

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa Abierta al Tiempo

TOXICIDAD DEL CROMO Y CADMIO EN OSTIÓN
***Crassostrea virginica* (Gmelin) DE LA LAGUNA DE**
MANDINGA, VERACRUZ.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOÓGICAS
PRESENTA

Guadalupe Barrera Escorcía

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA: Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz

ASESORA: Dra. Cecilia Vanegas Pérez

ASESORA: Dra. Patricia Ramírez Romero

MÉXICO, D.F.

16 de marzo de 2006

La presente tesis se desarrolló en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, el cual pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Guadalupe Barrera Escorcía

El día 16 de marzo de 2006.

Jurado:

Directora: Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz _____

Asesora: Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez _____

Asesora: Dra. Patricia Ramírez Romero _____

Sinodal: Dra. Irma Rosas Pérez _____

Sinodal: Dr. Fernando Martínez Jerónimo _____

Este estudio se realizó en:

Laboratorio de Ecotoxicología, Depto. Hidrobiología, División de Ciencias
Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Laboratorio Fisiología Celular, Depto. Ciencias de la Salud, División de Ciencias
Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Depto. Ingeniería Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAM-
Iztapalapa.

Laboratorio de Ecofisiología, Facultad de Ciencias, UNAM

Laboratorios de Biología Molecular y Celular, Depto. Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Investigación fue financiada y apoyada por:

CONACYT

y la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

a través del proyecto: “TOXICIDAD DEL CROMO Y CADMIO EN OSTION

***Crassostrea virginica* (Gmelin) DE LA LAGUNA DE MANDINGA,**

VERACRUZ.” clave: 0636P-T,

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo académico de la directora, las asesoras e integrantes del jurado: **Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz, Dra. Cecilia Vanegas Pérez, Dra. Patricia Ramírez Romero, Dra. Irma Rosas Pérez y Dr. Fernando Martínez Jerónimo**, quienes contribuido con sus conocimientos y valiosos comentarios, además del tiempo que han dedicado a mi formación, así como el acceso a equipo y material necesario.

Diversas personas han colaborado en aspectos específicos de esta tesis, a través de su participación directa en el desarrollo de este proyecto y/o de su asesoría. Apoyo que debe reconocerse en todo lo que vale. Tal es el caso del **M. en C. Ricardo Rosas Cedillo**, del Área de Ingeniería Química de la División de CBI de la UAMI, quien llevó a cabo el análisis de los metales, dirigió el montaje de las técnicas de digestión de muestras y su adecuación para el material biológico.

Las **Dras. Patricia Olivares y Leticia Bucio Ortiz** del Lab. de Fisiología Celular de la División de CBS de la UAMI, asesoraron el montaje de las técnicas para la determinación de proteínas, metalotioneínas y lipoperoxidación, y facilitaron el acceso al laboratorio y al equipo para el análisis de muestras.

La **Dra. Rocío Ortiz Muñiz**, el **M. en B. E. Eduardo Casas Hernández** y el **M. en C. Humberto González Márquez**, facilitaron el acceso a los laboratorios de Biología Molecular y Biología Celular, para el procesamiento de muestras en sus instalaciones, así como el préstamo de equipo.

El **M.V.Z. Carlos Romero Ramírez** del Depto. Biología de la Reproducción, quien proporcionó en diversas ocasiones la sangre de cordero necesaria para la obtención del hemolisado que se usa en la técnica de metalotioneínas.

La **M. en C. Ángeles Aguilar Santamaría** y la **Biól. Leonor Rodríguez Cruz**, del Lab. Genética y el **M. en C. Héctor Barrera Escorcía**, dieron un valioso apoyo en la coasesoría a estudiantes vinculados con el proyecto.

Los **Dres. Alfonso Vázquez Botello** y la **Dra. Sonia Espina Aguilera** enriquecieron con valiosos comentarios, así como con su asesoría y sugerencias al trabajo.

Este proyecto fue un trabajo de equipo, que contó con la valiosa colaboración de la **M. en C. Irma Wong Chang**, del Lab. Contaminación Marina, ICMYL, UNAM. Ella ha participado a lo largo de muchos años en este proyecto con interés y motivación. Su responsabilidad y compromiso nos ha permitido avanzar en nuestra preparación y crecer juntas tanto como individuos y como profesionales, razón por la cual le estoy muy agradecida.

Otras cercanas participantes a quienes extiendo mi agradecimiento son: la **Hbiól. Patricia Namihira Santillán**, quien llevó la pesada carga del análisis de numerosas muestras y el control de fases experimentales durante varios años, la **M. en B.E. Xochitl Guzmán García**, quien se ha formado académicamente, mientras nos ha brindado su apoyo y colaboración con un interés genuino y comprometido, y su amistad.

La **Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa**, quien sembró la semilla de este proyecto, estuvo en comunicación constante, proporcionó las nuestras de agua de CENAM, que sirvieron como referencia para las lecturas en espectro de absorción atómica y enriqueció con sus observaciones y comentarios.

Varios estudiantes se vincularon al proyecto en diferentes fases colaborando con su trabajo e interés, desarrollando su Servicio Social, como los **Hidrobiólogos Amparo Celene del Razo Estrada, José Francisco González Benítez y Mario Durán Herrera** quienes terminaron su licenciatura dentro del proyecto.

Las **Hidrobiólogas Sonia González Rebollar, Fanny Apartado Rodríguez**, quienes participaron temporalmente en el procesamiento de muestras, así como los profesores del Depto. Hidrobiología, **M. en C. Antonio Márquez G., M. en B.E. Sergio Álvarez H., M. en C. Roberto Torres Orozco B.**, y a los coordinadores de laboratorios, quienes en diversas ocasiones facilitaron equipo y material.

Fue muy importante, el apoyo de la Coordinación de Recursos Materiales de la UAMI, cuyo responsable fue en su momento el **Ing. Juan Jiménez Morales** y el personal de la UAMI de los departamentos de: plomería, carpintería, herrería, electricidad y refrigeración. Todos ellos sustentaron las diferentes fases del proyecto con su trabajo: desde la construcción del soporte para el sistema de mantenimiento de los organismos, la fabricación de dispositivos específicos de experimentación, hasta la reparación de equipo e instalaciones, y su mantenimiento. A todos ellos, siempre dispuestos en situaciones regulares y de emergencia, mi agradecimiento y reconocimiento.

Finalmente, agradezco a mi tía **Teófila Barrera Sánchez**, por su apoyo en la elaboración del fichero de referencias, lo que aligeró mi labor, y por brindarme siempre su apoyo.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis queridos hijos, Aideé e Israel, quienes han enriquecido mi vida con su presencia y su visión del mundo.

A mi esposo Sergio, que siempre me ha brindado su apoyo, por su infinita paciencia, y por su comprensión.

A mi madre por todo su apoyo y por forjarme.

A mi padre que me dio las bases.

A mis hermanos Eduardo y Héctor, por escucharme, enseñarme y formarme como maestra y como persona.

A mi tía Fila, con quien siempre he contado.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xv
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	13
1.2 Objetivos	17
1.3 Hipótesis	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Área de estudio	20
2.2 Colecta de los organismos	21
2.3 Fase de mantenimiento de los organismos	23
- Alimentación de los organismos	25
2.4 Modelo conceptual	26
2.5 Fases experimentales	27
2.5.1 Fase letal	28
2.5.2 Fase subletal	30
2.5.2.1 Evaluación de respuestas bioquímicas	31
A. Metalotioneínas	33
B. Lipoperoxidación	33
2.5.2.2 Evaluación de respuestas fisiológicas	34
A. Respuestas aisladas	36
B. Integraciones simples	38
C. Integraciones complejas	40
2.6 Determinación de metales	41
2.7 Estadística aplicada al análisis de datos	42

3. RESULTADOS	44
3.1 Concentraciones de metales en la laguna de Mandinga	45
3.2 Mantenimiento de los organismos en el laboratorio	46
3.2.1 Parámetros fisicoquímicos	47
3.2.2 Morfometría	49
3.3 Fase experimental	51
3.3.1 Parámetros fisicoquímicos	51
3.3.2 Morfometría de los organismos	52
3.3.3 Concentración de los metales en agua	54
3.3.4 Fase de letalidad	55
A. Efectos del cromo	55
B. Efectos del cadmio	58
C. Comparación de las respuestas letales de ambos metales .	63
3.3.5 Fase de subletalidad	65
3.3.5.1 Evaluación de las respuestas bioquímicas	65
A. Morfometría	65
B. Determinación de metalotioneínas	66
C. Estrés oxidativo	69
D. Metalotioneínas, lipoperoxidación y acumulación de los metales	
.....	71
3.3.5.2 Respuestas fisiológicas	75
A. Mortalidad durante la prueba	75
B. Morfometría posterior al bioensayo.....	76
C. Consumo de oxígeno	78
D. Excreción nitrogenada	81
E. Consumo de alimento	82
F. Producción de heces	85
3.3.5.3 Integraciones simples	86
A. Relación O:N	86
B. Tasa de filtración	88
C. Asimilación y eficiencia de asimilación	92

	D. Metabolismo basal	97
	E. Modificación de las respuestas fisiológicas y FBC	99
	3.3.5.2 Integraciones complejas	103
	A. Campo de crecimiento	103
	B. Campo de crecimiento y FBC	107
4.	DISCUSIÓN	109
4.1	Concentraciones de metales en la laguna de Mandinga	110
4.2	Fases experimentales	112
4.2.1	Control de parámetros	112
4.2.2	Morfometría de los organismos sometidos a bioensayo	112
4.2.3	Efectos letales	114
4.2.4	Efectos subletales	119
	4.2.4.1 Respuestas bioquímicas. Metalotioneínas y estrés oxidativo	120
	4.2.4.2 Respuestas fisiológicas. Integraciones simples	127
	A. Consumo de oxígeno	128
	B. excreción nitrogenada	131
	C. Relación O:N	132
	D. Consumo de alimento y tasa de filtración	134
	E. Asimilación y eficiencia de asimilación	139
	F. Metabolismo basal	142
	4.2.4.3 Integraciones complejas Campo de crecimiento	158
	4.2.4.4. FBC del Cr y el Cd asociado a las integraciones simples y al campo de crecimiento	149
	4.2.4.5 Integración general	151
5.	CONCLUSIONES	160
6.	REFERENCIAS	170

7.	ANEXOS	187
7.1	Establecimiento de las condiciones adecuadas de mantenimiento de los organismos previas a los bioensayos	188
7.2	Aspectos metodológicos comunes a todas las fases	192
7.3	Análisis del comportamiento de los metales en todas las pruebas ..	193
7.4	Análisis exploratorio de datos.....	199
7.5	Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos durante las fases experimentales	216
7.6	Publicación aceptada	229

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura. 1. Ubicación de la laguna de Mandinga, Ver.
- Figura. 2. Esquema del sistema de mantenimiento en el laboratorio para los organismos.
- Figura. 3. Monitoreo diario de parámetros fisicoquímicos en el sistema de mantenimiento.
- Figura. 4. Escalamiento del cultivo de *Tetraselmis suecica* hasta la fase exponencial y conservación de las células para alimentar al ostión.
- Figura. 5. Modelo conceptual de la evaluación de los efectos de Cr y Cd en *C. virginica*.
- Figura 6. Dispositivos experimentales de la fase aguda.
- Figura. 7. Cámaras individuales utilizadas para la evaluación de efecto subletal de la exposición a Cr y a Cd en *C. virginica*.
- Figura. 8. Ajuste de la salinidad en el período de mantenimiento previo a los bioensayos.
- Figura. 9. Morfometría de los ostiones en las fases de mantenimiento previas a la pruebas letales de Cd, Cr, las bioquímicas (BQ) y fisiológicas (FIS). Se grafican promedios, error estándar (EE) y desviación estándar (DE).
- Figura. 10. Mortalidad en los ostiones expuestos a Cr a las 96 y 168 h.
- Figura. 11. Concentración promedio de Cr en tejido y factor de bioconcentración (FBC) en los ostiones expuestos a concentraciones letales.
- Figura. 12. Peso total promedio de los organismos en el bioensayo agudo con Cr. Se grafica promedio.
- Figura. 13. Mortalidad en los ostiones con exposición al Cd determinada en diferentes períodos.
- Figura. 14. Concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal corporal media (CLC₅₀) obtenidas en diferentes períodos para *C. virginica* expuesta a Cd (\pm intervalo de confianza).
- Figura. 15. Concentración corporal de Cd y factor de bioconcentración (FBC) en los ostiones sometidos a concentraciones letales del metal.
- Figura. 16. Cd acumulado en el tejido de los ostiones muertos a las 72 h y en sobrevivientes a las 168 h del bioensayo con concentraciones letales.
- Figura. 17. Peso total, húmedo y seco (g) de los organismos al final de la exposición al Cd (promedio \pm DE).

Figura. 18. Factor de bioconcentración (FBC) de los organismos expuestos a concentraciones letales Cd y Cr.

Figura. 19. Porcentaje de humedad promedio de los tejidos de *C. virginica* al término de la evaluación bioquímica.

Figura. 20. Metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) en los tres tejidos de los organismos del grupo control, evaluados los días 1, 3 y 5 del bioensayo. Se señalan valores promedio, error estándar (EE) y desviación estándar (DE).

Figura. 21. Variación de las concentraciones de metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) en los tejidos de organismos control y expuestos a Cr y Cd, en los tres días evaluados. Se grafican valores promedio.

Figura. 22. Comportamiento de las concentraciones de MDA (nmol/mg proteína) en glándula digestiva de ostión, resultante de la exposición a Cr y Cd en los tres días evaluados.

Figura 23. Concentraciones promedio de Cr y Cd en los tres tejidos de ostión analizados al final de las pruebas bioquímicas.

Figura. 24. Variación del consumo de oxígeno en *C. virginica* (mg / h / gPS) a lo largo del bioensayo para evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

Figura. 25. Variación en la excreción nitrogenada de *C. virginica* (mg N-AT / h / gPS), a lo largo del bioensayo para evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

Figura. 26. Número de células de *T. suecica* suministradas a cada organismo (promedio) y depositación de células en las cámaras sin organismos.

Figura. 27. Producción diaria de heces (gPS / d) en *C. virginica* durante la evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

Figura. 28. Relación O:N en *C. virginica* asociada a la exposición a Cr y a Cd durante la evaluación de respuestas fisiológicas.

Figura. 29. Distribución de frecuencias de las tasas de filtración (L/h) en los ostiones *C. virginica* expuestos a Cr y Cd.

Figura. 30. Tasas de filtración obtenidas y esperadas en *C. virginica* de la misma talla.

Figura. 31. Tasa de ingestión (cal/d) en *C. virginica* durante el bioensayo de evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

Figura. 32. Tasa de producción de heces de *C. virginica* expresada en valores energéticos (cal/d) y gravimétricos (mgPS/d). Se presentan valores promedio de los grupos control y expuestos a Cr.

Figura. 33. Tasa de producción de heces de *C. virginica* (cal/d). Se presentan valores promedio de los grupos control y expuestos a Cd.

Figura. 34. Tasa metabólica basal (cal/h) obtenida a través de la relación del consumo de oxígeno y la tasa de filtración de *C. virginica* expuesta a Cr y Cd. Se grafican valores promedio.

Figura. 35. Relación entre la tasa de filtración (L/h) y la asimilación del alimento (cal/d) en ostiones *C. virginica* expuestos al Cr. Se incluyen los coeficientes de correlación.

Figura. 36. Relación de la tasa de filtración (mL/h) y la asimilación (cal/d) con el FBC derivado de la exposición a Cd en *C. virginica*. Se incluyen las regresiones lineales respectivas.

Figura. 37. Peso seco asociado al consumo de alimento en *C. virginica* expuesta a Cd. Se incluye la regresión lineal.

Figura. 38 Parámetros del campo de crecimiento (cal/d) de *C. virginica* expuesta a Cr y Cd; a) ingestión, b) respiración, c) producción de heces, y d) excreción nitrogenada. Se grafican valores promedio.

Figura. 39. Balance energético en el ostión *Crassostrea virginica* obtenido para los días 5, 10 y 15. Se presentan promedios.

Figura. 40. Proporción de energía ingerida canalizada a las diferentes respuestas fisiológicas que se integran en el balance energético de *C. virginica*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones en agua, sedimento y ostión en lagunas costeras del Estado de Veracruz.

Tabla 2. Límites máximos permitidos para el cromo y el cadmio.

Tabla 3. Calendarización de la evaluación de respuestas fisiológicas.

Tabla 4. Concentraciones promedio de Cr y Cd en agua (mg/L) y ostión ($\mu\text{g/gPS}$) de la laguna de Mandinga.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos registrados en la laguna de Mandinga durante las colectas del ostión *C. virginica*.

Tabla 6. Cantidad promedio de células de *T. suecica* proporcionadas como alimento a cada ostión diariamente (células/mL).

- Tabla 7. Valores de los parámetros fisicoquímicos en las fases de mantenimiento previas a los bioensayos (promedio \pm DE).
- Tabla 8. Morfometría de los organismos en el sistema de mantenimiento (promedio \pm DE).
- Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos en todas las fases de bioensayo (promedio \pm DE).
- Tabla 10. Morfometría de los organismos sometidos a las diferentes fases de bioensayo (promedio \pm DE).
- Tabla 11. Concentración letal ($CL_{50-168h}$) y concentración letal corporal ($CLC_{50-168h}$) medias de la exposición al Cr obtenidas por el modelo Probit Log X.
- Tabla 12. Pesos finales de *C. virginica* expuesta a Cr en la evaluación de efectos letales (promedio \pm DE).
- Tabla 13. Concentración letal (CL_{50-72h}) y concentración letal corporal (CLC_{50-72h}) medias de la exposición al Cd obtenidas por el modelo Probit X.
- Tabla 14. CL_{50} y CLC_{50} para las 96 h y 120 h de la exposición al Cd obtenidas por el modelo Probit X.
- Tabla 15. Relación peso seco/peso húmedo (gPS/gPH) en los tejidos de los ejemplares expuestos durante cinco días a niveles subletales de Cr y Cd.
- Tabla 16. Concentración de metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) en branquia, músculo abductor y glándula digestiva de ostiones expuestos a Cr y Cd, y evaluados los días 1, 3 y 5 de exposición (promedio \pm DE).
- Tabla 17. Concentraciones de MDA (nmol/mg de proteína) en la glándula digestiva de ostiones expuestos a concentraciones subletales de Cr y Cd.
- Tabla 18. Concentraciones de metal registradas en agua (mg/L) y factor de bioconcentración (FBC) durante las pruebas bioquímicas.
- Tabla 19. Correlación de las metalotioneínas y la lipoperoxidación con las concentraciones de Cr y Cd en agua y en ostión. Se incluyen solo las correlaciones significativas.
- Tabla 20. Mortalidad de *C. virginica* durante el bioensayo de evaluación de respuestas fisiológicas en exposición a concentraciones subletales de Cr y Cd.
- Tabla 21. Parámetros morfométricos de los ostiones al término de las pruebas fisiológicas con exposición subletal al Cr y al Cd (promedio \pm DE).
- Tabla 22. Peso seco (promedio \pm desviación estándar) e índice de condición (obtenido con todo el lote) de los organismos de las pruebas de evaluación de respuestas fisiológicas.

Tabla 23. Consumo de oxígeno (mg / h / gPS) en *C. virginica* expuesto a Cr y Cd. Se presentan valores promedio \pm desviación estándar.

Tabla 24. Excreción nitrogenada (mg N-AT / h / gPS) en los ostiones expuestos a Cr y Cd. Se indican valores promedio \pm desviación estándar.

Tabla 25. Consumo individual de células de *T. suecica* (10^6 / d) en *C. virginica* durante la evaluación de respuestas fisiológicas. Se presentan promedios \pm desviación estándar.

Tabla 26. Producción de heces (gPS / d) en diferentes plazos durante la evaluación de respuestas fisiológicas. Se presentan promedios \pm desviación estándar.

Tabla 27. Relación O:N generada durante el bioensayo fisiológico en ostiones *C. virginica* expuestos a Cr y Cd. Se presentan promedios \pm desviación estándar.

Tabla 28. Tasa de filtración promedio (L/h) de los ostiones durante la evaluación fisiológica.

Tabla 29. Tasa baja de filtración (L/h) determinada en ostiones durante la evaluación de efectos fisiológicos. Se señalan valores promedio.

Tabla 30. Producción individual de heces en *C. virginica* (cal/d) en organismos expuestos a Cr y Cd durante las pruebas fisiológicas. Se señalan promedios \pm desviación estándar.

Tabla 31. Asimilación del alimento (cal/d) en *C. virginica* expuesto a Cr y a Cd. Se presentan promedio \pm desviación estándar.

Tabla 32. Eficiencia de asimilación del alimento en *C. virginica* (%) en lotes control y expuestos a Cr y Cd.

Tabla 33. Concentración de Cr en tejido posterior a la exposición y FBC (promedio \pm DE).

Tabla 34. Concentración de Cd en tejido posterior a la exposición y FBC (promedio \pm DE).

Tabla 35. Parámetros del campo de crecimiento (cal/d) calculado para *C. virginica* a los 5, 10 y 15 días de exposición al Cr y al Cd. Se indican promedios \pm desviación estándar.

Tabla 36. Correlación entre el FBC y los parámetros del campo de crecimiento.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de Cr y Cd en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) procedente de poblaciones nativas de la Laguna de Mandinga, Veracruz, México. Se realizaron bioensayos agudos y subletales, semiestáticos, con organismos sometidos a un período de mantenimiento previo, en un sistema de circulación cerrada con purificación. Fueron alimentados con *Tetraselmis suecica* (Kyllin). Las condiciones fijas de ensayo (22 ‰ y 25 °C), fueron controladas junto con el pH, el oxígeno disuelto y el amonio total, además de la morfometría. Los metales se midieron por espectrofotometría de absorción atómica. Se obtuvo la concentración letal media, con base en los niveles en el agua y en el tejido. En la exposición subletal se determinaron a nivel bioquímico dos biomarcadores: metalotioneínas y lipoperoxidación. A nivel fisiológico: consumo de oxígeno, excreción nitrogenada, consumo de alimento y producción de heces, con los cuales se generaron las integraciones simples: relación O:N, tasa de filtración, asimilación y eficiencia de asimilación, además de las integraciones complejas: metabolismo basal y campo de crecimiento.

Las concentraciones letales medias ($CL_{50-168h} = 11.09$ mgCr/L y $CL_{50-72h} = 24.87$ mgCd/L), así como la concentración letal corporal de Cd ($CLC_{50-72h} = 502.25$ µgCd/gPS), mostraron un ajuste aceptable al modelo Probit log X, sin embargo la de concentración letal corporal de Cr ($CLC_{50-168h} = 475.85$ µgCr/gPS), mostró mal ajuste. La especie actuó como un acumulador neto de Cd, pero no de Cr. La resistencia de la especie fue similar a la registrada en estudios realizados en latitudes más altas.

En el análisis bioquímico se observó inducción de metalotioneínas en ostiones con 6 h de exposición a Cr. Los ostiones expuestos a Cd mostraron diferencias en el tiempo con la mayor inducción, en la glándula digestiva de ostiones expuestos a 0.110 mgCd/L, donde se registró 810.1 µg/g, y los valores fueron directamente proporcionales al Factor de Bioconcentración (FBC). Los expuestos a Cr no superaron los 299.2 µg/g, y la inducción se asoció a un menor FBC. El músculo abductor no mostró relaciones relevantes con ninguno de los dos metales. La lipoperoxidación, se incrementó después de 6 horas hasta 213 nmol MDA/mg y 263 nmol MDA/mg, en organismos expuestos a Cd, aproximadamente al doble que los controles, 133.5 nmol MDA/mg. En exposición a Cr, las diferencias fueron evidentes hasta las 72 horas, con promedios de 272 nmol MDA/mg y 157 nmol MDA/mg. Hubo incremento de metalotioneínas a las 6 h de exposición a Cr y de lipoperoxidación a las 72 h, el incremento de lipoperoxidación por exposición a Cd después de las 6 h, permite suponer que la inducción de metalotioneínas pudo ser anterior a ese plazo.

En la evaluación fisiológica, la condición de los organismos control fue buena hasta el final del bioensayo de veinte días, observándose en ellos ganancia de peso. La relación O:N, indicó estrés metabólico como consecuencia de la exposición, en las concentraciones más altas de ambos metales, con valores mínimos el día 3 en exposición a Cd y el día 5 en exposición a Cr. Esos valores se asocian al consumo de proteínas propias del animal, mientras que en las concentraciones más bajas de exposición se observaron valores asociados al consumo de carbohidratos el día 14 en exposición a Cd y el día 19 en exposición a Cr. La filtración en los organismos

mostró dos tasas, una alta que fue más frecuente en los controles y una tasa baja. En organismos expuestos a Cr, las tasas de filtración no evidenciaron la influencia del metal y la ingestión de alimento fue igual o superior a los controles, pero hubo pérdida calórica en heces fecales. Al igual que los controles, los expuestos a Cr, se encontraron en zona de tolerancia metabólica, en los días 5, 10 y 15 pero mostraron mayor consumo de energía para mantener metabolismo basal en exposición a 0.080 mgCr/L. El consumo energético en expuestos a 0.180 mgCr/L fue similar al de controles, pero estos animales ingirieron más alimento, tuvieron pérdida calórica en heces, mayor consumo de oxígeno y excreción nitrogenada el día 10, lo que coincidió con un menor aprovechamiento del alimento y con pérdida en peso. El FBC no tuvo correlación con los parámetros fisiológicos. Los ostiones expuestos a Cd no mostraron tasas altas de filtración y presentaron menor asimilación, y eficiencia de asimilación. El campo de crecimiento indicó que los organismos expuestos a 0.095 mgCd/L se encontraban en ración de mantenimiento y los expuestos a 0.170 mgCd/L, en zona de resistencia. El Cd generó un fuerte consumo de energía para mantener la metabolismo basal. El FBC fue proporcional al gasto por respiración, excreción nitrogenada y heces, mientras que la ingestión fue inversamente proporcional, al igual que el campo de crecimiento.

Los efectos observados, implican que, aunque *C. virginica* no es un acumulador neto de Cr, puede incorporarlo en grandes cantidades y generar un esfuerzo metabólico para mantener la homeostasis. Por otro lado, los niveles de Cd presentes en Mandinga, podrían representar un peligro para *C. virginica*, y la salud humana. Las temperaturas elevadas de las lagunas costeras mexicanas

representan un riesgo porque las variaciones ambientales pueden generar estrés metabólico, así como incrementar la biodisponibilidad de los metales.

ABSTRACT

The objective of the present research was to find out the effect of Cr and Cd in the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin), from native populations of the Mandinga Lagoon, Veracruz, Mexico. Acute and sublethal semistatic bioassays were performed with organisms previously kept on a maintenance period in a closed circulating system with filtration, they were fed with *Tetraselmis suecica* (Kyllin). Fixed conditions of the assay (22 ‰ and 25 °C) were controlled together with pH, dissolved oxygen and total ammonia, besides the morphometry. Metals concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometer. Mean lethal concentrations were obtained with levels in water and in tissue. In the sublethal exposure, were assessed two biomarkers: metallothionein and lipoperoxidation. In the physiological level: oxygen consumption, nitrogen excretion, food consumption, and faeces, were evaluated. Physiological data generated simple integrations as: O:N ratio, filtration rate, assimilation and assimilation efficiency and besides the complex integrations: basal rate and scope for growth. Mean lethal concentrations ($LC_{50-168h} = 11.09 \text{ mgCr/L}$ and $LC_{50-72h} = 24.87 \text{ mgCd/L}$, and), as well as Cd mean lethal body concentration ($LBC_{50-7h} = 502.25 \text{ } \mu\text{gCd/gDW}$), showed an acceptable fit to the Probit log X model, but a badfit for Cr body concentration ($LBC_{50-168h} = 475.85 \text{ } \mu\text{gCr/gDW}$). The species behaved as a net Cd

accumulator, but not in the case of Cr. The species resistance was similar to studies performed in higher latitudes.

Biochemical analysis indicated that metallothionein was induced in oysters with 6 h of exposition to Cr. Oysters exposed to Cd showed differences in time with the highest induction in digestive gland of oysters exposed to 0.110 mg Cd/L, where 810.1 $\mu\text{g/g}$, was registered and the values were directly proportional to the bioconcentration factor (BCF). The Cr exposed organisms did not exceed 299.2 $\mu\text{g/g}$; the induction was associated to a lower BCF. Abductor muscle did not show relevant relationships for both metals. Lipoperoxidation increased after 6 hours in Cd exposed organisms until 213 nmol MDA/mg and 263 nmol MDA/mg, almost twice the control value, 133.5 nmol MDA/mg. In Cr exposition, differences were evident at 72 hours with 272 nmol MDA/mg and 157 nmol MDA/mg, in average. Metallothionein increased after 6 h and lipoperoxidation after 72 h in Cr exposure, lipoperoxidation increase after 6 h in Cd exposure permits to suppose that metallothionein could be induced before.

