales y ácidos grasos libres, lubricidad, glicerina libre y glicerina total, contenido en alcohol y estabilidad a la oxidación (Ciria, 2007).

El biodiésel obtenido a partir del aceite de cocina usado (ACU) es una fuente de energía muy

económica, investigadores como Ramírez (2012) han informado que el uso del ACU en biodiésel en lugar de diésel disminuye las emisiones nocivas de escape con un rendimiento equivalente del motor. Asimismo, autores como Kulkarni y Dalai (2006) concluyen que el rendimiento del motor de biodiésel obtenido a partir del ACU es mejor que el diésel, con la excepción de que existe un incremento en los óxidos de nitrógeno (NOx). Bhuiya *et al.*, (2015), agregan que este biocombustible tiene escasas propiedades a bajas temperaturas y su naturaleza química hace que sea más susceptible a la oxidación o autooxidación durante su almacenamiento por periodos de más de seis meses, experimentando cambios en su número ácido, viscosidad y número de cetanos (Retana, 2008).

El biodiésel se puede utilizar puro y en mezcla con el diésel, esto hará que las propiedades sean diferentes en función del porcentaje utilizado, cuando se usa puro se denomina B100 y cuando participa en una mezcla, por ejemplo 20/80 con diésel se denomina B20 (Ciria, 2007). Según la Red Mexicana de Bioenergía el biodiésel es usado principalmente en Europa en mezclas con diésel al 5% o 20% (B5, B20) o como biodiésel puro (B100). En Brasil y Argentina se utiliza el B5 como mezcla obligatoria (Consultada en http://rembio.org.mx/?page_id=623 el 25/11/2015).

Una gran variedad de organismos están expuestos a los contaminantes en los sedimentos, directa o indirectamente. Algunas de las formas de exposición ocurren cuando los organismos ingieren materia orgánica o detrito presente en los sedimentos o mientras buscan alimento que está directamente expuesto a los contaminantes.

El efecto de los contaminantes sobre los componentes biológicos de los sistemas acuáticos se evalúa a través de bioensayos toxicidad (Alayo y Iannacone, 2002), los cuales han demostrado ser útiles para: identificar áreas de mayor o menor contaminación, evaluar la calidad del agua y de sedimentos en programas de monitoreo ambiental, determinar la relación entre efectos de tóxicos y su biodisponibilidad, y para investigar interacciones entre contaminantes, entre otras aplicaciones estudiadas (Carballo et al., 2010).

La evaluación del daño ecotoxicológico es indispensable para tener un mejor control de la calidad ambiental y la protección de los ecosistemas acuáticos, que incluyen especies de interés comercial que se pescan y cultivan, como son los crustáceos, los cuales al desarrollarse en ambientes sanos garantizan a su vez la protección humana (Ramírez et al., 2012).

Capítulo 1

Antecedentes

Crustáceos

Los crustáceos se reconocen dentro de los artrópodos por tener un cuerpo con una cabeza con 5 segmentos y un tronco que puede estar dividido, con muchas variaciones, en tórax y abdomen (Álvarez *et al.*, 2014). Destacan por su importancia biológica y económica los decápodos donde se incluyen: camarones, cangrejos, jaibas, langostinos y langostas (Hernández, 2007).

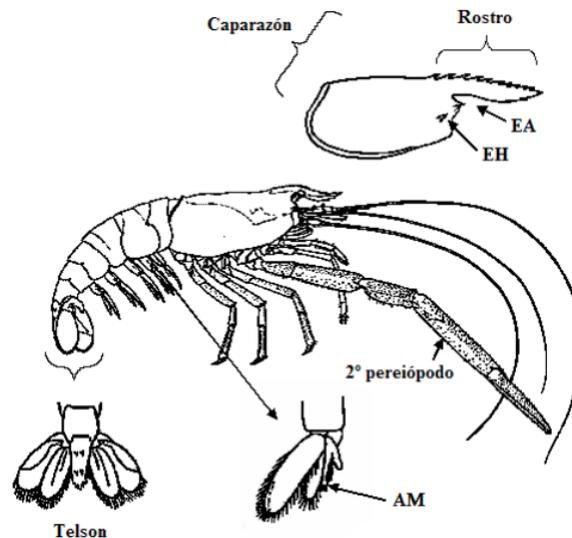


Figura 3. Esquema diagnóstico del género *Macrobrachium* en el que se muestran la esquina hepática (EH) y antenal (EA), el apéndice masculino (AM), así como el telson en vista dorsal tomado de Hernández, (2007).

En el aspecto biológico, los crustáceos son fundamentales en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos; por su abundancia y diversidad dan estructura a las comunidades de macroinvertebrados que habitan en ellos; por la composición que ocupan en las cadenas tróficas, como consumidores secundarios, se encargan de la transformación de la materia orgánica en energía y proteínas consumibles por los eslabones finales (García *et al.*, 2012).

Las especies de crustáceos que resaltan por su susceptibilidad al cultivo y valor comercial son los camarones y langostinos. Los langostinos de la familia *Palaemonidae* son los más diversos dentro del orden Decapoda, tienen una amplia distribución geográfica y están representados por numerosas especies en los sistemas marinos, estuarinos y dulceacuícolas. En la subfamilia *Palaemoninae* se incluye al género *Macrobrachium* (Bate, 1868), el cual constituye uno de los géneros más diversos, abundantes y ampliamente distribuidos (Hernández, 2008).

Los langostinos son habitantes de cuerpos de agua dulce principalmente lóticos, durante el día prefieren permanecer ocultos bajo rocas, tronco o plantas acuáticas o bien dentro de madrigueras, son de hábitos nocturnos ya que salen a alimentarse por la noche y aprovechan estos periodos para dar inicio a sus procesos de reproducción (Hernández, 2008). Durante los meses de lluvia se desplazan en grupo, son arrastrados por la corriente hacia cuerpos de agua costeros de variada salinidad y bocas de ríos, es en estos ambientes donde completan su ciclo reproductivo, pues es allí el lugar propicio para liberar las larvas y es durante este recorrido cuando son capturados para ser comercializados (Arana, 1974).

Tan solo en Veracruz se distribuyen 335 especies de crustáceos decápodos, 71% marinos, 18.6% estuarinos y 10.4% dulceacuícolas (Álvarez *et al.*, 1999). Al mismo tiempo en el 2005 el Estado se ubica en los primeros lugares de producción de crudo en el país con 62.3 mbd (miles de barriles diarios) (INEGI, 2006). Una gran variedad de organismos están expuestos a los contaminantes en los sedimentos, directa o indirectamente. Algunas de las formas de exposición ocurren cuando los organismos ingieren materia orgánica o detrito presente en los

sedimentos o mientras buscan alimento que está directamente expuesto a los contaminantes, tal es el caso de los crustáceos.

Biomarcadores

Diversas respuestas biológicas dan cuenta de la magnitud del daño de los contaminantes sobre la biota, tal es el caso de los biomarcadores de efecto, que son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos ocasionadas por la exposición a contaminantes. Los biomarcadores son útiles para generar datos cuantitativos asociados a la exposición a xenobióticos, permiten deducir efectos por sustancias químicas sobre sistemas biológicos y evaluar la susceptibilidad del sistema a la exposición del tóxico (Botello, 2005; Barrera, 2006).

Estabilidad lisosomal

Las interacciones de sustancias químicas antropogénicas con la biota se producen inicialmente a nivel celular, por lo tanto, las respuestas celulares se pueden utilizar como herramientas adecuadas para la detección temprana y sensible de la exposición a sustancias químicas (Cavalcante *et al.*, 2014). Tal es el caso de la estabilidad lisosomal; la cual es un parámetro que permite monitorear el impacto aditivo de los contaminantes ambientales sobre las funciones celulares (Zapata *et al.*, 2012).

Los lisosomas son organelos dinámicos y polimórficos que degradan macromoléculas, juegan un papel importante en la desintoxicación y la defensa en los organismos marinos. La determinación de la estabilidad lisosomal consiste en calcular la capacidad de retención de colorantes dentro del lisosoma (Svendsen *et al.*, 2004). Los lisosomas tienden a liberar hacia el citosol el colorante retenido, confiriéndole una tonalidad rosada; el tiempo en el cual se manifiesta éste fenómeno depende de la integridad de la membrana, por lo tanto un mayor nivel de estrés corresponde con un menor Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) lo

que se traduce en un mayor daño celular (Svendsen *et al.*, 2004).

Entre las pruebas más conocidas y ya validadas se encuentra el ensayo de Rojo Neutro que tiene como objetivo evaluar la citotoxicidad celular con el fin de estimar un daño que pueda ser detectado (Arencibia *et al.*, 2003). El rojo neutro es un producto químico lipofílico que puede difundirse pasivamente a través de la membrana celular. La retención del rojo neutro depende del pH del lisosoma y de la eficiencia de su bomba de protones unida a la membrana que mantiene la condición ácida del lisosoma (Zhao, 2011). Por lo tanto, los lisosomas en las células no estresadas pueden retener el rojo neutro por cierto tiempo después de su absorción. Sin embargo, cuando la membrana lisosomal o la bomba de iones H^+ se desestabiliza, el rojo neutro se fuga en el citosol de la célula mucho más rápido (Zhao, 2011).

Desde hace varios años se ha demostrado que el daño a la membrana lisosomal puede atribuirse a una amplia gama de factores ambientales ante la exposición de diversos contaminantes (Lowe *et al.*, 1995). Las respuestas lisosomales han sido ampliamente utilizadas como un biomarcador de efecto en varias especies, como el ostión (Izagirre *et al.*, 2014). Lowe *et al.* (1995), reportan una reducción significativa en el Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) en los lisosomas de células digestivas de *Mytilus edulis* expuestos a fluoranteno durante 7 días. Izagirre *et al.*, (2014) evaluaron los efectos biológicos a largo plazo causados por la marea negra del Prestige ocurrida en noviembre de 2002 frente a Galicia y el Cantábrico utilizando como biomarcador la cuantificación de los cambios en la estructura lisosomal en glándulas digestivas de *Mytilus galloprovincialis* donde registraron una estabilidad de la membrana lisosomal por debajo de los 20 minutos en los mejillones de menor tamaño, durante el periodo 2003-2007, lo que podría ser indicativo de cierta persistencia de los efectos de la marea negra hasta 2007.

Este biomarcador también ha sido evaluado para medir el efecto de otros tóxicos, Brown (2004), reportó que la permeabilidad de la membrana lisosomal en *Patella vulgata* se vio gravemente afectada por la exposición a $6.1 \mu g$ de $Cu L^{-1}$ durante 7 días, debido a que el cobre

reduce la permeabilidad de la membrana demostrada mediante la estabilidad lisosomal. Al mismo tiempo, mencionó que el crustáceo *Carcinus maenas* muestra alteraciones significativas en la Retención de Rojo Neutro (RRN) cuando es expuesto a 68.1 µg/L Cu, lo cual se consideró signo de estrés, además de presentar alteraciones en el ritmo cardiaco.

Estrés metabólico

El estrés fisiológico se presenta cuando los organismos sobrepasan su capacidad para compensar, resistir o adaptarse a los cambios ambientales (Espina y Vanegas, 1996). Un ejemplo de un biomarcador fisiológico que mide el estrés metabólico es la relación oxígeno:nitrógeno O:N, la cual se obtiene asociando el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada; esta relación genera información acerca del balance entre el catabolismo de las proteínas, lípidos y carbohidratos (Espina y Vanegas, 1996) lo que nos permite estimar los cambios en el sustrato energético utilizado por los organismos (Barrera, 2006).

Los organismos adquieren energía a partir de la respiración, la cual se determina por el consumo de oxígeno. Este consumo depende de la presencia de oxígeno disuelto (OD), que es un factor ambiental regulador del metabolismo de cualquier organismo. En este contexto y dependiendo de la especie, los procesos metabólicos pueden ser más o menos eficientes, dependiendo de la sensibilidad de las especies para tolerar bajos niveles de oxígeno disuelto (Rosas *et al.*, 2004).

Se ha observado que el metabolismo del nitrógeno es un buen indicador del estado metabólico de los organismos y ha sido utilizado para interpretar, junto con el consumo de oxígeno, el efecto de las características de la dieta en la fisiología de *Penaeus setiferus* en el Golfo de México (Rosas *et al.*, 2000).

El valor que integra la razón O:N es útil para conocer los ciclos de almacenamiento de energía de los organismos. Si bien hay variaciones estacionales, asociadas al estrés reproductivo y nutricional, que producen valores bajos de la razón O:N como resultado de la utilización de

las proteínas (Espina y Vanegas, 1996), el valor de la razón O:N puede también asociarse a estresores ambientales, tales como los contaminantes.

Nado contra corriente

Otro marcador de efecto a nivel fisiológico que evalúa el estado de salud de los langostinos es la resistencia natatoria. La velocidad natatoria se ha utilizado como un parámetro de comportamiento en los organismos acuáticos expuestos a contaminantes (Silva *et al.* 2013). Morales y Meruane (2012), utilizaron como biomarcador el comportamiento natatorio de las larvas de *Cryphiops caementarius* para la evaluación de la condición larvaria de la especie en condiciones de cultivo. En condiciones normales, en los días previos a la metamorfosis se manifestó un grado de lentitud. Los ejemplares se ubicaron en la zona profunda de la columna de agua o en el fondo del estanque, donde fueron estimulados a nadar principalmente por el impulso de la aeración. Esta conducta se considera asociada al escape frente a un estímulo de contacto con otras larvas.

Biodiésel

Químicamente, el biodiésel es un mono alquil éster (metil o etil éster) de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables como ricinoleato de metilo, oleato de metilo, esterearato de metilo, palmitato de metilo, linoleato de metilo, linolenato de metilo y araquidato de metilo (Castro, 2012; Tang, 2008; Sánchez y Huertas 2012; Yanamala *et al.* 2013; Moreau, 2008).

Khan *et al.*, (2012), realizaron pruebas de toxicidad aguda en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y en pulga de agua (*Daphnia magna*) utilizando biodiésel puro, mezclas de biodiésel y diésel. Los resultados de las pruebas indicaron que el diésel es más tóxico que las mezclas de biodiésel puro. De acuerdo con Nogueira *et al.*, (2013), se indujo la actividad enzimática de 7-etoxi-resorufina-O-desetilasa (EROD) que es un biomarcador de exposición

ampliamente utilizado para evaluar la capacidad de biotransformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en *Pterygoplichthys anisitsi* expuesto a las concentraciones de combustible diésel (100%), biodiésel al 5% (B5) y biodiésel al 20% (B20), así como un aumento en la actividad glutatión S-transferasa (GST) enzima responsable de la conjugación de metabolitos con glutatión en el hígado y branquias de *Siluriformes sp.* contaminados a las mismas concentraciones de combustibles y al 100% de biodiésel.

Diésel

La composición química del diésel depende en mayor medida del tipo de crudo procesado, debido a que son pocos los procesos químicos destinados a transformar el petróleo crudo en diésel. Un volumen importante proviene del proceso de destilación primaria del cual se separa la fracción de hidrocarburos que destilan aproximadamente entre los 175 y los 370 °C. En el diésel predominan los hidrocarburos no volátiles de tipo parafínico, arreglados principalmente en cadenas lineales de entre 11 y 22 átomos de carbono, también están presentes compuestos aromáticos, cuya concentración por cuestiones normativas, no puede ser superior a 30% en volumen (IMP, 2014). A través de un análisis de cromatografía de líquidos Nogueira *et al.*, (2011), reportan la presencia de naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno y criseno en el diésel comercial.

El efecto del diésel también ha sido evaluado; Alayo y Iannacone (2002), realizaron un ensayo estandarizado con los rotíferos *Brachionus plicatilis rotundiformis* y *Brachionus plicatilis hepatotomus* empleando la fracción soluble en agua (FSA) de tres hidrocarburos: Petróleo Crudo (PC), Diésel 2 (D2) y Diésel 6 (D6). Ellos demostraron que el rotífero *B. plicatilis rotundiformis* presentó mayor sensibilidad al petróleo crudo y menor sensibilidad a la fracción soluble del Diésel 6. El orden decreciente de toxicidad aguda fue: Petróleo crudo > Diésel 2 > Diésel 6. Para *B. plicatilis rotundiformis*, los valores de CL₅₀ a 24 h de exposición para las fracciones solubles del Petróleo crudo, Diésel 2 y Diésel 6 fueron 0.13

mg/L⁻¹, 0.65 mg/L⁻¹ y 4.20 mg/L⁻¹, respectivamente; y los valores de CL₅₀ a 48 h de exposición a las FSA del PC, D2 y D6 fueron 0.04 mg/L⁻¹, 0.14 mg/L⁻¹ y 0.33 mg/L⁻¹, respectivamente.

De igual manera se han realizado bioensayos para evaluar la toxicidad de las partículas de emisión tanto de diésel como de biodiésel, autores como Ackland *et al.*, (2007) demostraron que las partículas de emisión de diésel de petróleo (PDEP) a una concentración de 25 µg/ml provocaron la formación de células multinucleadas induciendo la apoptosis en células A549 de las vías respiratorias humanas.

Justificación

En el ambiente marino la mayoría de los hidrocarburos presentes son atribuibles principalmente a las operaciones rutinarias de lastre y a los accidentes eventuales de los buques tanqueros (Alayo y Iannacone, 2002). Algunos crudos residuales tienen una gravedad específica mayor a 1 y por lo tanto pueden hundirse fácilmente en aguas salobres. Sin embargo, muy pocos crudos son lo suficientemente densos para que sus residuos puedan hundirse por sí solos (densidad 1.025) (Botello *et al.*, 1996), estos dan como resultado una exposición de los organismos bentónicos a contaminantes. Alayo y Iannacone (2002), indican que el PC y sus derivados como son el Diésel D2 y el Diésel D6, perturban las comunidades biológicas, afectando a la conservación de los recursos naturales marinos.

Los derrames de combustibles derivados del petróleo y los llamados combustibles verdes (particularmente el bioetanol y biodiésel), constituyen un tema de preocupación debido a que constituyen una fuente importante de contaminación en los ecosistemas acuáticos, lo que puede ocasionar graves consecuencias para los organismos en el ambiente (Khan *et al.*, 2012). A pesar de que la mayor importancia reside en la contaminación de las aguas por petróleo, existe poca información acerca de los efectos que estos combustibles provocan sobre los organismos. Nuestra comprensión de los mecanismos de defensa que se desarrollan a nivel

celular y fisiológico para superar los efectos tóxicos de los hidrocarburos está lejos de ser completa. Incluso en grupos de importancia ecológica y económica como son los crustáceos, sólo hay pocos informes en los que se ha estudiado la alteración metabólica por la contaminación de hidrocarburos en agua dulce (Pasquevich *et al.*, 2013).