Condition in control organisms was good until the end of the twenty days bioassay in the physiological evaluation, with weight increase. The O:N ratio indicated metabolic stress as a consequence of exposure, in the highest concentrations of both metals, with minimum values in the third day with Cd exposition and in fifth day with Cr exposition. Those values were associated to own animal protein consumption, meanwhile in the lowest concentrations, values associated to carbohydrates consumption were observed in day 14 in Cd exposition and in day 19 in Cr exposition. Filtration presented two rates in organisms, a high rate, more

frequent in controls and a low filtration rate. In organisms exposed to Cr, filtration rates did not evidence the metal effect, and the food ingestion was equal or superior to the controls', but there were caloric losses in faeces. The controls and those oysters exposed to Cr were in the tolerance metabolic zone, in days 5, 10 and 15, but these presented more energy consumption to maintain basal rate in exposition to 0.080 mgCr/L. Energetic consumption in those exposed to 0.180 mgCr/L was similar to controls, but food ingestion, caloric loss by faeces, oxygen consumption, and nitrogen excretion were higher in those animals in day 10, which coincides with a lower food utilization and this, with the weight loss. The BCF was not correlated to the physiological parameters. Oysters exposed to Cd did not show high filtration rates and presented lower assimilation and assimilation efficiency. Scope for growth indicated that the organisms exposed to 0.095 mg Cd/L were in maintenance ration, and those exposed to 0.170 mgCd/L in the resistance zone. Cd generated a strong energetic consumption to maintain basal rate. BCF was proportional to oxygen consumption, nitrogen excretion and feces waste, meanwhile the ingestion, the same as the scope for growth were inverse proportional.

The observed effects imply that even if *C. virginica* is not a net Cr accumulator, it can incorporate important quantities, and generate a metabolic effort to maintain homeostasis. In the other hand, actual Cd levels in Mandinga could represent a danger to *C. virginica* and human health. The elevated temperatures in Mexican coastal lagoons represent a risk, because environmental variations can generate metabolic stress, as well as increase the bioavailability of metals.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes acuáticos han sido modificados como consecuencia de las actividades humanas. Es frecuente que las zonas costeras de México presenten deterioro. Sin embargo, los estudios relativos a los efectos que tienen los diversos tóxicos que se encuentran en el ambiente sobre los organismos, son escasos. La investigación sobre la contaminación en las costas mexicanas, como es el caso del Golfo de México, se ha enfocado casi exclusivamente a la determinación de las concentraciones de los tóxicos en el agua, el sedimento y los organismos, tal como se plantea en trabajos de recopilación como los de Paez (1996a) y Villanueva y Botello (1998). Algunos autores plantean que la capacidad para resolver los problemas de contaminación está limitada, debido a la escasez en el conocimiento de las propiedades básicas, la estructura y la función de los ecosistemas, así como los efectos de los contaminantes (Servos, 2000). Los ambientes más estudiados se encuentran en zonas templadas, lo que ha derivado en la tendencia a utilizar los resultados obtenidos en estas zonas, como adecuados para interpretar los efectos en zonas tropicales.

Las zonas tropicales, como es el caso de las lagunas costeras, son particularmente vulnerables, ya que son altamente productivas y cuentan con una alta diversidad. Los contaminantes son arrastrados a las zonas costeras y a los ambientes lagunares estuarinos en el agua de ríos en forma disuelta o particulada, o por escorrentía de lluvia y suelen precipitarse al entrar en estos, lo que genera que las lagunas costeras actúen como trampas de contaminantes (Contreras, 1985). Algunos agentes tóxicos, como los metales, son ampliamente utilizados en diferentes industrias en la región, motivo por el cual, los niveles han tendido a aumentar (Paez, 1996a). El incremento de metales como el cromo y el cadmio, en

cuerpos lagunares costeros mexicanos, involucra la necesidad de establecer si existe riesgo para las especies que viven en ellos.

El cromo, es un metal esencial en el metabolismo. No obstante, puede ser tóxico en concentraciones elevadas, mayores a la capacidad de regulación de los organismos. Se ubica en el grupo VI de la tabla periódica, con valencias -2 , $+2$, $+3$ y $+6$. Este metal se utiliza en diversas industrias para la elaboración de colorantes, pigmentos, plagicidas, cromado, electrolitos, galvanoplastia, curtido de pieles, tinción de textiles, quema de combustibles, explosivos, y en la industria química, minera y de fotograbado (Figueroa, 1990). La forma Cr^{3+} promueve la acción de la insulina, por lo que existe cierta regulación. Cantidades excesivas se excretan por orina, excreción biliar, cabello, uñas, leche y sudor en el hombre (Albert, 1997), en otros organismos, como cangrejos, se excreta por branquias y en bivalvos como ostiones y almejas, (*C. virginica* y *M. edulis*, L.) por manto y glándula digestiva (Espina y Vanegas, 1996b). El Cr se introduce a los organismos a través de las vías digestiva, cutánea y respiratoria, y puede entrar en diferentes estados de oxidación; con valencia 6^+ como trióxido de cromo, cromato o dicromato; con valencia 3^+ como óxido crómico e ión crómico; con valencia 2^+ como ión cromoro; e incluso con valencia 0 como cromo metálico. De estos, el Cr^{6+} es fuertemente oxidante y corrosivo por lo que es más tóxico que las formas restantes (Albert, 1997).

Se considera que el cromo tiene menor toxicidad que el cadmio, y no causa daño en cantidades traza (Goyer, 1991), sin embargo, la forma Cr^{6+} , es muy soluble y penetra a las células más fácilmente, que el Cr^{3+} , que es insoluble. El Cr es afectado por el potencial redox en la columna de agua, de manera que su toxicidad

depende de diversos factores ambientales, como la temperatura y la salinidad, que presentan variaciones e influyen en la especiación del metal. Usualmente en el agua, el Cr forma complejos, principalmente hidróxidos, sin embargo, no es raro encontrarlo asociado a materia orgánica (Botello, 1994; Sadiq, 1992), lo cual, lo hace accesible a los organismos.

El cadmio, es un metal sin función biológica conocida, que se ubica en la tabla periódica en el grupo II B, con valencia 2^+ . Su uso es común en la fabricación de pigmentos, pinturas, baterías, como estabilizador del PVC, recubrimiento de otros metales, en procesos de galvanoplastia, electroplateado, aleaciones, acumuladores, soldadura, reactores nucleares, joyería y otros (Albert, 1997). En el agua dulce suele presentarse como ión libre disuelto, aunque la dureza, el pH, la presencia de complejos solubles y sulfuros coloidales influyen en su solubilidad. En el agua el ión Cd^{2+} puede encontrarse como $CdSO_4$, $Cd(OH)_2$ y $CdCl_2$. La proporción de cada una de estas especies químicas depende de la presencia de otros iones y de factores ambientales. Por ejemplo: en ambientes estuarinos, una alta proporción se asocia a partículas formando complejos de cloro. A su vez, la modificación de la especie química por variaciones en el pH, la temperatura y la salinidad, afecta su toxicidad (Sadiq, 1992). También se deposita en los sedimentos quedando así atrapado en aguas costeras y estuarios. Esta inmovilización es potencialmente peligrosa, ya que puede llegar a disolverse si el pH disminuye (Badillo, 1990). Los sedimentos contaminados pueden permanecer como una fuente de metales, aún después de que la incorporación del metal en el ambiente ha cesado (Ford, *et al.*, 1998).

Dado que es un metal sin función biológica conocida, pero tiene un comportamiento similar al de muchos iones (como el Ca y el Zn), interfiere en diferentes rutas metabólicas. Puede interactuar con los canales de calcio en la membrana celular, y con los grupos tiol de las proteínas afectando múltiples procesos, así como sustituir al calcio en los huesos (Souza, 1996), por solo mencionar algunos de los efectos de este metal. La importancia de determinar los efectos por exposición a este metal, radica en que es tóxico para todas las formas de vida.

Los efectos adversos de ambos metales han sido evaluados en muchos organismos incluyendo moluscos (EPS, 1990; Pawlisz *et al.*, 1997; Widdows, 1993) y programas como Mussel Watch los han estudiado por décadas. Existe un consenso general en relación a que las especies estuarinas son más vulnerables que las marinas a la acción tóxica de los metales, ya que se encuentran sometidas a estrés por las continuas variaciones en las condiciones naturales, de manera que la presencia de un factor adicional de estrés, representado por algún tóxico contaminante puede generar una respuesta rápida (Espina y Vanegas, 1996 b).

Recientemente, en varios países se ha regulado el uso de los moluscos como biomonitores marinos (Franco *et al.*, 2002), debido a que el monitoreo químico no provee información directa sobre los efectos biológicos, derivados de la acción de los tóxicos ambientales. Si bien el análisis químico de las concentraciones de xenobióticos en agua, sedimento y organismos, proporciona datos útiles en la predicción del efecto potencial, se requiere de investigaciones que hayan relacionado exitosamente los niveles de contaminantes con las respuestas de los sistemas biológicos (Lam y Gray, 2003). De tal manera, para generar medidas de

protección para las especies, por efecto de los contaminantes, es necesario conocer, los efectos adversos en los organismos (Chapman, 2002).

Debido a la complejidad del medio y sus variaciones, ciencias como la toxicología y el conocimiento de la dinámica del comportamiento de los contaminantes en el ambiente, se han retroalimentado generando los estudios ecotoxicológicos, los cuales intentan explicar los mecanismos de intoxicación y demostrar los efectos de los contaminantes en los organismos (Baird *et al.*, 1996).

Una de las herramientas en el análisis ecotoxicológico es el uso de bioensayos, en los que una amplia gama de indicadores puede utilizarse para la determinación de efecto subletal de múltiples estresores ambientales, incluyendo los contaminantes (Simkiss y Masson, 1983). Las respuestas al estrés ambiental son evaluadas a diferentes niveles de organización biológica, incluyendo escalas espaciales y temporales amplias (Forbes y Depledge, 1996) y comprenden tanto respuestas integrales como específicas. En este sentido, diversas respuestas moleculares y biomarcadores de exposición son factibles de ser utilizados como un reflejo específico de la presencia de un contaminante, en condiciones de exposición crónica o subletal. A la vez, diversas respuestas biológicas dan cuenta de la magnitud del daño de estos contaminantes sobre la biota (biomarcadores de efecto) (Widdows y Donkin, 1991; Widdows, 1993; Word *et al.*, 1997). Los biomarcadores son señales identificables a diferentes niveles de organización biológica, que proporcionan advertencias tempranas del daño (Koeman, 1991). La detección temprana de daño en organismos que habitan áreas impactadas brinda información importante para los estudios de diagnóstico ambiental y de protección a los sistemas.

En México, los estudios efectuados en almejas y ostiones sugieren su utilidad como biomonitores, ya que por su hábito filtrador, pueden acumular metales (Ruelas-Inzunza y Paez-Osuna, 2000). Particularmente, el ostión *Crassostrea virginica* se considera un buen indicador para evaluar los aportes de contaminantes, ya que las concentraciones de metales que incorporan, varían reflejando las del ambiente; esta especie se encuentra ampliamente distribuida en las costas del Atlántico de Norteamérica y la literatura sobre su fisiología es abundante. Sin embargo, existen pocos trabajos que integran los aspectos fisiológicos en la habilidad de los ostiones como indicadores de acumulación de metales (Phillips, 1980). En México no existen estudios relativos a la sensibilidad de las poblaciones nativas de *C. virginica* a los metales o a otros xenobióticos ambientales.

Las respuestas fisiológicas del ostión pueden ser utilizadas como biomarcadores del efecto total de los tóxicos en el organismo, y estas respuestas, aunadas a biomarcadores bioquímicos específicos, en conjunción con la bioconcentración permitirían corroborar si las modificaciones se relacionan con la exposición a los tóxicos de interés.

Diversas respuestas fisiológicas pueden ser útiles para determinar los efectos de estresores ambientales. Existen integraciones simples y complejas. Entre el primer tipo, se incluyen: parámetros morfométricos como la relación entre la longitud y el peso (Powell, *et al.*, 1992); el índice de condición (Walne, 1984); también se incluyen la tasa de filtración, la eficiencia de asimilación y la razón O:N; integraciones complejas, como el campo de crecimiento, proporcionan información sobre el balance energético del animal (Widdows y Donkin, 1991).

La filtración es considerada una medición indirecta del consumo de alimento de cierta biomasa de ostión. La actividad filtradora puede ser relacionada con el consumo de oxígeno y permite establecer el valor energético del alimento consumido (Griffiths y Griffiths, 1987). A su vez, la eficiencia de asimilación del alimento ingerido, es un parámetro de primer orden que puede ser utilizado sistemáticamente para comparar la biodisponibilidad de diversos contaminantes. La eficiencia de asimilación, acoplada con la estimación de la incorporación de los contaminantes desde ambientes acuáticos, permite determinar la importancia relativa de la exposición por agua o por la dieta, ya que la bioacumulación de los metales en invertebrados acuáticos está fuertemente relacionada con los cambios en esta eficiencia. Su evaluación es crítica en la determinación de la toxicidad de un contaminante por transferencia trófica y la biomagnificación (Wang y Fisher, 1999).

Por otro lado, la razón O:N, evalúa la relación entre el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada, y es considerada un indicador de estrés fisiológico estimando los cambios en el sustrato energético utilizado por los organismos (Mayzaud y Conover, 1988). A la vez, la tasa metabólica (consumo de oxígeno), asociada con el consumo de alimento también manifiesta si existe un estrés fisiológico, además de que permite calcular la metabolismo basal, que a su vez indica cuales son los requerimientos energéticos del animal para sobrevivir (Griffiths y Griffiths, 1987).

Las integraciones complejas, como el campo de crecimiento, permiten evaluar la energía disponible para crecimiento y desarrollo. Además, en estudios crónicos del efecto de xenobióticos en bivalvos, puede orientar sobre algunos de los

mecanismos de toxicidad, así como mostrar la sensibilidad de los organismos de prueba y los efectos en el crecimiento, (Widdows, 1978). La investigación sobre energética fisiológica, asociada a la acumulación de los tóxicos en los tejidos, proporciona a la vez, información útil para establecer una base de datos, que permita la interpretación apropiada de los datos derivados de los programas de monitoreo químico en los organismos (Widdows y Donkin, 1991). De esta manera, las respuestas fisiológicas a la exposición a tóxicos pueden ser una herramienta útil para evaluar, explicar y predecir sus efectos, y además brindar información útil en la toma de decisiones relativas a los niveles aceptables en el ambiente.

Se debe considerar, sin embargo, que existen variaciones en las respuestas fisiológicas y algunas no son específicas para un tóxico en particular, por lo que es necesario asegurar que estas respuestas sean consecuencia de la exposición a los tóxicos de interés. Debido a ello se requiere de la determinación de algunas respuestas específicas a nivel molecular. Estas, pueden sondearse por la activación o inhibición de procesos, y/o por su interferencia a nivel bioquímico (Hodgson y Levi 1987). Así, los biomarcadores de exposición indican si el tóxico en estudio, ha generado una respuesta específica cuantificable.

Uno de los biomarcadores utilizados para evaluar efectos de metales esta constituido por las proteínas denominadas metalotioneínas. Estas tienen bajo peso molecular, y su composición incluye aproximadamente 30% de cisteína. El grupo tiol de este aminoácido, facilita su unión con metales. La expresión de las metalotioneínas está regulada por patrones complejos y se asocian a los requerimientos de metales esenciales. Particularmente en el caso de *C. virginica*, desempeñan un papel importante en la regulación del Zn, metal que ingresa en

grandes cantidades y es excretado rápidamente del organismo. El balance del Zn y el Ca están relacionados entre sí, ambos tienen que ver con la fijación del Ca en las valvas y por lo tanto con la resistencia de las mismas y el crecimiento del organismo. En presencia de cantidades excesivas de Zn, u otros metales esenciales como el Cr, o bien, en presencia de metales no esenciales como el Cd, la síntesis de metalotioneínas se incrementa (Roesijadi, 1996b). La metalotioneína unida a metales que no tienen una función biológica definida queda inhabilitada para sus funciones. El Cd desplaza los metales esenciales de las metalotioneínas y queda fijo en ellas, por lo que el organismo queda privado de importantes metaloenzimas, que actúan como cofactores en diversas funciones metabólicas. La metalotioneínas así secuestradas se acumulan dentro de la célula (Goyer, 1991).

Un segundo biomarcador de importancia, es el daño por estrés oxidativo, fenómeno común en condiciones de estrés fisiológico. El estrés oxidativo, consiste en la generación de radicales libres que, entre otros efectos, se manifiestan por el incremento en la oxidación de los lípidos de la membrana, conocida también como lipoperoxidación. El daño peroxidativo no se genera solo por lipoperoxidación, sino por intermediarios electrofílicos que pueden interactuar con otros sitios nucleofílicos de la célula, incluyendo el glutatión y las proteínas que presentan el grupo tiol, generando a su vez, el estrés oxidativo en toda la célula. En los ácidos nucleicos se encuentran también sitios nucleofílicos, por lo que la generación de radicales libres se relaciona además con mutagénesis y carcinogénesis a través de varios procesos. Algunos metales se consideran especies oxígeno reactivas porque

favorecen la generación de radicales OH⁻. Es conocido el hecho de que el Cd y el Cr producen cáncer (Goyer, 1991), por lo que el estrés oxidativo podría asociarse a la exposición a ambos metales. Además, el Cr⁶⁺ al ser un agente oxidante y corrosivo (Albert, 1997) es asociado también con estrés oxidativo. El efecto del Cd en la lipoperoxidación se relaciona con la interacción con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, aunque los mecanismos no son del todo conocidos (Souza *et al.*, 1996).

Recientemente, se ha considerado, que las concentraciones de los metales acumuladas dentro de los organismos, constituyen mejores indicadores del impacto biológico potencial que las concentraciones en el ambiente, debido a que la biodisponibilidad del metal es tomada en cuenta automáticamente (Borgmann, 2000). La fracción biodisponible de los metales constituye el mayor peligro para la biota (Soto-Jimenez *et al.*, 2001). Wood *et al.* (1997), indican que éste tipo de acercamiento puede ser útil para predecir la toxicidad de los metales inducida desde el agua hacia los organismos bentónicos. Aunque existen otras vías de entrada de ambos metales hacia los organismos, en el caso de los filtradores, la principal es el agua, ya que estos viven en contacto con ella (Neff, 2002; Rebouças *et al.*, 2005).

En la especie seleccionada para este estudio, *Crassostrea virginica*, los estudios realizados en México, han abordado aspectos relativos a su biología y su cultivo para la explotación comercial, (Camacho *et al.*, 1980; Walne, 1984; SEPESCA, 1988). No obstante, los estudios sobre el efecto de los xenobióticos ambientales son limitados. En el mismo taxa de otras zonas geográficas, se ha determinado la

concentración letal media (CL₅₀) de Cr y Cd en embriones (Calabrece *et al.*, 1973), pero no se ha realizado su evaluación en el caso de adultos. Los adultos cuentan con ciertas adaptaciones fisiológicas particulares, como el hecho de que pueden permanecer cerrados por períodos considerables, modificando los efectos tóxicos de los contaminantes. El período de cierre de valvas, es proporcional a la concentración del tóxico (Galtsoff, 1964). Este comportamiento le confiere a la especie una gran resistencia, aparentemente. Sin embargo, en concentraciones bajas de tóxicos, el período de cierre de las valvas es menor y el organismo puede estar en contacto con el contaminante durante más tiempo, de manera que el riesgo por exposición en bajas concentraciones, puede ser mayor, ya que se pueden generar efectos dañinos en plazos menores.

C. virginica es una especie de importancia ecológica, debido a la elevada tasa de eliminación de partículas, reciclado de nutrientes y biodepositación (Ward *et al.*, 1994). Especies relacionadas, como *C. gigas* (Thunberg), se han utilizado como filtros para disminuir el fitoplancton que afecta los niveles de nutrientes en varios ambientes acuáticos. De tal manera, la actividad filtradora de estos bivalvos ha sido utilizada como un indicador de la salud ambiental de algunos ecosistemas acuáticos (Shpigel y Blaylock, 1991).

C. virginica se encuentra ampliamente distribuida en las lagunas costeras del Golfo de México, siendo la laguna de Mandinga, ubicada en el estado de Veracruz, uno de los ambientes donde se cultiva. Este cuerpo de agua tiene importancia además por la extracción de otras especies de interés comercial, como son el robalo, el bagre y el camarón (Contreras y Castañeda, 1995; Botello, 1994). Las concentraciones de metales tóxicos en Mandinga, se consideran intermedias

comparadas con otras lagunas costeras del Golfo de México (Villanueva y Botello, 1998). Esta laguna se encuentra bien comunicada y accesible, de manera que constituye un sitio conveniente para la extracción de los organismos de esta especie.

1.1 ANTECEDENTES.

La especie *C. virginica* se extrae de varias lagunas costeras del Golfo de México y representa un recurso importante a nivel nacional. Su producción en el estado de Veracruz ha ocupado del primer, al tercer lugar, a nivel nacional de 1996 a la fecha, solo por debajo de Sinaloa y Sonora (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>). La producción en el estado de Veracruz fue de 33,737 Ton en 2004 (<http://veracruz.com>).

En las lagunas costeras de Veracruz (tabla 1), los niveles de Cr y Cd se han reportado por debajo de los límites establecidos para aguas residuales que vierten a cuerpos acuáticos con actividad pesquera o a estuarios, según la actual legislación mexicana (tabla 2). Sin embargo, en el caso del Cd, los límites para la protección de la vida acuática han sido rebasados en el agua de lagunas como Tamiahua y Tampamachoco (Rosas *et al*, 1989; Rosas *et al*, 1983). A su vez, los límites del Cr, han sido rebasados en las lagunas de Pueblo Viejo y el Canal del Chijol (Robledo, 1987; Ávila Pérez y Zarazua-Ortega, 1993). En otras lagunas, como el Llano, la Mancha y Salada, ambos metales se encuentran en

concentraciones bajas en agua; sin embargo, de acuerdo con Botello (1994), no permanecen mucho tiempo en fase soluble y se acumulan en el sedimento, superando con mucho las del agua. Como se aprecia en la tabla 1, los registros recientes de ambos metales, indican valores mayores, en lagunas como Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco (Contreras, 1996).

Tabla 1. Concentraciones en agua, sedimento y ostión en lagunas costeras del Estado de Veracruz.

Laguna	Referencia	CROMO			CADMIO		
		Agua (mg/L)	Sedimento (µg/gPS)	Ostión (µg/gPS)	Agua (mg/L)	Sedimento (µg/gPS)	Ostión (µg/gPS)
Pueblo Viejo	Robledo, 1987	51.0 2*					
	Contreras, 1996		65.41(90.77)			3.08 (6.59)	
Canal del Chijol	Avila-Pérez y Zarazua-Ortega, 1993	42 (90)*		20*			
Tamiahua	Rosas <i>et al.</i> , 1989	0.04 (0.05)	0.54 (0.93)		0.03*	0.16 (1.01)	
	Contreras, 1996		54.64 (101.2)			3.36 (4.98)	
Tampamachoco	Rosas <i>et al.</i> , 1983	0.001	9.55	0.89	0.001*	0.098	2.06*
	Contreras, 1996		35.45 (50.6)			3.16 (4.12)	
Sontecomapan	González-Fierro <i>et al.</i> , 1994		74.1(150.6)	6.23		1.43 (2.7)	2.48*
El Llano	Botello, 1994	<0.13	34.25 (58.95)	4.57(5.74)	<0.025	1.44 (2.07)	1.1(1.15)*
	Villanueva y Botello, 1998		36.24	4.58		1.35	1.11*
La Mancha	Botello, 1994	<0.13	49.75 (75.65)	1.60 (2.0)	<0.025	1.35 (2.08)	6.4 (10.4)*
	Villanueva y Botello, 1998		49.75	5.13		1.47	1.34*
Salada	Botello, 1994	<0.13	29.68 (45.11)		<0.025	2.2 (3.06)	
	Villanueva y Botello, 1998		29.69			2.20	
Mandinga	Rosas <i>et al.</i> , 1983	0.004	7.43	2.24	0.002	0.015	1.54
	Botello, 1994		45.74 (64.57)	3.8 (4.19)		1.22 (2.07)	1.15 (2.24)
	Villanueva y Botello, 1998		21.92	3.32		1.09	3.13
Alvarado	Rendón <i>et al.</i> , 1995			1.55			0.27
	Villanueva y Botello, 1998		159.73				
El Ostión	Villanueva y Botello, 1998		140.70	N.D.		N.D.	N.D.

N.D. No Detectable; Concentración promedio (Concentración máxima); * concentraciones por arriba de los límites máximos permisibles establecidos en diversas normas; gps, gramos de peso seco.

Como se aprecia en la tabla 2, se han establecido los límites de concentración máxima permisible de Cd en tejido de ostión para consumo humano en México

(NOM-031-SEMARNAT-1996); no obstante, no se cuenta con límites establecidos para Cr en ostión. Las concentraciones usualmente detectadas, aparentemente son seguras para el consumo humano, considerando los límites establecidos para Cr³⁺ por la Food and Drugs Administration (FDA, 1993). No obstante, algunas investigaciones previas, cuya interpretación se basó en la legislación de otros países, indican que en *C. virginica* se rebasan los límites para Cr y para Cd (Villanueva y Botello, 1992).

Tabla 2. Límites máximos permitidos para el cromo y el cadmio.

Referencia	Uso asociado	Límite máximo permitido (promedio diario)	
		Cromo (mg/L)	Cadmio (mg/L)
NOM-001-SEMARNAT-1996	Concentraciones en descargas de agua residual a cuerpos de agua costeros con actividad:		
	Pesquera	1.0	0.2
	Estuarios	0.5	0.2
Comisión Nacional del Agua, 2003	Para protección de la vida acuática en agua costera y estuarios	0.01	0.0002
NOM-031-SSA1-1993	Concentración permitida en tejido de ostión para consumo humano (peso húmedo).	*	0.5 µg/g
FDA, 1993	Concentración permitida en tejido de ostión para consumo humano (peso húmedo).	17 µg/g	*

* no existen.

Considerando las concentraciones en el sedimento, en donde los metales permanecen más tiempo, se ha observado un aumento de los niveles de Cr y Cd. Este se atribuye a las descargas de ríos y a actividades diversas llevadas a cabo en las riberas, por lo que las fuentes son heterogéneas (Rosas *et al.*, 1983; Botello, 1994; Villanueva y Botello, 1998). Así mismo, en la laguna de Mandinga puede apreciarse un incremento en ambos metales.

En *Crassostrea virginica* procedente de las costas mexicanas, además de la investigación sobre la acumulación de contaminantes, se han realizado estudios aplicados sobre acuacultura y su explotación comercial (Secretaría de Pesca, 1988). Recientemente se ha obtenido semilla en Ciudad del Carmen, Campeche y se desarrollan estudios de histoquímica en el CINVESTAV, Mérida (comunicación personal, G. Gold).

Es necesario reconocer, sin embargo, que el manejo de la especie en la zona costera del Golfo de México, se limita usualmente a la obtención de juveniles a través de la fertilización en granjas, con la posterior introducción de estas formas juveniles en las lagunas costeras, de donde se extrae cuando alcanza la talla comercial. En algunos casos, se lleva a cabo una depuración de bacterias previa al consumo humano, como en los especímenes procedentes de la laguna de Mandinga, los cuales pasan un período de aproximadamente 48 h, en plantas de tratamiento, en las cuales se exponen al agua filtrada y ozonificada de la laguna. No obstante, en estos organismos nativos de los ambientes mexicanos no han sido evaluados los efectos adversos de contaminantes como los metales.

1.2 OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto letal y subletal del Cr y del Cd en ostión *Crassostrea virginica* de la laguna de Mandinga, Ver.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la acumulación de ambos metales en ostión adulto en su ambiente natural como punto de referencia.
2. Determinar el efecto letal de ambos metales en el ostión *Crassostrea virginica* y su relación con la concentración corporal.
3. Determinar el efecto de niveles subletales de Cr y Cd en biomarcadores bioquímicos de exposición y de efecto, y en respuestas fisiológicas simples y complejas.

1.3 HIPÓTESIS.

1. Si los efectos tóxicos letales y subletales a nivel bioquímico (inducción de metalotioneínas y estrés oxidativo) y fisiológico, así como la acumulación de ambos metales, son proporcionales a la concentración de exposición, entonces se observará mayor daño en las concentraciones más altas y este se asociará al factor de bioconcentración.
2. Si se demuestra daño en *C. virginica* expuesta a concentraciones subletales que impliquen una acumulación en tejido no considerada peligrosa para el consumo humano, entonces las poblaciones nativas de *C. virginica* en ambientes mexicanos, podría encontrarse en riesgo.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1 ÁREA DE ESTUDIO.