En el 2005, la demanda interna de combustible diésel en México representó el 26% en relación con los otros combustibles, e incrementó su tasa de crecimiento anual en casi 3% en los últimos 10 años. En México esta situación ha sido recientemente abordada en la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos que tiene como objetivo lograr la diversificación energética y el desarrollo sostenible (Lozada *et al.*, 2010); aunque aún falta mucho por desarrollarse en cuanto a la normatividad nacional en materia ambiental, tomando en cuenta la entrada en vigor de la nueva reforma energética. Debido a lo anterior, los impactos ambientales de combustibles como el diésel y el biodiésel deben evaluarse.

El biodiésel toma cada vez más relevancia en el mundo, pues está considerado como un combustible alternativo y limpio que puede ser obtenido de diversas fuentes renovables. Sin embargo, el incremento en su demanda aumenta el riesgo de derrames y aún no se conocen claramente las consecuencias que éste producto pudiera ocasionar al ambiente marino. Si bien el origen biológico del diésel podría indicar que es amigable con el ambiente, este combustible tiene algunos inconvenientes, a bajas temperaturas y debido a su naturaleza química, este es más susceptible a la oxidación o auto-oxidación durante el almacenamiento a largo plazo en comparación con el diésel. Se sabe también, que las propiedades del biodiésel varían dependiendo de las fuentes de materia prima y estas a su vez tienen un impacto considerable sobre el funcionamiento del motor así como de las características de las emisiones, y aunque el biodiésel reduce la emisión de la materia particulada (PM), hidrocarburos (HC) y monóxido de carbono (CO), genera un ligero aumento las emisiones de óxidos de nitrógeno (Bhuiya *et al.*, 2015).

El consumo de diésel y biodiésel en las zonas costeras involucra la posibilidad de derrames,

y como se mencionó anteriormente, este tipo de combustibles tiende a hundirse. Los sedimentos son un componente ecológicamente importante en el hábitat acuático y actúan como un reservorio natural de contaminantes (Carballo *et al.*, 2010); debido a ésta razón las concentraciones de éstos son mucho mayores y menos variables que en el agua, por lo que constituye una matriz idónea para evaluar el estado de contaminación.

La mayoría de los compuestos químicos de origen antropogénico que son introducidos en el ambiente marino se acumulan en el sedimento, generando así, una fuente tóxica para la fauna marina (Alborán, 2012). El análisis químico de los sedimentos puede proporcionar una estimación de los niveles de contaminación; sin embargo, los posibles efectos biológicos sólo pueden evaluarse mediante el uso de bioensayos (Geffard *et al.*, 2004). Un claro ejemplo de esto son los contaminantes orgánicos, los cuales muestran una alta persistencia en el medio ambiente debido a que son resistentes a la degradación por procesos naturales, son lipofílicos y suelen quedar retenidos en tejido de los organismos (Carballo *et al.*, 2010).

Debido a la escasa información toxicológica del biodiésel y el impacto demostrado que provoca el diésel, lo cual está asociado también a sus reformulaciones específicas, existe la necesidad legal y regulatoria para de determinar la toxicidad de sedimentos contaminados con estos xenobióticos.

Capítulo 2

Hipótesis

Si los langostinos *Macrobrachium sp.*, se alimentan de la materia orgánica de los sedimentos y éstos se encuentran contaminados con diésel o biodiésel, entonces dichos tóxicos provocarán alteraciones a nivel celular, metabólico y fisiológico que pudieran comprometer su supervivencia.

Capítulo 3.

Objetivos.

Objetivo general

Evaluar el efecto tóxico de sedimentos contaminados con diésel o biodiésel en juveniles de *Macrobrachium sp.* a través de biomarcadores celulares, metabólicos y fisiológicos.

Objetivos particulares

- Evaluar el daño celular a través de la estabilidad de la membrana lisosomal de juveniles de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel.
- Determinar si la exposición de los langostinos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel sufren alteraciones en la relación O:N evidenciando un estrés metabólico.
- Evaluar el impacto en el estado fisiológico de langostinos expuestos a sedimentos contaminados a través de la resistencia al nado contra corriente.
- Comparar el efecto tóxico de ambos combustibles en juveniles de *Macrobrachium sp.*, a través de la integración de la respuesta de los biomarcadores.

Capítulo 4

Metodología

Colecta de organismos y sedimentos

Los crustáceos fueron capturados en el estero del Río Tecolutla, Veracruz, en las coordenadas N 20° 28' 06.7" W 97° 00'28.9" (Fig. 4). El punto de muestreo para la colecta de los organismos fue en “El Tular” el día 22/07/2016 se utilizó una red de cuchara la cual se sumergió a la altura de las raíces del lirio acuático que habita en el río (Fig. 5), los organismos obtenidos se seleccionaron para obtener juveniles de tallas entre 1.8 y 3.5 cm (Fig. 6) depositándolos en cubetas de plástico con agua del sitio. Asimismo, se registraron los parámetros físico-químicos de la zona de muestreo (temperatura, salinidad, pH, conductividad utilizando un medidor multiparamétrico portátil (ProDSS) en agua y la profundidad del sitio donde se realizó la recolecta de sedimentos) (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del sitio de muestreo

Temperatura (°C)	Salinidad (ppm)	pH	Conductividad (S/m)	Profundidad (m)
25.1	1	7.9	0.01	1.45



Figura 4. Mapa de la zona de colecta de sedimento y crustáceos (Tomado de *Google Earth*, 2014)



Figura 5. Colecta de organismos utilizando una red de cuchara.



Figura 6. Colecta de crustáceos juveniles.

Mantenimiento de los organismos en el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, los crustáceos se colocaron en peceras de 40 L de capacidad (50% de agua potable a una parte por mil de salinidad y 50% agua del sitio de colecta) (Fig. 7). Cada pecera contó con dos filtros de cascada, un refugio artificial, aireación continua y se mantuvieron a una temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Fig. 8). Los especímenes se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 oscuridad; se alimentaron diariamente con pellet para langostino, en cantidades que variaron entre 3–17% de la biomasa del tanque (FAO, 1998). Diariamente se sifoneó cada pecera y se registraron los parámetros: temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y salinidad utilizando un medidor multiparamétrico portátil (ProDSS). La aclimatación de los crustáceos tuvo una duración de un mes para después ser expuestos al bioensayo. ANEXO 1.



Figura 7. Preparación de peceras para la aclimatación de los organismos.



Figura 8. Aclimatación de los organismos en el laboratorio de Ecotoxicología.

Preparación del sedimento

Al sedimento colectado se le retiraron los primeros dos cm de superficie utilizando una espátula metálica, con el fin de retirar el sedimento que estuvo en contacto con la bolsa de plástico y así evitar posibles interferencias con los componentes de éste material; el sedimento restante se colocó en recipientes de acero inoxidable para secarlo en un horno de convección (BINDER ED 23) a 60°C durante 48 horas (Fig. 9). Una vez que el sedimento se

secó fue triturado utilizando un molino manual para granos (Estrella, MM-E) con el fin de triturar las piezas de mayor tamaño (Fig. 10) y un mortero de porcelana con el fin de obtener el tamaño de la partícula deseada, finalmente el sedimento fue tamizado ($< 250\mu\text{m}$) dos veces hasta tener una matriz homogénea y libre de macrofauna.



Figura 9. Secado de sedimentos en un horno de convección a 60°C.



Figura 10. Trituración de sedimentos utilizando un molino manual para granos.

Método de contaminación de sedimentos

Se utilizaron dos Kg de sedimento ya procesado a los que se les agregó 600 mL de diésel comercial para preparar la concentración al 100% (Greg et al., 1997), realizando la misma mezcla para biodiésel el cual fue obtenido gracias a una donación de SOLBEN®. Esta mezcla se colocó en cuatro frascos ámbar de un litro en un agitador rotatorio para pruebas analíticas (Associated Design & Manufacturing Co. Modelo 3740-8-BRE) durante 10 días (Fig. 11). Posteriormente se dejó sedimentar la mezcla por 24 horas para retirar el exceso de agua: Se agregaron 250 mL de agua para experimentación (agua a una ppm de salinidad) a los cuatro frascos para volver a rotar durante 24 horas, luego se les dejó sedimentar 12 horas y se retiró el exceso de agua; este procedimiento se repitió por triplicado. Con el fin de garantizar el adecuado enjuague del sedimento, éste se centrifugó durante tres minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) en dos etapas utilizando 4 frascos de teflón de 250 mL (Fig.

12).



Figura 11. Mezcla de diésel y sedimento en rotación durante 10 días.



Figura 12. Centrifugación la mezcla tres veces con agua para experimentación a 3000 rpm.

Para preparar las diferentes proporciones o concentraciones de diésel y biodiésel (3%, 6.25%, 12.5%, 25% y 50%) se tomaron las cantidades indicadas en la Tabla 2 y se colocaron en un frasco ámbar de 1 L agregando 200 mL de agua para experimentación, después fueron rotados durante 12 horas para garantizar una mezcla homogénea.

Tabla 2. Proporciones para preparar las diferentes concentraciones de sedimentos contaminados.

	control	B 12.5 %	B 25%	B 50%	D 3%	D 6.25%	D 25%	D 50%
Sedimento control	500 g	437.50 g	375 g	250 g	485 g	468.75 g	375 g	250 g
Sedimento con biodiésel	NA	62.50 g	125 g	250 g	NA	NA	NA	NA
Sedimento con diésel	NA	NA	NA	NA	15 g	31.25 g	125 g	250 g
Sedimento total	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g

NA= No aplica para la mezcla

El sedimento de cada frasco correspondió a una concentración y fue colocado cuidadosamente en su respectiva pecera. Cada frasco se enjuagó con 5 L de agua para experimentación con el fin de retirar todo el sedimento que se pudiera quedar en las paredes

del envase (Fig. 13). La mezcla se dejó decantar durante 24 horas y se procedió a llenar las peceras con agua para experimentación utilizando una manguera delgada adherida al vidrio de la pecera para evitar que el sedimento decantado volviera a agitarse de manera excesiva, una vez llenas las peceras se dejaron reposar por 24 horas para proceder a colocar 60 organismos en cada una.



Figura 13. Preparación de peceras para bioensayo en sus diferentes concentraciones de sedimento contaminado.

Bioensayo

Se llevaron a cabo dos bioensayos, cada uno con una semana de diferencia. En el primer experimento se expusieron las concentraciones de biodiésel en las siguientes proporciones: 12.5%, 25% y 50% más un control libre de contaminantes, mientras que las concentraciones de diésel fueron al 12.5 y 25%. De tal manera que el segundo bioensayo se expusieron las concentraciones de diésel al 3%, 6.25% y el control. Estas concentraciones fueron planteadas con base en los resultados obtenidos de un bioensayo preliminar (Anexo 1) y debido a la alta mortalidad que se presentó en las concentraciones de diésel. Cada pecera contó con un termostato y dos aireadores para mantener la concentración de oxígeno disuelto dentro del óptimo y la temperatura controlada. Todas las peceras fueron cubiertas con una cortina negra con el fin de no estresar a los organismos y controlar el fotoperiodo. Los crustáceos se alimentaron diariamente con pellet de langostino en cantidades que van de 3-17% de la biomasa del tanque (FAO, 1998).

Las características fisicoquímicas del agua de cada una de las peceras: temperatura, oxígeno disuelto (O.D.), salinidad y pH fueron medidas diariamente utilizando el medidor multiparamétrico portátil (ProDSS).

El bioensayo tuvo una duración de 21 días y se midieron los biomarcadores de estabilidad lisosomal, estrés metabólico (O:N) y resistencia al nado contra corriente los días 0, 7, 14 y 21; en cada concentración de la prueba se utilizaron entre cuatro y ocho organismos para la determinación de la estabilidad lisosomal (dependiendo de la talla de éstos), cuatro organismos para relación O:N y cuatro más para la prueba de nado contra corriente. En la Tabla 3 se muestran las características generales y fisicoquímicas del bioensayo.

Debido al amplio espacio que se necesita tener en el montaje del bioensayo y al gran número de organismos que estarían expuestos en la prueba, no existieron réplicas en las concentraciones de diésel y biodiésel, por ésta razón se determinó exponer a 60 organismos en cada pecera.

Tabla 3. Características generales y fisicoquímicas del bioensayo

Tipo de bioensayo	Subcrónico
Tiempo de exposición	21 días
Días de evaluación	0,7, 14 y 21
Biomarcadores	Estabilidad lisosomal, estrés metabólico y resistencia al nado contra corriente
Temperatura del agua	24 ± 1 °C
pH	8.79
Fotoperiodo	12 h. luz, 12 h. oscuridad
Aireación	Continua
Salinidad	1 ups
Oxígeno disuelto	4 a 5 mg O ₂ /L
Tamaño del recipiente de vidrio	40 L

Edad de los organismos	Juveniles
Gramos de sedimento por envase	500g
Nº de organismos por envase	60
Concentraciones en sedimento	Control Biodiésel: 12.5%, 25%, 50% Diésel: 3%, 6.25% 12.5%, 25%

Medición de estabilidad lisosomal

Para evaluar el efecto de la exposición a contaminantes sobre los lisosomas se empleó la técnica RRN (Lowe *et al.*, 1995). Para lo cual se extrajo la hemolinfa de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal utilizando una jeringa para insulina de un mililitro de capacidad previamente cargada con 100 μ L de solución fisiológica salina. Se extrajeron 100 μ L de hemolinfa de los organismos (entre cuatro y ocho ejemplares, dependiendo de su tamaño) (Fig.14), el líquido se colocó en un tubo Eppendorf para posteriormente homogenizar la muestra en un equipo vórtex. En un portaobjetos se agregaron 40 μ L de PolyLisina a los cuales se les adicionó 75 μ L de la solución de hemolinfa y finalmente se le añadió 40 μ L de colorante Rojo Neutro. Se colocó un cubreobjetos y se observaron las laminillas a través de un microscopio óptico marca Leica modelo DM100, utilizando el objetivo 40x, a una temperatura de 22°C y con baja intensidad de luz, registrando los respectivos Tiempos de Retención de Rojo Neutro (TRRN). Se registró fotográficamente cada tratamiento y réplica, las observaciones se hicieron a los 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Se determinó la primera observación como la acumulación máxima de Rojo Neutro en los lisosomas y las observaciones terminaron cuando se perdió el 50% de la tinción.



Figura 14. Extracción de hemolinfa en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel.

Estrés metabólico

El estrés metabólico se evaluó a través de la relación O:N con el método de Mayzaud y Conover (1998). Este se calculó a partir de los resultados del consumo de oxígeno ($\text{mg/O}_2/\text{h/gPS}$) y el valor del nitrógeno amoniacal producido ($\text{mg/NH}_3/\text{h/gPS}$) y fue expresado como razón atómica de oxígeno y nitrógeno amoniacal.

Se tomaron cinco litros de agua para experimentación sobresaturándola de oxígeno disuelto burbujeando aire durante cinco minutos, la cual se utilizó para llenar 36 cámaras de 120 mL de capacidad, en las que se colocaron de manera individual cuatro organismos extraídos de los acuarios sometidos a cada una de las condiciones experimentales: Control, B 12.5%, B 25%, B 50%, D 3%, D 6.25%, D 12.5% y D25% y cuatro cámaras vacías. En la Figura 15 se muestran las cámaras para la evaluación del biomarcador.



Figura 15. Cámaras para la determinación de consumo de oxígeno y excreción amoniacal en crustáceos.

Los frascos se llenaron con agua para experimentación hasta llegar al tope con el fin de evitar que se almacenara oxígeno entre la superficie del agua y la tapa que pudiera ocasionar una alteración de los resultados. La prueba tuvo una duración de 6 horas y se midieron los parámetros de OD, nitrógeno amoniacal, pH, salinidad y temperatura al inicio y al final de la evaluación.

Consumo de oxígeno

Con el fin de conocer la tasa del consumo de oxígeno de los organismos, se midió directamente la cantidad de oxígeno disuelto de cada cámara antes de ser llenada al tope, utilizando un medidor multiparamétrico portátil (ProDSS), después de seis horas aislamiento se tomó una muestra del agua de cada cámara para volver a medir OD. El consumo de oxígeno (mgL^{-1}) se calculó por la diferencia entre la concentración inicial y final del oxígeno disuelto de las muestras (incluyendo las cámaras sin organismos) y en relación a la duración de la prueba (Vanegas, 1996).

Excreción nitrogenada

La excreción nitrogenada (N-NH_4^+) se evaluó en los mismos organismos del dispositivo y de manera similar a la empleada para cuantificar el consumo de oxígeno, registrando la cantidad

de nitrógeno amoniacal utilizando un laboratorio portátil HACH DR 2700 (Fig. 16). La cantidad de nitrógeno amoniacal excretado por los crustáceos (mg/L) se calculó por la diferencia entre las concentraciones final e inicial de las muestras de agua de cada cámara (incluyendo las muestras de agua sin organismos) y en relación a la duración de la prueba (Vanegas, 1996).



Figura 16. Medición de Amonio excretado de langostinos

Al final de la prueba se obtuvieron las medidas biométricas de cada ejemplar, la longitud, medida desde el extremo distal de la espina rostral hasta la punta del telson en centímetros y el peso húmedo medido en gramos utilizando una balanza analítica (RADWAG modelo AS220-C2), para después dejarlos en el horno de convección (BINDER ED 23) a 60°C hasta obtener el peso constante y alcanzar el peso seco de cada organismo, Fig. 17.



Figura 17. Obtención del peso seco de langostinos en bioensayo.

Determinación del consumo de oxígeno.

Con las concentraciones de oxígeno disuelto obtenidas al inicio t_0 y término de la prueba t_1 (seis horas), se calculó el consumo de oxígeno en mg O / h / individuo, y posteriormente el consumo de oxígeno estandarizado (por gramo de peso seco).