La laguna de Mandinga, es uno de los sitios donde la especie *C. virginica* desarrolla su ciclo de vida completo. Este cuerpo de agua se ubica entre los 19°00'-19°06' N y 96°02'-96°06' W), en el estado de Veracruz (Contreras y Castañeda, 1995). Constituye un sistema costero tropical típico, con un impacto relativamente menor derivado de las actividades humanas. El clima de la zona es $Aw_2 (w)(i)w''$, que corresponde al más húmedo de los subhúmedos con lluvias en Verano, con muy poca variación de temperatura en el año (García, 1981). La variación anual de los parámetros fisicoquímicos del agua de la laguna, oscila entre 4.58 ‰ y 29.05 ‰ de salinidad, 28.2 °C y 33.1 °C de temperatura, 1.73 mg/L y 4.22 mg/L de oxígeno disuelto, y 4.5 a 8.7 de pH (Contreras y Castañeda, 1995). Es una laguna de salinidad baja, aunque puede llegar a tener salinidad marina, presentando un gradiente desde la boca hacia tierra adentro (Botello, 1994). La orientación de la laguna es norte-sur, adoptando una dirección noroeste-sureste cerca de la boca. Cuenta con seis elementos: la laguna Larga, el estero el Conchal, el estero Horcones, la laguna Chica, el estero de Mandinga y la laguna Grande (Fig. 1). En ella se encuentran varias especies de interés económico, como son: el bagre, la anchoa, la lisa, el robalo, el pargo, la mojarra y la guavina. *Crassostrea virginica* representa un recurso pesquero importante para muchas comunidades en la zona (Palacios-Fest y Vargas-Rangel, 2002), y se comercializa ampliamente en la Ciudad de México. La distribución de la especie dentro de la laguna depende de la época de reproducción y las condiciones locales de salinidad y temperatura.



Figura. 1. Ubicación de la laguna de Mandinga, Ver.

2.2 COLECTA DE LOS ORGANISMOS.

Los ejemplares fueron extraídos de la zona central de la denominada laguna Chica. En cada colecta se extrajo un promedio de 200 organismos, de talla comercial (>5 cm de longitud), por medio del arte de pesca denominado gafas. Los muestreos se realizaron en octubre de 1996, mayo, septiembre y noviembre de 1997, julio y septiembre de 1998.

Las mediciones *in situ* incluyeron: oxígeno disuelto (± 0.005 mg/L), temperatura (0 ± 0.05 °C), pH (± 0.005), salinidad (± 0.05 ‰) y turbidez (0.5 UT), determinados con un multianalizador Horiba U-10.

Simultáneamente se tomaron muestras de agua para el análisis posterior de las concentraciones de cadmio y cromo. Estas se tomaron en recipientes de plástico de un litro de capacidad y se fijaron a pH < 2 con 0.5 mL de ácido nítrico (APHA, 1995), se colocaron en hieleras para su transporte al laboratorio y se congelaron a -20 °C hasta realizar el análisis de contenido de metales.

Los ostiones fueron trasladados en bolsas de plástico a 4 °C al laboratorio. Mientras los organismos eran transportados, se ajustó en el laboratorio la salinidad del sistema de mantenimiento, igualándola con la del sitio de colecta para evitar un choque osmótico en los animales, para esto se utilizó un refractómetro de mano. Al arribar los organismos, se corroboró la salinidad con el multianalizador Horiba U-10. La temperatura del sistema quedó fija en 25 °C y la salinidad en 22 ‰.

Una vez en el laboratorio, los organismos fueron lavados de acuerdo al método indicado en APHA (1995), eliminando los epibiontes evidentes y el lodo adherido a las valvas con cepillos de plástico y acción mecánica con tubos de PVC, utilizando agua corriente. Fueron enjuagados y posteriormente sumergidos en alcohol al 70 % por un espacio de 10 minutos. Se enjuagaron nuevamente con agua corriente y se tomaron parámetros morfométricos para garantizar la selección de organismos homogéneos, adultos, de talla comercial. Los parámetros fueron: largo, ancho y alto, medidos con vernier (0.1 mm ± 0.05), y el peso total con balanza de plato Ohaus (± 0.0005 g).

2.3 FASE DE MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS.

En cada colecta, los organismos fueron colocados en un sistema de mantenimiento por un período que fluctuó entre 10 y 28 días, antes de ser sometidos a bioensayo. Este período fue establecido de acuerdo a pruebas previas, tal como se describe en el Anexo 7.1. Se introdujeron 144 ejemplares seleccionados como homogéneos, en el sistema de mantenimiento. Este sistema, de 600 L de capacidad, con circulación cerrada, contaba con: 12 acuarios, aireación, un filtro de carbón y antracita para partículas y un filtro biológico húmedo-seco (Fig. 2). Se colocaron doce organismos en cada una de las doce cámaras interconectadas (Fig. 3). Con el fin de garantizar contaran con las óptimas condiciones, la temperatura se mantuvo a 25 °C y la aireación fue constante (> 5 mg/L de oxígeno disuelto). La salinidad se ajustó a razón de 0.5 ‰ por día, desde los valores determinados en cada colecta en campo, hasta alcanzar los niveles seleccionados para los bioensayos (22 ‰). Se utilizó agua salina artificial Instant Ocean (Shumway y Köehn, 1982), preparada y prefiltrada desde un mes antes en cada colecta para su adecuada maduración. Los organismos permanecieron un mínimo de 8 días con salinidad constante a 22 ‰ antes de realizar las pruebas. Se llevó a cabo la limpieza del sistema cada tercer día para la extracción de heces y residuos de alimento. Se determinaron diariamente los parámetros fisicoquímicos anteriormente mencionados con el multianalizador Horiba U-10 (Fig. 3). Cada semana se midieron los niveles de amonio total por la técnica de azul de indofenol, indicada por Lind (1985). La morfometría se determinó al incluir y al extraer a los organismos del sistema.

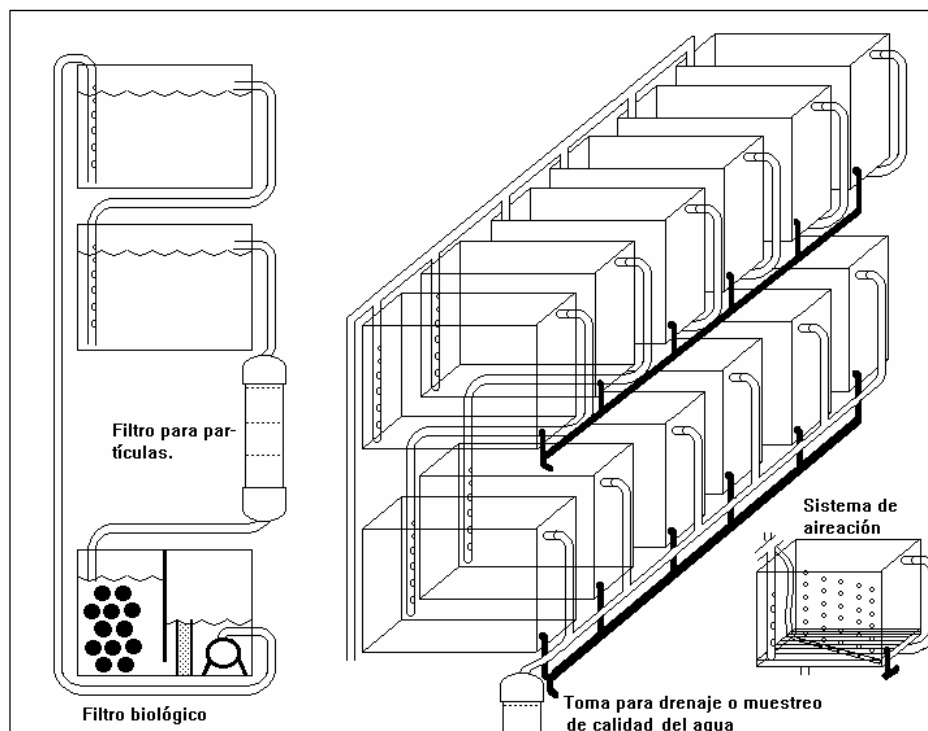


Figura. 2. Esquema del sistema de mantenimiento en el laboratorio para los organismos.

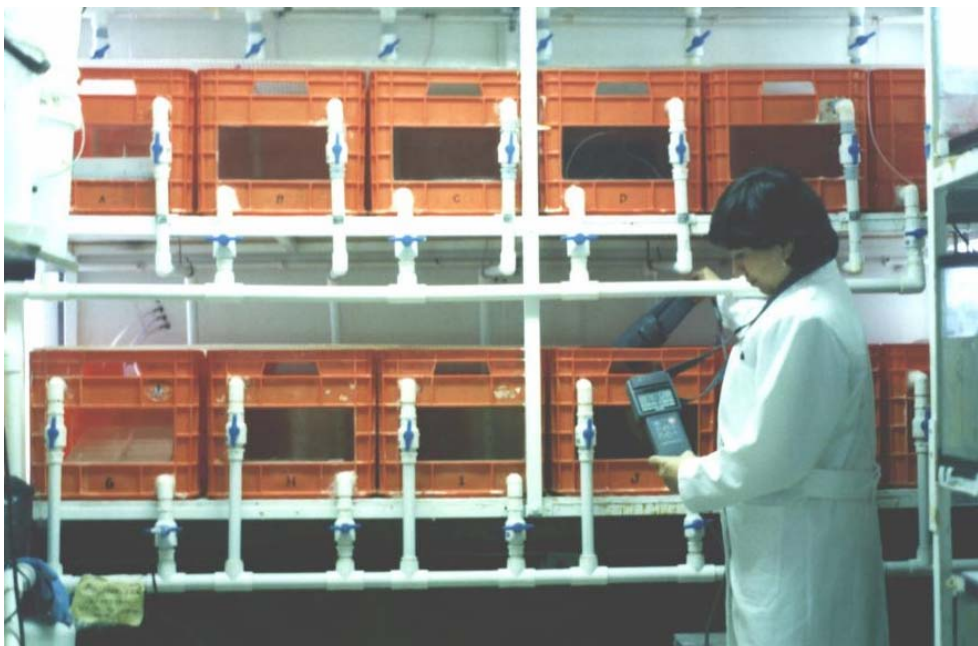


Figura. 3. Monitoreo diario de parámetros físico-químicos en el sistema de mantenimiento.

Alimentación de los organismos.

Para la alimentación de los organismos se escaló un cultivo del alga *Tetraselmis suecica* (Kyllin), cultivada en el medio Gillard f-2 (Castrejón *et al.*, 1994), desde recipientes de 250 mL hasta 20 L, bajo luz continua. (Fig. 4).

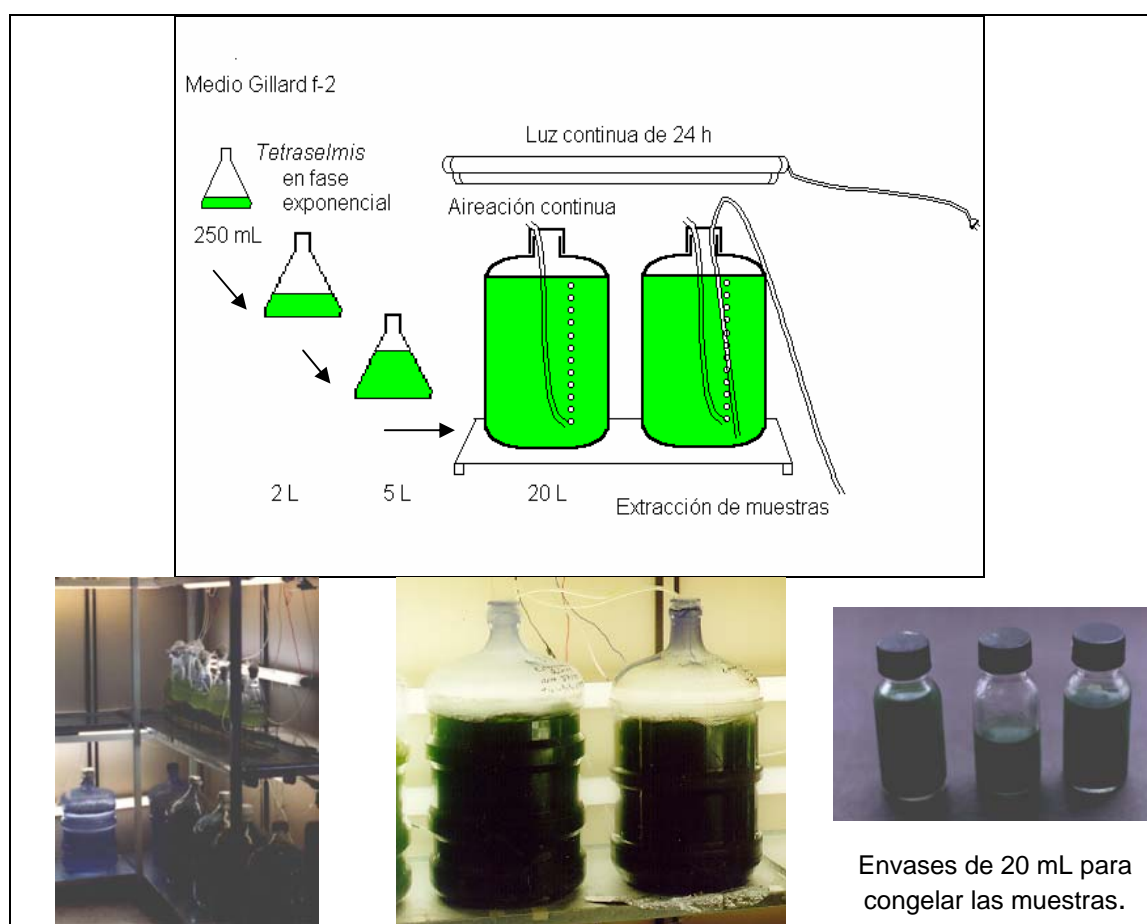


Figura. 4. Escalamiento del cultivo de *Tetraselmis suecica* hasta la fase exponencial y conservación de las células para alimentar al ostión.

Con el fin de obtener la densidad máxima de células, se llevó hasta la fase exponencial de división celular. Una vez alcanzada, todo el cultivo fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 min en una centrífuga Solbart, en tubos de 50 mL. Se eliminó el sobrenadante y los concentrados de células fueron congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frascos de 20 mL (Fig. 4). Para la alimentación de los organismos, las células se descongelaron cada día según los requerimientos. Una vez descongeladas se midió la densidad por hemocitómetro, para ajustarla a 300,000 cel/mL aproximadamente. Las células se dividieron en doce partes para cada uno de los dispositivos del sistema. La concentración de células se determinó nuevamente en cada cámara para asegurar una densidad de 15 a 20×10^6 células por organismo por día (Castrejón *et al.*, 1994). Durante la alimentación se detuvo el flujo del agua, dejando solo el burbujeo por una hora, para que las células de *T. suecica* se mantuvieran resuspendidas. Este procedimiento se llevó a cabo diariamente.

2.4 MODELO CONCEPTUAL.

El análisis se basó en el siguiente modelo (Fig. 5). Se llevó a cabo la evaluación del efecto letal de ambos metales determinando la concentración letal media, y la concentración letal corporal media para asociar el efecto respecto a la concentración de exposición y al metal incorporado en el organismo. Los resultados de esta fase sirvieron como base para seleccionar las concentraciones de prueba a las cuales fueron sometidos los animales posteriormente. Durante la evaluación subletal se obtuvieron las respuestas de los biomarcadores a nivel bioquímico

(metalotioneínas y lipoperoxidación) y fisiológico en diferentes plazos. Estas últimas fueron utilizadas para alimentar los modelos de evaluación denominados integraciones simples, que son obtenidos directamente de las respuestas, así como el balance energético considerado como integración compleja.

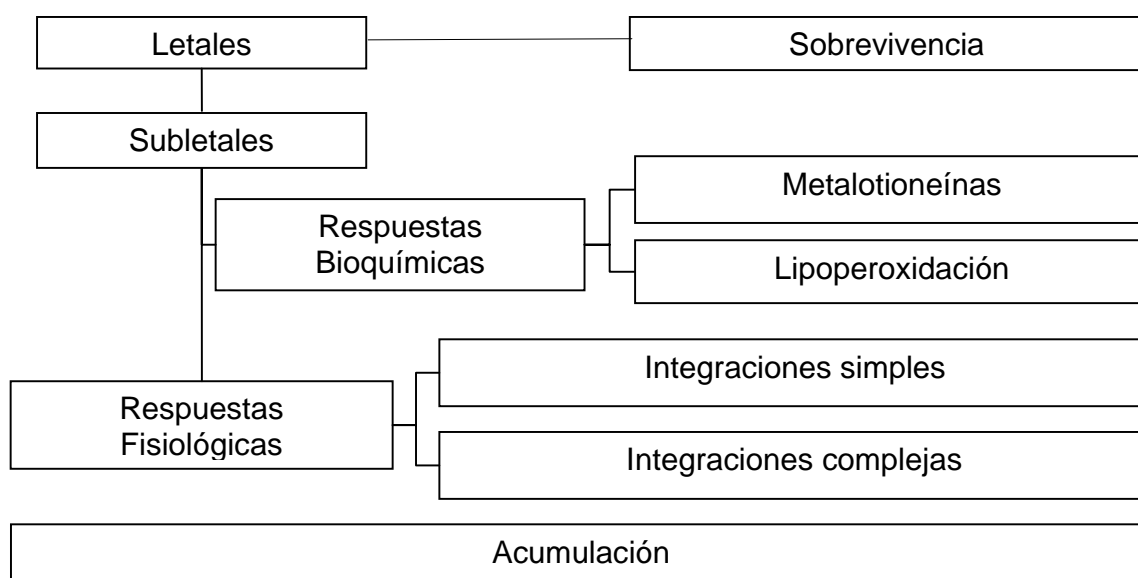


Figura. 5. Modelo conceptual de la evaluación de los efectos de Cr y Cd en *C. virginica*.

2.5 FASES EXPERIMENTALES.

Los bioensayos se llevaron a cabo en agua con salinidad de 22 ‰ y temperatura de 25 °C, que es el promedio del intervalo óptimo para el cultivo de ostión indicado por la Secretaría de Pesca (SEPESCA, 1988). Estas condiciones son a la vez similares a los parámetros fisicoquímicos obtenidos en la laguna de Mandinga en el

ciclo 1996-1997, datos proporcionados por el Laboratorio de Ecosistemas Costeros de la UAM y que fueron a la vez seleccionados para el período de mantenimiento. Los organismos, seleccionados al azar, se trasladaron a los acuarios experimentales y estuvieron en ayuno 24 horas antes de exponerlos a los metales en evaluación (Cr y Cd), tanto en las pruebas letales como en las subletales.

2.5.1 FASE LETAL.

Los ostiones no fueron alimentados durante esta fase. Se llevaron a cabo dos bioensayos semiestáticos de 168 h, en los meses de septiembre y diciembre de 1997, utilizando en cada uno 80 organismos morfométricamente homogéneos (74.9 mm de longitud, 42.13 g de peso total) con un índice de condición de 101.7 g/mL, considerado adecuado, el cual fue calculado de acuerdo a Walne (1984):

$$IC = P \times 1000 / V$$

IC = Índice de Condición, P = Media del peso de masa viva (gPH), V = Media del volumen intervalvas del lote de organismos en experimentación (mL).

Se colocaron ocho ostiones por concentración, por duplicado, en acuarios de vidrio de 40 L de capacidad (Fig. 6). Los organismos fueron expuestos a las siguientes concentraciones de Cr: 3.53, 8.26, 21.48, 25.20 y 35.19 mg/L. El metal se adicionó desde una solución de 100 g Cr/L de $K_2Cr_2O_7$ (Baker Analyzed) en el volumen necesario para alcanzar las concentraciones experimentales. En el caso del Cd, los ostiones fueron expuestos a: 5.75, 13.05, 18.85 y 30.50 mg/L. El Cd fue incorporado como $CdCl_2 \cdot 2 \frac{1}{2} H_2O$ (Baker Analyzed) a partir de una solución de 50

g Cd/L, hasta alcanzar las concentraciones deseadas en el experimento. En ambos bioensayos se consideró un grupo control sin exposición al metal, también por duplicado.



Figura. 6. Dispositivos experimentales de la fase aguda.

Durante los ensayos se registraron diariamente el oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y la salinidad; cada tercer día se midió el amonio total con la técnica indicada por Lind (1985). Cada 48 h, se hicieron recambios parciales de agua, correspondientes al 25 % del volumen de agua en todos los acuarios. La mortalidad fue monitoreada cada dos horas durante el primer día de ensayo y posteriormente cada 12 horas. El criterio para determinar muerte del organismo fue la apertura permanente de valvas.

La morfometría de los organismos fue determinada al inicio y al final del bioensayo. El IC fue calculado solo en los sobrevivientes. La disección de cada organismo

para la determinación del contenido de metales, se llevó a cabo con material de plástico previamente lavado con HNO₃ 10%. El tejido fue pesado y se secó a 60 °C hasta peso constante en una estufa Coleman. Los organismos sobrevivientes se sacrificaron al final del ensayo, siguiendo con ellos este mismo procedimiento. Posteriormente se cuantificó el metal acumulado en tejido (ver inciso 2.6).

El peso seco medido al final del ensayo, fue comparado con el esperado para organismos de la misma talla, calculándolo con la ecuación morfométrica obtenida por Powell *et al.* (1992):

$$L_j = w_j^{0.32} * 10^{0.67}$$

L = longitud (mm), w = peso seco del organismo para la clase de talla j (gPS).

Se tomaron muestras de agua para la determinación de metales desde el inicio, hasta el final de la prueba, en diferentes plazos (ver inciso 2.6).

La concentración letal media (CL₅₀) y la concentración letal corporal media (CLC₅₀) fueron calculadas para varios períodos de experimentación (72, 96, 120 y 168 h), a través del método Probit utilizando el programa DORES (Ramírez, 1989). Para la determinación de la CL₅₀ se consideraron las concentraciones determinadas en agua (mg/L), y para la CLC₅₀, las concentraciones determinadas en tejido (μg/g peso seco). Para el establecimiento de la CL₅₀ y la CLC₅₀, se seleccionaron los modelos con menor variación y mejor ajuste.

El factor de bioconcentración (Buikema *et al.*, 1982), fue calculado como:

$$FBC = Ct / Ca$$

FBC = factor de bioconcentración, Ct = concentración en tejido (μg/gPS) y Ca = concentración en agua (mg/L).

2.5.2 FASE SUBLETAL.

Las concentraciones elegidas para llevar a cabo las pruebas del efecto subletal, se establecieron con base en las CL_1 , calculadas para 96 h, a partir de las CL_{50} obtenidas en la fase letal, así como en pruebas previas realizadas en la misma especie con otros metales (Connors y Ringwood, 1997). Adicionalmente, se consideró la concentración del medio externo en el cual fueron colectados los organismos y los niveles aceptables en agua que vierte a cuerpos acuáticos según la legislación mexicana. Así mismo se consideraron los niveles externos en los que la bioacumulación en tejido se estima aceptables para el consumo humano de acuerdo con la NOM-031-SSA1-1993 y la FDA (1993).

2.5.2.1 FASE DE EVALUACIÓN DE RESPUESTAS BIOQUÍMICAS.

Se efectuaron dos bioensayos semiestáticos de 96 h, con recambio para valorar el efecto subletal de la exposición al Cr y al Cd sobre dos respuestas bioquímicas: un biomarcador de exposición (metalotioneínas) y otro de efecto (lipoperoxidación). Las pruebas se realizaron en julio y agosto de 1998. En cada bioensayo se utilizaron dos concentraciones de cada metal: 88 $\mu\text{g/L}$ y 144 $\mu\text{g/L}$ de Cr, y 110 $\mu\text{g/L}$ y 211 $\mu\text{g/L}$ de Cd, además de un grupo control, sin adición de los metales.

En la primera prueba, se utilizaron 60 ejemplares de talla comercial, en acuarios de 40 L, colocando 6 ostiones en cada una de las cuatro concentraciones y en el control, por duplicado. Diariamente se extrajeron dos organismos por condición experimental, incluyendo a los controles. Los ostiones se extrajeron a las 6 h de exposición, a las 24, 48, 72 y 96 h. Los organismos restantes de cada lote, se utilizaron para determinar metales en los tres órganos destino: branquia, músculo abductor y glándula digestiva. La disección de estos tejidos (0.1 - 0.2 g) se realizó con instrumentos de plástico.

En el segundo bioensayo, se utilizaron 80 organismos también en acuarios de 40 L, en este caso, 8 en cada una de las cuatro concentraciones y los controles, por duplicado. Se extrajeron cinco ejemplares después de 6 h de exposición (día 1), cinco a las 48 h (día 3) y cinco a las 96h (día 5), para cada condición. Los ostiones restantes se utilizaron para la determinación de metales en tejido al final de esta prueba también.

Diariamente se realizó el monitoreo y ajuste de los parámetros fisicoquímicos, los cuales se mantuvieron similares a los de las pruebas anteriores. Al término de las pruebas, se obtuvo la morfometría de los organismos (longitud, ancho, alto, peso total y peso húmedo), aunque no fue posible determinar el peso seco, ya que diferentes partes del organismo fueron extraídas para las pruebas bioquímicas. Las concentraciones de metales en agua se obtuvieron en muestras tomadas al inicio y al final de ambos experimentos.

A. Metalotioneínas.

Para la cuantificación de metalotioneínas, las muestras fueron homogenizadas con 4 volúmenes de sacarosa 0.25 M (relación 1 : 4; peso : volumen) y posteriormente congeladas a – 85 °C en un congelador REVCO para su posterior procesamiento.

La producción de metalotioneínas se evaluó por la técnica de saturación de plata de Scheuhammer y Cherian (1991), que consiste en la sustitución de los metales unidos a las metalotioneínas, por la plata, ya que este metal es más afín a estas proteínas. Se utilizó posteriormente un hemolisado de sangre de cordero para arrastrar en la hemoglobina los metales no atrapados en las metalotioneínas. Posteriormente fueron eliminadas las moléculas no deseadas por baño María (hirviendo, 2 min) y centrifugación a 4,000 RPM, recuperando el sobrenadante. Este fue centrifugado a 13,000 RPM por 5 min. La concentración de metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) se determinó por la lectura de la concentración de plata remanente a través de espectrofotometría de absorción atómica.

B. Lipoperoxidación.

La lipoperoxidación solo se determinó en glándula digestiva (0.1 g), este procedimiento se realizó inmediatamente después de la extracción de las muestras. La peroxidación de lípidos se estableció por producción de componentes reactivos al ácido tiobarbitúrico (Bucio *et al.*, 1995), expresados como equivalentes de la

concentración de malondialdehído (nmol/mg proteína), el cual representa más del 80% de los componentes reactivos al ácido tiobarbitúrico que se asocian a lipoperoxidación (Bucio, *et al.*, 1995).

Parte de la muestra fue separada para determinar proteínas, este tejido fue congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inmediatamente después de su extracción, para realizar el análisis mas adelante. Las proteínas fueron determinadas a través de la técnica de Lowry (Cooper, 1977), que se basa en una lectura colorimétrica cuyo indicador es el reactivo de Folin y que utiliza como base una curva patrón de albúmina bovina.

2.5.2.2 EVALUACIÓN DE RESPUESTAS FISIOLÓGICAS.

Para evaluar las respuestas fisiológicas planteadas, asociadas a la exposición subletal de los metales Cr y Cd, se llevó a cabo un bioensayo con duración de veinte días en octubre de 1998. La exposición fue semiestática. Diariamente se eliminó y repuso en las cámaras experimentales un litro de agua con la concentración del metal correspondiente. También se midieron los parámetros fisicoquímicos, los cuales se mantuvieron en las condiciones antes descritas (aireación constante, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 22 ‰). El diseño requirió colocar los organismos en cámaras individuales de cristal, de 3.78 L de capacidad, cada una de las cuales contaba con mangueras para la aireación, la colocación de alimento, el recambio de agua y la extracción diaria de heces (Fig. 7).