1. Consumo de oxígeno (mg/L)

$$VO \text{ (mg/L)} = OD \text{ (mg/L)} t_1 - OD \text{ (mg/L)} t_0$$

2. Consumo/h en cada cámara

$$VO_c \text{ (mg/h)} = (VO \text{ (mg/L)} / 6 \text{ h}) * \text{Vol cámara (L)}$$

3. Oxígeno consumido por organismo

$$VO_{\text{camarón}} \text{ (mg/h)} = VO_c \text{ (mg/h)} [\text{Cámara con camarón}] - VO_c \text{ (mg/L)} [\text{Cámara vacía}]$$

4. Oxígeno consumido estandarizado (de preferencia en peso seco).

$$VO_{\text{camarón}} (\text{mg/h} \cdot \text{gPS}) = VO_{\text{camarón}} (\text{mg/h}) / \text{peso seco (g)}$$

Determinación de la excreción nitrogenada como nitrógeno amoniacal total.

La excreción nitrogenada se calculó de manera similar, por la diferencia entre las concentraciones de nitrógeno amoniacal inicial t_0 y final t_1 .

Determinación del estrés metabólico a través de la razón O:N.

1. El valor del oxígeno consumido, VO, que fue obtenido en mg, se transformó a peso átomo gramo.

Peso átomo gramo del oxígeno = $O/\text{peso atómico del oxígeno}$; por tanto $VO/16 = O$

$$VO \text{ mg/h} \cdot \text{gPS} / 16 = O$$

2. El valor del nitrógeno producido $\Delta N\text{-NH}_3$ (mg), fue igualmente transformado a peso átomo gramo.

El sistema HACH calculó el amoniaco producido (NH_3), el nitrógeno amoniacal N- es sólo una proporción de la molécula NH_3 , cuyo peso es 17. El peso del Nitrógeno (14) solo es 82.35% del peso de la molécula, así:

$$\text{Peso átomo gramo del N en la molécula NH}_3 = N * (0.8235)/14 = N$$

$$[\Delta N\text{-NH}_3 (\text{mg/h} \cdot \text{gPS})] * (0.8235)/14 = N$$

Determinación de O:N

La relación O:N se calculó dividiendo el oxígeno consumido entre la producción de nitrógeno. El resultado es absoluto y no tiene unidades.

Tomando como criterio los valores indicados por Mayzaud y Conover (1988), se determinó que el catabolismo de proteínas se asocia a valores entre 3 y 16, valores entre 17 y 50 indican mezclas entre proteínas y lípidos, O:N entre 50 y 60 indican a un metabolismo equilibrado de proteínas, carbohidratos y lípidos, mientras los valores mayores a 60 corresponden al consumo de un sustrato que mezcla los carbohidratos con los lípidos (Díaz *et al.*, 2010).

Resistencia al nado contra corriente

Para realizar la evaluación del estado físico de los crustáceos, se colocaron de manera individual cuatro organismos por cada uno de los grupos de exposición en un dispositivo de forma rectangular, disponiendo de un volumen de agua de 30 L con el fin de mantener una presión de salida constante, en el cual se simuló la corriente en la que nadarían los organismos; se encendió el motor para que corriera el agua sobre el dispositivo (Fig. 18), posteriormente se colocó el animal en un extremo del canal y se comenzó a tomar el tiempo, el conteo finalizó cuando el ejemplar deja de nadar y es arrastrado al otro extremo (Morales y Meruane, 2012).

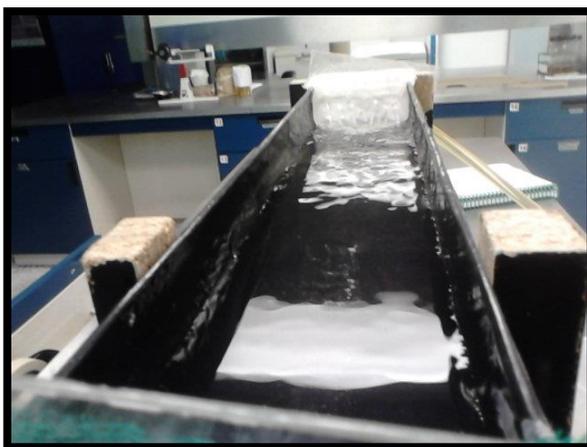


Figura 18. Dispositivo de nado contra corriente.

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó a través del software STATISTICA 7. Se realizó un análisis de varianza para los controles de ambos contaminantes con el objeto de determinar si estos mostraban diferencias o podrían analizarse en conjunto.

Para determinar si los datos presentaban un comportamiento normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicaron pruebas de normalidad en la estabilidad lisosomal, consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y nado contra corriente a través de un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre la respuesta de los organismos expuestos y los controles. Posteriormente se realizó la prueba de Fisher para determinar entre que contaminantes y concentraciones de estos se presentaban dichas diferencias. En el caso de las pruebas que no presentaron normalidad (relación O:N) se realizó un análisis de Kruskal-Wallis y una prueba múltiple de comparación de los valores de “*p*”.

Capítulo 5

Resultados

Estabilidad lisosomal

El TRRN permitió observar patrones de respuesta claros. La prueba de ANOVA mostro diferencias significativas ($p < 0.01$) en el tiempo de retención de los diferentes tratamientos al día 7 de exposición. En la Fig. 19 se observa la formación de tres grupos. El grupo “a” con el mayor TRRN (120 min) conformado por el control y las concentraciones de B 12.5%, D 3% y D 6.25%. El grupo “b” formado por los organismos expuestos a las concentraciones B 25%, B 50% y D 12.5% (90 min), y el grupo “c” con la concentración D 25% (60 min) en la

cual se observó una disminución de la mitad de TRRN en comparación con el grupo “a”.

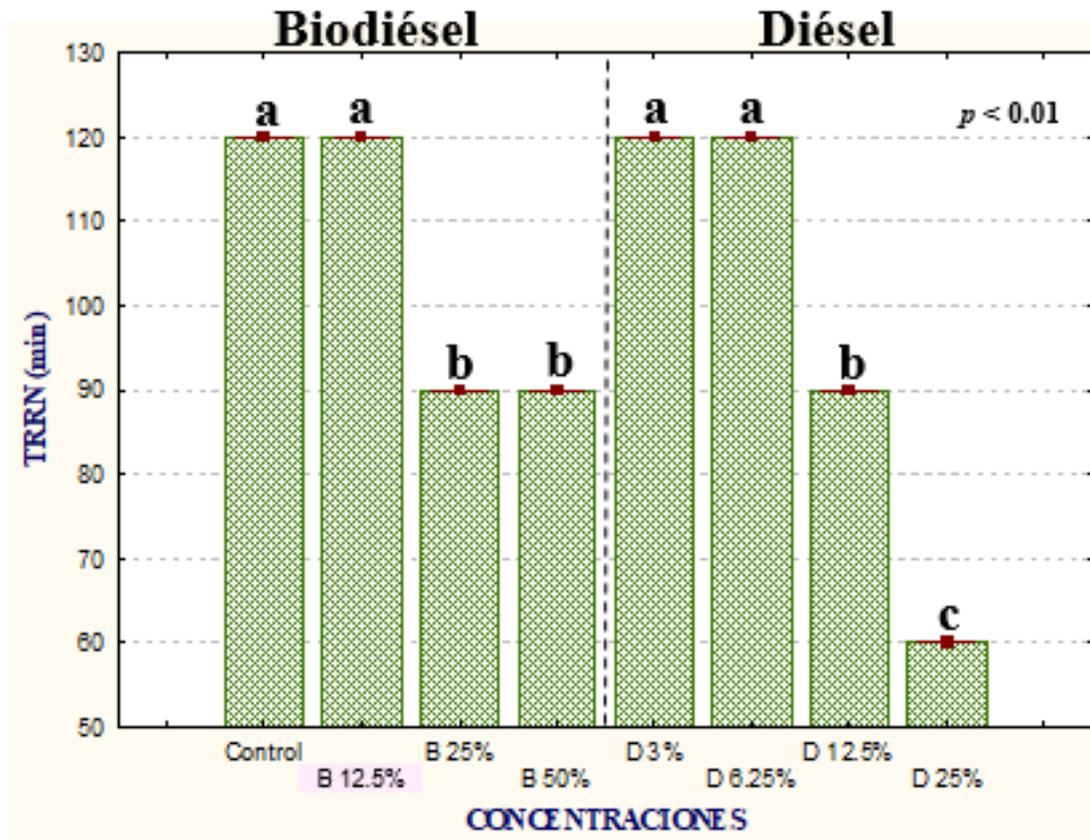


Figura 19. Tiempos de Retención promedio de organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 7. Las letras representan las diferencias significativas entre los tratamientos.

En el día 14 los resultados permitieron conformar cuatro grupos ($p < 0.01$). El grupo “a” se formó con el control, D 3% y D 6.25%, en los cuales el TRRN promedio fue de 120 min. El grupo “b”, lo conformó solamente la concentración D 12.5% con un promedio de 105 min; el grupo “c”, comprendió la concentración de B 12.5% obteniendo un promedio de 90 min, y finalmente el grupo “d” tuvo un TRRN promedio de 57.50 min en las concentraciones de B 25%, B 50% y D 25 (Fig. 20).

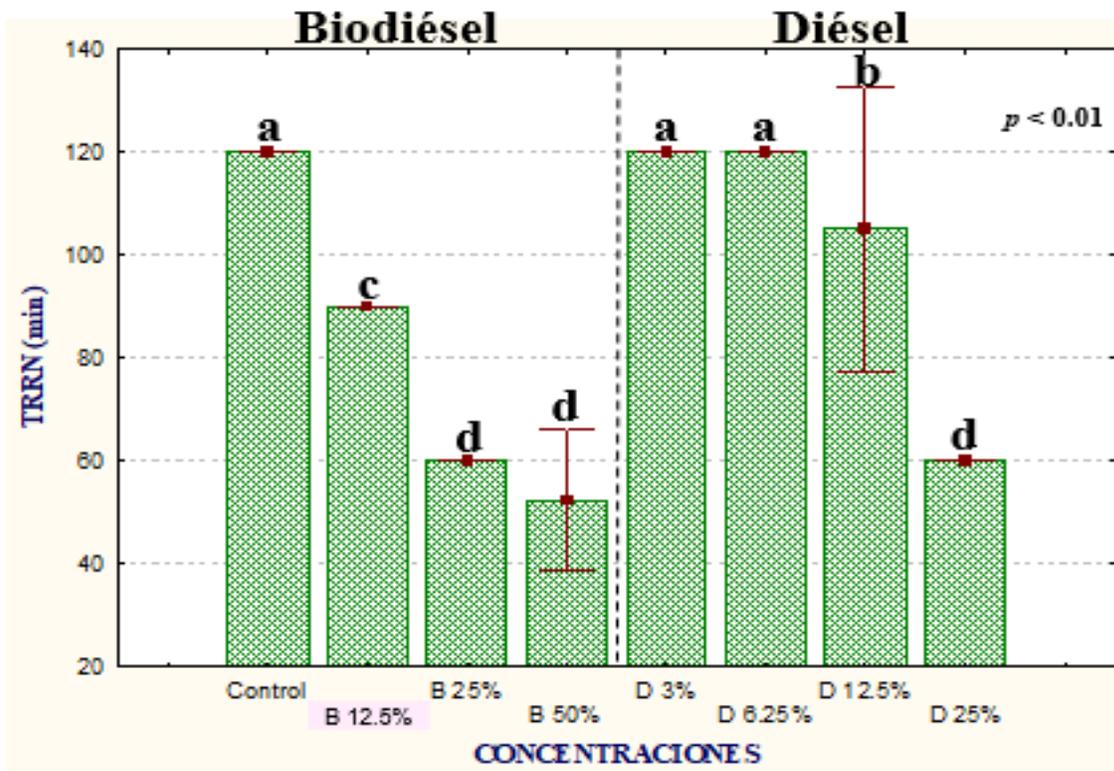


Figura 20. Tiempos de Retención promedio y desviación estándar de organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 14. Las letras representan las diferencias significativas entre los tratamientos.

En la Fig. 21 se muestra el TRRN el día 21 se formaron 4 grupos ($p < 0.01$). El grupo “a” está conformado por el control y la concentración más baja de diésel (D 3%) con un promedio de 120 min. El grupo “b” conformado por las concentraciones: B 12.5%, D 6.25% y D 12.5%, con un promedio de 90 min. El grupo “c” con la concentración de B 25% (promedio de 60 min); y por último el grupo “d”, con el TRRN más bajo durante todo el bioensayo en promedio 45 min, que incluyó a los organismos expuestos a las concentraciones más altas de ambos contaminantes (B 50% y D 25%).

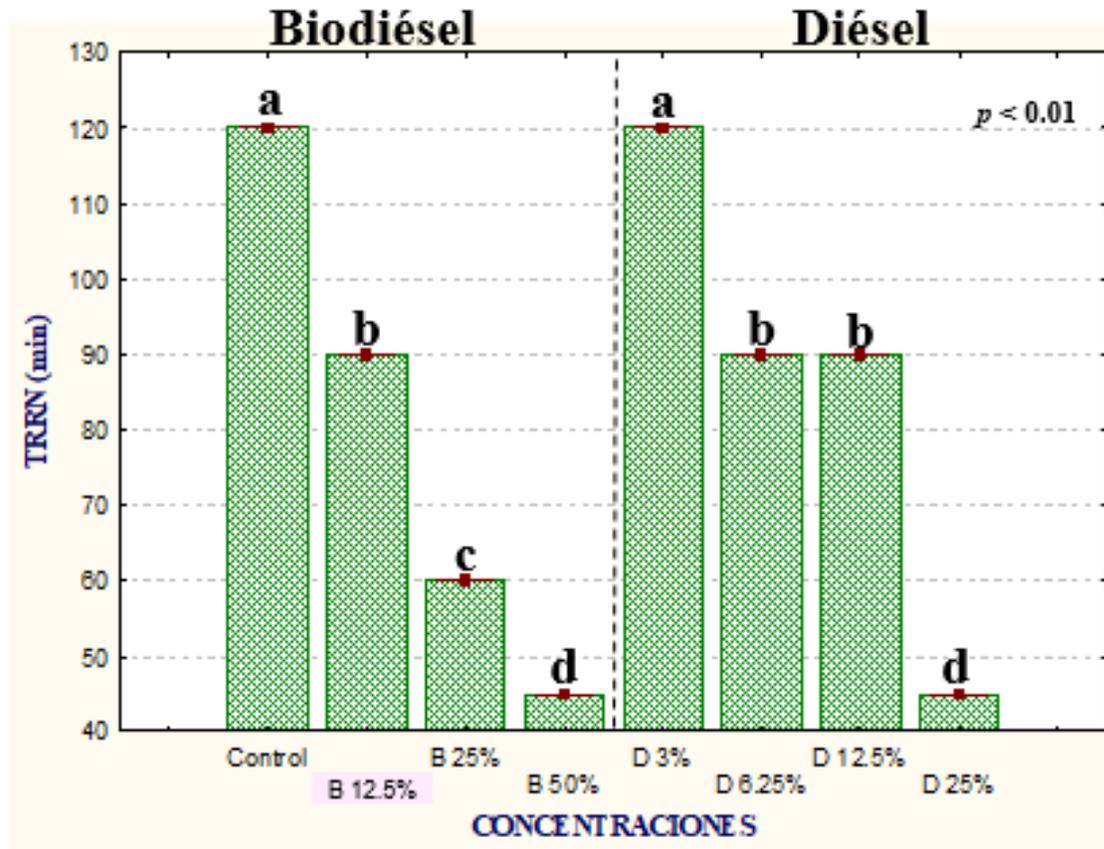


Figura 21. Tiempos de Retención promedio de organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 21. Las letras representan las diferencias significativas entre los tratamientos.

Estrés metabólico

Durante el análisis estadístico de éste biomarcador se observaron que los resultados obtenidos en el segundo bioensayo son incompatibles con el primero, ya que el consumo de oxígeno y excreción nitrogenada en las concentraciones D 3% y D 6.25% no son compatibles con la primer prueba por lo que sólo se analizaron estadísticamente las concentraciones B 12.5%, B 25%, B50%, D 12.5%, D 25% y el control para este biomarcador.

Consumo de Oxígeno

Al realizar el análisis de los organismos control en los marcadores de: consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y relación O:N se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), por

lo que se decidió analizar por separado diésel y biodiésel.

Consumo de oxígeno de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel.

El promedio inicial de oxígeno disuelto (OD) en las cámaras sin organismo fue de 6.38 ± 0.30 mg/L. El consumo de oxígeno por cámara tuvo un promedio de 0.008 mg/L. Éste valor fue restado del consumo de oxígeno en las cámaras con organismos. El promedio del oxígeno consumido por los langostinos al día 0 fue de 0.63 ± 0.16 mg/h*gPS.

Al día 7 el consumo de oxígeno de la concentración B 12.5% presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la concentración B 50%. En el día 14 la concentración B 50% presentó la tasa de consumo de oxígeno más baja durante toda la prueba, con un valor promedio de 0.47 ± 0.37 mg/h*gPS y finalmente al día 21 de medición, los langostinos expuestos a las concentraciones B 25% y B 50% presentaron la mayor tasa de respiración durante toda la evaluación con un valor promedio de 1.52 ± 0.30 y 1.39 ± 0.23 mg/h*gPS respectivamente, cabe destacar que en dichas concentraciones se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control y a B 12.5% (Fig.22). Considerando que el control en los 3 días de medición equivaldría un 100%, se puede apreciar en la Figura 23, que a pesar de que en las primeras dos mediciones existían variaciones en la respiración de los organismos con respecto al control, al día 21 las 3 concentraciones evaluadas superaron el 100%, indicando que en este día, los organismos respiraban más que los organismos control, presentando así un estado de estrés ante la presencia de sedimentos contaminados con biodiésel.