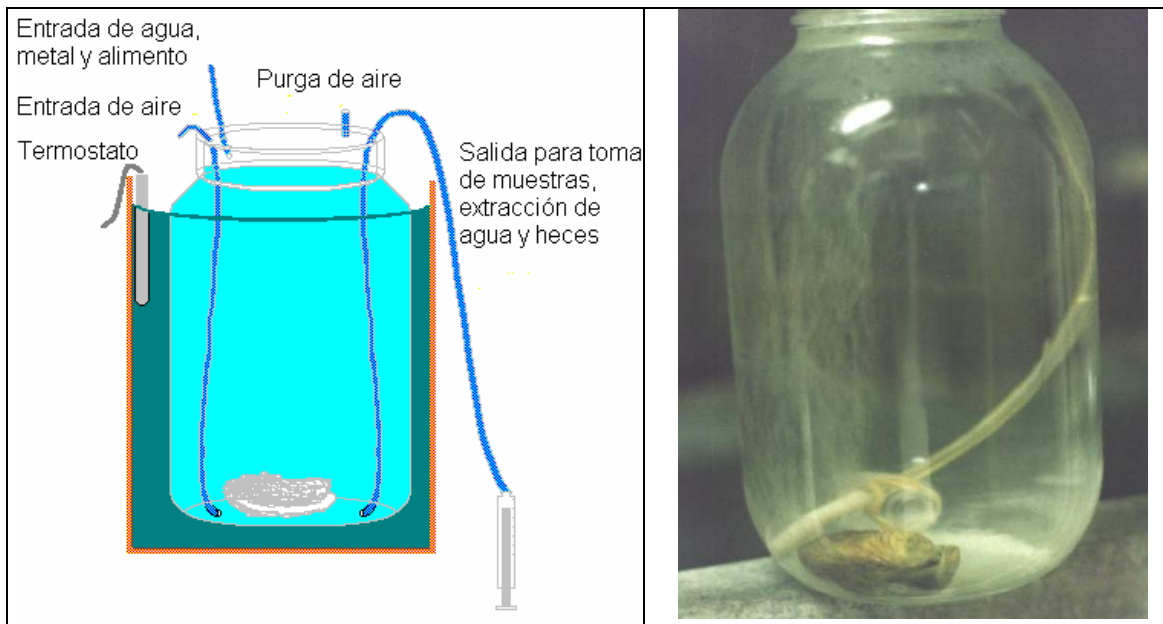


Figura. 7. Cámaras individuales utilizadas para la evaluación de efecto subletal de la exposición a Cr y Cd en *C. virginica*.

Los ostiones fueron expuestos a dos concentraciones de Cd: 95 $\mu\text{g/L}$ y 170 $\mu\text{g/L}$, y dos de Cr: 80 $\mu\text{g/L}$ y 180 $\mu\text{g/L}$. Se utilizaron doce cámaras individuales por concentración y doce cámaras control con organismos no expuestos a los metales. Además se colocaron seis cámaras sin organismos en las cuales se efectuaron todos los registros de manera semejante a las cámaras con organismos y se determinó la depositación de células. A diferencia de las fases anteriores, los organismos fueron alimentados durante el período experimental, siguiendo el patrón establecido de 1 a 15 $\times 10^6$ células por organismo por día, efectuándose los ajustes pertinentes para garantizar la densidad adecuada de células por organismo, en los dispositivos de ensayo. Se emplearon 60 organismos para esta prueba.

A. Respuestas aisladas.

A lo largo del período experimental (tabla 3) fueron evaluados el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada, el consumo de alimento y la producción de heces. El consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada, fueron estimados cinco veces, para lo cual, dejó de proporcionarse alimento 24 horas antes de las determinaciones, con el fin de eliminar una presencia excesiva de materia orgánica y garantizar la condición postabsortiva de los organismos. Los ostiones fueron alimentados en catorce ocasiones, aunque solo en ocho se evaluó el consumo de alimento. Las heces se extrajeron diariamente.

Tabla 3. Calendarización de la evaluación de respuestas fisiológicas.

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	A		A		A	A	A	A		A	A	A		A	A	A	A		A	
			R		R					R				R						R
						C	C	C			C	C			C	C	C			

A, alimentación y extracción de heces; R, respirometría y excreción nitrogenada; C, consumo de alimento.

El consumo de oxígeno (Shumway y Köehn, 1982), se registró en las cámaras cerradas herméticamente, suspendiendo la aireación, a través de la diferencia de concentración de oxígeno disuelto en el agua al inicio y al término de 6 h después de eliminar la aireación. La concentración de oxígeno se determinó con el multianalizador Horiba U-10 en mg/L. El consumo de oxígeno se calculó en mg O₂ / h / individuo y se corrigió eliminando el consumo de oxígeno en las cámaras sin

organismos; posteriormente se calculó el consumo en mg O₂/ h / g PS.

En el mismo período se calculó la excreción nitrogenada por la diferencia en la concentración de amonio total en el agua, en las mismas 6 h. La concentración total de amonio se determinó en mg/L por la técnica Lind (1985). Se calculó la producción en mg N-AT / h / individuo y se corrigió considerando la producción de las cámaras sin organismos; después se expresó en mg N-AT /h / g PS.

El consumo de células de *Tetraselmis suecica* por día, se evaluó a través la desaparición de células (Navarro y Winter, 1982; Powell *et al.*, 1992) 6 h después de la colocación del alimento en cada cámara, suspendiendo la aireación. La densidad de células por mL se determinó con hemocitómetro al inicio y al final de este plazo. Al consumo individual, se le restó la depositación de células observada en las cámaras sin organismos.

La producción de heces (g) se midió por gravimetría, extrayéndolas diariamente al hacer el recambio de agua de cada cámara. Las muestras se colectaron en papel filtro Whatman rápido, previamente pesado. Posteriormente, el papel fue pesado con la muestra, secado hasta peso constante en horno a 60 ° C y pesado nuevamente.

Al final del bioensayo, se obtuvo la morfometría de los ejemplares y se tomaron muestras para determinar los niveles de Cr y Cd en tejido. También se obtuvieron muestras de agua de todas las cámaras al inicio, en el día 10 y al final del experimento para la determinación de los metales (ver inciso 2.6).

Las respuestas fisiológicas evaluadas se incorporaron en varios modelos simples y complejos, que se describen a continuación.

B. Integraciones simples.

Índice de condición (IC).

El peso seco obtenido se comparó con el peso esperado en los organismos a través del modelo de Powell, *et al.* (1992) y se determinó el IC (Walne, 1984), ambos descritos previamente.

Relación atómica O:N.

Esta se obtuvo a partir de los resultados del consumo de oxígeno (mg O₂/ h / g PS) y la producción de amonio total (mg N-AT/ h / g PS), de acuerdo a Dillon y Lynch (1981).

Tasa de filtración.

A partir del consumo de alimento, se calculó esta tasa, con la fórmula indicada por Griffiths y Griffiths (1987):

$$TF = V / [N \times t] * \log_e C_0 / C_t$$

TF = Tasa de filtración (L/h); t = tiempo (h); V = volumen en suspensión (L), N = número de organismos, C₀ y C_t = Concentración de partículas inicial y al tiempo t (cel/L).

Los valores esperados de las tasas alta y baja de filtración se calcularon, través de las ecuaciones alométricas de Powell *et al.* (1992):

$$TB = -7.44 \times 10^{-2} + [1.33 \times 10^{-2} * L] + [1.80 \times 10^{-4} * L^2]$$

$$TA = -1.20 + [0.12 * L] + [8.16 \times 10^{-5} * L^2]$$

TB = Tasa Baja (L/h); L = Longitud (mm); TA = Tasa Alta (L/h).

Asimilación del alimento.

Esta se calculó a partir del alimento ingerido (células / d). La ingestión se expresó en unidades de energía (cal / d / gPS). El contenido energético se determinó a través del contenido calórico promedio de seis muestras de 0.2 g PS de *T. suecica*, con un número de células conocido, valor que se extrapoló a los datos del consumo diario de células por organismo. En el caso de las heces se consideró el peso seco producido individualmente (gPS / d). El valor calórico de cada muestra, se obtuvo por la lectura directa de las mismas, restando el valor calórico del papel donde se filtró. Todas las muestras se procesaron en una bomba calorimétrica Semimicro de Parr Instruments. La asimilación del alimento ingerido fue calculada como indica Widdows (1978) a través de la siguiente fórmula:

$$A = I - H$$

A = Asimilación (cal / d / gPS), I = Ingestión (cal / d / gPS), H = Excreción por heces (cal / d / gPS).

Eficiencia de asimilación del alimento.

Esta se determinó con la relación entre la asimilación y la ingestión del alimento ingerido (Widdows, 1978):

$$EA = A / I$$

EA = Eficiencia de asimilación (%), A = Asimilación (cal/d/gPS), I = Ingestión de alimento (cal/d/gPS).

Metabolismo basal.

Esta se determinó como el requerimiento energético del organismo sin actividad, interpretado como la ordenada al origen de la relación entre el consumo de oxígeno y la tasa de filtración promedio (Griffiths y Griffiths, 1987), expresados ambos en cal / h. El punto donde no hay filtración pero se consume oxígeno corresponde a la

metabolismo basal. Esta tasa se obtuvo para los días 5, 10 y 15 de los bioensayos expresada en valores calóricos (cal / h) (Griffiths y Griffiths, 1987).

C. Integraciones complejas.

Campo de crecimiento.

A través de la ecuación del campo de crecimiento, en la cual se integran las diferentes respuestas fisiológicas evaluadas, se determinó el balance energético de los organismos (Widdows, 1993):

$$P = I - (R + H + U)$$

P = Producción o energía disponible para crecimiento (cal/d/gPS), I = Ingestión de alimento, R = Respiración o consumo de oxígeno, H = Producción de heces, U = Excreción nitrogenada.

Los valores de la ingestión de alimento y la producción de heces se obtuvieron en cal / d / gPS. Para el consumo de oxígeno (mg O₂ / h / gPS), los valores fueron transformados a mL/h dividiendo entre 1.428, y transformados a valores energéticos utilizando el equivalente calórico de 4.8 cal/ mL O₂ (Griffiths y Griffiths, 1987) y finalmente extrapolados a cal / d / gPS. La excreción nitrogenada (mg N-AT / h / gPS), fue transformada a valores energéticos (cal / h / gPS) utilizando el coeficiente calórico de 5.94 cal / mg N-AT (Elliot y Davidson, 1975; Vanegas, 1996) y desde ahí a cal / d / gPS.

2.6 DETERMINACION DE METALES.

Las concentraciones de metales totales se determinaron en el agua de los acuarios y en los organismos experimentales.

A las muestras de agua de 45 mL se adicionaron 5 mL de ácido nítrico para disolver toda la materia orgánica asociada a los metales, que pudiera interferir con las lecturas. Una vez fijadas, se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su procesamiento. Para la digestión se colocaron en vasos de teflón, donde se dejaron 5 min en una campana de extracción y se cerraron los recipientes, los vasos se colocaron en un horno de microondas CEM-MDS-81D por 10 min al 80 % de potencia del aparato. Esta corrida fue establecida con pruebas previas, utilizando muestras de agua del ambiente en que se colectaron los organismos

Las muestras del tejido extraído de los organismos, tanto en organismos completos como en órganos disectados, fueron pesadas en cajas petri previamente lavadas, posteriormente secadas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta peso constante, y almacenadas hasta su procesamiento. El tejido fue digerido acorde al método propuesto por Huan (1994), el cual requirió ajustes para adecuarlo al horno utilizado (descrito en el Anexo 7.2).

Se procesaron 0.25 g del tejido de ostión, en el caso de animales completos. En el análisis por tejidos (branquia, músculo abductor y glándula digestiva), se pesó la muestra total del tejido.

Los metales se determinaron con un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) Varian AA20 ($\pm 0.005\text{ mg/L}$), provisto con flama de aire-acetileno. Se utilizaron como referencia muestras proporcionadas por el Centro Nacional de

Metrología con 4.0 ± 0.12 mgCr/L, en la cual se leyó 4.02 mgCr/L y con 1.45 mgCd/L ± 0.059 , donde se leyó 1.40 mgCd/L. No se requirió horno de grafito para las lecturas.

2.7 ESTADÍSTICA APLICADA EN EL ANÁLISIS DE DATOS.

El análisis se llevó a cabo con los paquetes de Excell de ambiente Windows versión 95 y XP2000, y con el programa Statistica de Statsoft Ser. (1997).

Antes de aplicar las pruebas estadísticas, se realizó el análisis exploratorio de datos para comprobar si las poblaciones cumplían con las cuatro hipótesis fundamentales: aditividad, homocedasticidad, independencia y normalidad (de acuerdo con Tuckey, 1977), para determinar la conveniencia de la aplicación de análisis paramétricos o no paramétricos. Se incluyeron en este análisis los datos de parámetros fisicoquímicos, la morfometría, las lecturas iniciales y finales de todos los parámetros, así como los modelos que integraron los resultados.

Para la comprobación de la independencia de los datos se utilizó el test de ciclos por encima y debajo de la mediana (Sokal y Rolhf, 1969); para la comprobación de la independencia se usó la prueba de Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov (Marques de Cantú, 1991); para la comprobación de la homocedasticidad u homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de Bartlett (Sokal y Rolhf, 1969), y para probar la aditividad la prueba de Tuckey (Sokal y Rolhf, 1969).

En las poblaciones de datos aditivos, independientes, normales y homocedásticos, se utilizaron pruebas de tipo paramétrico. En estos casos, se aplicó la prueba de t

de student para datos apareados y no apareados, según el tipo de datos generados, análisis de varianza (ANOVA) y coeficiente de correlación de Pearson (Marques de Cantú, 1991).

En el caso de que las poblaciones de datos no cumplieran con las hipótesis mencionadas, se aplicaron pruebas de tipo no paramétrico: la prueba de rango para muestras independientes o U de Mann-Whitney (Marques de Cantú, 1991) para comparar dos grupos de datos apareados; en datos no homocedásticos se hizo comparación de medias con la prueba de Wilcoxon (Sokal y Rohlf, 1969); en poblaciones no normales, ni homocedásticas la comparación de medias, se llevó a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis; para correlación de datos se utilizó en coeficiente de Spearman por rangos (Marques de Cantú, 1991).

Con el fin de expresar la dispersión de los datos de manera unificada, los valores se expresaron en promedios con desviación estándar. La significancia de las pruebas fue $P < 0.05$ en todos los casos, aunque en casos particulares se indicó si $P < 0.01$.

3. RESULTADOS

3.1 CONCENTRACIONES DE METALES EN LA LAGUNA DE MANDINGA.

Las colectas realizadas en la laguna de Mandinga permitieron obtener las concentraciones de Cr y Cd en el agua y los niveles acumulados en organismos recién extraídos (tabla 4). El promedio general en agua fue para Cr de 0.080 mg/L y para Cd fue de 0.078 mg/L. Los ostiones recién extraídos en septiembre de 1998, tuvieron un promedio (\pm desviación estándar, DE) de 1.2 μg Cr/gPS \pm 0.6 y 2.3 μg Cd/gPS \pm 1.1.

Tabla 4. Concentraciones promedio de Cr y Cd en agua (mg/L) y ostión ($\mu\text{g/gPS}$) de la laguna de Mandinga.

	Cromo		Cadmio	
	Agua (mg/L)	Ostión ($\mu\text{g/gPS}$)	Agua (mg/L)	Ostión ($\mu\text{g/gPS}$)
Mayo 1997	0.111	ND	0.068	ND
Septiembre 1997	ND	ND	0.083	ND
Noviembre 1997	0.029	ND	ND	ND
Julio 1998	0.099	ND	ND	ND
Septiembre 1998	ND	1.2	0.082	2.3
Promedio general	0.080		0.078	

Los parámetros fisicoquímicos registrados en el sitio de extracción de los ostiones durante las colectas, indicaron por lo general, salinidad más baja, de 17.7 ‰ y temperatura más alta, 26.5 °C, que las establecidas para los bioensayos, de 22 ‰ y 25 °C. Las condiciones de oxigenación promedio, fueron de 5.75 mg/L y el pH fue

cercano a neutro, 7.32, (tabla 5). Los valores de oxígeno disuelto y pH registrados en Mandinga indican valores típicos de una laguna costera.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos registrados en la laguna de Mandinga durante las colectas del ostión *C. virginica*.

Colecta	Fase	pH	OD (mg/L)	Sal (‰)	Temp (°C)	Turb (UT)
Oct. 1996	Montaje del sistema de mantenimiento	7.67	5.84	11.9	29.2	ND
May. 1997	Montaje del sistema de alimentación	6.63	5.42	29.2	26.5	9
Sept. 1997	Bioensayo de letalidad para Cadmio	ND	ND	13.0	28.0	ND
Nov. 1997	Bioensayo de letalidad para Cromo	7.82	7.22	19.1	22.1	10
Jul. 1998	Bioensayo de subletalidad, pruebas bioquímicas	ND	ND	ND	ND	ND
Sept. 1998	Bioensayo de subletalidad, pruebas fisiológicas	7.51	4.61	9.4	29.4	20

OD, Oxígeno disuelto; Sal, Salinidad; Temp., Temperatura; Turb, turbidez; ND, No determinado.

3.2 PERÍODO DE MANTENIMIENTO.

El tiempo de mantenimiento adecuado, la forma de alimentación y el método de conteo de células más conveniente, quedaron establecidos de acuerdo con las pruebas previas a las fases experimentales, descritas en el Anexo 7.1.

Los períodos de mantenimiento anteriores a las fases experimentales definitivas, tuvieron una duración de 16 a 28 días, para las pruebas letales y subletales.

El conteo de células se llevó a cabo por hemocitómetro en 0.2 mL de cultivo de *T. suecica* o de su dilución para colocación en cámaras y acuarios. De acuerdo con la Secretaría de Pesca (1988), la concentración de células adecuada para alimentar al ostión en cultivo es de 1 a 15 X 10⁶ células promedio al día, concentración que permite incorporar unas 10,000 células/L, durante una hora. Castrejón *et al.*,

(1994), indican que la concentración adecuada para alimentar a estos organismos se encuentra entre 15 a 20 X 10⁶ células por día. Se colocaron entre 8,000 y 26,000 células/L durante los períodos de mantenimiento. Las pruebas experimentales se realizaron con concentraciones entre 10,000 y 20,000 células/L (tabla 6). Se determinó que un intervalo de una hora, suspendiendo durante ese período la aireación, era suficiente para que los organismos incorporaran el número de células adecuado, asegurando la obtención de heces y no de pseudoheces. Las concentraciones de células colocadas en el sistema de mantenimiento presentaron cierta variación, pero se consideraron dentro del intervalo aceptable. Debido a que las células remanentes no podían eliminarse de los recipientes, se realizó el conteo de células diariamente para garantizar que no se acumularan por arriba de lo recomendado.

Tabla 6. Cantidad promedio de células de *T. suecica* proporcionadas como alimento a cada ostión diariamente (células/mL).

	Fase de mantenimiento	Fase experimental
Prueba aguda con Cr	15,964	No se alimentaron
Prueba aguda con Cd	20,074	No se alimentaron
Pruebas bioquímicas Cr y Cd	13,356	10,312
Pruebas fisiológicas Cr y Cd	26,120	9,769

3.2.1 Parámetros fisicoquímicos.

Los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados durante las fases de mantenimiento previas a la experimentación se presentan en la tabla 7. El

valor de pH fluctuó entre 7.92 y 8.41, los niveles promedio de oxígeno disuelto se encontraron entre 4.78 a 5.47 mg/L, la temperatura del sistema se mantuvo entre 23 °C y 25 °C. En el caso de la turbidez, los valores fueron bajos en general, alrededor de 1.0 UT, aunque no hubo registro en todos los casos. Algunos picos se asociaron a la colocación de los organismos en el sistema, el cual debía ser limpiado a las 48 h de la introducción de los ostiones, ya que estos tienden a excretar. Sin embargo, posteriormente los niveles se mantuvieron bajos (< 1.0 UT).

Tabla 7. Valores de los parámetros fisicoquímicos en las fases de mantenimiento previas a los bioensayos (promedio \pm DE).

Fecha	Fase	pH	Oxígeno disuelto(mg/L)	Salinidad (‰)	Temperatura (°C)	Turbidez (UT)
Mayo 1997	Montaje del sistema de alimentación	8.41 \pm 0.09	5.10 \pm 0.60	28.5 \pm 1.6	23.5 \pm 1.3	2.9 \pm 2.4
Sept. 1997	Prueba aguda con Cd	8.40 \pm 0.13	8.07 \pm 1.20	16.4 \pm 4.4	23.1 \pm 1.3	ND
Nov. 1997	Prueba aguda con Cr	8.08 \pm 0.33	5.47 \pm 0.86	20.2 \pm 0.9	23.3 \pm 1.3	3.5 \pm 3.8
Julio 1998	Prueba Bioquímicas 1 ^a	7.60 \pm 0.23	4.75 \pm 0.32	23.0 \pm 0.7	24.9 \pm 1.0	2.3 \pm 1.8
Julio 1998	Prueba Bioquímicas 2 ^a	7.92 \pm 0.38	4.89 \pm 0.28	23.3 \pm 0.6	24.5 \pm 0.8	1.0 \pm 1.6
Sept. 1998	Pruebas Fisiológicas	8.29 \pm 0.36	4.78 \pm 0.17	18.4 \pm 4.7	24.3 \pm 0.6	2.8 \pm 0.9

ND, No se determinó.

La salinidad fue el parámetro con mayor variación. Debido a que la registrada en la laguna, frecuentemente fue menor a la seleccionada para las pruebas, el ajuste requirió diferentes plazos de aclimatación de los organismos en cada ocasión, para alcanzar la salinidad de bioensayo (Fig. 8).

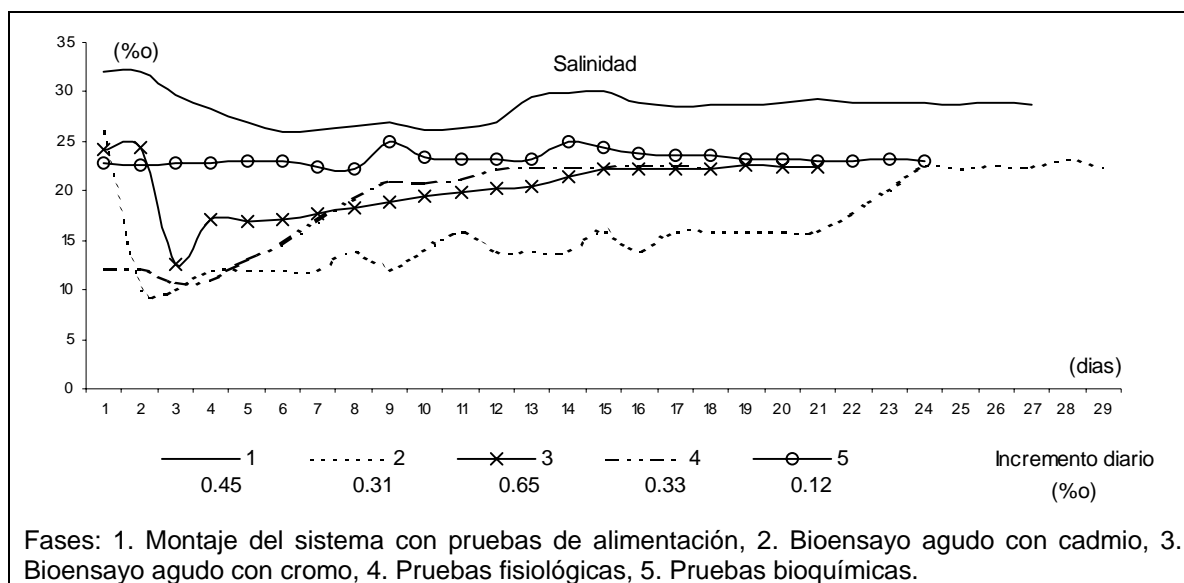


Figura. 8. Ajuste de la salinidad en el período de mantenimiento previo a los bioensayos.

3.2.2 Morfometría.

Durante la fase del montaje del sistema de alimentación, en la cual se utilizó el sistema de 200 L, se seleccionaron organismos de talla comercial (longitud > 5 cm), pero no se hizo el registro de su morfometría, por lo que no se cuenta con datos de este período.

Los lotes en mantenimiento, ya en el sistema de 600 L, tuvieron valores extremos de longitud de 52 y 97 mm, con un promedio de 69.8 mm (tabla 8). Los organismos colectados para las pruebas bioquímicas tuvieron una longitud de 68 mm, menor a la de los lotes restantes. El peso total, en promedio fue menor en los organismos colectados para las pruebas bioquímicas, 43.62 g, y mayor en los organismos que entraron a las pruebas fisiológicas, 53.41 g.

Tabla 8. Morfometría de los organismos en el sistema de mantenimiento (promedio \pm DE).

	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso total (g)
Bioensayo con Cd	69.6 \pm 8.8	46.2 \pm 5.9	25.5 \pm 4.0	47.84 \pm 10.36
Bioensayo con Cr	71.3 \pm 8.8	42.2 \pm 5.1	24.0 \pm 4.6	44.95 \pm 12.95
Bioensayo Bioquímico	68.0 \pm 8.8 *	40.4 \pm 4.9	23.5 \pm 4.3	43.62 \pm 9.79 *
Bioensayo Fisiológico	70.2 \pm 6.1	46.3 \pm 6.3	26.4 \pm 4.2	53.41 \pm 11.56 **

* valores menores, ** valores mayores ($P < 0.01$ por la prueba de Kruskal-Wallis).

En todos los parámetros morfométricos se presentaron casos extremos. El ancho de los ejemplares tuvo valores entre 29 y 77 mm, la altura entre 11 y 40 mm, así mismo las fluctuaciones en el peso fueron muy marcadas, de 22 a 132 g (Fig. 9).

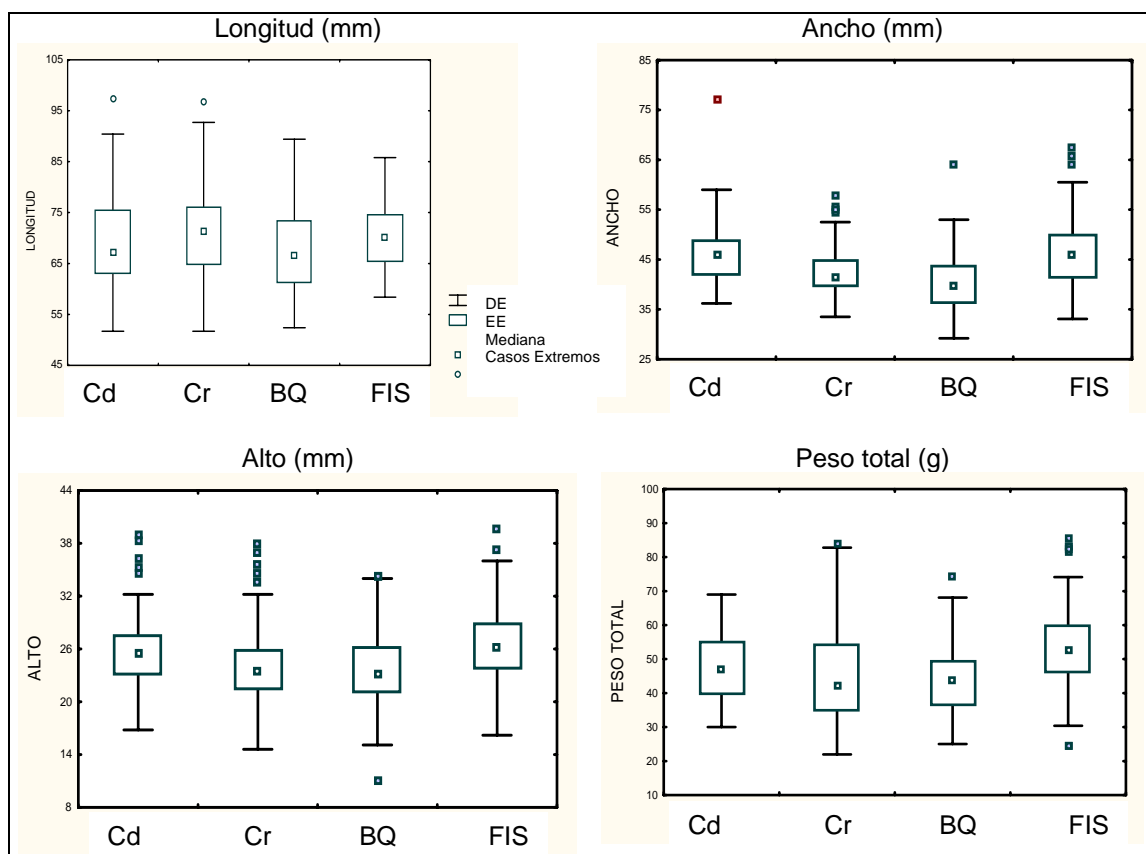


Figura 9. Morfometría de los ostiones en las fases de mantenimiento previas a la pruebas letales de Cr, Cd, las bioquímicas (BQ) y las fisiológicas (FIS). Se grafican medianas, error estándar (EE) y desviación estándar (DE).

3.3. FASE EXPERIMENTAL.

3.3.1. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.