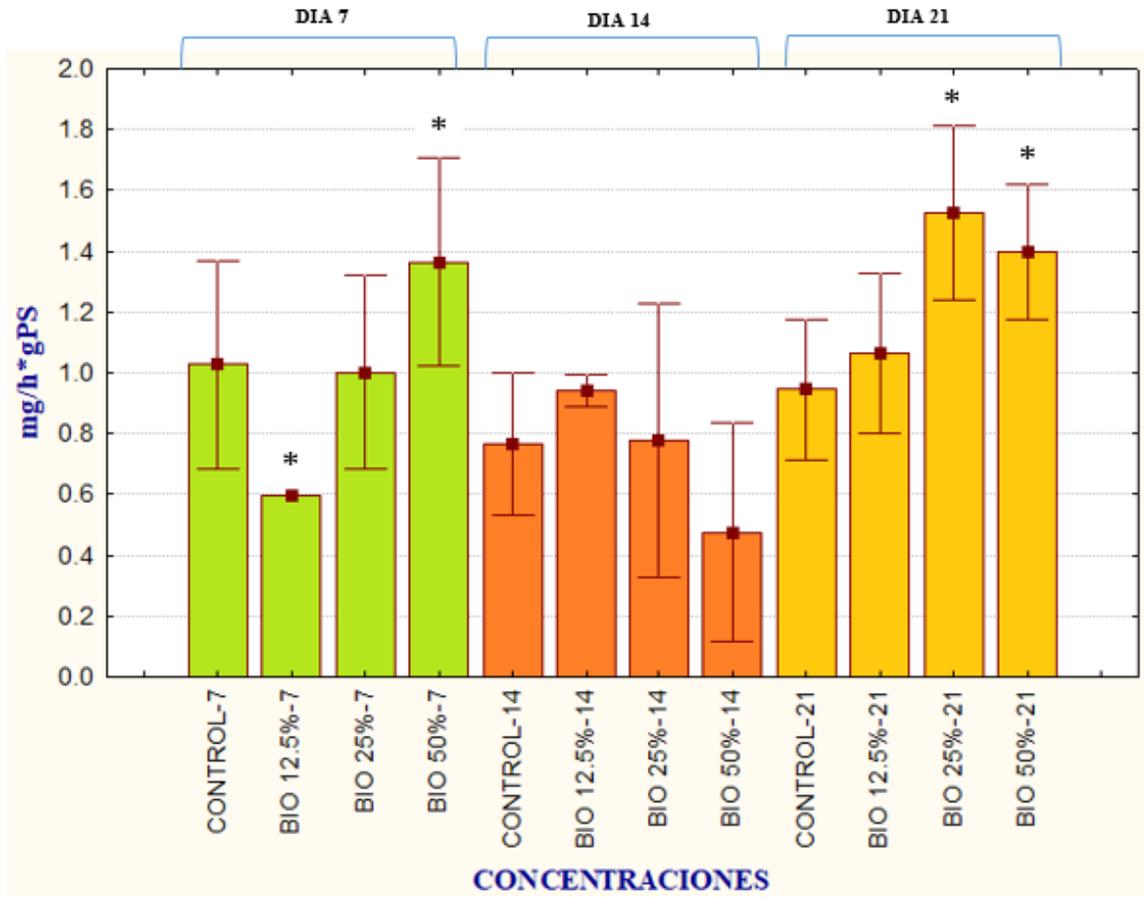


Figura 22. Consumo de oxígeno de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel en los días 7, 14 y 21 (promedio \pm sd). * Representa las diferencias significativas en el día 7 y 21 ($p < 0.01$).

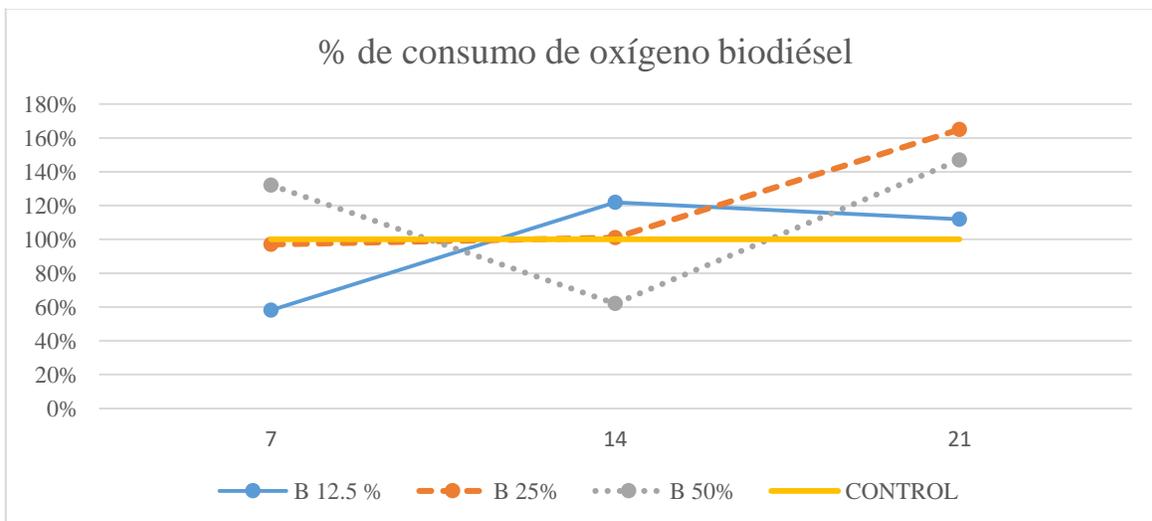


Figura 23. Porcentaje de consumo de oxígeno en las concentraciones de biodiésel con respecto al control durante los días de medición 7, 14 y 21.

Consumo de oxígeno de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel.

En la Fig. 24 se presenta el consumo de oxígeno en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel durante los diferentes días de medición. Al día 7 los valores oscilaron entre 1.02 y 1.64 mg/h*gPS, mientras que en el día 14 la tasa de respiración más baja se observó en el control (0.76 ± 0.24 mg/h*gPS), datos elevados se presentaron en la concentración D 12.5% donde se observaron los niveles más altos de con un valor promedio de 1.86 ± 0.75 mg/h*gPS, así mismo, dichas concentraciones (control y D 12.5%) mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$). En el último día de evaluación, la respiración de los organismos obtuvo valores entre 0.94 y 1.37 mg/h*gPS, cabe mencionar que en la concentración más alta (D 25%), la desviación fue bastante amplia debido a que sólo sobrevivieron tres especímenes para la realización de esta prueba.

En la Fig. 25 se representa el porcentaje del consumo de oxígeno de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel, donde claramente se puede apreciar que en ambas concentraciones, la respiración de los organismos superó al control, específicamente en el día 14 donde se obtuvieron valores hasta de 242% sobre el control en la concentración D 12.5% y 186% en la concentración D 25%. Si bien, al día 21 el porcentaje de consumo de oxígeno fue de 140%, no deja de ser superior al control. Lo que sugiere claramente que en cuestión de respiración el diésel afectó de manera drástica comparado con el biodiésel, ya que en el mismo porcentaje de concentración los organismos mostraron una tasa de respiración más alta ante la exposición a diésel indicando una situación de mayor estrés provocada por dicho contaminante.

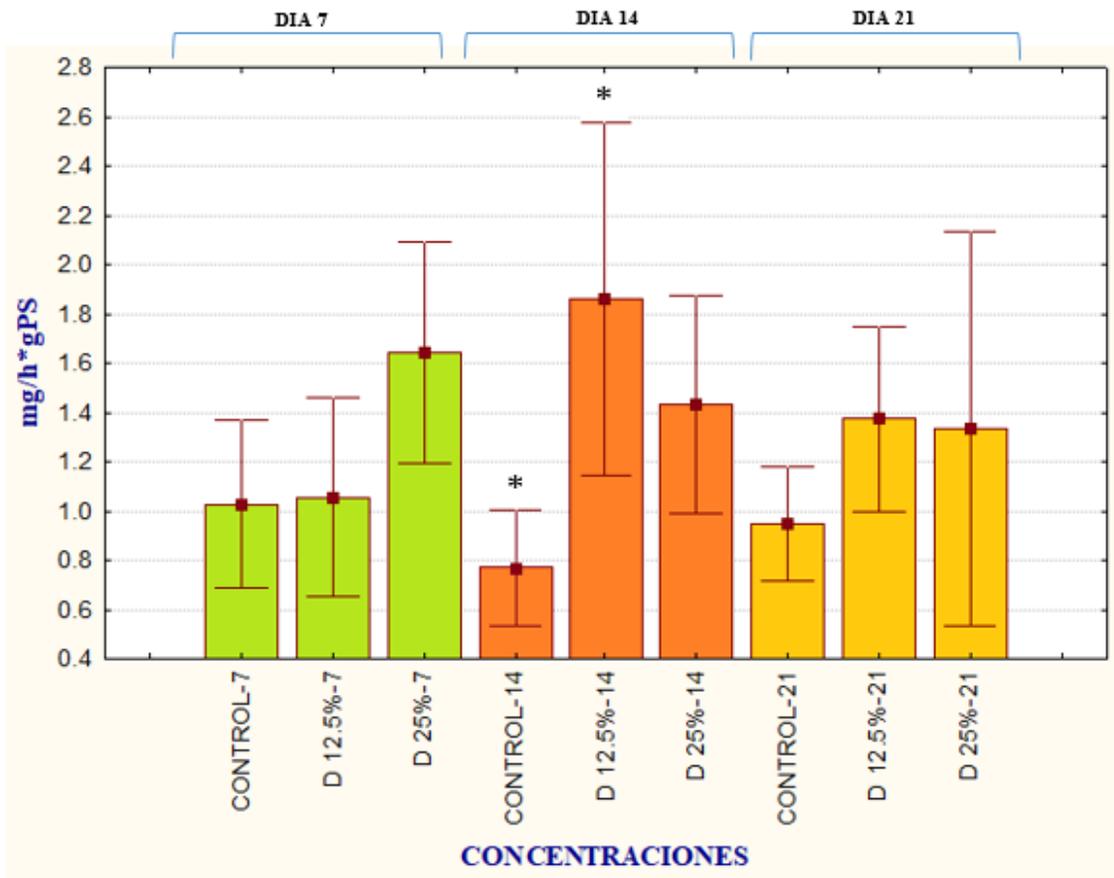


Figura 24. Consumo de oxígeno de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel en los días 7, 14 y 21 (promedio \pm sd). * Representa las diferencias significativas en el día 14 ($p < 0.01$).

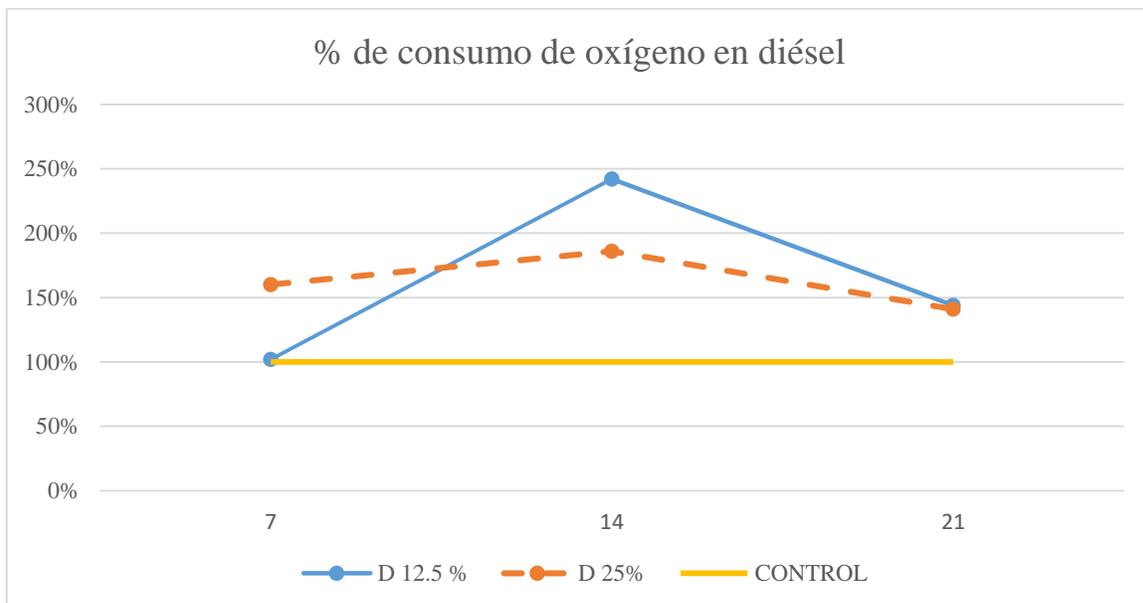


Figura 25. Porcentaje de consumo de oxígeno en las concentraciones de diésel con respecto al control

durante los días de medición 7, 14 y 21.

Estos resultados pueden corroborar que el consumo de oxígeno es una medida indirecta del metabolismo aerobio, que refleja indirectamente las reacciones que requieren energía para cubrir las funciones globales del organismo; de tal manera, se considera una medida de integración sencilla que da cuenta de la condición fisiológica de los especímenes (Vanegas, 1996).

Excreción Nitrogenada

Excreción nitrogenada en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel.

La concentración inicial de amonio total en las cámaras sin organismos fue de 0.0 mg/L. La excreción nitrogenada en las cámaras vacías tuvo un promedio de 0.001 mg/L, éste valor fue restado de la producción individual. El promedio de la excreción nitrogenada al día 0 tuvo un valor de 0.013 ± 0.010 mg/h*gPS.

La excreción nitrogenada de los organismos expuestos a biodiésel mostró pocas diferencias significativas a lo largo del bioensayo (Fig. 26). En el día 7, la concentración B 12.5% obtuvo el valor promedio más bajo durante toda la prueba (0.018 ± 0.015 mg/h*gPS). Al día 14 se manifestó una amplia dispersión de datos en las desviaciones estándar, principalmente en la concentración B 12.5% cuyo valor promedio de amonio excretado fue de 0.080 ± 0.052 mg/h*gPS, lo cual impidió obtener diferencias significativas en este día de evaluación. Sin embargo, al final de la medición (día 21) la concentración más alta (B 50%) demostró una mayor excreción respecto al resto de los tratamientos ($p < 0.05$) con un valor de 0.135 ± 0.051 mg/h*gPS.

Con el fin de observar el comportamiento de cada concentración durante el tiempo de evaluación, se realizó un análisis del porcentaje de excreción de los organismos, donde el control equivale el 100% a lo largo de toda la prueba (Fig. 27). Claramente, al día 14 todos

los tratamientos obtuvieron un porcentaje de excreción mayor a los organismos control y al final de la prueba sólo la concentración B 50%, excretó una mayor cantidad de amonio, mientras que el resto de los tratamientos mostraron una tendencia a la baja de excreción en proporciones similares al control.

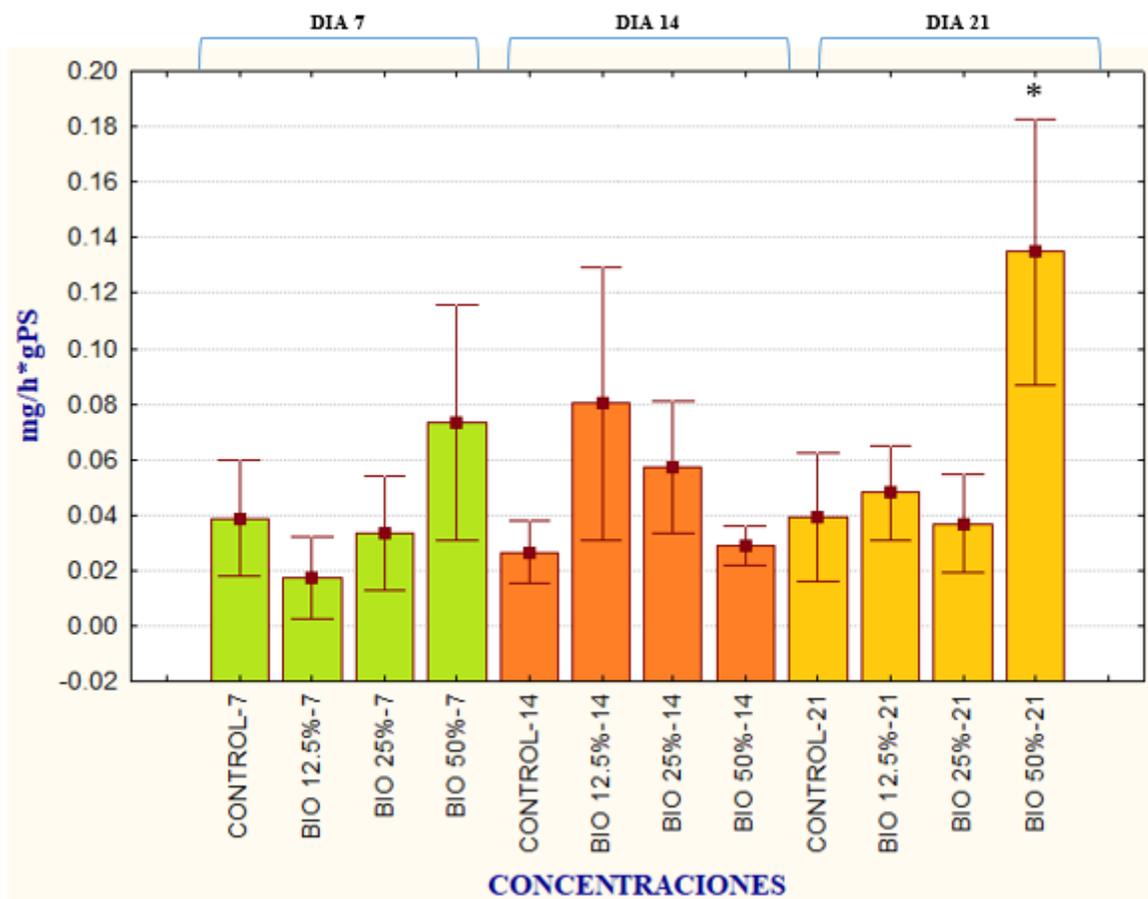


Figura 26. Excreción nitrogenada de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel en los días 7, 14 y 21 (promedio \pm sd). * Representa las diferencias significativas en el día 21 ($p < 0.01$).

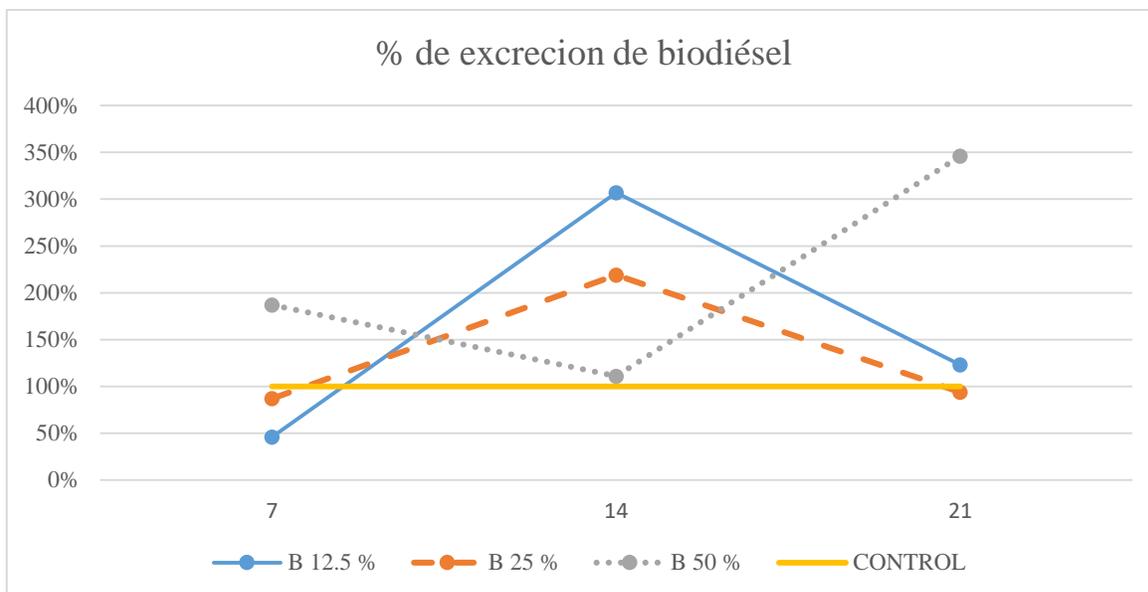


Figura 27. Porcentaje de consumo de oxígeno en las concentraciones de biodiésel con respecto al control durante los días de medición 7, 14 y 21.

Excreción nitrogenada en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel.

De manera general, en el bioensayo de exposición a sedimentos contaminados con diésel, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los días de evaluación, debido a la presencia de casos extremos que generaron importantes desviaciones estándar de los tratamientos (Fig. 28), esta condición se manifiesta notoriamente en el día 14, en el cual las concentraciones D 12.5% y D 25% presentaron valores promedio de excreción de 0.081 ± 0.047 y 0.038 ± 0.038 mg/h*gPS respectivamente. Al día 21, a pesar de que sólo se trabajó con tres especímenes en la concentración D 25% los datos obtenidos de excreción fueron considerablemente más homogéneos en comparación con el consumo de oxígeno de esta misma concentración, dichos valores de excreción nitrogenada fueron de 0.32 ± 0.023 mg/h*gPS.

Con respecto al análisis porcentual de éste contaminante (Fig. 29), nuevamente se observó un porcentaje de excreción mayor al control en el día 14 donde el valor más alto fue en la concentración D 12.5% con un 311%. No obstante, al día 21, el porcentaje de excreción fue

inferior al control en ambas concentraciones obteniéndose valores de 61% en la concentración D 12.5% y de 82 % en D 25%.

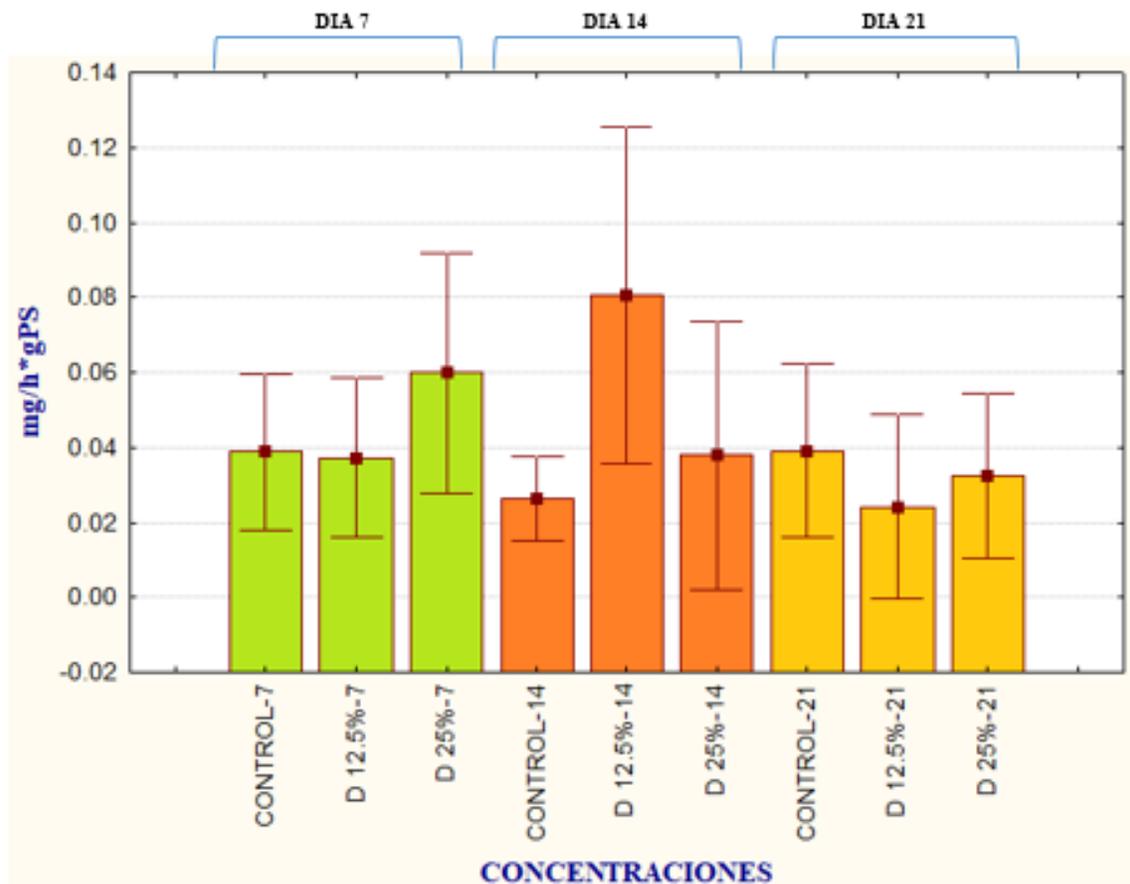


Figura 28. Excreción nitrogenada de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel en los días 7, 14 y 21 (promedio \pm sd).

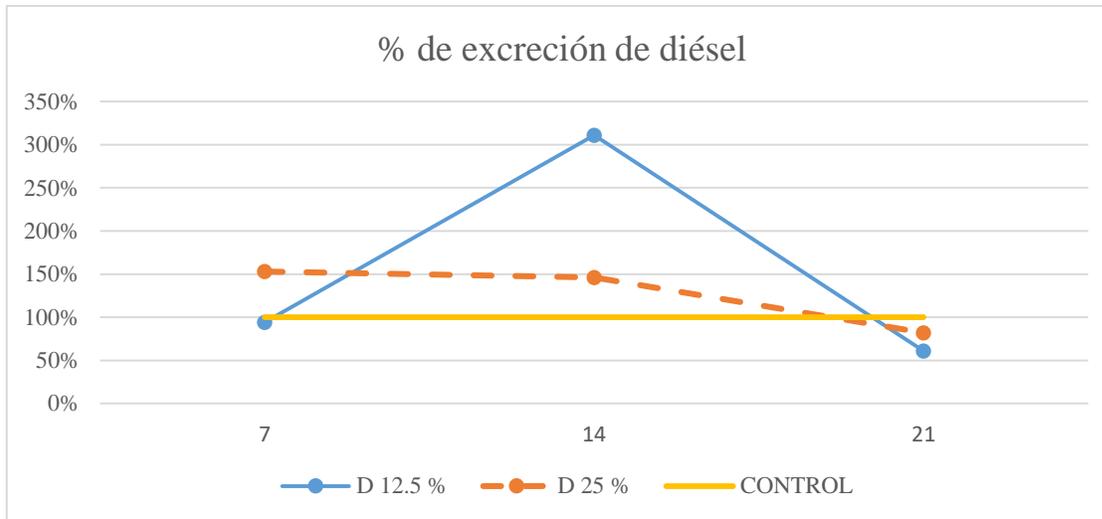


Figura 29. Porcentaje de consumo de oxígeno en las concentraciones de biodiésel con respecto al control durante los días de medición 7, 14 y 21.

Relación O:N

Relación O:N en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel.

Los valores obtenidos del consumo de oxígeno y de la excreción nitrogenada de los crustáceos en sus diferentes tratamientos, se integraron en la razón atómica O:N (Vanegas, 1996). Al inicio del bioensayo (día 0), los organismos tuvieron una relación O:N promedio de 65.03 ± 25.26 , reflejando un ligero estrés de los organismos por consumo de lípidos y carbohidratos, este dato se puede atribuir al cambio en el que someten los organismos por adaptarse a las condiciones del bioensayo.

Los promedios de la relación O:N presentaron desviaciones estándar muy grandes, por lo cual no pudieron demostrarse diferencias significativas en los tratamientos ($p > 0.05$). En el día 7 de exposición, se presentó una amplia dispersión de los datos en el control y en la concentración B 12.5% con valores promedio de 44.91 ± 39.94 y 87.07 ± 76.93 respectivamente. Con base a los valores establecidos por Mayzaud y Conover (1988), se

logró observar que la relación O:N al día 7 refleja un consumo de proteínas y lípidos en los organismos control, B 25% y B 50%, mientras que en la concentración B 12.5% el valor de O:N se asoció a un catabolismo de hidratos de carbono y lípidos.

Al día 14 los organismos control, B 25% y B 50% continuaron la dependencia al consumo de proteínas y lípidos como sustrato energético, sin embargo, la concentración B 12.5% bajo a un valor de 15.52 ± 6.7 denotando un catabolismo estrictamente proteico.

En el último día de medición, los organismos control y la concentración B 12.5% mostraron valores que pueden asociarse a un consumo de proteínas y lípidos, mientras que los resultados de la concentración B 25% demostraron un metabolismo en equilibrio con un valor promedio de 60.78 ± 50.03 y finalmente en la concentración más alta de biodiésel (B 50%) se obtuvo el valor más bajo de O:N en toda la prueba (12.20 ± 5.05) que puede asociarse a un catabolismo proteico (Figura 30).

Relación O:N en langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel.

En la Figura 30 se observa el promedio y desviación estándar de la relación O:N de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel durante los días 7, 14 y 21, los cuales mostraron una gran dispersión en los datos que impidió observar diferencias significativas ($p > 0.05$).

Al día 7, los resultados de la relación O:N de todos los tratamientos incluyendo el control, estuvieron dentro del rango de 17 y 50, indicando que los crustáceos evaluados ese día, presentaron un severo estrés metabólico.

En la segunda medición, el control y la concentración D 12.5% mostraron también valores bajos asociados al consumo de proteínas con promedios de 37.23 y 27.44 respectivamente, en contraste, la última concentración (D 25%), generó valores promedio de 119.29 ± 111.89

indicando que los organismos consumieron principalmente sus reservas representadas por consumo de carbohidratos y lípidos.

Al final de la medición (día 21), solamente el control presentó un consumo de proteínas y lípidos con un valor promedio de 35.86 ± 25.04 , mientras que los resultados obtenidos en las concentraciones D 12.5% y D 25% reflejaron un consumo de carbohidratos y lípidos indicando un efecto de estrés por la exposición a diésel.

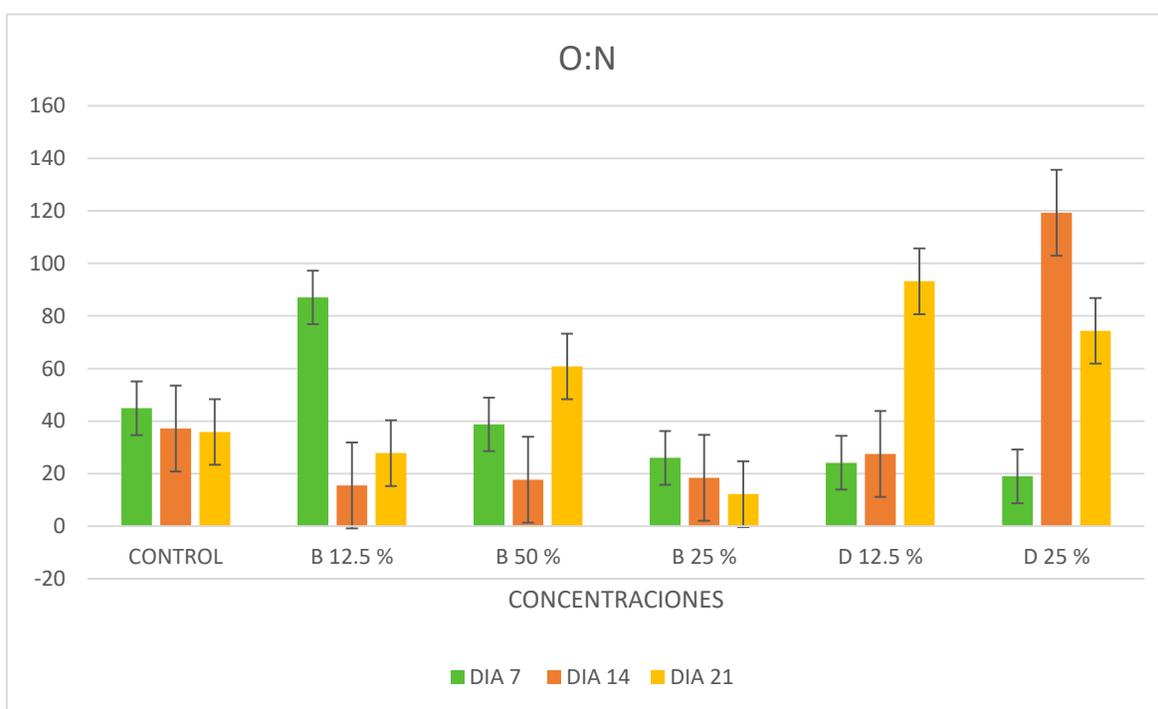


Figura 30. Relación O:N generada durante el bioensayo de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel durante los días 7, 14 y 21 de exposición (promedio \pm sd).

Los resultados obtenidos en las pruebas asociadas a las funciones metabólicas sugieren una influencia del biodiésel en el consumo de oxígeno, y un efecto más evidente en el caso de la exposición a sedimentos contaminados con diésel. Las alteraciones de la excreción nitrogenada se manifestaron en el incremento asociado a la exposición a ambos tipos de combustible. Los valores de estos parámetros fisiológicos integrados en la relación O:N

implicaron una influencia importante de la excreción nitrogenada en los primeros días de ensayo, que derivó en valores bajos de la relación O:N, los cuales podrían asociarse al consumo de las proteínas de los organismos, pero también a un esfuerzo por depurar al hacerse presente una importante excreción nitrogenada. Los valores de O:N elevados de la parte final del bioensayo indican que los organismos en esta etapa trataban de compensar el gasto metabólico haciendo uso de sus reservas. Las alteraciones observables en las dispersas desviaciones estándar de los valores, impidieron frecuentemente demostrar estadísticamente diferencias significativas. Pero estas mismas alteraciones indican que los organismos están sometidos a un estrés derivado de las condiciones experimentales. La irregularidad de las respuestas metabólicas observadas en los sujetos experimentales hace conveniente complementar el análisis con los biomarcadores bioquímicos con el propósito de explicar a detalle el efecto tóxico que el combustible provoca en los crustáceos.

Nado contra corriente

Con el fin de conocer el estado locomotor inicial de los crustáceos, se tomaron cuatro organismos al azar para evaluar la resistencia natatoria al día 0, en el que se obtuvo un promedio de 30.50 ± 4.20 minutos.

En la Fig. 31 se representa la resistencia de los organismos en el nado contra corriente al día 7. En este día se observó la formación de tres grupos que representaron las semejanzas y diferencias entre los tratamientos ($p < 0.01$). El promedio más alto fue el grupo “a” con un tiempo promedio en el control de 24.25 ± 7.72 minutos. En el mismo además del control, se incluyeron los organismos expuestos a las concentraciones B 12.5% y D 3%. El grupo “b” quedó integrado por los animales de las concentraciones B 25%, B 50%, D 6.25% y D 12.5%. Y el grupo “c” estuvo conformado por los organismos de la concentración más alta de diésel (D 25%) con un tiempo de resistencia de 9.00 ± 2.94 minutos.

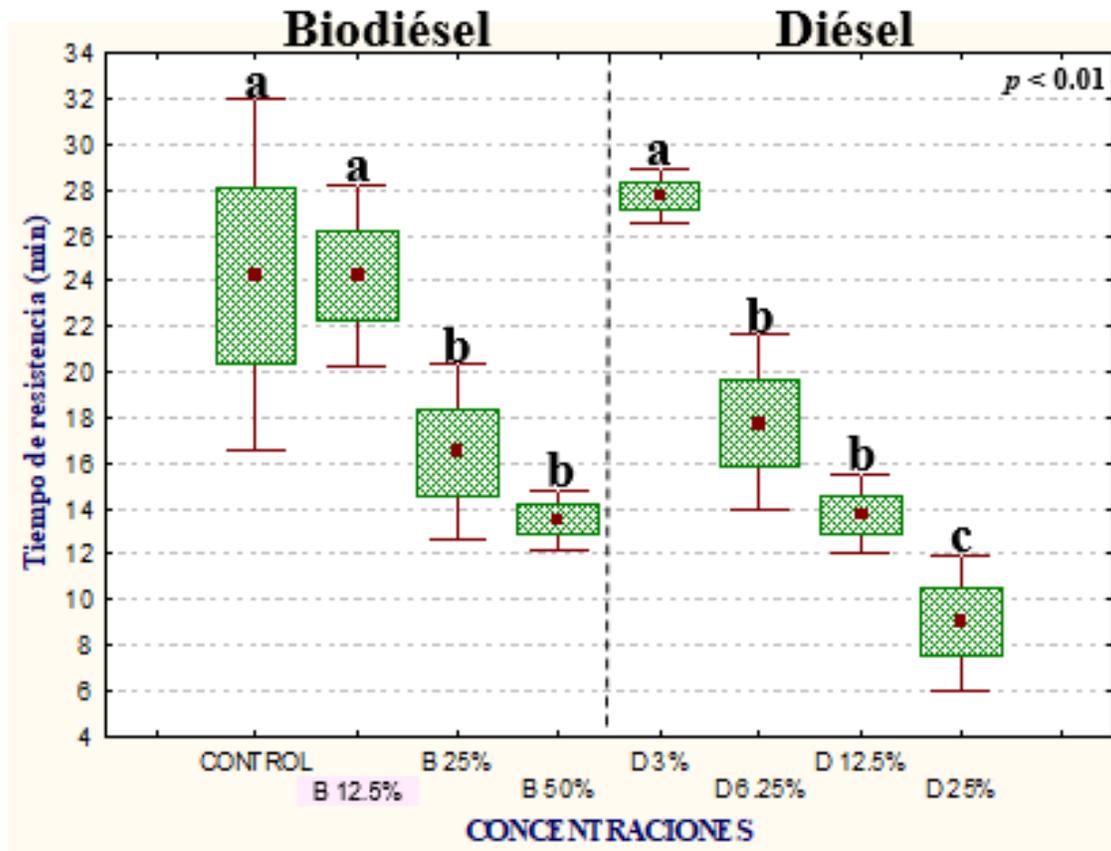


Figura 31. Tiempos de resistencia en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 7 (promedio \pm sd).