Los valores promedio del pH, fluctuaron entre 8.15 y 8.35 (tabla 9). Los valores de los parámetros fisicoquímicos restantes no se consideraron semejantes entre las fases experimentales ($P < 0.05$, por la prueba de Kruskal-Wallis). Hubo algunas variaciones en el oxígeno disuelto, las cuales se presentaron principalmente en dispositivos con organismos expuestos a los metales. También llegaron a presentarse variaciones en la salinidad y la temperatura observadas en la fase de evaluación de efectos letales. Sin embargo, estas no presentaron correlación con mortalidad, ni con la concentración de los metales en los organismos. Estas conclusiones derivaron de un análisis detallado del comportamiento de los parámetros fisicoquímicos, descrito puntualmente en el Anexo 7.5 para todas las fases experimentales.

Derivado del mismo análisis, se llegó a la conclusión de que en la fase de evaluación de efectos subletales, tampoco hubo relación de los parámetros con la mortalidad que llegó a presentarse en las pruebas fisiológicas, ni con la concentración del metal en el agua o en el tejido de los animales. Se llegó a observar interacción temperatura-salinidad en las pruebas para evaluación de respuestas bioquímicas; la cual fue minimizada al eliminar de los datos anómalos y las respuestas de los organismos, así como los ejemplares que se encontraban en estos dispositivos experimentales.

Tabla 15. Parámetros fisicoquímicos en las fases experimentales (promedio \pm DE).

Fase de evaluación	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)	Salinidad (‰)	Temperatura (°C)
Aguda Cd, Oct. 1997	8.34 \pm 0.21	3.89 \pm 1.16	22.50 \pm 0.53	24.28 \pm 0.71
Aguda Cr, Dic. 1997	8.37 \pm 0.05	4.85 \pm 0.24	21.35 \pm 0.49	24.65 \pm 0.95
Bioquímica I, Jul. 1988	8.35 \pm 0.21	4.83 \pm 0.26	23.4 \pm 0.54	24.50 \pm 0.43
Bioquímica II, Ags. 1998	8.25 \pm 0.21	4.72 \pm 0.21	23.1 \pm 0.23	24.70 \pm 0.58
Fisiológica, Oct. 1998	8.15 \pm 0.27	3.95 \pm 0.83	21.72 \pm 1.34	24.66 \pm 0.47

El amonio total se encontró generalmente por debajo de 0.1 mg/L. Aunque en ocasiones se registraron valores elevados. Considerando la temperatura, la salinidad y el pH, en los cuales se realizaron los ensayos, la concentración de amoniaco de cada muestra podría representar entre 11 % y 13 % de las lecturas de amonio total (Aminot y Chaussepied, 1983). Esto quiere decir, que sí en los acuarios se midió 0.16 mg/L de amonio total, podría haberse encontrado un máximo de 20 μ g/L de amoniaco. A pesar de las anomalías registradas, los valores se consideraron dentro de los límites aceptables para los bioensayos.

3.3.2 MORFOMETRÍA DE LOS ORGANISMOS.

Los parámetros morfométricos promedio se presentan en la tabla 10. La longitud, el ancho y el alto de los organismos utilizados en los bioensayos de efectos letales, se consideró igual entre los individuos control y los expuestos a los metales ($P > 0.19$, ANOVA). Además, los ostiones de ambos ensayos fueron similares en longitud y peso total ($P = 0.18$ y $P = 0.26$, t de student, respectivamente).

Tabla 10. Morfometría de los organismos sometidos a las diferentes fases de bioensayo (promedio \pm DE).

Fases	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso total (g)	P. húmedo (g)	P. seco (g)
Letal Cd	70 \pm 8	48 \pm 5*	28 \pm 5*	43.4 \pm 10.9	6.5 \pm 2.3	0.9 \pm 0.4
Letal Cr	72 \pm 9	43 \pm 5	25 \pm 8	42.6 \pm 14.0	3.4 \pm 1.4	0.4 \pm 0.2
Fisiológica	69 \pm 6	48 \pm 6*	27 \pm 5*	55.0 \pm 12.8*	5.8 \pm 1.5	1.1 \pm 0.5
Bioquímica I	66 \pm 8*	42 \pm 5	24 \pm 4	42.7 \pm 9.8	9.0 \pm 2.8	ND
Bioquímica II	69 \pm 9	42 \pm 5	24 \pm 4	46.3 \pm 9.2	9.9 \pm 2.6	ND
Promedio	69 \pm 8	45 \pm 5	26 \pm 5	46.0 \pm 11.3	6.9 \pm 2.2	0.8 \pm 0.4

* Inferior a otras fases experimentales ($P < 0.01$ por prueba de ANOVA); ND, No se determinó.

Los organismos utilizados para las pruebas de efectos subletales, donde se evaluaron las respuestas bioquímicas, fueron obtenidos de una sola colecta. Las dos pruebas se realizaron con una diferencia de diez días. La longitud (67 \pm 9 mm), el ancho (42 \pm 5 mm) y el alto (24 \pm 5 mm) de los ostiones fue semejante en ambas pruebas ($P > 0.06$, t de student). Sin embargo, en el segundo bioensayo, los ostiones tuvieron mayor peso total (46.3 \pm 9.2 g), y húmedo (9.9 \pm 2.6 g) ($P < 0.04$), respecto a la primera prueba, en la cual el peso total fue 42.7 \pm 9.8 g y el peso húmedo fue 9.0 \pm 2.8 g. Para conformar lotes experimentales homogéneos, los especímenes fueron seleccionados con base en la longitud, que es el parámetro más fácil de medir y con menor variación. Las réplicas de cada condición experimental tuvieron morfometría semejante ($P > 0.07$, ANOVA), los extraídos en los diferentes días de ensayo fueron iguales ($P > 0.17$) y tampoco se presentaron diferencias entre los ostiones de acuarios control y con exposición a ambos metales ($P > 0.07$). En estas pruebas, el tejido de los organismos se utilizó para las determinaciones de metalotioneínas, proteínas y lipoperoxidación, por lo que no se obtuvieron los pesos secos.

Los lotes de ostiones utilizados en los bioensayos de efectos subletales para evaluación de respuestas fisiológicas, tuvieron los pesos totales más elevados,

respecto a otras fases experimentales ($P < 0.01$), pero los lotes fueron similares ($P > 0.09$). Las variaciones en los pesos húmedos y secos, estuvieron relacionadas con el efecto de los metales, por lo que se discutirán más adelante con los resultados de efectos fisiológicos.

Los organismos sometidos a todas las pruebas tuvieron las clases de talla más recomendables para bioensayos de acuerdo con Powell *et al.* (1992), con longitud cercana a los 70 mm, si bien los organismos sometidos en la primera prueba subletal para evaluar efectos bioquímicos tuvieron una longitud menor (66 mm) que la de los ostiones de las pruebas para evaluar efectos letales (71 mm).

3.3.3. CONCENTRACIÓN DE CR Y CD EN AGUA.

Los resultados se analizaron con las concentraciones nominales registradas en los dispositivos experimentales. Las concentraciones colocadas presentaron algunas variaciones, atribuibles a la salinidad del agua. Las lecturas menores a las colocadas, derivaron de la precipitación del metal, lo que fue evidente en las concentraciones más elevadas de las pruebas para evaluar efectos letales. En estos casos, los resultados de acuarios con fuerte afectación fueron eliminados del análisis. También se presentaron interferencias de matriz, por la salinidad en las lecturas en el EAA. Esta fue calculada, comprobándose que solo afectó las lecturas de Cd, las cuales fueron corregidas. La interferencia en las lecturas y la precipitación de los metales fue mínima en las pruebas de subletalidad. El análisis del comportamiento de los metales se presenta en el Anexo 7.3.

3.3.4. FASE DE LETALIDAD

A. Efectos del cromo.

La concentración en la que se presentó 50% de mortalidad por exposición a Cr, fue calculada para las 168 h ($CL_{50-168h}$) en 11.09 mg/L y la concentración letal corporal media para el mismo plazo ($CLC_{50-168h}$), fue de 475.85 $\mu\text{g/gPS}$ (tabla 11). Los datos se ajustaron al modelo Probit Log X en ambos casos de manera significativa ($P < 0.05$). El coeficiente de correlación del modelo para al CL_{50} considerando la concentración en agua, dio un mejor ajuste ($r = 0.93$), que considerando la concentración corporal ($r = 0.76$), aunque en este caso el coeficiente de variación fue menor (11.3%).

Tabla 11. Concentración letal ($CL_{50-168h}$) y concentración letal corporal ($CLC_{50-168h}$) medias de la exposición al Cr, obtenidas para el modelo Probit Log X.

Concentración de Cr	En agua	En tejido
$CL_{50-168h}$	11.09 mg/L	475.85 $\mu\text{g/gPS}$ (9.15 $\mu\text{mol/gPS}$)
Intervalo de Confianza	5.28	148.9
Coeficiente de determinación r^2	0.86	0.58
Coeficiente de correlación	0.93	0.76
Coeficiente de variación (%)	19.7	11.3
$X^2_{(0.05,3)}$ obtenido y esperado	2.18 < 7.82	3.36 < 7.82

Estos valores se determinaron para las 168 h, ya que a las 96 horas aún no se presentaba el 50% de mortalidad (Fig. 10).

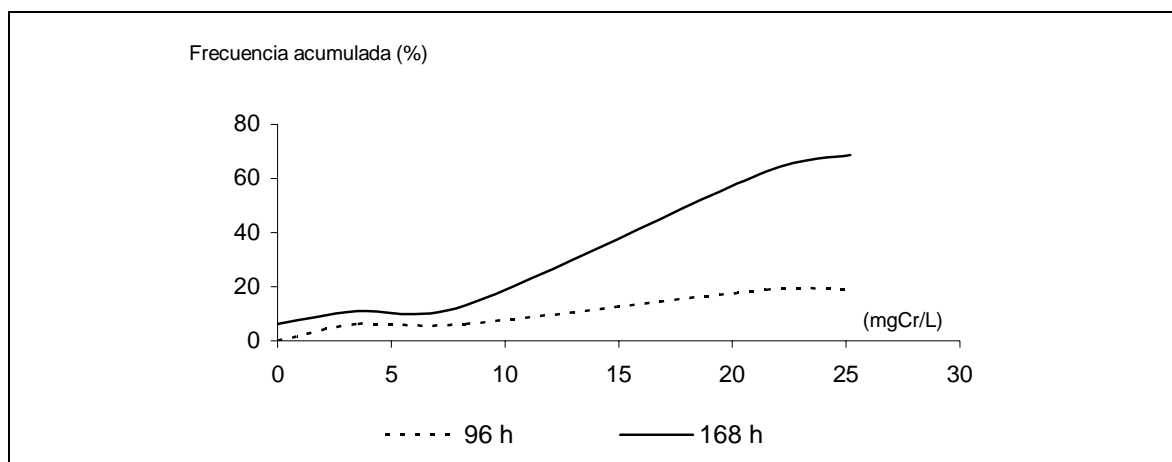


Figura. 10. Mortalidad en los ostiones expuestos a Cr a las 96 y a las 168 h.

Los controles presentaron $2.51 \mu\text{gCr/gPS}$ en tejido y el metal en agua estuvo por debajo del límite de detección del aparato (0.002 mgCr/L). Los organismos incorporaron en el tejido cantidades de Cr proporcionales a la concentración del metal en agua. Sin embargo, el factor de bioconcentración (FBC) fue mayor en los ostiones que se encontraban en concentraciones bajas; los expuestos a 3.53 mgCr/L incorporaron $289.35 \pm 138.90 \mu\text{gCr/gPS}$ y tuvieron un FBC de 75 ± 37 , mientras que en ostiones expuestos a 35.19 mg/L , el FBC fue 36 ± 12 dada una incorporación de $1244.38 \pm 412.43 \mu\text{gCr/gPS}$. El valor mínimo de FBC de 23 ± 14 , se determinó en especímenes expuestos a 21.48 mg/L , los cuales incorporaron $537.15 \pm 340.21 \mu\text{gCr/gPS}$ (Fig. 11).

Los organismos se sometieron a experimentación en condiciones adecuadas, con un IC = 101.7 g/mL . Este índice disminuyó en todos los organismos como resultado de la ausencia de alimentación, y fue en promedio de 49.58 g/mL (± 21.43) al final del bioensayo. Este valor sólo representa un 49 % de IC inicial y fue semejante entre organismos control y los expuestos a Cr ($P > 0.05$, ANOVA).

Del mismo modo, el peso total de los organismos al final del experimento fue similar entre los lotes, $45.20 \pm 13.43\text{g}$ (tabla 12).

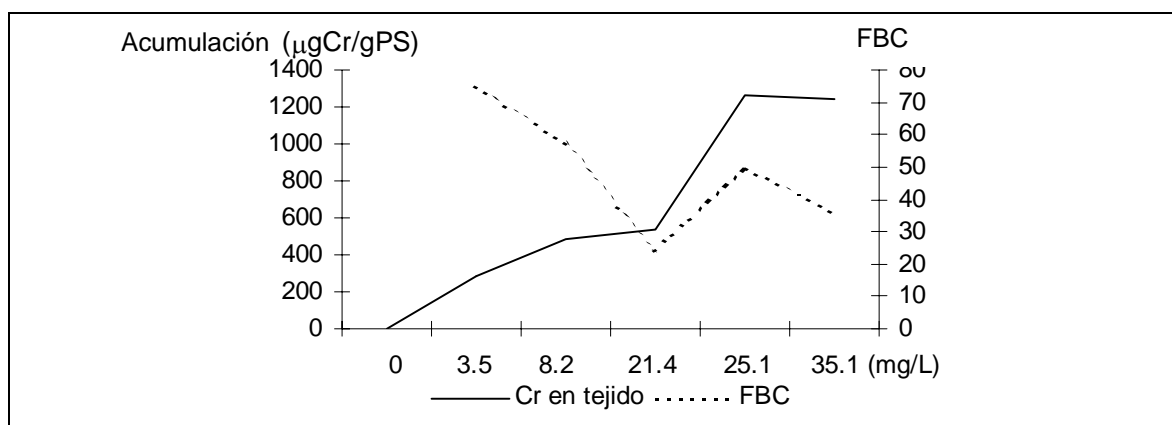


Figura. 11. Concentración promedio de Cr en tejido y factor de bioconcentración (FBC) en los ostiones expuestos a concentraciones letales.

Tabla 12. Pesos finales de *C. virginica* expuesta a Cr en la evaluación de efectos letales (promedio \pm DE).

Concentración (mgCr/L)	Peso total (g)	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)
Control	44.73 ± 13.43	3.80 ± 1.15	0.552 ± 0.215
3.53	47.63 ± 15.16	3.38 ± 1.67	0.456 ± 0.241
8.26	41.32 ± 10.98	$2.72 \pm 1.02^*$	$0.375 \pm 0.179^*$
21.48	50.02 ± 14.13	3.57 ± 1.43	$0.330 \pm 0.184^*$
25.20	41.42 ± 14.66	3.73 ± 1.29	0.418 ± 0.184
35.19	46.08 ± 11.03	4.13 ± 0.91	0.512 ± 0.121

* Diferencias significativas ($P < 0.05$ por ANOVA) respecto a ostiones control.

Solo el peso húmedo final de los organismos expuestos a 8.26 mgCr/L fue menor que el de los controles. Además, el peso seco también mostró ser menor en ostiones expuestos a 8.26 mgCr/L y 21.48 mgCr/L al final del experimento. El peso seco esperado para los ostiones de la longitud seleccionada fue calculado en 1.83 g. Después del bioensayo la pérdida en peso seco representó el 75% tanto en el grupo control, como en los expuestos.

El peso total, registrado también al inicio de la prueba, fue comparado con los

valores obtenidos al final, ya mencionados. Los controles y los ostiones expuestos a 3.53 mgCr/L, tuvieron valores semejantes. Sin embargo, en todas las concentraciones de exposición superiores a esta, los pesos al final fueron menores ($P < 0.05$ por t de student) (Fig. 12).

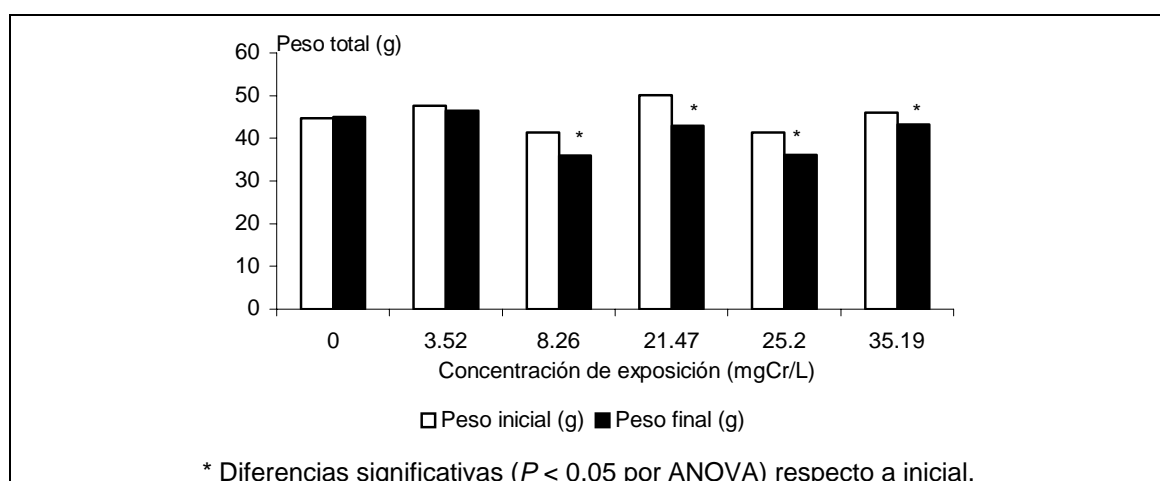


Figura. 12. Peso total promedio de los organismos en el bioensayo agudo con Cr. Se grafica promedio.

B. Efectos del cadmio.

La concentración en la que se presentó el 50% de mortalidad por exposición a Cd, calculada para las 72 h (CL_{50-72h}) fue de 24.87 mg/L y la concentración letal corporal media CLC_{50-72h} fue de 502.25 $\mu\text{g/gPS}$. Estos valores tuvieron un ajuste al modelo probit X significativo en ambos casos ($P < 0.05$), con coeficientes de variación inferiores a 15%, incluso el obtenido con base en las concentraciones en el tejido fue menor (7%). Por otro lado, el ajuste obtenido con la concentración en agua tuvo un coeficiente de correlación mayor ($r = 0.97$) que el derivado de la

concentración corporal ($r = 0.81$) (tabla 13).

El plazo de 72 h fue seleccionado para la determinación de estas concentraciones, debido a que en plazos mayores, la mortalidad fue elevada (Fig. 13).

Tabla 13. Concentración letal (CL_{50-72h}) y la concentración corporal letal (CLC_{50-72h}) medias de la exposición al Cd obtenidas por el modelo Probit X.

Concentración de Cd	En agua	En tejido
CL_{50-72h}	24.87 mg/L	502.25 μ g/g (4.47 μ mol/g)
Intervalo de confianza	9.54	118.20
Coefficiente de determinación r^2	0.94	0.65
Coefficiente de correlación	0.97	0.81
Coefficiente de variación (%)	12.06	7.38
$X^2_{(0.05,3)}$ obtenido y esperado	0.95 < 5.99	4.73 < 5.99

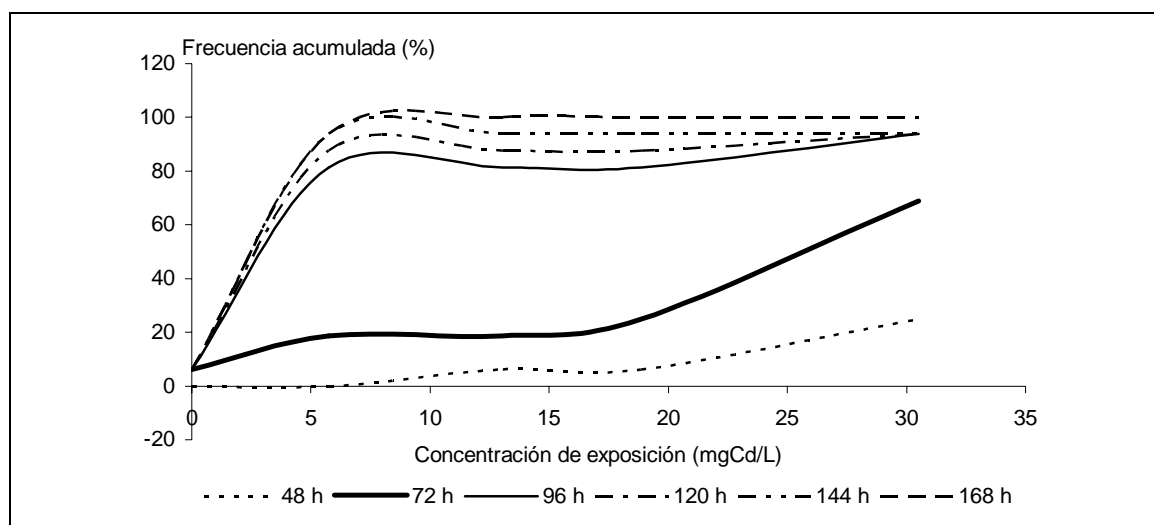


Figura. 13. Mortalidad en los ostiones con exposición al Cd determinada en diferentes períodos.

No obstante, fueron calculados otros valores de CL_{50} y CLC_{50} para las 96 h y 120 h con fines comparativos, (tabla 14). Las CL_{50} y CLC_{50} de estos plazos y las de 72 h, fueron graficadas encontrándose un comportamiento casi lineal con los valores

basados en las concentraciones corporales, CLC₅₀ (Fig. 14).

Tabla 14. CL₅₀ y CLC₅₀ para las 96 h y 120 h de la exposición al Cd obtenidas por el modelo Probit X.

	CL _{50-96h}	CL _{50-120h}	CLC _{50-96h}	CLC _{50-120h}
CL ₅₀	11.23 mg/L	9.68 mg/L	386.27 µg/g	278.10 µg/g
Intervalo de confianza	1.97	2.65	43.32	270.03
Coefficiente de determinación r ²	0.99	0.95	0.99	0.36 *
Coefficiente de correlación	0.99	0.97	0.99	0.60
Coefficiente de variación (%)	4.4	6.8	2.59	30.57 *
X ² _(0.05,3) obtenido y esperado	12.4 > 3.84 *	2.09 < 5.99	0.11 < 3.84	4.78 < 5.99

* No significativo.

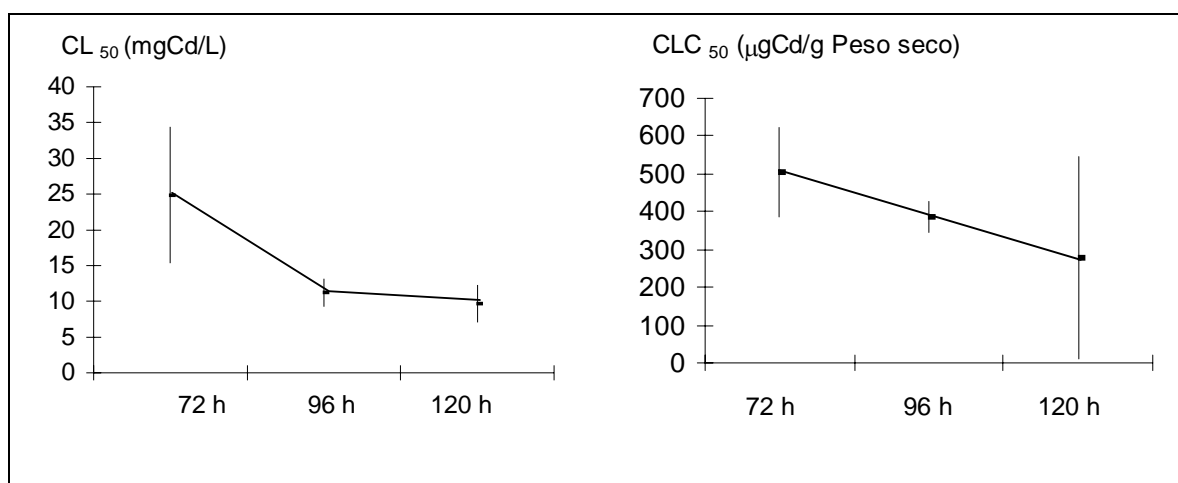


Figura. 14. Concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal corporal media (CLC₅₀) obtenidas en diferentes períodos para *C. virginica* expuesta a Cd (\pm intervalo de confianza).

La concentración en el tejido se incrementó de manera proporcional a la concentración en agua ($r = 0.90$), mientras que el Cd acumulado en tejido tuvo una correlación significativa negativa con el FBC ($r = -0.62$, $P < 0.05$) (Fig. 15).

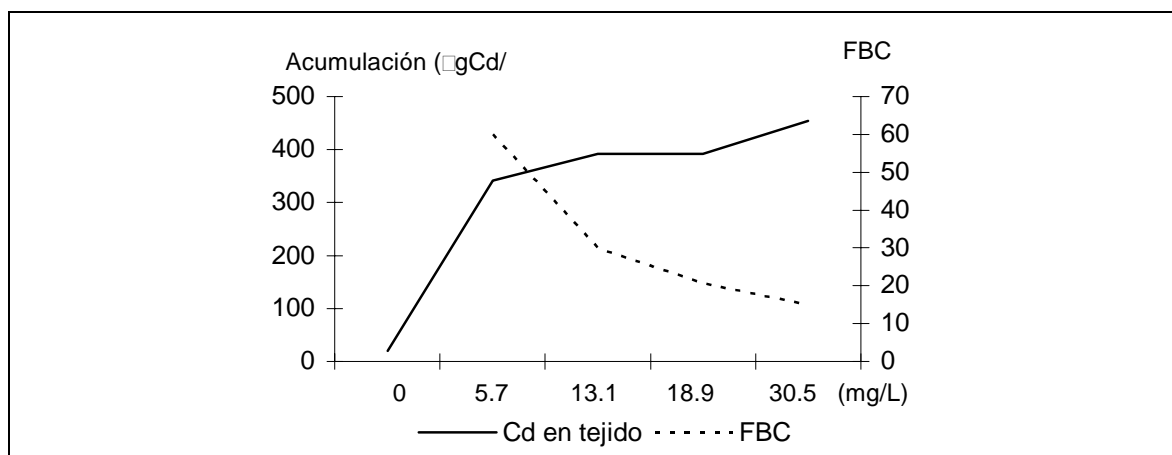


Figura. 15. Concentración corporal de Cd y factor de bioconcentración (FBC) en los ostiones sometidos a concentraciones letales del metal.

Cabe mencionar, que en caso de esta prueba, el Cd acumulado en los ostiones que murieron durante la prueba tuvo marcadas diferencias con el que se acumuló en organismos que sobrevivieron al bioensayo. Haciendo un análisis por separado de estos organismos, se pudo apreciar la diferencia en los niveles incorporados por especímenes expuestos a 5.75 mgCd/L, que murieron antes de transcurrir 72 horas del bioensayo, los cuales incorporaron 261.2 µgCd/gPS y tuvieron un FBC de 45, mientras que los ostiones sobrevivientes al bioensayo, expuestos en esa concentración, incorporaron únicamente 158.0 µgCd/gPS y tuvieron un FBC de 27. De igual manera, los organismos expuestos a 30.05 mgCd/L, que murieron a las 72 h, acumularon 508.8 µgCd/gPS en tejido y tuvieron un FBC de 17, mientras que los sobrevivientes en esa concentración, solo incorporaron 113.20 µgCd/g y su FBC fue de 4 (Fig. 16). Esto es, los organismos sobrevivientes del bioensayo acumularon menos Cd y tuvieron por ende un FBC menor que los que murieron en el transcurso de las pruebas. No se llevó a cabo una comparación estadística, debido a que el número de ejemplares no lo permitió.