La Fig. 32 corresponde a la evaluación del día 14 en la cual se observó también la formación de tres grupos con diferencias significativas ($p < 0.01$), el grupo “a” lo integró el control con un tiempo de nado contra corriente de 36.25 ± 3.30 minutos, el grupo “b” lo formaron los animales de las concentraciones B 12.5% y D 3% con promedios de 21.50 ± 5.07 y 17.50 ± 2.38 minutos, respectivamente. Y finalmente el grupo “c” se conformó por los organismos de las concentraciones: B 25%, B 50%, D 6.25%, D 12.5% y D 25%. Las concentraciones más altas de ambos contaminantes tuvieron un tiempo de resistencia únicamente de 3.25 minutos, presentando el menor tiempo de resistencia de nado en este día de medición.

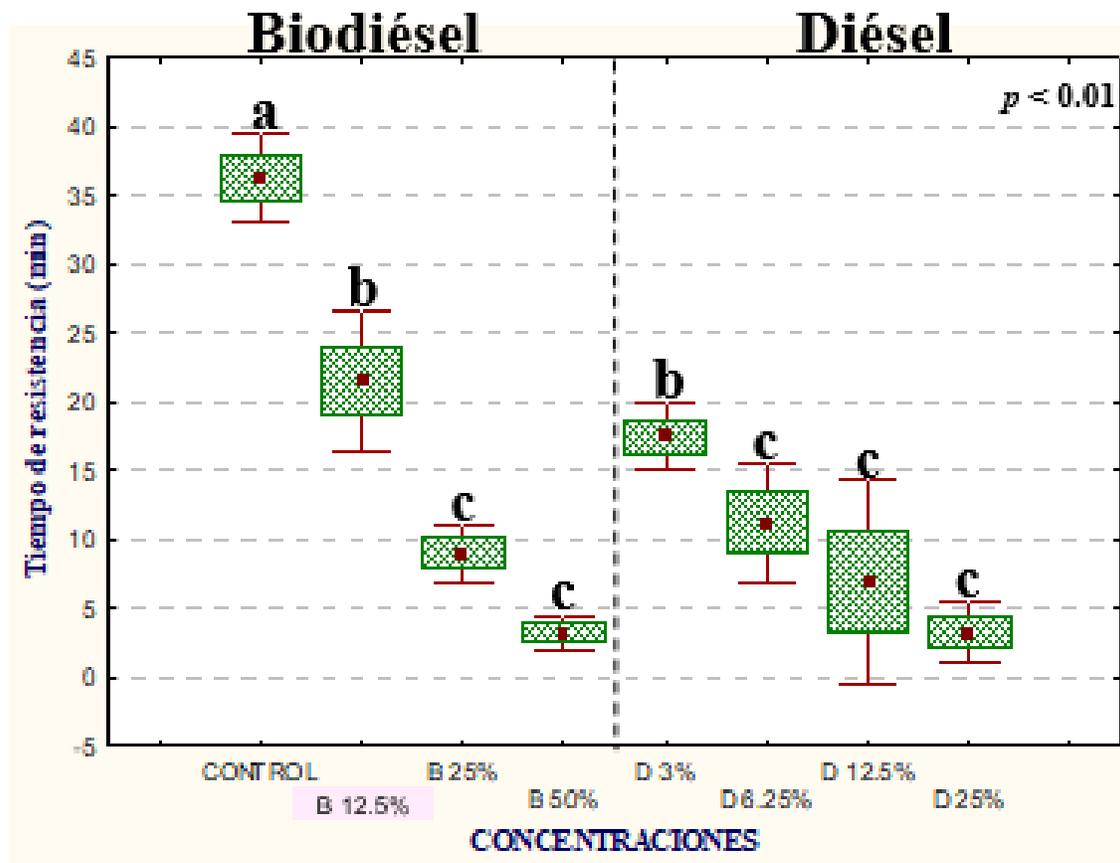


Figura 32. Tiempos de resistencia en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 14 (promedio \pm sd).

Al día 21 se mantuvo la formación de 3 grupos (Fig. 33) ($p < 0.01$), el grupo “a” fue conformado por los organismos del control con una resistencia de 28.75 ± 3.86 minutos; los ejemplares de la concentración B 12.5% conformaron el grupo “b” (21 ± 1.83 minutos). Por último los crustáceos del grupo “c” cuyo valor más alto de resistencia al nado contra corriente fue 10.25 ± 2.22 minutos en D 3%. Este grupo también incluyó las concentraciones: B 25%, B 50%, D 6.25%, y D 12.5%. Cabe mencionar que los organismos de la concentración más alta de diésel (D 25%) presentaron una mortalidad del 90% de manera que no fue posible concluir la última medición de éste biomarcador, motivo por el cual no se presentan datos para ser analizados estadísticamente.

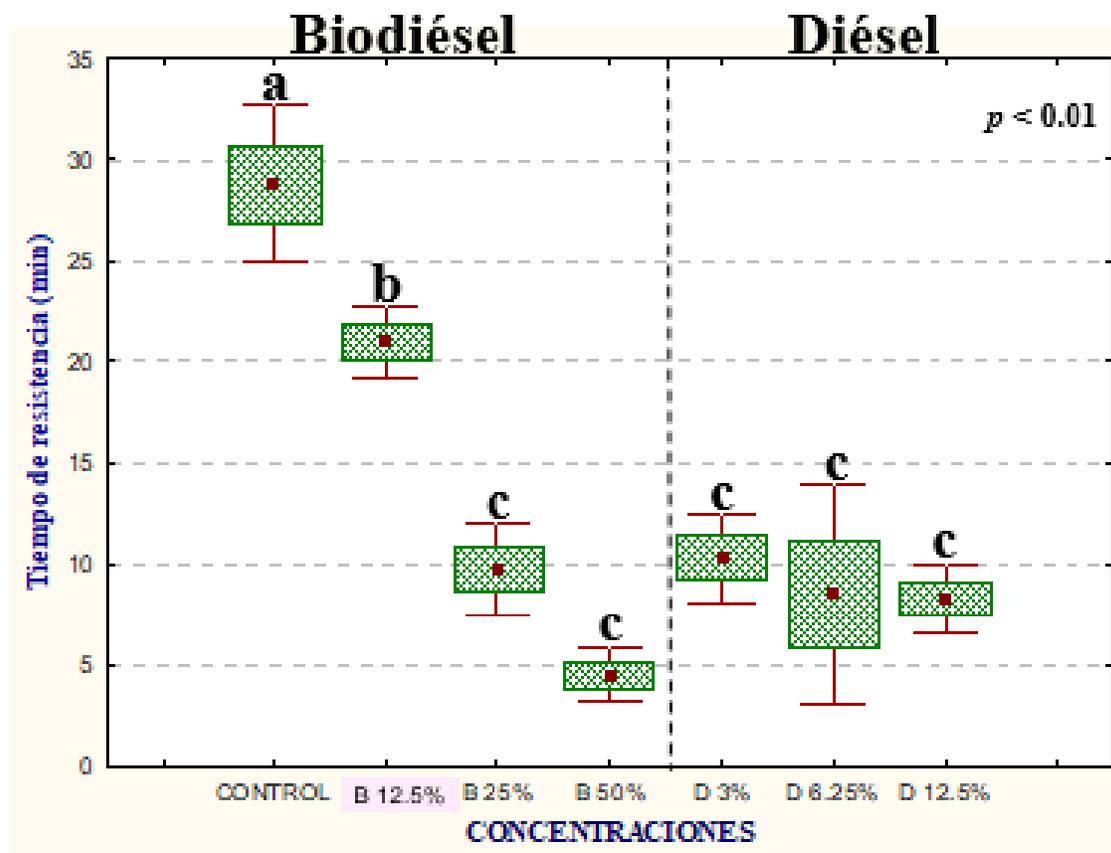


Figura 33. Tiempos de resistencia en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 21 (promedio \pm sd).

Este biomarcador resultó ser de crucial importancia en la evaluación de los efectos de diésel y biodiésel en sedimentos, ya que indica, que en el ambiente marino, donde es factible la presencia de estos combustibles, podría interferir directamente en la eficacia del crustáceo en la búsqueda de alimento, en la capacidad de escape de los depredadores e inclusive en su reproducción (Plaut, 2001) poniendo en riesgo la sobrevivencia de dicha especie.

Discusión

Estabilidad lisosomal

El nivel de organización biológica celular es útil para la detección y comprensión de los mecanismos comunes de toxicidad. Las interacciones de sustancias químicas antropogénicas con la biota se producen inicialmente a este nivel, por lo que las respuestas celulares se pueden utilizar como herramientas adecuadas para la detección temprana y sensible de la exposición a sustancias químicas (Moore, 1990). Una respuesta comúnmente utilizada para determinar el daño ocasionado por los contaminantes en las células, es la estabilidad de la membrana celular a través de la técnica de retención de rojo neutro, en la cual, un menor tiempo de retención del colorante indica un mayor daño celular.

Así mismo, los lisosomas son organelos intracelulares que actúan de manera óptima a un pH ácido, son importantes para el secuestro de contaminantes lipofílicos y su desintoxicación. Debido a esta condición, son propensos al daño oxidativo que a su vez, puede conducir a la desestabilización de la membrana (Nolde *et al.*, 2006). De esta manera, el estrés oxidativo es una respuesta celular que contribuye a la desestabilización de los lisosomas. El daño reflejado por el menor TRRN podría ser explicado por el daño oxidativo provocado por los radicales libres que se liberan durante el metabolismo de los compuestos del biodiésel, como los ácidos grasos insaturados (monoinsaturados de ácido oléico (C18: 1), poliinsaturados de ácido linoléico (C18: 2) y el ácido linolénico (C18:3)) (Bhuiya *et al.*, 2015; Yanamala *et al.*, 2013).

En este estudio se midió el TRRN en los lisosomas de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel, el daño celular se asoció a un menor TRRN con respecto al control; el TRRN disminuyó con el paso de los días, lo que indica que los organismos expuestos a la mayor concentración (50 %) presentaron un importante estrés oxidativo en el día 21. No existen estudios similares, por lo que este trabajo reporta por primera vez el daño a nivel celular que puede provocar el biodiésel que contamina los sedimentos. Sin embargo, Cavalcante *et al.*, (2014) en un estudio *in vitro* demostraron que la fracción soluble del biodiésel metílico también provoca daño de tipo oxidativo en células de pez cebra (ZFL), medido a través de la actividad de biotransformación de la enzima glutatión S-transferasa

(GST).

En cuanto a los resultados obtenidos en el bioensayo con diésel, se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$) en el TRRN desde el día 7 en las concentraciones D 12.5 y D 25%. Cabe señalar que no se encontraron estudios por exposición a sedimentos contaminados con este combustible por lo que los resultados se comparan con estudios de toxicidad de la fracción soluble del diésel y otros hidrocarburos. En este sentido se pueden mencionar los trabajos de Lowe *et al.*, (1995), quienes reportaron una reducción significativa de la estabilidad lisosomal en las células digestivas de mejillones (*Mytilus edulis*) expuestos a 160 μ l de fluoranteno durante 7 días, .Por otra parte, Nogueira *et al.*, (2011) observaron estrés oxidativo en el hígado de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) después de 7 días de exposición a 0.01 mL/L de diésel observando un aumento en los niveles de peroxidación de lípidos, glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).

La concentración menor de diésel (3%) tuvo una respuesta similar al control durante los 21 días de exposición, por lo que se estableció esta como la Concentración de Efecto no Observable o NOEL (por sus siglas en inglés), que podría ser sugerida como Concentración Objetivo en caso de la aplicación de algún método de restauración o evaluación ambiental.

Diferentes autores reportan daño en la membrana lisosomal al exponer a diferentes organismos a hidrocarburos, tal es el caso del daño en los hepatocitos de pez *Limanda limanda* después de ser expuestos a un gradiente de contaminación en el Río Weser, de Alemania, el cual presenta hidrocarburos, bifenilos policlorados (PCBs), lindano y metales como el cadmio, tal como reportó Lowe en 1992. Otro ejemplo, es el estudio de Mendoza *et al.*, (2014) donde reportaron un TRRN en hemocitos de ostras *Crassostrea corteziensis* significativamente menor comparado con el control al ser expuestos a 20 μ g/L de naftalina por 72 horas.

Nogueira *et al.*, (2011), reportaron la presencia de hidrocarburos como naftaleno, acenafteno,

fluoreno, fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno y criseno en el diésel comercial, compuestos a los que se puede atribuir el daño en la membrana lisosomal a estos compuestos anteriormente mencionados ya que el metabolismo de una gran variedad de contaminantes, incluyendo los hidrocarburos, produce especies reactivas de oxígeno (ROS) (Regoli *et al.*, 2002) lo que puede desencadenar daño oxidativo en las células hasta provocar apoptosis.

Un estudio realizado por Suarez-Rocha *et al.*, (2015) en el cual analizaron muestras de sedimento localizados en las cercanías de una refinería de petróleo en Brasil mostraron un potencial citotóxico, a través de la técnica de retención de rojo neutro, en la línea celular permanente de fibroblastos derivada del hígado de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) atribuyendo este daño a altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) principalmente fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno. Las características físicas y químicas de estos compuestos varían con el peso molecular. A mayor masa se incrementa su resistencia a la oxidación, reducción, vaporización e hidrosolubilidad, por lo que este tipo de compuestos presentará diferente comportamiento y distribución en el ambiente, y sus efectos en los sistemas biológicos también serán distintos. Los más ligeros producen toxicidad aguda significativa a los organismos acuáticos, mientras que los más pesados no producen efectos agudos, sin embargo, algunos de ellos se reconocen como carcinogénicos (Salazar, 2008) (Anexo 2).

Las concentraciones más altas de cada contaminante al final del bioensayo, mostraron el mismo TRRN denotando que el biodiésel causa de igual manera efectos adversos en la estructura de los lisosomas, convirtiéndola en una membrana frágil y más permeable (Lowe *et al.* 1992). En ambos casos el metabolismo de los contaminantes puede provocar la presencia ROS que al intentar estabilizarse reaccionan con los lípidos de la membrana convirtiéndolos en hidroperóxidos de lípidos lo que ocasiona una reacción en cadena que daña la función de la membrana mediante la alteración de la fluidez, volviéndola más permeable y activando las fosfolipasas, que forman ampollas en la membrana y su eventual

ruptura (Storey, 1996).

El resultado final del daño a la membrana lisosomal provocado por la exposición a diésel y biodiésel se observó claramente en el presente estudio en los tres días de medición donde se registraron TRRN menores a los tiempos del grupo control, lo que implica daños en las funciones esenciales de la célula por una pérdida de citoplasma y por consiguiente una reducción de su estado fisiológico lo que impacta la nutrición y la defensa celular (Moore *et al.*, 2008; Nolde *et al.*, 2006).

Analizando los resultados de las Figuras 19, 20 y 21 se hizo evidente que el efecto del diésel fue mayor en los organismos, debido a que se requirió una menor concentración para observar estrés oxidativo, sin embargo, el efecto de la exposición a biodiésel no debe ser considerado menos peligroso, ya que a lo largo del bioensayo, en la concentración más alta (B 50%), se observó el mismo comportamiento que en el diésel, demostrando esto que también es un contaminante citotóxico y que debe ser vigilado cuando se presente en el ambiente.

Consumo de Oxígeno

El oxígeno disuelto (OD), es un factor ambiental regulador del metabolismo de los crustáceos (Martinez *et al.*, 1998; Rosas *et al.*, 1999) El papel regulador del OD está dado por su intervención directamente en la capacidad de los organismos de obtener energía a partir de la respiración (Rosas, 2004).

En la Fig. 23 se aprecia que la tasa de respiración en las concentraciones B 12.5 % al día 7 y la concentración B 50% al día 14, presentaron niveles de consumo de oxígeno más bajos que en la línea control (60% menos). Sokolova *et al.*, (2012) mencionan a través de una clasificación estrés basada en la energía, que el alcance general de los valores de un factor ambiental experimentado por un organismo se divide en varios rangos, uno de ellos es la situación de estrés extrema en la cual el organismo reacciona suspendiendo temporalmente su actividad metabólica a través de la disminución del consumo de oxígeno para la formación

de energía ATP, mientras se mantiene el equilibrio de energía a través de mecanismos aeróbicos hasta alcanzar un punto crítico para la anaerobiosis. De igual manera Alcaraz *et al.*, (1999) atribuyen esta disminución en la tasa de consumo de oxígeno a la acumulación de nitrito, que posteriormente induce fallos en el transporte y el suministro de oxígeno a tejidos, incluso bajo la exposición a corto plazo.

En el resto de las concentraciones durante los tres días de medición, se manifestaron consumos de oxígenos mayores al control. Vanegas (1996) atribuye este tipo de comportamiento a que el incremento en el metabolismo respiratorio frecuentemente se relaciona con una mayor demanda energética debido a alteraciones en el equilibrio iónico y osmótico de los organismos por estresores ambientales.

Algunos investigadores agregan que el trabajo osmótico de los invertebrados acuáticos puede ser mínimo cuando el medio externo y los fluidos corporales están en equilibrio, sin embargo, cuando existe un estrés ambiental, los organismos presentan un aumento en el consumo de oxígeno ya que necesitan disponer de más energía para mantener el equilibrio ante el gradiente osmótico (Díaz y Bückle, 1993;Díaz *et al.*, 1993).

Al día 21 de evaluación, todos los organismos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel presentaron una elevada tasa de consumo de oxígeno con respecto al control, datos similares cita Vanegas (1996), donde juveniles de *P. setiferus* se expusieron durante 21 días a 0.05 y 0.14 mg de Cd/L y a 0.16 y 0.26 mg Zn/L, en los cuales se observó un aumento significativo en la tasa respiratoria, lo que sugiere la participación de mecanismos de compensación en los procesos respiratorios que demandan un significativo gasto energético, tales como el aumento en la ventilación branquial y en la frecuencia cardiaca de los crustáceos.