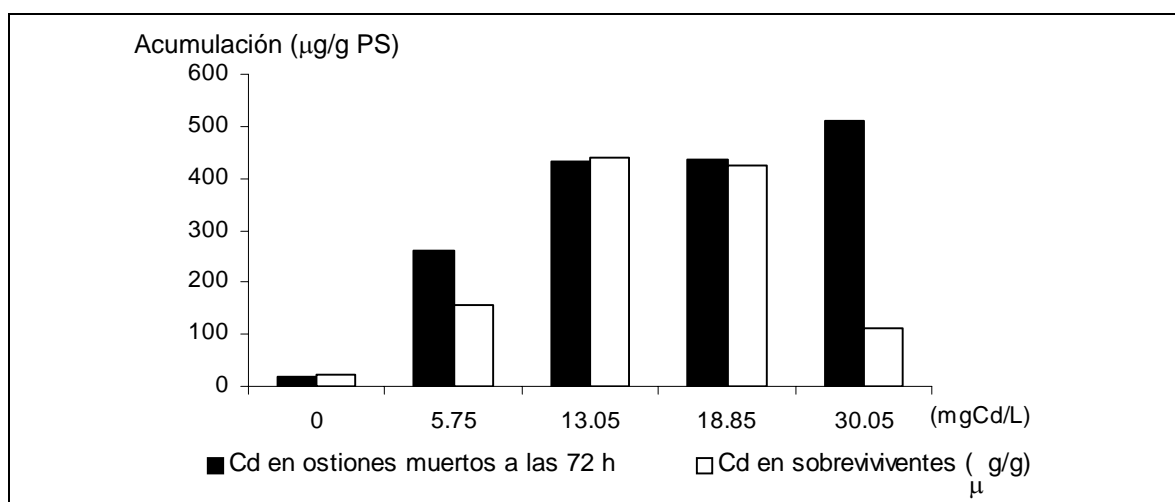
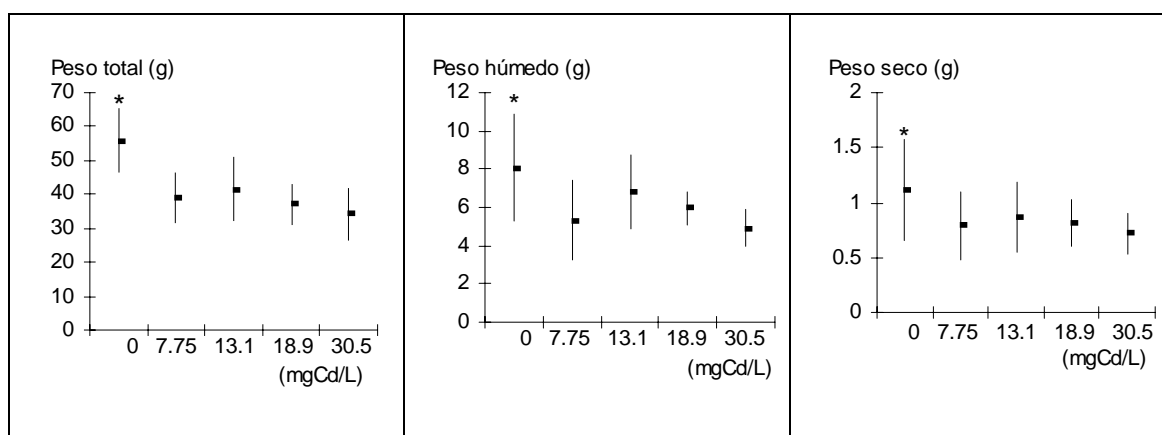


Figura. 16. Cd acumulado en el tejido de los ostiones muertos a las 72 h y en los sobrevivientes a las 168 h del bioensayo con concentraciones letales.

El índice de condición (IC) en los ostiones control de este bioensayo, mostró una disminución desde 101.7 g/mL hasta 48.1 g/mL como resultado de la ausencia de alimento. Este índice no fue determinado en los organismos expuestos al Cd, debido a que los sobrevivientes mostraron una alteración en el cierre de valvas, el cual se hizo lento e incompleto, de manera que al ser extraídos del acuario, los sobrevivientes no se cerraban completamente y su líquido intervalvas se perdió.

Los pesos obtenidos al final del ensayo (peso total húmedo y seco) fueron significativamente inferiores en los organismos expuestos (Fig. 17). El peso seco esperado para ostiones de la talla utilizada es de 1.71 g. Después del bioensayo, el peso seco de los organismos control fue de 1.11 g (± 0.46), y en promedio fue 0.84 g (± 0.25) en organismos expuestos. En los organismos control, representó 30% menos del valor calculado, mientras que en los ostiones expuestos, la pérdida fue del 50%.



* Diferencias significativas ($P < 0.01$ por ANOVA) entre controles y expuestos.

Figura. 17. Peso total, húmedo y seco (g) de los organismos al final de la exposición al Cd (promedio \pm DE).

El incremento de la concentración de Cd en el tejido de los especímenes expuestos que murieron a lo largo del ensayo, tuvo una correlación inversa significativa ($P < 0.05$) con el peso total, el peso húmedo y el peso seco ($r = -0.48$, $r = -0.34$ y $r = -0.35$, respectivamente). La correlación negativa fue todavía mayor con el peso seco de los organismos que sobrevivieron a las 168 h ($r = -0.96$), los cuales fueron sacrificados al final del bioensayo, ya que en estos, la pérdida de peso seco y acumulación de Cd fueron mayores.

C. Comparación de las respuestas letales en ambos metales.

La CL_{50} y la CLC_{50} obtenidas mostraron la mayor toxicidad del Cd. La exposición al Cr demostró que la mortalidad se interpretó mejor con base en las concentraciones medidas en agua. En el caso del Cd el modelo aplicado, tanto para la CL_{50} , como para la CLC_{50} fue significativo e incluso, en el caso del tejido, presentó una menor

variación. Los ostiones que murieron a las 72 horas acumularon más Cd que los sobrevivientes en dos concentraciones de exposición, además se observó una importante pérdida de peso en todas las concentraciones. En contraste, en organismos expuestos al Cr, la acumulación del metal en los ostiones que murieron durante el bioensayo y los sobrevivientes fue similar y la pérdida de peso de los organismos expuestos no fue siempre significativa respecto a los controles. Las diferencias más claras se apreciaron al comparar los pesos totales al inicio y al final del bioensayo, ya que los ostiones expuestos a las concentraciones más altas de Cd mostraron diferencias significativas con los valores iniciales. Otro aspecto que corrobora la mayor toxicidad de este metal, es que la máxima acumulación fue cercana a $700 \mu\text{gCd/gPS}$, mientras que en el caso del Cr se alcanzaron niveles de $1200 \mu\text{g/gPS}$. El FBC fue mayor en las concentraciones más bajas en ambos metales, pero los valores de FBC fueron menores en el caso del Cd, ya que tuvo valores mínimos de 15 en la máxima concentración de exposición, mientras que en el caso del Cr, el mínimo fue 24 (Fig. 18).

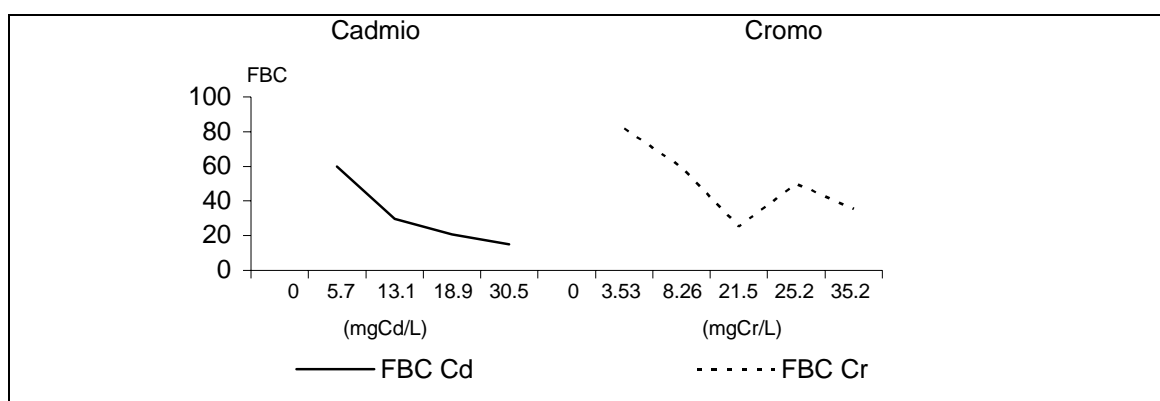


Figura. 18. Factor de bioconcentración (FBC) de los organismos expuestos a concentraciones letales Cd y Cr.

3.3.5 FASE DE SUBLETALIDAD.

3.3.5.1. EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS BIOQUÍMICAS.

A. Morfometría.

Los organismos tuvieron en promedio una relación peso seco/peso húmedo de 0.16, lo que representa un porcentaje promedio de humedad de 83.0% (tabla 15). Los controles tuvieron un 84.6 % en todos los tejidos. El mayor porcentaje, se presentó en la branquia, 86.2 %. Los ostiones expuestos a ambos metales presentaron un menor porcentaje de humedad en glándula digestiva (79.3%, $P < 0.05$), lo que indicaría una deshidratación (Fig. 19).

Tabla 15. Relación peso seco/peso húmedo (gPS/gPH) en los tejidos de los ejemplares expuestos durante cinco días a niveles subletales de Cr y Cd.

	Control	0.088 mgCr/L	0.144 mgCr/L	0.110 mgCd/L	0.211 mgCd/L
Branquia	0.15	0.13	0.14	0.14	0.14
Glándula	0.16	0.20	0.21	0.22	0.20
Músculo	0.16	0.17	0.17	0.20	0.17

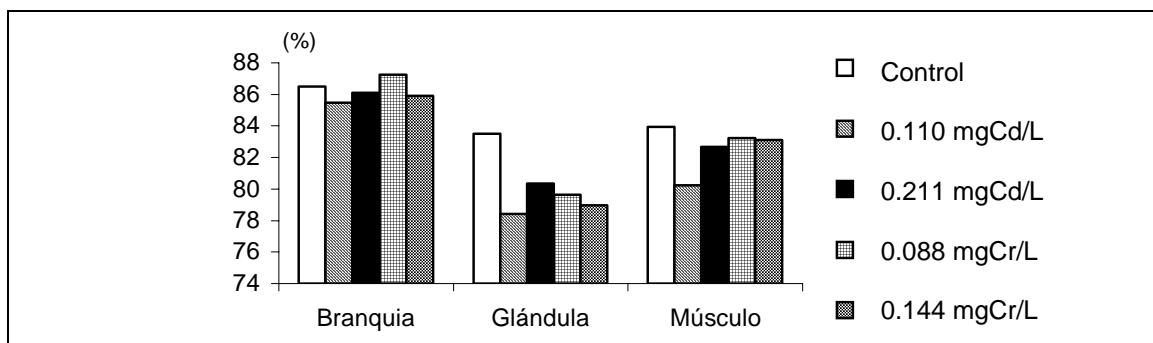


Figura. 19. Porcentaje de humedad promedio de los tejidos de *C. virginica* al término de la evaluación bioquímica.

B. Determinación de metalotioneínas.

De los tres tejidos analizados, los niveles más altos de metalotioneínas se encontraron en la glándula digestiva. En los controles experimentales la concentración de metalotioneínas de la glándula digestiva fue similar en los dos bioensayos ($P > 0.05$, U Mann-Whitney), por lo que los datos se analizaron promediando ambas pruebas.

Los organismos control mostraron valores diferentes en los días analizados (D1, a las 6 h de iniciado el ensayo; D3, a las 72 h; y D5, a las 96h). La mayor fluctuación se observó en glándula digestiva, en la cual los valores se encontraron entre 35 $\mu\text{g/g}$ y 435.6 $\mu\text{g/g}$ de tejido, siendo las concentraciones del D3, las mayores ($P < 0.04$ por Kruskal-Wallis). En el caso del músculo abductor fue hasta el D5 que se registraron valores significativamente elevados ($P < 0.04$). Las concentraciones en la branquia tuvieron valores similares en los tres días evaluados, lo que pudo ser resultado de la amplia dispersión de los datos ($P < 0.05$) (Fig. 20).

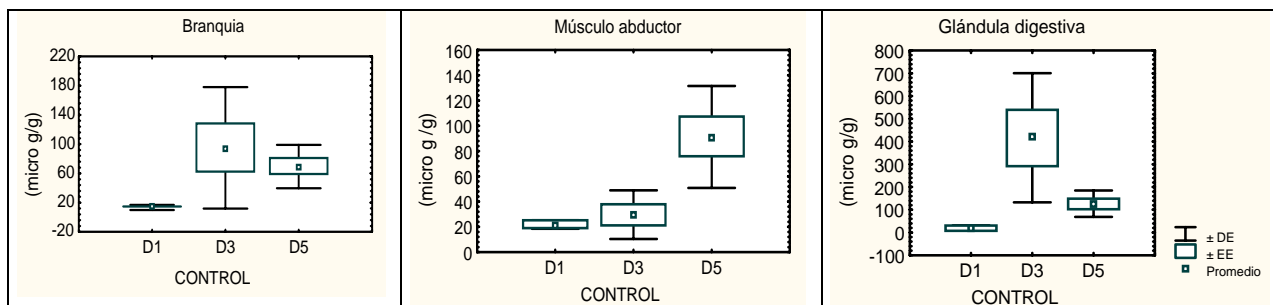


Figura. 20. Metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) en los tres tejidos de los organismos del grupo control, evaluados los días 1, 3 y 5 del bioensayo. Se señalan valores promedio, error estándar (EE) y desviación estándar (DE).

Debido a la elevada dispersión de los datos, solo se observaron diferencias estadísticas entre los controles y los expuestos a Cr, en el músculo abductor y la glándula digestiva, a las 6 h de la exposición ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis) (tabla 16). La branquia no mostró diferencias, a pesar de que el promedio de los controles fue $8.5 \mu\text{g/g}$ y en los expuestos a 0.088 mgCr/L se registraron $93.8 \mu\text{g/g}$. En exposición al Cr no hubo diferencias entre los días evaluados ($P > 0.05$).

En los ostiones expuestos a Cd, no se apreciaron diferencias entre controles y expuestos, sin embargo, las variaciones entre los días evaluados fueron evidentes. Concentraciones significativamente elevadas de metalotioneínas en branquia y músculo se registraron a las 72 y 96 h en las dos concentraciones de exposición. La concentración promedio más alta en branquia fue de $275.0 \mu\text{g/g}$ y en el caso del músculo abductor fue de $138.4 \mu\text{g/g}$. En la glándula digestiva, la concentración de metalotioneínas fluctuó significativamente entre los valores registrados a las 6 h de exposición ($59.3 \mu\text{g/g}$) y los determinados a las 72 h, que se elevaron a $810.1 \mu\text{g/g}$ en organismos expuestos a 0.110 mgCd/L (Fig. 21).

Tanto en los ostiones control, como en los expuestos a ambos metales, se observó inducción de metalotioneínas a las 72 h de exposición con amplias dispersiones de los datos, por lo que no se demostraron diferencias significativas en los ostiones expuestos a los metales en ese lapso.

Tabla 16. Concentración de metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) en branquia, músculo abductor y glándula digestiva de ostiones expuestos a Cr y Cd, y evaluados los días 1, 3 y 5 de exposición (promedio \pm DE).

Tejido y día		Control	0.088 mgCr/L	0.144 mgCr/L	0.110 mgCd/L	0.211 mgCd/L
Branquia	D1	8.5 (\pm 6.0)	93.8 (\pm 79.8)	66.8 (\pm 68.8)	16.0 (\pm 15.2)	11.2 (\pm 0.9)
	D3	72.6 (\pm 77.8)	96.9 (\pm 122.5)	78.1 (\pm 138.3)	85.9 ** (\pm 63.4)	275.0 ** (\pm 452.4)
	D5	69.3 (\pm 29.6)	63.3 (\pm 43.9)	127.5 (\pm 90.6)	116.8 ** (\pm 37.2)	98.7 ** (\pm 77.0)
Músculo abductor	D1	34.5 (\pm 21.3)	92.2 * (\pm 55.4)	182.5 * (\pm 90.9)	38.8 (\pm 16.6)	57.7 (\pm 16.5)
	D3	46.9 (\pm 38.1)	26.8 (\pm 14.6)	73.4 (\pm 67.3)	53.9 ** (\pm 43.7)	36.5 ** (\pm 37.6)
	D5	109.1 (\pm 59.9)	59.6 (\pm 32.5)	268.7 (\pm 463.53)	138.4 ** (\pm 128.3)	80.5 ** (\pm 24.4)
Glándula digestiva	D1	33.0 (\pm 37.2)	251.0 * (\pm 175.5)	172.0 * (\pm 90.11)	59.3 (\pm 69.3)	76.4 (\pm 73.54)
	D3	435.6 (\pm 377.1)	299.2 (\pm 263.5)	266.2 (\pm 46.0)	810.1 ** (\pm 860.3)	491.0 (\pm 470.4)
	D5	126.4 (\pm 57.9)	159.5 (\pm 74.8)	75.4 (\pm 80.0)	158.6 (\pm 94.8)	178.4 (\pm 124.2)

* Valores superiores en los organismos expuestos a Cr respecto a los controles; ** Valores superiores a los registrados el primer día en exposición a Cd ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

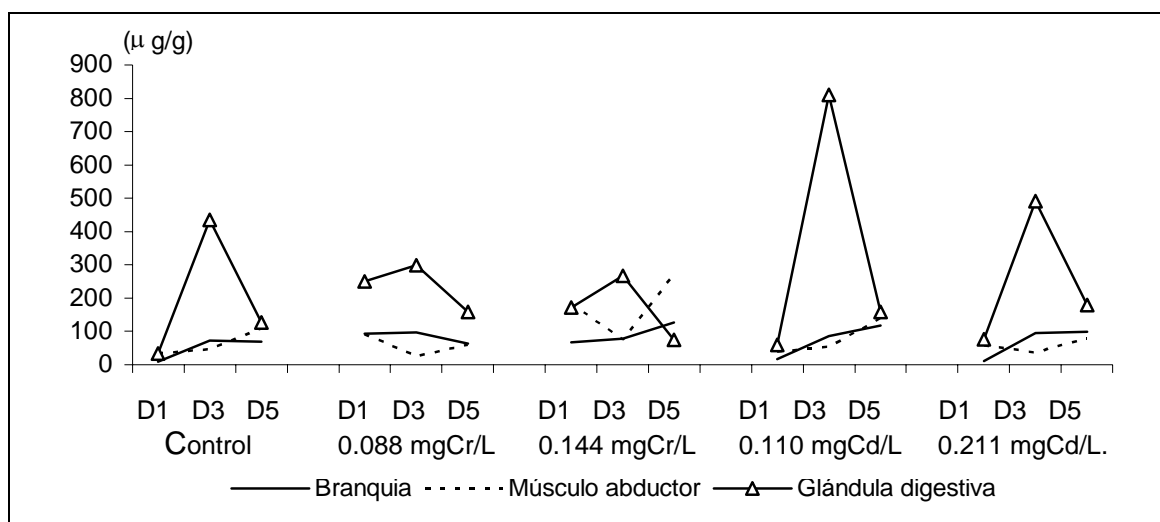


Figura. 21. Variación de las concentraciones de metalotioneínas ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo) en los tejidos de organismos control y expuestos a Cr y Cd, en los tres días evaluados. Se grafican valores promedio.

A pesar de no demostrarse las diferencias significativas, pudo apreciarse sin embargo, que el 83.5% de los organismos expuestos a los metales mostraron

concentraciones por encima del promedio en los controles de branquia, en proporciones que iban de 10% más, hasta 16 veces el valor de referencia, mientras que solo el 16.5% estuvo por debajo de estos valores. En glándula digestiva, el 72.5% de las muestras tuvieron de 10% hasta 13.5 veces el valor de los controles y solo el 27.5% tuvieron valores inferiores. Finalmente, en el músculo abductor, el 57.5% de las muestras de organismos expuestos tuvieron desde 10% hasta 7 veces el valor de los controles, y el 42.5 % fue inferior. De manera que en este tejido, no se observó una proporción marcada de muestras con concentraciones por encima de los controles, como en la branquia y en la glándula digestiva.

C. Estrés oxidativo.

*

Este biomarcador se midió a través de la lipoperoxidación, la cual se describe como producción de malondialdehído (MDA) en nmol/mg de proteína, y solo se analizó en glándula digestiva, donde los valores promedio fueron 74 ± 29 mg/mL. Los valores obtenidos en los controles, 155.8 ± 42.4 nmol/mg de proteína, fueron similares en los tres días evaluados. Los ostiones expuestos a Cr mostraron concentraciones significativamente mayores el tercer día. También ese día los organismos expuestos a 0.088 mgCr/L, presentaron mayor producción de MDA que los controles ($P < 0.05$). El quinto día, los organismos expuestos 0.144 mgCr/L, mostraron valores bajos respecto al control ($P = 0.02$). Los organismos expuestos a Cd presentaron valores mayores que los controles el primer día de

exposición ($P < 0.03$), aunque estos organismos no mostraron diferencias apreciables entre los días analizados (tabla 17).

Tabla 17. Concentraciones de MDA (nmol/mg de proteína) en la glándula digestiva de ostiones expuestos a concentraciones subletales de Cr y Cd.

Día	Control	0.088 mgCr/L	0.144 mgCr/L	0.110 mgCd/L	0.211 mgCd/L
1	133.5	192.1	131.5	213.0^a	262.6^a
3	179.0	271.7 * ^a	157.5	155.9	231.6
5	155.1	150.6	83.8 ^b	147.0	197.3

* Valores más altos el día 3 ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis); ^a valores superiores a controles ese día; ^b menor al control, MDA, Malondialdehído.

La respuesta derivada de la exposición al Cd fue mayor y fue evidente el primer día de exposición (a las 6 h), mientras que la respuesta en la exposición al Cr, fue posterior, hasta las 72 h (Fig. 22). En ambos metales los niveles de MDA disminuyeron para el quinto día.

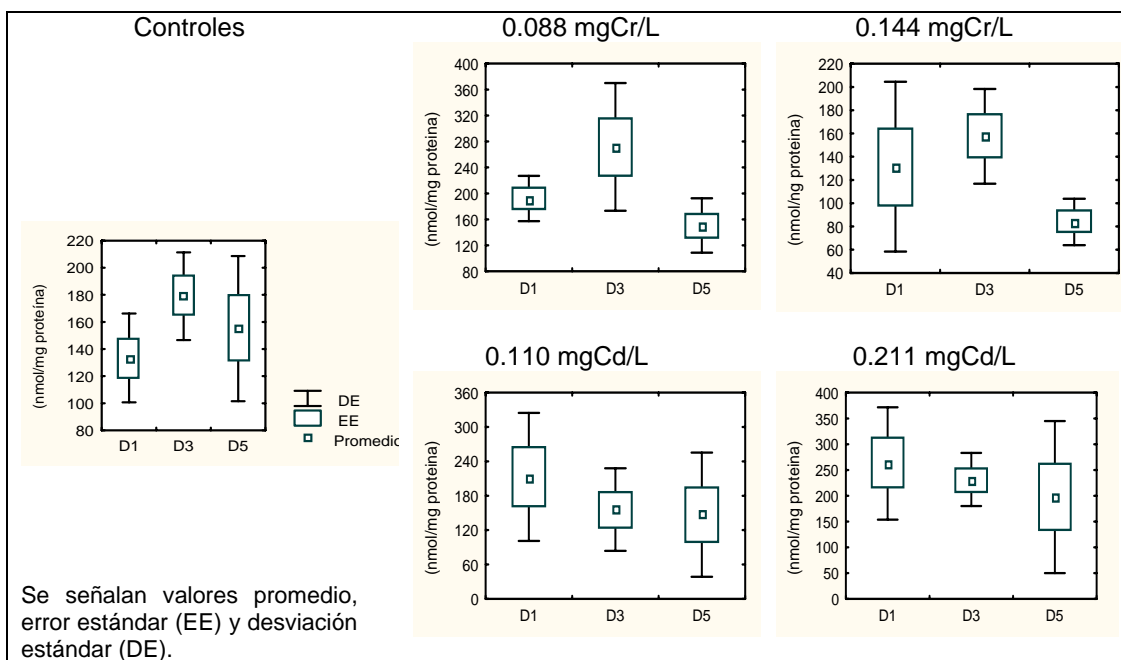


Figura. 22. Comportamiento de las concentraciones de MDA (nmol/mg proteína) en glándula digestiva de ostión, resultante de la exposición a Cr y Cd en los tres días evaluados.

El incremento de MDA en ostiones expuestos a Cr se apreció a las 72 h de exposición, mientras que el incremento de las metalotioneínas se observó a las 6 h de exposición.

Los valores elevados de MDA en glándula digestiva de organismos expuestos a Cd se observaron únicamente a las 6 h de exposición, mientras que las concentraciones elevadas de metalotioneínas en este órgano, se apreciaron a las 72 h en ostiones expuestos a 0.110 mgCd/L. En este caso, la ausencia de diferencias significativas respecto a los controles derivó de la dispersión de los datos, sin embargo el incremento mencionado, indica una alteración importante en los organismos expuestos a 0.110 mdCd/L.

A. Metalotioneínas, lipoperoxidación y acumulación de los metales.

Las determinaciones de metales en ostión se obtuvieron con un número limitado de organismos, ya que en el primer ensayo solo se contó con dos animales por concentración y en el segundo con uno, si bien todas las lecturas tuvieron tres réplicas. El número de organismos fue restringido porque los especímenes tuvieron que ser seccionados para tomar las muestras utilizadas en la determinación de metalotioneínas y lipoperoxidación. Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los dos bioensayos realizados para cada metal, se presentan los promedios de ambas pruebas. Las concentraciones en tejido se obtuvieron al final del ensayo, después de 96 h de exposición.

Los organismos expuestos a Cr presentaron mayor concentración del metal en branquia ($27.47 \mu\text{gCr} / \text{gPS}$) en exposición a 0.088 mgCr/L y menor ($19.41 \mu\text{gCr} / \text{gPS}$) en exposición a 0.144 mgCr/L . Por el contrario, los niveles alcanzados en glándula digestiva, fueron proporcionales a la concentración en agua, donde la acumulación en la concentración de 0.144 mgCr/L ($28.19 \mu\text{gCr} / \text{gPS}$), fue más del doble que la alcanzada en exposición a 0.088 mgCr/L ($13.89 \mu\text{gCr} / \text{gPS}$). El músculo abductor fue el tejido con menor acumulación del metal (máximo $10.76 \mu\text{g} / \text{gPS}$). La concentración de Cd en cada tejido indicó que también la branquia y la glándula digestiva acumularon más el metal, respecto al músculo abductor. Los valores alcanzados en branquia ($34.54 \mu\text{gCd} / \text{gPS}$ y $47.51 \mu\text{gCd} / \text{gPS}$) y en glándula digestiva ($39.84 \mu\text{gCd} / \text{gPS}$ y $48.69 \mu\text{gCd} / \text{gPS}$), fueron proporcionales a la concentración en agua y contrastaron con los registrados en músculo (máximo $10.80 \mu\text{gCd} / \text{gPS}$) (Fig. 23).

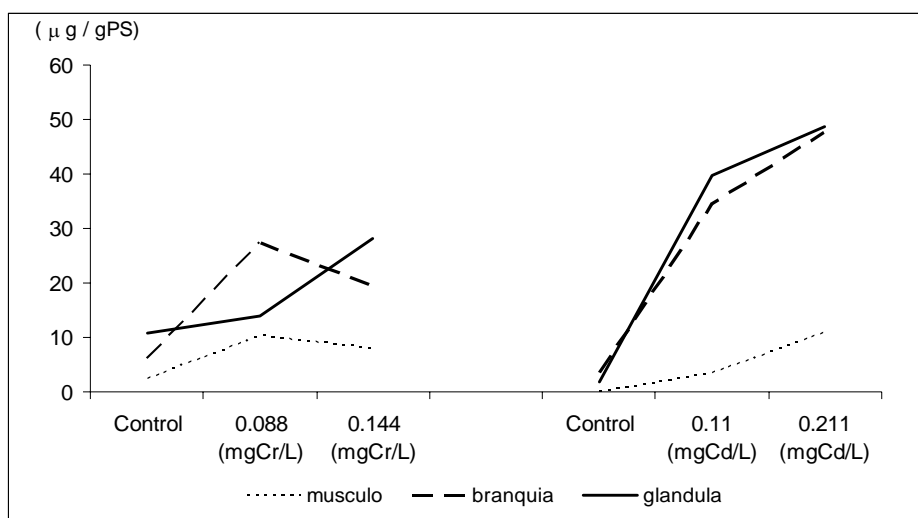


Figura 23. Concentraciones promedio de Cr y Cd en los tres tejidos de ostión analizados al final de las pruebas bioquímicas.

El FBC de Cr fue mayor en la concentración 0.088 mg/L en los tres tejidos analizados. En el caso del Cd, el FBC fue mayor que el del Cr y en glándula digestiva y branquia se asoció a la concentración 0.110 mg/L. El músculo abductor tuvo el mayor FBC en la concentración 0.210 mg/L y representó una acumulación inferior a los otros tejidos (tabla 18).

Tabla 18. Concentraciones de metal registradas en agua (mg/L) y factor de bioconcentración (FBC) durante las pruebas bioquímicas.

	Cr			Cd		
	Control	0.088	0.144	Control	0.110	0.211
Agua (mg/L)	0.021	0.088	0.144	0.052	0.110	0.211
FBC Branquia	343.2	298.6	125.2	65.3	314.0	225.2
FBC Músculo	122.1	111.5	51.2	0	30.7	51.2
FBC Glándula digestiva	563.7	151.0	181.9	34.9	362.2	230.8

El análisis del comportamiento de las metalotioneínas en relación a las concentraciones de metal en el agua, en el ostión y su FBC, se describe en la tabla 19, en la cual solo se incluyeron aquellas correlaciones que fueron significativas ($P < 0.05$). En este análisis solo se consideraron los datos del quinto día de exposición, ya que no se obtuvieron datos de acumulación en otros plazos. Las concentraciones de Cr en el agua y en el ostión tuvieron correlación negativa con el FBC, el cual fue mayor en la concentración de exposición menor. En estos organismos, la producción de metalotioneínas en branquia y en glándula digestiva se correlacionó directamente con la concentración de Cr en agua y en ostión, mientras que la correlación fue negativa con el FBC de Cr en la glándula y el músculo.

En el caso de los organismos expuestos al Cd, la producción de metalotioneínas, presentó correlaciones positivas con el contenido de Cd en agua, en ostión y

también con el FBC la glándula digestiva y la branquia. El músculo abductor, pareció responder de manera pasiva a la acumulación del Cd, ya que no se observaron correlaciones relevantes de las metalotioneínas con el Cd en el agua, en el organismo, ni con el FBC en este tejido.

En el caso del daño peroxidativo, el cual solo fue analizado en glándula digestiva, los niveles altos de MDA presentaron una correlación negativa ($r = -0.75$), con la concentración de Cr en el ostión. Esto es, hubo mayor daño peroxidativo en ostiones que tuvieron menor acumulación del metal. En el caso del Cd, la concentración de MDA presentó una correlación positiva con la concentración del metal en agua ($r = 0.99$). La producción de MDA, no presentó correlaciones relevantes con el FBC en ninguno de los dos metales.

Tabla 19. Correlación de las metalotioneínas (MT) y la lipoperoxidación (LIPO) con las concentraciones de Cr y Cd en agua y en ostión. Se incluyen solo las correlaciones significativas.

Inducción por Cr.										
	Branquia			Músculo			Glándula			
	MT	Cr Agua	Cr Ostión	MT	Cr Agua	Cr Ostión	MT	Cr Agua	Cr Ostión	LIPO
Cr Agua	0.71			0.84			0.94			
Cr Ostión	0.99	0.64			0.72		0.73	0.92		-0.75
FBC		-0.92		-0.99	-0.89		-0.98	-0.85	-0.58	
Inducción por Cd.										
	Branquia			Músculo			Glándula			
	MT	Cd Agua	Cd Ostión	MT	Cd Agua	Cd Ostión	MT	Cd Agua	Cd Ostión	LIPO
Cd Agua	0.48						0.99			0.99
Cd Ostión	0.77	0.93			0.99		0.94	0.88		
FBC	0.99	0.51	0.80		0.96	0.95	0.60	0.47	0.83	

MT, metalotioneínas; LIPO, Lipoperoxidación; FBC, Factor de Bioconcentración.

3.3.5.2. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS.

En esta sección se presentan las respuestas directas medidas durante el bioensayo con exposición de 20 días. Inicialmente se mencionan aspectos relacionados con mortalidad que llegó a presentarse durante las pruebas, después se analiza la morfometría, finalmente las respuestas fisiológicas. Las actividades metabólicas que se describen son: el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada, el consumo de alimento, y la producción de heces.

A. Mortalidad durante la prueba.

A pesar de que las concentraciones seleccionadas se consideraron adecuadas para las pruebas de subletalidad, llegó a presentarse mortalidad en el bioensayo en los días indicados en la tabla 20. En exposición a Cr, el primer caso se presentó el día 12 en la concentración 0.080 mgCr/L, lo que representaba 6.25% de mortalidad y, hasta el día 16, se presentó otro, esta vez en la concentración 0.180 mgCr/L . Todavía llegó a presentarse un caso más en la primera concentración, el día 18 (12.5% de mortalidad), pero se decidió no suspender este experimento dado que restaban solamente tres días para terminar el plazo programado. Sin embargo, al presentarse otro organismo muerto en la segunda concentración, se terminó el ensayo el día 20. En el caso de los organismos expuestos a Cd, el primer organismo muerto se presentó a los 6 días de iniciado el bioensayo en la concentración 0.170 mgCd/L; el segundo, el día 8 en 0.095 mgCd/L. Debido a que el día 9 murió otro

ostión en la concentración 0.170 mgCd/L, el día 10, se suspendió la exposición a esta concentración. El día 14 se suspendió el experimento con Cd, debido a la mortalidad de un organismo más.

Tabla 20. Mortalidad de *C. virginica* durante el bioensayo de evaluación de respuestas fisiológicas en exposición a concentraciones subletales de Cr y Cd.

Día	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Control															
0.080 mgCr/L							*						*		
0.180 mgCr/L											*				*
0.095 mgCd/L			*					*	Φ						
0.170 mgCd/L	*			*	Φ										

* Mortalidad de un individuo del lote de 12; Φ, suspensión del bioensayo en esa concentración.

B. Morfometría posterior al bioensayo.

Las características de los organismos obtenidas al final de los bioensayos (tabla 21), hicieron evidente que los organismos expuestos a Cr (los cuales llegaron a los veinte días de exposición), presentaron pesos menores respecto a los organismos del grupo control ($P < 0.02$, ANOVA). En los ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L el peso total de fue 47.63 ± 9.33 g y representó el 80% del peso total de los controles, 59.17 ± 11.70 g. El peso húmedo fue 4.80 ± 1.13 g y representó el 71% respecto a los controles 6.75 ± 1.67 g. El peso seco fue 0.81 ± 0.28 g, correspondiente al 59% del grupo control (1.38 ± 0.47 g). La exposición de 10 y 14 días al Cd no modificó el peso de los ostiones respecto al grupo testigo ($P > 0.05$).

Tabla 21. Parámetros morfométricos de los ostiones al término de las pruebas fisiológicas con exposición subletal al Cr y al Cd (promedio \pm DE).

	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso total (g)	Peso Húmedo (g)	Peso seco (g)
Control	70.0 \pm 7.0	47.9 \pm 5.6	28.4 \pm 5.0	59.17 \pm 11.70	6.75 \pm 1.67	1.378 \pm 1.467
0.080 mgCr/L	68.9 \pm 6.0	47.4 \pm 4.7	28.9 \pm 3.3	56.54 \pm 9.91	5.93 \pm 1.42	1.029 \pm 0.405*
0.180 mgCr/L	70.4 \pm 6.3	45.5 \pm 7.9	25.5 \pm 4.6	47.63 \pm 9.33 *	4.80 \pm 1.13 *	0.807 \pm 0.282*
0.095 mgCd/L	67.0 \pm 4.8	49.5 \pm 6.9	25.9 \pm 4.4	54.69 \pm 13.31	6.21 \pm 1.68	1.276 \pm 0.613
0.170 mgCd/L	68.8 \pm 6.9	49.9 \pm 5.9	28.3 \pm 4.9	56.83 \pm 17.27	5.54 \pm 1.31	1.231 \pm 0.438

* Diferencias significativas respecto al control.

La comparación entre la morfometría inicial y la final, indicó diferencias significativas en la longitud de los organismos ($P < 0.01$, t de student apareada). El promedio al inicio del bioensayo fue 69.6 mm y al final 70.0 mm. Sin embargo, debido a que esta característica se obtiene con vernier, y puede existir el riesgo de manipulación, esta diferencia no se consideró contundente. El ancho y el alto no presentaron diferencias importantes. Por otro lado, el peso total de los organismos control fue menor ($P < 0.01$) al inicio del ensayo (55.92 \pm 8,59 g), respecto al final (56.39 \pm 11.70 g), lo que implica que únicamente los ostiones no expuestos a los metales mostraron un incremento en el peso.

El peso seco esperado para ostiones de la clase de talla utilizada durante los bioensayos (Powell *et al.*, 1992), indicó valores similares a los obtenidos al término del ensayo, en los organismos control y en los expuestos a 0.095 mgCd/L ($P > 0.09$, t de student). Sin embargo, en los expuestos a 0.080 mgCr/L, 0.180 mgCr/L, así como a 0.170 mgCd/L, fue menor al esperado ($P < 0.01$) (tabla 22). Estos últimos, los expuestos a 0.170 mgCd/L, también tuvieron un peso seco significativamente menor al de los controles, a pesar de duraron menos tiempo en el bioensayo. Si bien el peso seco indicó que hubo un deterioro en estos organismos, el índice de

condición (IC), no se afectó por la exposición a los metales, durante el período de prueba. De acuerdo a este índice, los organismos se encontraban aún en buenas condiciones al final del bioensayo. El IC menor, se registró en ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L (96.1 g/mL), pero se considera que los ostiones se encuentran en condiciones adecuadas si su IC está entre 80 g/mL y 100 g/mL (Walne, 1984).

Tabla 22. Peso seco (promedio \pm desviación estándar) e índice de condición (obtenido con todo el lote) de los organismos en las pruebas de evaluación de respuestas fisiológicas.

	Peso seco obtenido (g)	Peso seco esperado (g)	Índice de Condición (g/mL)	
Mantenimiento	1.59 \pm 0.13		131.8	Al inicio
Control	1.38 \pm 0.47	1.66	114.0	20 días
0.080 mgCr/L	1.03 \pm 0.40 *	1.58	101.7	20 días
0.180 mgCr/L	0.81 \pm 0.28 *^a	1.68	96.1	20 días
0.095 mgCd/L	1.28 \pm 0.61	1.46	106.4	14 días
0.170 mgCd/L	1.23 \pm 0.44 *	1.66	115.4	10 días

* Diferencias significativas respecto al esperado; ^a, significativamente menor que el control.

C. Consumo de oxígeno.

Se compararon las condiciones iniciales de oxígeno disuelto en las cámaras experimentales, para observar si los organismos se encontraban en condiciones similares. Los valores de oxígeno disuelto al inicio de la evaluación fueron similares en las doce cámaras con organismos control, lo mismo que en las cámaras de cada una de las concentraciones de exposición ($P > 0.05$, ANOVA). El oxígeno disuelto promedio en las cámaras al inicio de la evaluación del consumo, tuvo un promedio de 3.81 ± 0.64 mg/L. El promedio inicial en las cámaras sin organismos fue de 4.6 ± 0.22 mg/L. El consumo de oxígeno en las cámaras sin organismos,

tuvo un promedio de 0.24 mg/h por cámara. Este valor fue restado del consumo de oxígeno de cada animal.

El oxígeno que fue consumido por cada organismo control en una hora, fue similar en los doce especímenes que conformaron el lote ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis). En este lote se presentó un consumo mayor el día 5 del experimento de 0.70 ± 0.40 mg/h/gPS ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis), mientras que los días restantes fue en promedio de 0.26 ± 0.18 mg/h/gPS.

La respiración mostró valores uniformes en los organismos expuestos a Cr, a lo largo de los días evaluados, estos consumieron en promedio 0.52 ± 0.37 mg/h/gPS y 0.45 ± 0.40 mg/h/gPS, en exposición a 0.080 mgCr/L y 0.180 mgCr/L, respectivamente. La respiración de los organismos expuestos a Cr fue prácticamente idéntica los días 10, 14 y 19 en las dos concentraciones de prueba (Fig. 24).

Los ostiones expuestos al Cd mostraron variaciones en el consumo de oxígeno a lo largo del bioensayo ($P < 0.05$). El día 5, los organismos expuestos a 0.170 mgCd/L tuvieron un mayor consumo (0.88 ± 0.77 mg / h / gPS) que el resto de los organismos, incluyendo los controles ($P < 0.03$). En la concentración 0.095 mgCd/L, el día 14 los ostiones presentaron el mayor consumo de oxígeno promedio registrado en el bioensayo que fue de 1.41 ± 1.16 mg / h / gPS ($P < 0.01$). Los ostiones expuestos a esta concentración, en contraste, habían mostrado un consumo bajo el día 3 (0.16 ± 0.03 mg / h / gPS). En los ostiones expuestos al Cd el consumo de oxígeno fue heterogéneo dentro de cada lote, de hecho, las desviaciones estándar manifestaron la presencia de casos extremos en los lotes con organismos expuestos a ambos metales a partir del día 10 (tabla 23).

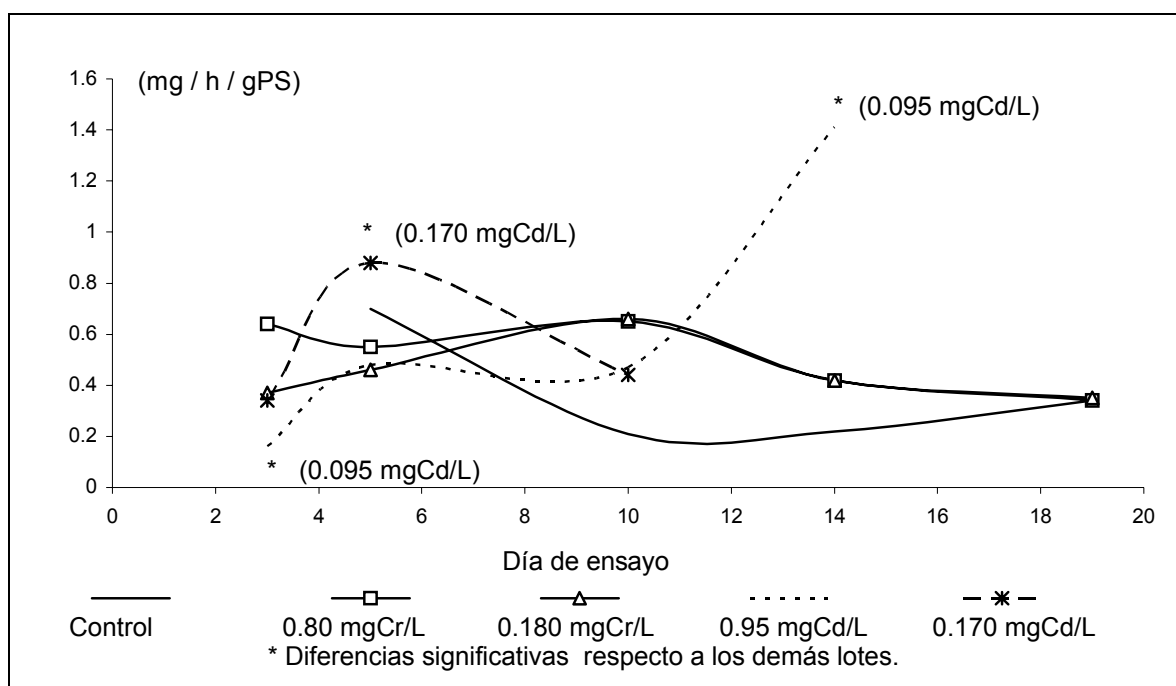


Figura 24. Variación del consumo de oxígeno en *C. virginica* (mg / h / gPS) a lo largo del bioensayo para evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

Tabla 23. Consumo de oxígeno (mg / h / gPS) en *C. virginica* expuesto a Cr y Cd. Se presentan valores promedio \pm desviación estándar.

Día	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
D3	-	0.64 \pm 0.44	0.37 \pm 0.18	0.16 \pm 0.03 *	0.34 \pm 0.34
D5	0.70 \pm 0.40	0.55 \pm 0.51	0.46 \pm 0.30	0.48 \pm 0.54	0.88 \pm 0.77 *
D10	0.21 \pm 0.13	0.65 \pm 0.36	0.66 \pm 0.64	0.47 \pm 0.63	0.44 \pm 0.43
D14	0.22 \pm 0.26	0.42 \pm 0.35	0.42 \pm 0.52	1.41 \pm 1.16 *	
D19	0.34 \pm 0.14	0.34 \pm 0.21	0.35 \pm 0.37		

* Diferencias significativas respecto al resto de los lotes ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

Las variaciones en el consumo de oxígeno no se asociaron a la pérdida de peso de los organismos en ninguno de los dos metales.

D. Excreción nitrogenada.

La concentración de amonio total promedio al inicio de los bioensayos fue de 0.13 ± 0.09 mg/L y los valores fueron similares entre las doce cámaras de cada condición experimental. La concentración inicial en las cámaras sin organismos fue 0.15 ± 0.02 mg/L. El incremento de amonio total en estas fue de 0.053 mg/h. Este valor fue restado de la producción individual.

De manera general, se observó una disminución en los valores a lo largo de los días evaluados ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis). Esta fue significativa en los organismos control y en los expuestos a Cr, los cuales mostraron la tasa más baja día 19 ($P < 0.04$). Solo se demostró una mayor excreción nitrogenada en los organismos expuestos a 0.180 mgCr/L el día 10 (0.141 ± 0.088 mg N-AT / h / gPS), respecto a los controles ($P < 0.01$) (Fig. 25).

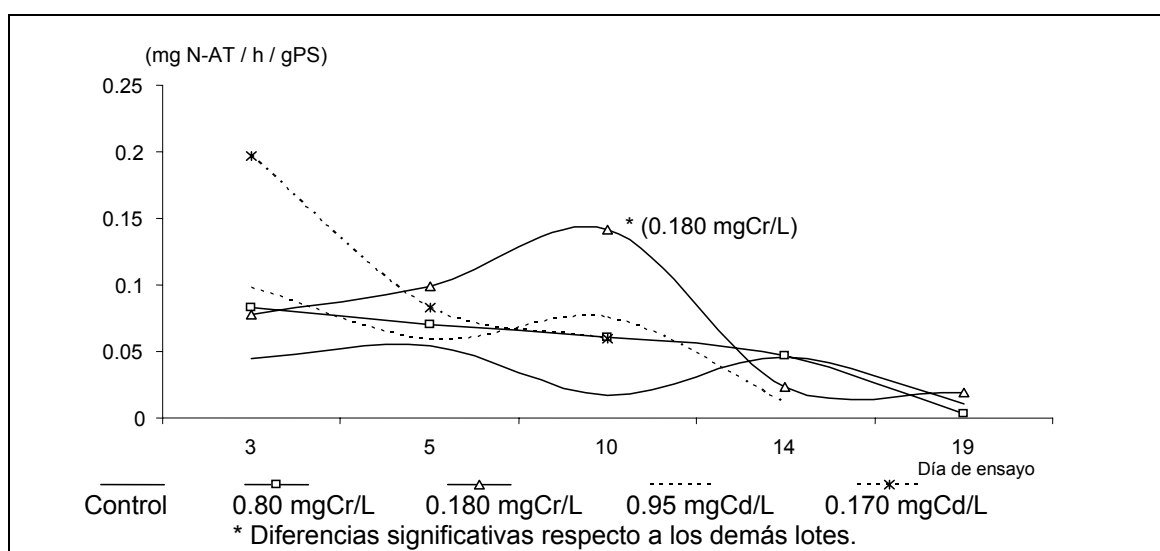


Figura. 25. Variación en la excreción nitrogenada de *C. virginica* (mg N-AT / h / gPS), a lo largo del bioensayo para evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

En los organismos expuestos al Cd, no se observaron diferencias significativas por efecto del metal (tabla 24). La dispersión de los datos de excreción nitrogenada fue amplia e influyó en el análisis.

Tabla 24. Excreción nitrogenada (mg N-AT / h / gPS) en los ostiones expuestos a Cr y Cd. Se indican valores promedio \pm desviación estándar.

Día	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
D3	0.045 \pm 0.041	0.083 \pm 0.063	0.077 \pm 0.068	0.098 \pm 0.080	0.195 \pm 0.250
D5	0.054 \pm 0.037	0.070 \pm 0.050	0.098 \pm 0.16	0.059 \pm 0.057	0.083 \pm 0.122
D10	0.017 \pm 0.026	0.061 \pm 0.083	0.141 \pm 0.088 *	0.075 \pm 0.053	0.059 \pm 0.084
D14	0.046 \pm 0.035	0.047 \pm 0.086	0.023 \pm 0.027	0.012 \pm 0.015	
D19	0.010 \pm 0.010	0.003 \pm 0.003	0.019 \pm 0.009		

* Mayor excreción respecto al control ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

E. Consumo de alimento.

El número de células colocadas como alimento en las cámaras experimentales a lo largo de los bioensayos, fue en promedio de 9,769 cel/mL. La tasa de depositación de células se calculó en las seis cámaras sin organismos. En estas, la cantidad diaria de células colocada, se estimó en 10,134 \pm 2,756 cel/mL. Las concentraciones fueron similares en las cámaras y fueron similares en los días en los que se determinó la tasa de depositación ($P > 0.05$, ANOVA). Como se llevó a cabo el recambio diario de un litro de agua, en cada ocasión, se adicionó una densidad de células semejante a la colocada el día anterior, y dado que no había consumo de células en estas cámaras, la concentración total se incrementó cada día. Debido a esto, los valores se ajustaron por regresión lineal para conocer el

incremento de células diario en las cámaras, y la diferencia por día permitió a la vez estimar la tasa de depositación diaria de células. Con estos datos se determinó la depositación diaria de 3,728 cel/mL, con la cual se efectuaron las correcciones del número de células incorporadas por los organismos. La depositación fue similar en las seis cámaras sin organismos durante los días evaluados ($P > 0.05$). La concentración inicial de células registrada en cada uno de dispositivos experimentales con organismos, en las ocasiones en que se evaluó el consumo de alimento (días 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16 y 17), fue en promedio $10,707 \pm 5,398$ y fue semejante en los lotes control y los expuestos a los metales. Además fue similar a la concentración colocada, ($P > 0.05$, t de student). A pesar de que los dispositivos con ostiones expuestos a Cd mostraron un valor promedio aparentemente mayor cada día, alcanzando el día 12, una concentración hasta de de 23,883 cel/mL, las concentraciones de células registradas dentro de las cámaras no mostraron diferencias significativas entre los días evaluados ($P > 0.05$, ANOVA) (Fig. 26).

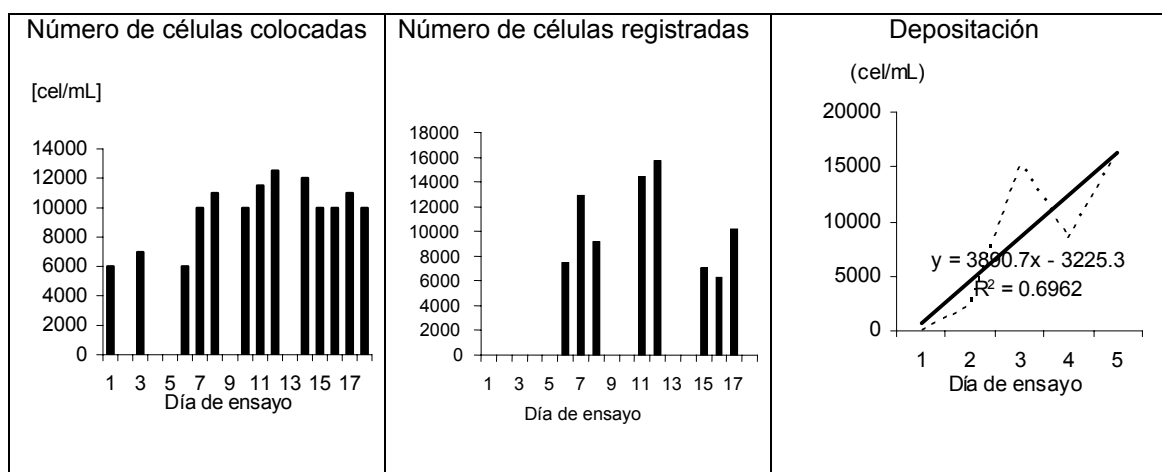


Figura. 26. Número de células de *T. suecica* suministradas a cada organismo (promedio) y depositación de células en las cámaras sin organismos.

La incorporación de células por parte de los organismos se consideró continua en 24 horas, al igual que su depositación. El consumo diario se determinó en millones de células por organismo. El grupo de ostiones control presentó diferencias significativas en los días analizados ($P < 0.01$, ANOVA), con consumo significativo el día 7 y una posterior disminución paulatina. Los ostiones expuestos a Cr mostraron un consumo alto, particularmente los días 7, 11 y 12, si bien, las diferencias no fueron significativas respecto al consumo del grupo control debido a la dispersión de los datos. Únicamente el día 17, los ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L tuvieron un consumo mayor que el grupo control. En algunas cámaras con organismos expuestos al Cd, la depositación de células fue mayor que el consumo los días 6, 7 y 11, debido a ello se obtuvieron valores negativos. En este análisis se eliminaron los datos negativos, en los que el consumo pudo ser nulo. Los ostiones expuestos a Cd no mostraron diferencias respecto a los controles (tabla 25).

Tabla 25. Consumo individual de células de *T. suecica* (10^6 / d) en *C. virginica* durante la evaluación de respuestas fisiológicas. Se presentan promedios \pm desviación estándar.

Día de ensayo	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
D6	58 \pm 32	71 \pm 44	72 \pm 27	30 \pm 39	34 \pm 24
D7	151 \pm 95 *	121 \pm 99	150 \pm 12	36 \pm 25	56 \pm 64
D8	98 \pm 73	73 \pm 76	74 \pm 52	63 \pm 17	118 \pm 124
D11	79 \pm 49	149 \pm 69	110 \pm 43	95 \pm 74	
D12	82 \pm 58	151 \pm 144	145 \pm 203	144 \pm 91	
D15	52 \pm 51	52 \pm 63	48 \pm 57		
D16	31 \pm 40	59 \pm 53	40 \pm 16		
D17	44 \pm 30	43 \pm 47	103 \pm 53 **		

* Diferencias significativas en el tiempo; ** Mayor consumo que el grupo control ese día ($P < 0.05$, ANOVA).

F. Producción de heces fecales.

La cantidad de heces producidas por todos los organismos, incluyendo los controles disminuyó a lo largo del bioensayo ($P < 0.01$, ANOVA) (Fig. 27). Dada la cantidad requerida para su análisis, los datos fueron agrupados promediando los valores de varios días. La producción de heces generalmente fue mayor en los organismos control. Así, en los días 2 y 3, los organismos expuestos a 0.080 mgCr/L y a 0.170 mgCd/L, tuvieron menor producción de heces que los demás grupos. Los días 6 a 10, los controles tuvieron una producción mayor que los expuestos a ambos metales, y finalmente en los días 11 a 14, los organismos control, así como los expuestos 0.080 mgCr/L, produjeron más heces que el resto de los animales (tabla 26).

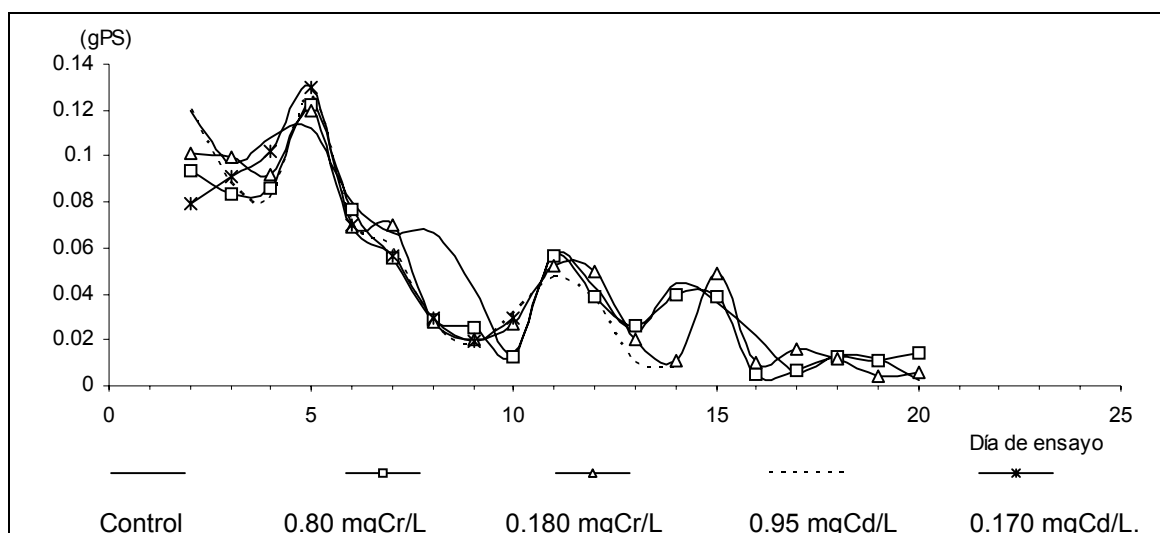


Figura. 27. Producción diaria de heces (gPS / d) en *C. virginica* durante la evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

Tabla 26. Producción de heces (gPS / d) en diferentes plazos durante la evaluación de respuestas fisiológicas. Se presentan promedios \pm desviación estándar.