El biodiésel es un monoalquil ester de ácidos grasos Castro *et al.*, (2012), que según Sushchik (2013), comprenden estructuras químicas muy diversas y poseen una notable resistencia a la

degradación. En este sentido, el aumento en el metabolismo respiratorio de los camarones expuestos a biodiésel, también se puede relacionar con el costo energético invertido para la eliminación de este compuesto a través de la exuvia, ya que al día 21 de exposición los organismos evaluados presentaron manchas de combustible en el telson, apéndice y en los segundos periópodos.

En comparación con el biodiésel, la exposición de crustáceos a sedimentos contaminados con diésel presentó la mayor tasa de consumo de oxígeno en la concentración D 12.5% al día 14 de medición. Estos resultados no coincidieron con Tendengren *et al.*, (1988), quienes mencionan que la exposición a diésel generalmente resulta en un decremento del consumo de oxígeno en los crustáceos anfípodos *Gammarus*. Esta discrepancia se le puede atribuir a la biodisponibilidad del contaminante en los organismos, ya que como se ha mencionado anteriormente, suponemos que debido a los enjuagues realizados en el proceso de contaminación de sedimentos, sólo se alojó en ellos la fracción pesada del diésel que incluye compuestos como: antraceno, fenantreno, benzo(a)antraceno y criseno. Dichos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) tienden a acumularse en los sedimentos por su afinidad hidrófoba, ocasionando una continua exposición en los organismos bentónicos los cuales pueden presentar daños crónicos y carcinogénicos Salazar (2008).

La importancia que tiene este tipo de estudios en los organismos acuáticos de interés comercial como el realizado con los juveniles del langostino, radica en que este es un índice cuantitativo que permite describir, explicar y predecir la condición o estado fisiológico de organismos (Díaz *et al.*, 1992).

Excreción nitrogenada

Varios factores del medio ambiente, así como los factores bióticos afectan la excreción de nitrógeno amoniacal. En crustáceos decápodos, el nitrógeno es principalmente excretado como amonio (60-70%), con pequeñas cantidades de aminoácidos, urea y ácido úrico. El

amonio se forma principalmente del catabolismo de aminoácidos; la mayoría del NH_3 producido aparece en el hepatopáncreas y se excreta a través del epitelio branquial en crustáceos. Se ha reportado que existen alteraciones en la excreción de amonio en *Macrobrachium rosenbergii* por cambios en factores como temperatura, salinidad y pH (Kaushik, 2000; Chen y Kou, 1996). La excreción nitrogenada permite en valores normales mantener el pH en condiciones óptimas (Barrera, 2008). En el caso de *M. rosenbergii* este puede ser criado en óptimas condiciones en un intervalo de temperatura de 14 a 35°C y un pH de 7.0 - 8.5 (Chen y Kou, 1996).

En los crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel, la tasa de excreción nitrogenada mostró cierta variabilidad con respecto al tiempo de exposición, sin embargo, la mayoría de las concentraciones superaron los datos de excreción de los organismos control principalmente la concentración más alta de biodiésel (B 50%), en la cual el sustrato energético utilizado por los organismos denotó un catabolismo estricto de proteínas. Este resultado lo justifica Martins *et al.*, (2016) mencionando que el amoniaco es el principal producto generado por el catabolismo proteico en la mayoría de los organismos acuáticos, y también se origina a partir de la descomposición de los alimentos no ingeridos y otros desechos orgánicos, por lo que también podemos atribuir este aumento de la excreción nitrogenada como una respuesta de estrés ante el proceso de degradación del biodiésel en el medio acuoso.

El aumento en la tasa de excreción de amonio observado en esta investigación se relacionó de igual manera con lo justificado por Díaz y Bückle (1993) en el sentido de que un incremento en la actividad de la bomba de intercambio iónico $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ en medios diluidos o concentrados puede contribuir al mantenimiento de niveles altos de Na^+ en la hemolinfa de los crustáceos.

Durante la exposición a sedimentos contaminados con diésel, el comportamiento de la excreción nitrogenada fue similar al biodiésel en el día 14 de medición presentando valores

de excreción superiores al control. Sokolova *et al.* (2012), explican que la exposición a bajos y moderados grados de estrés causan una aceleración metabólica, lo que permite compensar los gastos de energía adicionales para una mayor actividad fisiológica y de reparación de daño. En general, los procesos compensatorios, aunque son esenciales para sobrevivir al estrés, son energéticamente costosos y pueden desviar el flujo de energía y el poder metabólico de las funciones relacionadas con el ejercicio, como la reproducción y el crecimiento.

No obstante, al final de la prueba los valores siguieron una tendencia descendiente ligeramente menor que el grupo control, esta depresión en el metabolismo de los aminoácidos se estableció para garantizar el equilibrio de energía, lo que representa una compensación que será limitada en el tiempo, ya que no permite la supervivencia de la población a largo plazo debido a que estos mecanismos implican un gasto de energía que puede ser necesaria para invertir en el crecimiento y la reproducción (Sokolova, 2012).

Aunque el metabolismo nitrogenado ha sido poco considerado en los estudios fisiológicos-nutricionales (Rosas *et al.*, 2000), es evidente que los datos que se reportan pueden coadyuvar a una mejor comprensión del estado fisiológico del organismo ante una situación de estrés y sus requerimientos nutricionales en una especie de interés comercial como son los langostinos.

Relación O:N

En los organismos amoniotélicos como son los crustáceos, la integración de la tasa respiratoria y la excreción nitrogenada en la relación O:N es una medida de integración simple, empleada para describir la naturaleza del sustrato metabolizado como fuente energética (Vanegas, 1996). Este parámetro suele relacionarse además con condiciones de estrés en organismos, debido a la influencia de los factores ambientales (incluido los contaminantes) (Barrera, 2006). Valores teóricos en la relación O:N entre 3 y 16 se asocian

al catabolismo estricto de proteínas, entre 17 y 50 al catabolismo de proteínas y lípidos, valores entre 50 y 60 reflejan la oxidación equilibrada de lípidos y proteínas, y valores mayores de 60, se asocian al catabolismo de lípidos y carbohidratos (Barrera, 2006: Diaz *et al.*, 2010: Mayzaud y Connover, 1988).

Los organismos del grupo control presentaron valores de O:N entre 35 y 44 durante los tres días de medición, los cuales, aunque entran en el rango del catabolismo de proteínas y lípidos los datos se aproximan a 50, lo que en su desarrollo adulto, se pudieran asociar a un catabolismo equilibrado de proteínas y lípidos.

Curiosamente al día 14, la mayoría de los tratamientos, con excepción de D 25%, tuvieron un valor promedio de O:N entre 41 y 49, indicando un consumo del sustrato energético de lípidos y proteínas, valores que podrían ser considerados normales, pero que fueron generados del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada alterada simultáneamente como consecuencia de la exposición, lo cual a su vez, debe asociarse con la elevada tasa de excreción nitrogenada que presentaron los organismos (0.029 - 0.081 mg/h*gPS) durante todo el bioensayo. Valdez *et al.*, (2008) explican que el aumento en la tasa de excreción nitrogenada en peneidos puede ser explicado por un aumento en el catabolismo de los aminoácidos involucrados en la regulación de la presión osmótica de la hemolinfa.

A lo largo de toda la prueba sólo B 12.5% en el día 7, D 25% en el día 14 y las concentraciones de diésel en el día 21, presentaron valores de O:N que se asociaron al catabolismo de carbohidratos y lípidos. Estos datos coinciden con Rosas *et al.*, (2000) quienes mencionan que dichos compuestos tienen poca participación en el metabolismo energético de los crustáceos, ya que estos organismos no cuentan con muchos sitios en los cuales puedan almacenar las sustancias de reserva, por tal motivo, los carbohidratos son procesados para la formación de glucógeno desde el cual la glucosa es utilizada para la formación de aminoácidos como fuente de energía metabólica.

En el presente estudio la mayoría de los tratamientos evaluados obtuvieron una relación O:N asociable al catabolismo de proteínas y lípidos. Díaz *et al.*, (2010) comentan que en los organismos marinos, los lípidos son el mayor recurso energético durante el ayuno, limitándose al catabolismo de proteínas cuando las reservas de lípidos son limitadas.

Únicamente en las concentraciones B 12.5% al día 14 y B 50% al día 21 mostraron una excreción exclusivamente proteica, relacionado este resultado con la depleción en la tasa respiratoria y al aumento de la tasa de excreción al 300% y 350% respectivamente con respecto a la línea control. Este resultado coincide con lo publicado por Tendengren *et al.*, (1988) al observar en los anfípodos del crustáceo *Gramarus*, una reducción en la razón O:N por la exposición de la fracción soluble de diésel (10 mg/l) dicha reducción fue explicada por una creciente dependencia al catabolismo de proteínas con el fin de cubrir las necesidades energéticas inmediatas del organismo.

La variabilidad en los resultados obtenidos en el presente estudio, sugiere que en juveniles de langostinos, la razón atómica O:N no es un índice adecuado que refleje la magnitud del efecto tóxico de la exposición a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel por lo que se propone en investigaciones futuras, considerar otros biomarcadores conocidos para evaluar las respuestas a los componentes tóxicos del diésel y biodiésel como los biomarcadores enzimáticos: citocromo P450, las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidación lipídica (TBARS).

Nado contra corriente

Además de demostrar el daño citotóxico que causa tanto el diésel como el biodiésel, éste trabajo demostró que se presentan efectos nocivos en la locomoción de los organismos. En la prueba realizada con sedimentos contaminados utilizando biodiésel, se observó claramente en las gráficas presentadas (Fig. 31, 32 y 33), que en los tres días de medición existió una tendencia en la disminución del tiempo de nado de los crustáceos conforme aumentó la

concentración y los días de exposición. Datos similares se obtuvieron en peces bentónicos expuestos a las cenizas de carbón acumuladas en los sedimentos, que mostraron reducciones significativas en el rendimiento de la natación, con un valor medio de casi el 50% menor en los peces expuestos a cenizas, demostrando que la toxicidad subletal se manifestaba claramente en la velocidad de los organismos. Lo que sugiere que el deterioro en el rendimiento de dichos animales puede ser un indicador sensible y más fácil de medir que los biomarcadores de toxicidad más tradicionales (Hopkings *et al.*, 2003).

Amin y Comoglio (2002) agregan que la eventual presencia de hidrocarburos en el medio marino además de ser letal, aumenta la sensibilidad de las poblaciones al afectar procesos metabólicos y motrices que convierten a las especies en potenciales presas. Esta información coincide con los resultados obtenidos en los langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel en los que, al igual que la exposición a biodiésel, el tiempo de resistencia disminuyó conforme aumentó la concentración del diésel y el tiempo de exposición. Tendengren, menciona que el crustáceo *Gammarus* al ser expuesto a la fracción soluble del diésel (10 mg/l) durante 6 h presentó un efecto de narcosis decreciendo su actividad locomotora. Amin y Comoglio en el 2002, reportaron fallas en la natación de larvas del crustáceo centolla patagónica (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*) expuestas a concentraciones superiores al 13% de la fracción soluble de diésel en las primeras 24 horas. Car y Rice (1984) realizaron un estudio con el fin de evaluar la toxicidad de los lodos de perforación en Alaska utilizando larvas de cangrejo real (*Paralithodes camtschatica*), cangrejo Dungeness, camarón coonstripe (*Pandalus hypsinotus*) y camarón kelp (*Eualus suckleyi*), en los cuales observó una reacción lenta en la movilidad de los organismos al ser expuestos en las primeras 96 h. Linden (1976) reportó un trastorno en el comportamiento de *Gammarus oceanicus* cuando fue expuesto a la fracción soluble de petróleo (5 a 20 mg/l). El primer síntoma fue una natación continua y agitada y más tarde detuvieron completamente su actividad natatoria y comenzaron a arrastrarse en la superficie.

Sin embargo en la concentración más baja (D 3%) se pudo observar que en las primeras dos mediciones no existieron diferencias significativas con respecto al control, sólo al final de la prueba, el tiempo de resistencia en la natación llegó a una disminución de 10 minutos en comparación con el control que fue de 29 minutos. Esto indica que en esta concentración la dosis no fue la suficiente como para mostrar efectos nocivos en la locomoción de los organismos.

Al día 21 en la concentración D 25% se presentó la mortalidad de todo el lote expuesto impidiendo la realización de la prueba, en el resto de las concentraciones el tiempo de resistencia fue el más bajo registrado en todo el bioensayo, oscilando entre 10 y 8 minutos. Datos similares obtuvo Brodersen (1987) al día 21 de exposición a la fracción soluble de petróleo crudo (1-3 ppm) en larvas de “camarón espalda rota” (*Eualus suckleyi*) las cuales dejaron de nadar dentro del intervalo de 20 minutos.

Como es discutido por Brodersen (1987) y Tendengre *et al.* (1988), la primera manifestación a bajas concentraciones o al inicio de la exposición de la fracción soluble de hidrocarburos suele manifestarse en las larvas como la finalización de la actividad natatoria, con el objetivo de lograr un “retraso” en la muerte de los organismos. La sensibilidad podría ser comparada con base en la morbilidad de los organismos más que en la mortalidad (Amin y Comoglio, 2002). Otros efectos asociados a la exposición a hidrocarburos en larvas de diversos crustáceos son, el retraso en el desarrollo larval, y la inhibición en el crecimiento y la muda (Weis *et al.*, 1992), asociando estas respuestas a la interferencia de este tipo de compuestos sobre las vías metabólicas normales de los ácidos grasos y a disrupciones energéticas en general (Amin y Comoglio, 2002).

Como menciona Sokolova (2012), los organismos sometidos a bajos niveles de estrés ambiental emplean numerosos mecanismos para reducir el impacto negativo. A nivel

organismo, dichos mecanismos de compensación pueden involucrar un comportamiento de escape. En general, aunque los procesos de compensación son esenciales para la sobrevivencia, estos son energéticamente costosos y pueden comprometer funciones biológicas como la reproducción y el crecimiento. Por otro lado, cuando se presentan factores estresantes extremos, el organismo suele buscar refugio sin la necesidad de invertir un esfuerzo extra en la actividad locomotora, volviéndolo más susceptible a ser depredado y comprometiendo la supervivencia de la especie.

Dichos resultados obtenidos a través de los diferentes biomarcadores evaluados nos pueden indicar que tanto el diésel como el biodiésel provocan daños a nivel celular y de organismo, en los juveniles de langostinos *Macrobrachium sp.*, más evidentes en el TRRN y el comportamiento de nado contra corriente, y en menor medida en las respuestas fisiológicas relacionadas con el estrés metabólico.

Actualmente en México existen cuatro empresas dedicadas a la recolección de aceite de cocina usado (ARUC) para la producción de biodiésel, una de ellas es SOLBEN, la empresa que proveyó el biodiésel para la realización de este trabajo, dedicada a recolectar ARUC, producción de biodiésel y venta de platas productoras El aumento de la producción y el consumo del biocombustible debería de alentar a realizar más investigaciones ambientales para evaluar el peligro potencial, así como su destino en el medio ambiente. Y a nivel comercial se debería de considerar este producto como otro combustible que puede llegar al medio ambiente a través de liberaciones accidentales y pérdidas de rutina asociadas con su uso que no está exento de generar daño en la biota.

Capítulo 6

Conclusiones

- Conforme aumentó el tiempo de exposición y las concentraciones en los sedimentos contaminados con diésel y biodiésel, se presentó una reducción en el TRRN en los lisosomas de *Macrobrachium sp.* durante los 21 días de exposición. La permeabilidad de los lisosomas fue inversamente proporcional a la concentración de los tratamientos.
- La relación O:N no demostró un cambio notable en el estrés metabólico, debido a que las alteraciones observadas en el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada tuvieron valores compensatorios ya unificadas. Cada una de estas respuestas por separado si mostró alteraciones, sin embargo, la elevada variabilidad de las respuestas impidió demostrar diferencias significativas respecto a los controles por la exposición a diésel y biodiésel.
- El presente estudio aporta información sobre la resistencia locomotora de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel por 21 días, la cual se vio comprometida al aumentar la concentración de los combustibles provocando un efecto de narcosis en los crustáceos, causando el aletargamiento en los ejemplares y convirtiéndolos en potenciales presas vulnerables en el ecosistema.
- La estabilidad lisosomal y nado contra corriente resultaron menos alterados por el biodiésel, ya que se necesitó el doble de la concentración para producir el mismo efecto que el diésel.
- A nivel temporal, el biodiésel presentó un comportamiento ecotoxicológico similar en la recta final del bioensayo, ya que produjeron efectos de la misma magnitud en ambos combustibles, tanto en el biomarcador celular, como en el comportamiento de locomoción, en las diferentes concentraciones evaluadas.
- El uso del biodiésel constituye una alternativa importante para cubrir la demanda energética a nivel nacional y mundial, es una propuesta que vino a sustituir

paulatinamente al combustible diésel, asegurando no comprometer el estado de salud de los ecosistemas, sin embargo, el presente estudio permitió demostrar que este también genera efectos citotóxicos, daños fisiológicos y de locomoción a los organismos acuáticos.

- En el Golfo de México ocurren actividades humanas que ejercen una fuerte presión sobre ambientes frágiles y de gran diversidad biológica como lo son las lagunas costeras, por lo tanto, la extracción y transporte de hidrocarburos en conjunto generan una mayor presión en estos ecosistemas.
- Aunque existe cierto riesgo en extrapolar los resultados que se obtuvieron directamente a las condiciones ambientales, estos pueden orientar sobre algunos factores estresantes, por lo que esta investigación es relevante para interpretar los posibles efectos de estos combustibles en el ambiente con el fin de evitar desastres naturales, ya que los resultados son legítimos y significativos.

Recomendaciones y/o perspectivas

- Para ayudar a predecir el potencial tóxico de los contaminantes en los ecosistemas, se recomienda el uso del biomarcador de estabilidad lisosomal ya que permite vincular los efectos de la exposición de estos combustibles a nivel bioquímico y fisiológico.
- Los tiempos de residencia de los hidrocarburos fósiles en sedimentos pueden ser de 3 a 10 años, según la velocidad de degradación de los compuestos que los constituyen, por esta razón se necesitan realizar estudios ecotoxicológicos a largo plazo que permitan determinar los efectos de los contaminantes depositados en el sedimento.

- Se recomienda incluir en investigaciones futuras evaluaciones como el balance energético para proporcionar información que permitiera cuantificar, describir y explicar a detalle el estado fisiológico de los crustáceos expuestos a éstos combustibles.
- Es importante ampliar los estudios de los efectos causados por la exposición a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en diversos organismos acuáticos con el fin de identificar especies vulnerables en el ecosistema.

Referencias

Ackland M., Zou L., Freestone D., Van de Waasenburg S. y Michalczyk A. (2007). Diesel Exhaust particulate matter induces multinucleate cells and zinc transporter-dependent apoptosis in human airway cells. *Immunology and Cell Biology* 85: 617-622.

Alayo, M., Iannacone, J. (2002). Ensayos toxicológicos con petróleo crudo, diésel 2 y diésel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera Mongononta). *Gayana (Concepción)*, 66(1), 45-58.

Alborán, D M D E Y. (2012). Estrategia marina demarcación marina del estrecho y Alborán parte IV. Descriptores del buen estado ambiental descriptor 8: contaminantes y sus efectos evaluación inicial y buen estado ambiental. Madrid.

Alcaraz G., Espinoza V., Vanegas C. (1999). Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarve under different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 30: 98-106.

Álvarez F., Villalobos J., Hendrickx M., Escobar E., Rodríguez G., Campos E. (2014). Biodiversidad de crustáceos decápodos (Crustacea: Decapoda) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S208-S219.

Álvarez F., Villalobos J., Rojas Y. Robles R. (1999). Lista y comentarios sobre los crustáceos decápodos de Veracruz México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 70(1): 1-27.

Amin O. y Comoglio L. (2002). Toxicidad del petróleo diésel en el primer estadio larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37 (2): 139-144.

Arana F. (1974). Experiencias sobre el cultivo de langostino (*Macrobrachium americanum* Bate) en el Noroeste de México (Experiments on culture of *Macrobrachium americanum*

Bate in northeastern México). In H. K. Dupree, K. S. Prince, Jr. W. N. Shaw, and K. S. Danberg, editors. Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina, volumen 1. Documentos de investigación. FAO, Rome. 139-147.

Arencibia D., Rosario L. y Curveco D. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Toxicología experimental, 40-52.

Barrera, G. (2006). Toxicidad de cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la laguna de Mandinga, Veracruz. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Bhuiya M., Rasul M., Khan M., Ashwath N., Azad A. y Hazrat M. (2015). Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel – Part 2: Properties, performance and emission characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 55: 1129-1146.

Botello A. (1996). Fuentes, transformación y caracterización geoquímica del petróleo en el ambiente marino, p. 211-223. In: Botello A., Rojas J., Benítez J. y Zárata D. (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.

Botello A. (2005). Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.

Brodersen C. (1987). Rapid narcosis and delayed mortality in larvae of King Crabs and Kelp Shrimp exposed to the water-soluble fraction of crude oil. Marine Environmental Research 22: 233-239.

Brown R., Galloway T., Lowe D., Browne M., Dissanayake A. Jones M. y Depledge M. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquatic Toxicology. 66: 267-278.

Carballo O., Arencibia G., y Concepción J. Isla M. (2010). Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos." C. Habana, Cuba: Centro de Investigaciones Pesqueras.

Carls M. y Rice S. (1983). Toxic contribution of specific drilling mud components to larval shrimp and crabs. Marine Environmental Research 12: 45-62.

Castro C., Beltrán L. y Ortiz J. (2012). Producción de biodiésel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética? Ra Ximhai, Universidad Autónoma Indígena de México. 8(3): 93-100.

Castro P., Coello J., y Castillo L. (2007). Opciones para la producción y uso de Biodiésel en el Perú. Soluciones Prácticas, ITDG. Lima, Perú.

Cavalcante D., Silva N., Marcarini Juliana., Mantovani M., Marin M. y Martinez C. (2014). Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. Toxicology in Vitro 28: 1117-1125.

- Chen J. y Kou C. (1996). Nitrogenous excretion in *Macrobrachium rosenbergii* at different pH levels. *Aquaculture* 155-164.
- Ciria, J. (2007). Propiedades y características de combustibles diésel y biodiesel. *Virtual Pro*.
- Díaz E., Galicia F., Bückle L., Báez M. y Perera E. (2010). Respiración, excreción y relación oxígeno: nitrógeno de filosomas de la langosta roja *Panulirus interruptus*. *Hidrobiológica*, 20 (2): 135-146.
- Díaz F. y Bückle L. (1993) Efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno y la excreción de amonio de *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Palaemonidae). *Revista de Biología Tropical* 41 (2), 239-243.
- Díaz F., Bückle L. y Reichelt A. (1993). Osmorregulación y campo de crecimiento de *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Palaemonidae). *Revista de Biología Tropical* 41 (3): 585-590.
- Díaz F., Juárez G., Pérez E. y Bückle F. (1992). Balance energético de postlarvas y juveniles del langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Palaemonidae). *Ciencias Marinas* 18 (2): 19-32.
- Espina S. y Vanegas C. (1996). Ecofisiología y Contaminación, p. 45-68. *In*: Botello A., Rojas J., Benítez J. y Zárate D. (Eds.) Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX serie científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.
- FAO. (1998). Manual para la cría de camarones peneidos. Brasil: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAO. (2008). Oferta y demanda de energía: Tendencias y perspectivas. Bosques y energía: cuestiones clave. Estudio FAO Montes.
- García M., Villalobos J., Álvarez F., y Bastida R. (2012). Estado del conocimiento de los crustáceos de México. *Ciencia y Mar*, 16(46), 43-62.
- Geffard O., His E., Budzinski H., Chiffolleau J., Coynel A y Etcheber H. (2004). Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environmental Pollution*. 129: 457-465.
- González F., Jiménez I., Rodríguez M., Restrepo S. y Gómez J. (2008). Biocombustibles de segunda generación y Biodiésel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes. *Revista de ingeniería*. Universidad de los Andes Bogotá, Colombia 28: 70-82.
- Gregg J., Fleeger J. y Carman K. (1997). Effects of suspended, diesel-contaminated sediment on feeding rate in the darter goby, *Gobionellus boleosoma* (Teleostei: Gobiidae). *Marine pollution bulletin*, 34(4), 269-275.
- Hernández L. (2007). Revisión sistemática del género *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) de la península de Baja California, México. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz, Baja California Sur. México.

Hernández P. (2008). Efecto de la temperatura en el crecimiento y sobrevivencia del langostino *Macrobrachium occidentale* y del acocil *Cherax quadricarinatus*. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.

Hopkings W. Snodgrass J. Staub B., Jackson B. y Congdon J. (2003). Altered swimming performance of a benthic fish (*Erimyzon sucetta*) exposed to contaminated sediments. *Achieves of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 383-389.

INECC-CCA. (2010). Manual de métodos de muestreo y preservación de muestras de las sustancias prioritarias para las matrices prioritarias del PRONAME. México, 29-35.

INEGI (2006). El petróleo. <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/petroleo/dondeesta.aspx?tema=E>. Fecha de consulta 27-06-2016.

Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). (2014). Informe técnico. Factores de emisión para los diferentes tipos de combustibles fósiles que se consumen en México. Primer Informe Parcial. Dirección de servicios de Ingeniería 14-15.

Izagirre U., Garmendia L., Soto M., Etxebarria N. y Marigómez I. (2014). Health status assessment through an integrative biomarker approach in mussels of different ages with a different history of exposure to the Prestige oil spill. *Science of the Total Environment*, 493: 65-78.

Kaushik, S. (2000). Factores que afectan la excreción nitrogenada en teleósteos y crustáceos. *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 15-18.

Khan N., Warith M. y Luck G. (2012). A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. *Journal of the Air y Waste Management Association*, 57:3, 286-296.

Kulkarni M., Dalai A. (2006). Waste cooking oil an economical source for biodiesel: a review. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45 (9), 2901–2913.

Lei Q., Wang Z. y Zhang J. (2016). Influence of waste cooking oil biodiesel on oxidation reactivity and nanostructure of particulate matter from diesel engine. *Fuel*. 181: 389-395.

Leiva M. y Rodríguez N. (2015). El diésel. PEMEX, Refinación. <http://www.ref.pemex.com/octanaje/24DIESEL.htm>. Fecha de consulta 20/03/2015.

Linden O. (1976). Effects of oil on amphipod *Grammarus oceanicus*. *Environmental pollution* 10: 239-250.

Lowe D., Soverchia, C., y Moore M. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 33: 105–112.

Lozada I., Islas. J. y Grande G. (2010). Environmental and economic feasibility of palm oil biodiesel in the Mexican transportation sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*

14: 486-492.

Martins F., Fomeck S., Caramelo C., Arruda C y Cupertino E. (2016). Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Helle, 1862. *Aquaculture* 453: 104-109.

Mayzaud P. y Conover R. (1988). O:N atomic ratio as a tool to describe zooplakton metabolism. *Marine Ecology Progress Series* 45: 289-302.

Mendoza D., Girón M., Romero C., Rojas A., Barrón B., Medina I. y Robledo M. (2014). Oxidative stress in oysters (*Crassostrea corteziensis*) exposed to naphthalene. *Invertebrate Survival Journal* 11: 143-148.

Moore M. (1990). Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemical Journal* 22: 187-191.

Moore M., Kohler A., Lowe D. y Viarengo A. (2008). Lysosomes and Autophagy in Aquatic Animals. In Daniel J. Klionsky, editor: *Methods in Enzymology*, Vol. 451. Burlington: Academic Press. 581-620.

Morales y Meruane (2012). Indicadores de condición larvaria aplicados al camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782), en condiciones de cultivo controlado. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40: 730-742.

Moreau R., Scott K. y Haas M. (2008). The identification and Quantification of Steryl Glucosides in Precipitates from Commercial Biodiesel. *J. Am Oil Chemistry Society* 85: 761-770.

Nogueira L. Madeira A., Da Silva D., Ferrizi V., Moreira A. y De Almeida E. (2011). Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere* 85: 97-105.

Nogueira L., Da Silva D., Yukio T., Correa J., Arantes A. y De Almeida E. (2013). Biochemical responses in armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere* 93: 311-319.

Nolde N., Drobne D., Valant J., Padovan I., y Horvat M. (2006). Lysosomal membrane stability in laboratory and field-exposed terrestrial isopods *porcellio scaber* (*Isopoda, crustacea*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 25 No. 8 pp. 2114-2122.

Pasquevich M., Dreon M., Gutierrez J., Vázquez C. y Heras H. (2013). Effect of crude oil petroleum hydrocarbons on protein expression of the prawn *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 157: 390-396.

Plaut I. (2001). Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 131: 41-50.

Ramírez J. (2012). Evaluación del uso de biodiésel obtenido a partir de aceite de cocina usado en un motor diésel. *El hombre y la máquina*. 40: 102-110.

Ramírez P., Guzmán M., Barrera G. y Guzmán X. (2012). La ecotoxicología, herramienta para la conservación y la óptima producción de organismos acuáticos. In: Acuicultura en México: Impacto en producción, manejo y conservación. Editorial Académica Española. 612.

Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S., Winston G. (2002). Oxidative stress in ecotoxicology; from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54: 419-423.

REMBIO. Red Mexicana de Bioenergía A.C. (<http://rembio.org.mx/>) Fecha de consulta 25/11/2015.

REPSOL (2015). https://www.repsol.com/es_es/corporacion/conocer-repsol/contexto-energetico/matriz-energetica-mundial/default.aspx. Fecha de consulta 08/05/2016.

Retana J. (2008). Transferencia tecnológica sobre las ventajas y desventajas de la utilización del biodiesel. Instituto Nacional de Aprendizaje, San José, Costa Rica.

Rosas C., Cooper E., Pascual C., Brito., Gelabert R., Moreno T. y Sánchez A. (2004). La condición reproductiva del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Crustacea; Penaeidae): Evidencias de deterioro ambiental en el sur del Golfo de México. Caso et al., Diagnóstico Ambiental del Golfo de México. INE-SEMARNAT.

Rosas C., Gaxiola G., y Sánchez A. (2000). El metabolismo del nitrógeno y su relación con los requerimientos nutricionales de los camarones Peneidos. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre, 15-18.

Rosas C., Martínez E., Gaxiola G., Brito R., Sánchez A. y Soto L. (1999) The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 234: 41- 57.

Salazar L. (2008) Evaluación de la toxicidad de hidrocarburos poliaromáticos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.

Sánchez I. y Huertas K. (2012). Obtención y caracterización de biodiésel a partir de aceite de semillas de *Ricinus communis*. (Higuerilla) modificadas genéticamente y cultivadas en el eje cafetero. Tesis de licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.

SENER 2013. Secretaría de Energía. Prospectiva de Petróleo Crudo y Petrolíferos 2013-2027.

Silva C., Oliveira C., Gravato C. y Almeida J. (2013). Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo (a) pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. *Marine Environmental Research* 90: 39-46.

Sokolova I., Frederich M., Bagwe R., Lanning G. y Sukhotin A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*. 79: 1-15.

Storey K. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1715-1733.

Sushchik N., Kuchkina A. Gladyshev M. (2013). Fatty acid content and composition of sediments from Siberian eutrophic water bodies: Implications for biodiesel production. *Water research*, 47: 3192-3200.

Svendsen, C., Spurgeon D., Hankard P. y Weeks J. (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(1): 20–29.

Tang H., Salley S. y Simon K. (2008). Fuel properties and precipitate formation at low temperature in soy-, cottonseed-, and poultry fat-based biodiesel blends. *Fuel*. 87: 3006-3017.

Valdez R. (2009). Biocombustibles, perspectivas, riesgos y oportunidades. *Perspectivas*. 23: 11-25. Cochabamba, Bolivia.

Vanegas C. (1996). Efectos subletales del cadmio y zinc en *Penaeus setiferus*. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Yanamala N., Hatfield M., Farcas M., Schwegler-Berry D., Hummer J., Shurin M., Birchd, M., Gutkin D., Kisin E, Kagan V. Bugarski A. y Shvedova, A.(2013). Biodiesel versus diesel exposure: Enhanced pulmonary inflammation, oxidative stress, and differential morphological changes in the mouse lung. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272. 373-383.

Zapata E., Rojas L., Sánchez G. y Barreto M. (2012). Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias marinas*, 38(3), 517-528.

Zhao Ch., Li X., Luo S. y Chang Y. (2011). Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture. *African Journal of Biotechnology*. 10 (64):13698-13973.

Anexos

Anexo 1. Características generales y fisicoquímicas del bioensayo preliminar

El bioensayo preliminar se realizó con el fin de determinar el porcentaje de las concentraciones de los contaminantes, la duración del bioensayo y la estandarización de los biomarcadores establecidos para el cumplimiento de los objetivos. Los parámetros fisicoquímicos fueron establecidos con base a Puente (2009).

Tipo de bioensayo	Subcrónico
Tiempo de exposición	14 días
Días de evaluación	0,7,14
Biomarcadores	Estabilidad lisosomal, estrés metabólico y resistencia al nado contra corriente
Temperatura del agua	24 ± 1 °C
pH	8.79
Fotoperiodo	12 h. luz, 12 h. oscuridad
Aireación	Continua
Salinidad	1 ups
Oxígeno disuelto	4 a 5 mg O ₂ /L
Tamaño del recipiente de vidrio	40 L
Edad de los organismos	Adultos
Gramos de sedimento por envase	500g
Nº de organismos por envase	10
Concentraciones en sedimento	Control Diésel: 25%, 50% y 75%
% Mortalidad	A los 14 días en la concentración del 75% hubo un 100% de mortalidad

Anexo 2. Características físicas y químicas de los HAP componentes del diésel comercial.

En la siguiente tabla se presentan los principales HAP del biodiésel y sus características fisicoquímicas.

Las características de presión de vapor determinan la presencia de HAP en el ambiente, los compuestos de 2-3 anillos son muy volátiles y los de 4 o más muestran volatilidad insignificante bajo condiciones ambientales (Salazar, 2008).

HAP	N° de anillos bencenicos	Peso molecular (daltones)	Solubilidad a 25°c (µg/l)	Presión de vapor a 25°c (mm hg)	log kow (log koc)
Naftaleno	2	128.8	12500 a 34000	1.8×10^{-2}	3.37
Acenafteno	2	154.2			4.07 (3.4)
Fluoreno	2 (3)	166.2	800		4.18 (3.86)
Antraceno	3	178.2	59	2.4×10^{-4}	4.5 (4.15)
Fenantreno	3	178.2	435	6.8×10^{-4}	4.46 (4.15)
Benzo(a)antraceno	4	228.3	11.0	1.1×10^{-7}	5.63 (5.3)
Criseno	4	228.3	1.9		5.63 (5.3)

Tomado de Salazar (2008)

Kow= Coeficiente de partición octanol-agua; Koc= Coeficiente de partición en carbono orgánico.

Anexo 3. Principales características del diésel y biodiésel

Combustible	Diésel	Biodiésel
Número de cetano	46	51
Densidad (g cm ⁻³ a 20°C)	0.83	0.88
Viscosidad cinemática (mm ² s ⁻¹ a 40 °C)	3.4	4.6
Contenido de oxígeno (% en peso)	0	10.8
Contenido de azufre (mg/Kg)	<350	<10
Punto de condensación (°C)	0	-1
Valor calorífico (MJ Kg ⁻¹)	44	39
Contenido de éster (% en peso)	-	>96.5
Monoglicérido (% en peso)	-	<0.8
Índice de acidez (mg KOH/g)	<0.084	<0.5
Contenido de metales (Na, K, Ga, Mg) (mg/kg)	-	<5

Tomado de Qu Lei, Wang Zhong y Zhang J. (2016). Influence of waste cooking oil biodiesel on oxidation reactivity and nanostructure of particulate matter from diesel engine. Fuel. 181. 389-395.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00023

Matrícula: 2141801070

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS CON DIESEL Y BIODIESEL UTILIZANDO CRUSTÁCEOS DE IMPORTANCIA ECOLÓGICA EN EL GOLFO DE MEXICO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 7 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. XOCHITL GUZMAN GARCIA
DRA. XENIA MENA ESPINO
M. EN C. LUCIA SALAZAR CORIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (ENERGIA Y MEDIO AMBIENTE)
DE: ALMA DIANA ARELLANO MONDRAGON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ALMA DIANA ARELLANO MONDRAGON
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA

DRA. XOCHITL GUZMAN GARCIA

VOCAL

DRA. XENIA MENA ESPINO

SECRETARIA

M. EN C. LUCIA SALAZAR CORIA