Grupo de días	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
2 a 3	0.112 \pm 0.022	0.089 \pm 0.023 *	0.106 \pm 0.024	0.104 \pm 0.027	0.085 \pm 0.015 *
4 a 5	0.110 \pm 0.017	0.105 \pm 0.022	0.106 \pm 0.029	0.104 \pm 0.029	0.112 \pm 0.025
6 a 10	0.058 \pm 0.029 *	0.045 \pm 0.026	0.044 \pm 0.027	0.044 \pm 0.028	0.042 \pm 0.024
11 a 14	0.042 \pm 0.018 *	0.041 \pm 0.020 *¹	0.033 \pm 0.022	0.027 \pm 0.021	
15 a 20	0.014 \pm 0.013	0.015 \pm 0.016	0.019 \pm 0.018		

* Diferencias significativas, los controles con valores mayores que los expuestos ($P < 0.01$, ANOVA);

¹ No diferente respecto al control ($P > 0.05$).

3.3.5.3. INTEGRACIONES SIMPLES.

Los modelos que representan integraciones simples se describen en esta sección, e incluyen la relación O:N, tasa de filtración, asimilación y eficiencia de asimilación.

A. RELACIÓN O:N.

Los valores, obtenidos para los días 3, 5, 10, 14 y 19 se consideraron similares entre los doce organismos que conformaron los lotes, tanto en controles como en expuestos a los metales ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis). Los organismos control tuvieron una relación O:N de 40.0 ± 47.9 en las evaluaciones del día 5 al 19.

Los organismos expuestos a 0.080 mgCr/L mostraron una gran dispersión de los datos, lo cual impidió demostrar diferencias estadísticas entre los días evaluados.

En los ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L, la relación O:N tuvo variaciones a lo largo del experimento, presentándose valores muy bajos el día 10 (0.7 ± 0.2), que además fueron significativamente menores al control ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

Los ostiones expuestos a 0.095 mgCd/L, mostraron diferencias estadísticas respecto a los controles el día 14. Por otro lado, en los organismos expuestos a 0.170 mgCd/L también se comprobaron diferencias entre los días evaluados, siendo elevados los valores del día 5, si bien ese día no se consideraron diferentes de los controles (tabla 27).

Tabla 27. Relación O:N generada durante el bioensayo fisiológico en ostiones *C. virginica* expuestos a Cr y Cd. Se presentan promedios \pm desviación estándar.

Día de ensayo	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
D3		14.6 \pm 19.0	11.2 \pm 20.2	17.1 \pm 22.4	2.3 \pm 2.4
D5	15.3 \pm 9.3	2.2 \pm 2.1	50.3 \pm 60.7	67.7 \pm 96.6	83.2 \pm 79.3 *
D10	27.6 \pm 23.4	16.3 \pm 15.0	0.7 \pm 0.2 *	8.4 \pm 9.6	12.7 \pm 16.8
D14	8.0 \pm 6.8	14.5 \pm 16.1	42.4 \pm 21.7	227.7 \pm 168.3 **	
D19	63.4 \pm 62.8	223.5 \pm 166.0	20.4 \pm 26.1		

* Diferencias significativas respecto a otros días evaluados; **, Diferencias respecto al control ese día ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

Los valores de la relación O:N que se determinaron para controles se consideran asociados a un metabolismo equilibrado de proteínas, carbohidratos y lípidos (Mayzaud y Conover, 1988), por lo que estos organismos no presentaron una condición de estrés.

Los valores bajos, menores a 3.0, determinados de los organismos expuestos a 0.180 mgCr/L (0.7) se asocian al consumo de las proteínas del animal. Los altos, superiores a 50.0, como los determinados el día 19 en ostiones expuestos a 0.080 mgCr/L, implican un consumo de los materiales de reserva del animal. En ambos casos la respuesta indica que el organismo se encuentra en una condición de estrés.

En el caso de los ostiones expuestos a Cd la relación O:N determinada el día 5

(83.2), en 0.170 mgCd/L; así como la elevación hasta 227.7 (significativamente diferente a los controles) en ostiones expuestos a 0.095 mgCd/L, también son relevantes a nivel metabólico (Fig. 28).

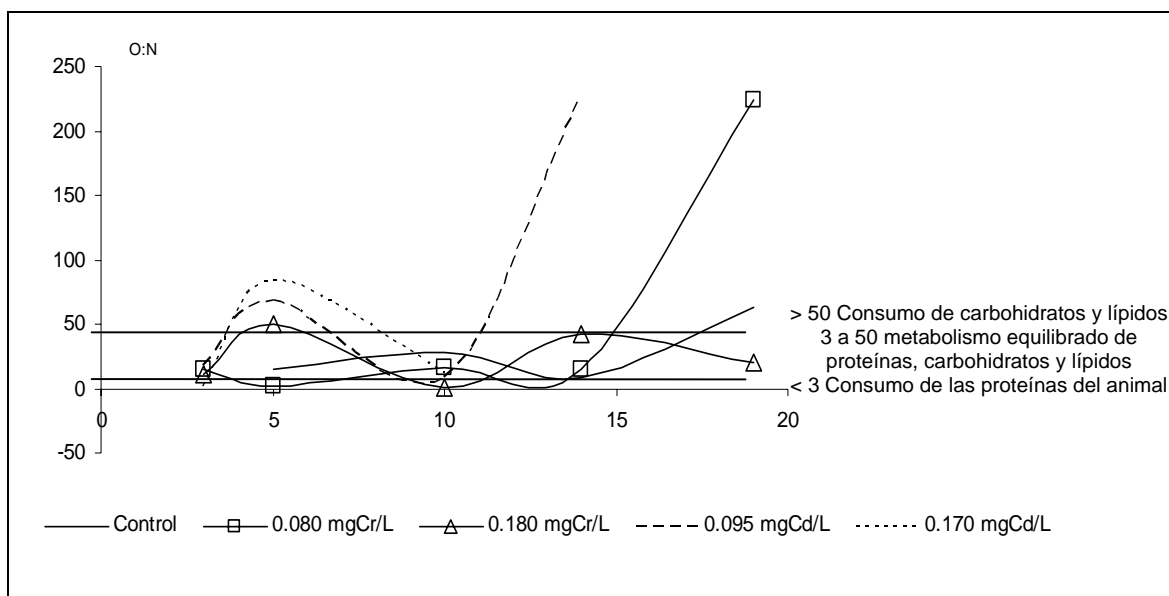


Figura. 28. Relación O:N en *C. virginica* asociada a la exposición a Cr y a Cd durante la evaluación de respuestas fisiológicas.

B. Tasa de filtración.

La tasa de filtración fue determinada los días 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16 y 17 (tabla 28). Los ostiones control presentaron variaciones entre los individuos que conformaron el grupo ($P < 0.01$) asociables a la presencia de casos extremos. Si bien hubo algunos casos extremos en la tasa de filtración de organismos expuestos a los metales, no se presentaron diferencias significativas dentro de los lotes.

La tasa de filtración fue de 1.21 L/h en ostiones control y se consideró similar a la de ostiones expuestos al Cr, 1.07 L/h y 0.82 L/h y sin variaciones importantes al paso de los días evaluados ($P > 0.07$, Kruskal-Wallis).

No Hubo diferencias apreciables en la tasa de filtración de los organismos expuestos a Cd a lo largo de los días evaluados. Sin embargo, los ostiones expuestos a este metal presentaron una tasa de filtración promedio menor a la de los controles ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis), de 0.68 L/h, y 0.44 L/h en los organismos expuestos a 0.095 mgCd/L y 0.170 mgCd/L, respectivamente.

Tabla 28. Tasa de filtración promedio (L/h) de los ostiones durante la evaluación fisiológica.

Día de ensayo	Control*	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
6	2.06	1.37	0.46	0.69	0.24
7	0.76	0.75	0.68	0.36	0.35
8	0.78	0.51	0.86	0.91	0.59
11	1.10	0.55	0.74	0.45	
12	0.54	1.12	0.59	0.90	
15	2.57	2.04	1.14		
16	0.68	1.37	0.96		
17	1.55	1.07	0.31		
Promedio \pm DE	1.21 \pm 1.47	1.07 \pm 1.44	0.82 \pm 0.94	0.68 \pm 1.09 **	0.44 \pm 0.41 **
Mínimo	0.04	0.03	0.01	0.07	0.06
Máximo	5.66	5.87	5.57	5.98	1.70

* Diferencias significativas entre los individuos que conformaron el lote; **, Diferencias significativas respecto al control ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis).

La dispersión de los datos generada por valores extremos en el lote de organismos control, indicó la posibilidad de que existieran dos tasas de filtración. La distribución de frecuencias mostró que efectivamente se presentaron dos tasas y que los

valores mayores a 4.00 L/h pudieron considerarse altas y los menores a 2.00 L/h, tasas bajas (Fig. 29).

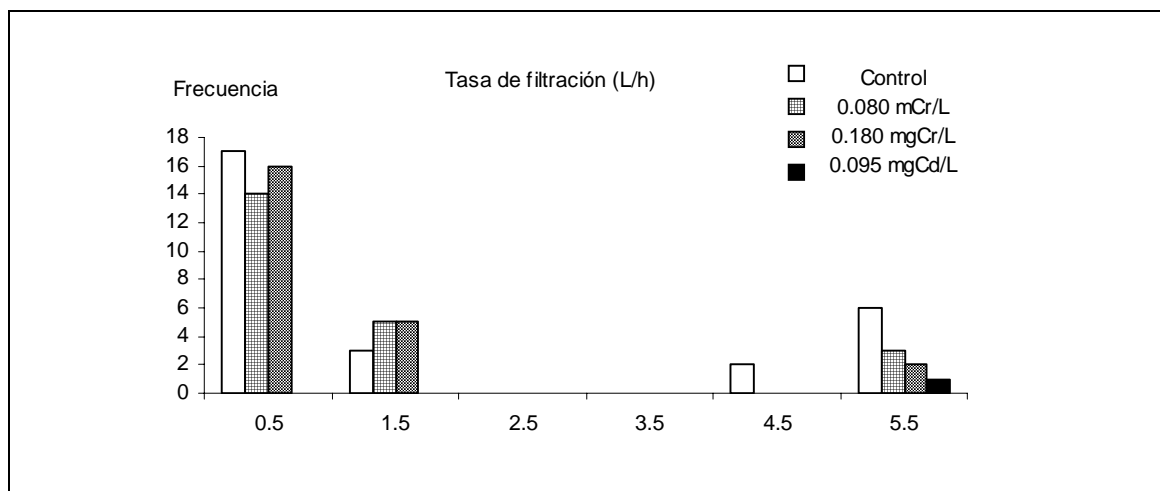


Figura. 29. Distribución de frecuencias de las tasas de filtración (L/h) de los ostiones *C. virginica* expuestos a Cr y Cd.

El valor promedio de las tasas altas en organismos control fue 5.27 L/h y representaron el 13% de los datos. En los ostiones expuestos a 0.080 mgCr/L y 0.180 mgCr/L, fueron de 5.51 L/h y 5.01 L/h, representando el 9% y el 4% de los datos, respectivamente. Solo un organismo expuesto a 0.095 mgCd/L presentó una tasa elevada de 5.98 L/h. No hubo tasas altas en ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L. Las tasas altas de filtración no presentaron diferencias, entre los ostiones control y los expuestos a los metales ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis). Su escaso número no permitió obtener una tendencia respecto al tiempo.

Las tasas de filtración bajas representaron el 92.5% de todas las tasas medidas (tabla 29). Los organismos de cada lote tuvieron tasas bajas semejantes ($P > 0.05$, ANOVA), no se observaron diferencias entre los controles y los expuestos a los metales. Además, a pesar de que se obtuvieron valores que aparentemente

disminuían, no hubo diferencias significativas en los días evaluados ($P > 0.05$, ANOVA).

Tabla 29. Tasa baja de filtración (L/h) determinada en ostiones durante la evaluación de efectos fisiológicos. Se señalan valores promedio.

Día de ensayo	Control	0.080 mgCr/L	0.180 m μ gCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
6	0.80	0.84	0.95	0.69	0.24
7	0.76	0.75	0.68	0.36	0.35
8	0.78	0.50	0.86	0.91	0.59
11	0.53	0.55	0.74	0.45	
12	0.54	0.64	0.59	0.25	
15	0.41	0.38	0.51		
16	0.68	0.25	0.54		
17	0.56	0.59	0.31		
Promedio	0.64 \pm 0.45	0.60 \pm 0.44	0.64 \pm 0.50	0.50 \pm 0.44	0.44 \pm 0.41

Las tasas de filtración altas y bajas esperadas para organismos de la misma talla, fueron de 7.56 L/h y 1.72 L/h, respectivamente. En todos los casos, ambos valores fueron estadísticamente mayores a los obtenidos ($P < 0.01$, t de student) (Fig. 30).

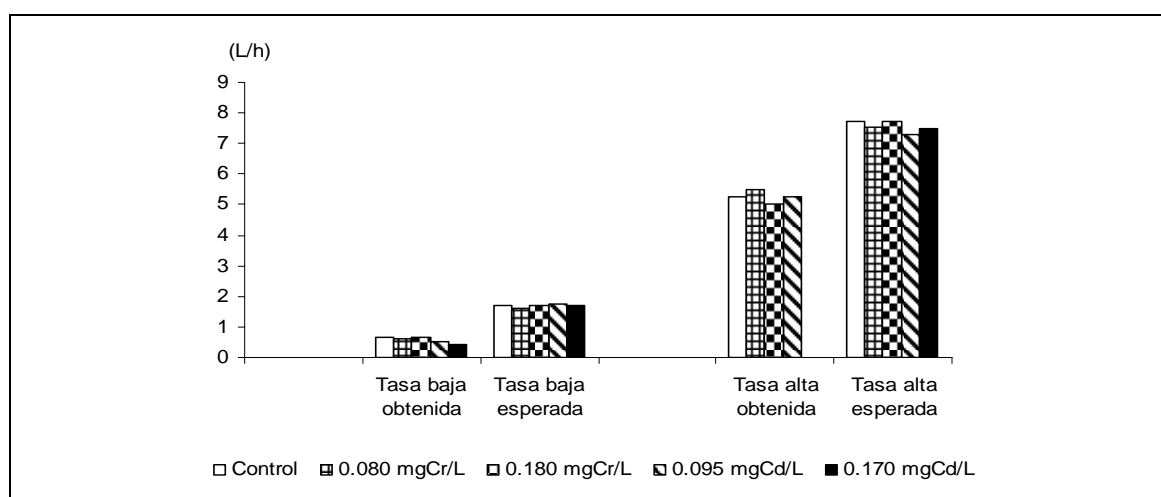


Figura. 30. Tasas de filtración obtenidas y esperadas en ostiones *C. virginica* de la misma talla.

C. Asimilación y eficiencia de asimilación.

Para la determinación de esta tasa, se utilizaron los datos de ingestión y producción de heces en unidades energéticas. La tasa de ingestión de células se transformó a valores energéticos (cal/d), a partir del valor calórico de muestras de *T. suecica* con un peso y un número de células conocidos. Este valor fue de 2,048 cal / gPS. La tasa de ingestión de cada individuo, fue de 328.4 ± 257.6 cal/d en el grupo control. Hubo una disminución significativa en la tasa de ingestión de este grupo a lo largo del período evaluado ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

Los ostiones expuestos a Cr tuvieron una tasa de 379.3 ± 321.6 cal/d y 412.1 ± 378.8 cal/d, en las concentraciones de exposición baja y alta, respectivamente. En los organismos expuestos al Cr, la dispersión de los datos enmascaró las diferencias en el tiempo y respecto al grupo control (Fig. 31).

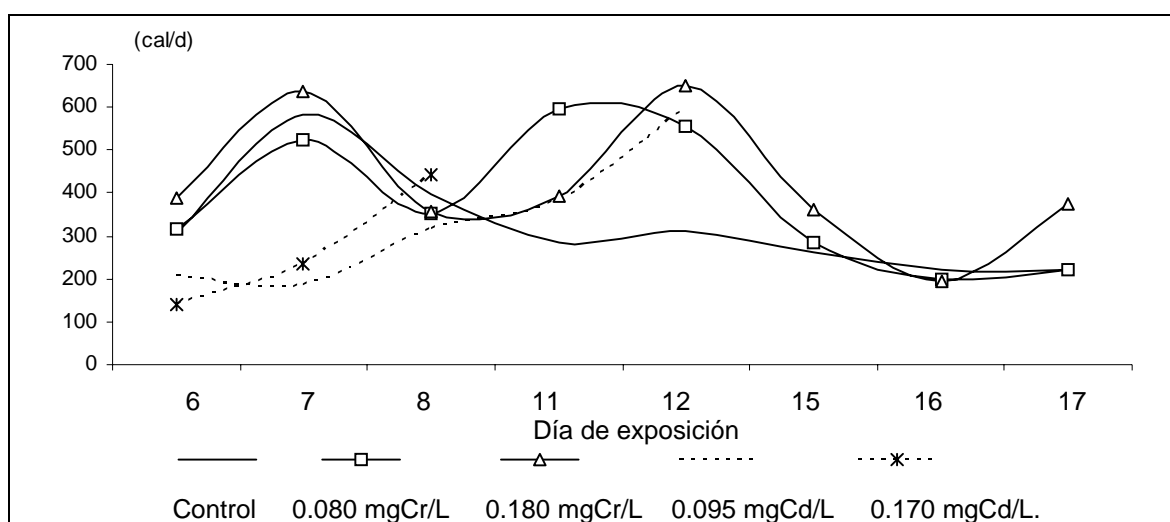


Figura. 31. Tasa de ingestión (cal/d) en *C. virginica* durante el bioensayo de evaluación de respuestas fisiológicas. Se grafican valores promedio.

En el caso de los ostiones expuestos a Cd, la tasa de ingestión promedio fue de 338.8 ± 181.9 cal/d y 272.6 ± 284.5 cal/d en la concentración menor y mayor, respectivamente. De manera semejante a la exposición a Cr, a pesar de algunos valores aparentemente altos, la ingestión también se consideró similar entre los ostiones del grupo control y los expuestos a este metal ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis).

La producción de heces se expresó en valores energéticos a partir del análisis calórico de las muestras generadas por cada individuo y se determinó también para días específicos (tabla 30). El valor calórico tuvo variaciones en los días analizados, tanto en el grupo control como en ostiones expuestos a los metales ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis). De manera general los valores mostraron una tendencia a disminuir, aunque en los ostiones expuestos al Cr se observaron amplias variaciones.

Tabla 30. Producción individual de heces en *C. virginica* (cal/d) en organismos expuestos a Cr y Cd durante las pruebas fisiológicas. Se señalan promedios \pm desviación estándar.

Día de ensayo	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
6	17.6 \pm 6.4	19.5 \pm 15.8	21.6 \pm 6.2	17.1 \pm 4.0	20.4 \pm 4.6
7	14.6 \pm 4.1	14.2 \pm 4.0	21.7 \pm 6.1^a	14.6 \pm 5.5	16.4 \pm 4.5
8	14.6 \pm 7.3^{a, b}	7.3 \pm 4.6	8.56 \pm 6.2	6.5 \pm 3.2	8.7 \pm 4.9
11	11.2 \pm 3.0	22.8 \pm 8.1^a	14.6 \pm 3.8^a	14.1 \pm 5.4	
12	8.4 \pm 2.0	16.1 \pm 3.8^a	13.8 \pm 5.5^a	11.6 \pm 3.3^b	
15	9.8 \pm 3.2	22.1 \pm 9.6^a	14.5 \pm 3.2^a		
16	1.3 \pm 0.9	3.0 \pm 4.1	2.9 \pm 2.3		
17	1.5 \pm 0.8	3.8 \pm 2.3^a	5.11 \pm 2.5^a		

^a, Diferencia entre organismos control y expuestos a Cr ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis); ^b, Diferencia entre organismos control y expuestos a Cd.

Como se observa en la Fig. 32, los valores calóricos de las heces producidas por ostiones expuestos al Cr, tuvieron un comportamiento diferente al registro gravimétrico. La producción de heces expresada en unidades energéticas fue significativamente mayor que los controles, los días 11, 12, 15 y 17. Por otro lado, solo el día 8, el valor calórico de las heces de ostiones control fue mayor. Esto implica que, si bien la producción gravimétrica de heces fue similar ambos grupos, con una tendencia a disminuir, la pérdida calórica por heces puede interpretarse como una asimilación incompleta del alimento en animales expuestos a este metal.

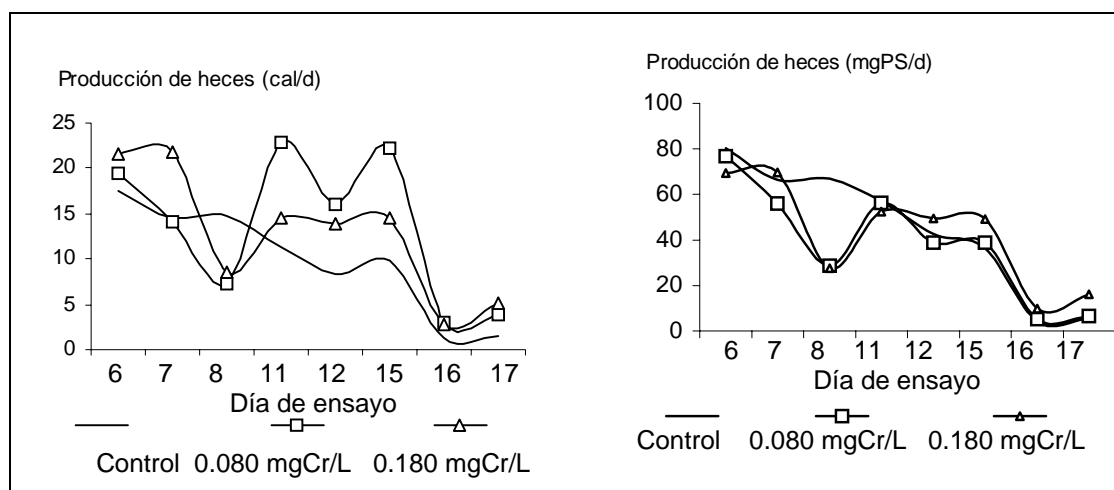


Figura. 32. Tasa de producción de heces de *C. virginica* expresada en valores energéticos (cal/d) y gravimétricos (mgPS/d). Se presentan valores promedio de los grupos control y expuestos a Cr.

En los organismos expuestos a Cd también se observaron irregularidades significativas en la tasa de producción de heces en valores calóricos a lo largo del bioensayo, aunque en general no hubo diferencias apreciables respecto a los controles. La excepción fue el día 8 en que los organismos expuestos al Cd tuvieron un valor calórico menor a los controles ($P < 0.01$), y el día 12, en que los

especímenes expuestos a 0.095 mgCd/L tuvieron un valor superior al del control ($P < 0.01$) (Fig.33).

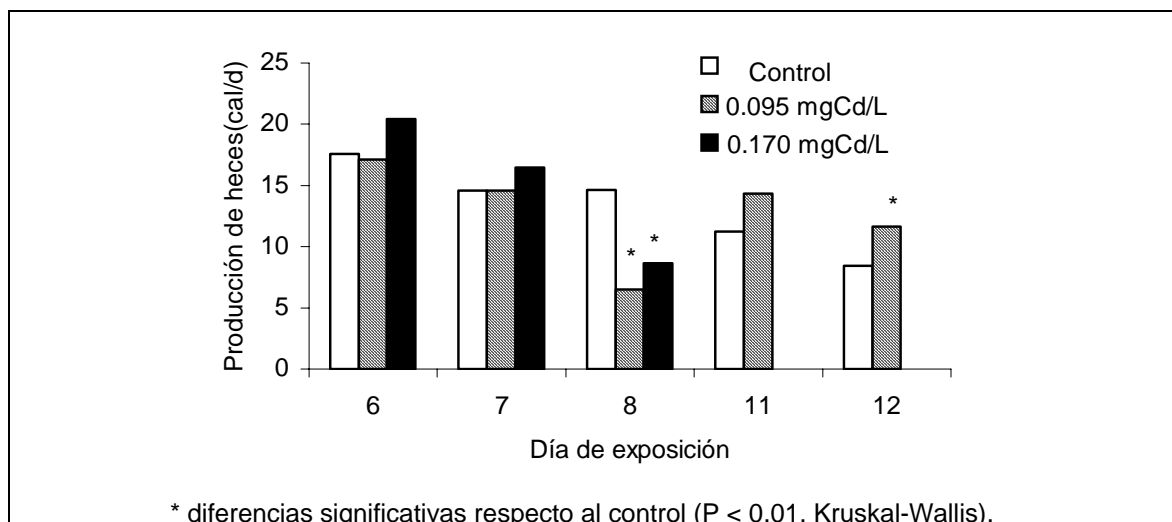


Figura. 33. Tasa de producción de heces de *C. virginica* (cal/d). Se presentan valores promedio de los grupos control y expuestos a Cd.

La asimilación del alimento no mostró cambios a lo largo de los días, en el grupo control, cuyo promedio fue 236.5 ± 263.8 cal/d, ni en los expuestos a Cr, con promedios de 217.3 ± 317.1 cal/d y 271.0 ± 363.6 cal/d, para las concentraciones de exposición baja y alta, respectivamente. No se presentaron diferencias entre la asimilación de los organismos control y los expuestos a este metal, con excepción del día 7, en el cual los organismos control presentaron una mayor asimilación. Se determinaron valores aparentemente elevados de eficiencia de asimilación en ostiones expuestos a Cr, que no tuvieron diferencias estadísticas con los controles. De esta manera la influencia de la exposición al Cr no quedó claramente demostrada.

La asimilación del alimento en individuos expuestos al Cd ($P < 0.02$, Kruskal-

Wallis) fue menor que el grupo control los días 6 y 7 del ensayo. Además se apreció un incremento durante el período evaluado, que fue significativo en los ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis) (tabla 31).

Tabla 31. Asimilación del alimento (cal/d) en *C. virginica* expuesto a Cr y a Cd. Se presentan promedio \pm desviación estándar.

Día de ensayo	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L**
6	236.5 \pm 190.6	217.3 \pm 229.2	271.0 \pm 201.0	104.3 \pm 140.4 *	26.6 \pm 90.9 *
7	469.9 \pm 416.9	377.6 \pm 394.2 *	190.5 \pm 389.0 *	47.02 \pm 101.4 *	176.6 \pm 244.9 *
8	250.8 \pm 313.9	227.6 \pm 301.2	287.2 \pm 233.2	107.8 \pm 163.5	432.3 \pm 483.0
11	222.7 \pm 217.1	324.4 \pm 364.5	181.4 \pm 265.3	125.2 \pm 250.9	
12	251.7 \pm 240.0	337.0 \pm 483.8	473.1 \pm 745.5	372.0 \pm 388.5	
15	187.1 \pm 187.1	133.3 \pm 133.3	167.0 \pm 230.2		
16	152.6 \pm 146.2	105.3 \pm 200.7	121.8 \pm 139.3		
17	165.2 \pm 153.3	196.5 \pm 189.3	369.6 \pm 270.5		

* Diferencias estadísticas, mayor asimilación en ostiones control ese día ($P < 0.05$ por Kruskal-Wallis); ** Diferencias estadísticas entre los días evaluados.

La variabilidad de los resultados de la asimilación del alimento y de la tasa de producción de heces influyó de manera determinante en el análisis de la eficiencia de asimilación del alimento ingerido por los ostiones (tabla 32).

La eficiencia de asimilación del alimento ingerido se mantuvo en el grupo de organismos control con valores de 74 ± 6 % a través del período experimental ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis).

No se demostraron diferencias entre los grupos control y los expuestos a Cr, cuya eficiencia de asimilación fue de 64 ± 13 % y 66 ± 22 %, en las concentraciones baja y alta respectivamente. En ambos casos no se registraron diferencias en los días evaluados.

Sin embargo, la exposición a Cd si afectó la eficiencia de asimilación y se

presentaron diferencias significativas durante el periodo de exposición. Los días 6 y 7, la eficiencia fue menor en los ostiones expuestos al metal ($P < 0.02$).

Tabla 32. Eficiencia de asimilación del alimento en *C. virginica* (%) en lotes control y expuestos a Cr y Cd.

Día de ensayo	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	0.095 mgCd/L **	0.170 mgCd/L **
6	78	69	69	50 *	19 *
7	81	72	30	25 *	75 *
8	63	65	81	34	98
11	78	54	46	33	
12	81	61	73	62	
15	71	47	46		
16	69	53	62		
17	74	89	99		

* Diferencias estadísticas entre organismos control y expuestos a Cd ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis); ** Diferencias estadísticas entre los días evaluados.

D. Metabolismo basal.

El metabolismo basal determinada mediante la relación entre el consumo de oxígeno y la tasa de filtración, integró ambas respuestas, aunque estas fueron medidas en días secuenciales. Así, el consumo de oxígeno medido los días 5, 10 y 14, se asoció a la tasa de filtración promedio obtenida de los días 6, 7 y 8, en el primer caso, 11 y 12, en el segundo y 15, 16 y 17 en el tercero. Por este motivo los resultados se presentan como integrados para los días 5, 10 y 15.

El metabolismo basal representó en los organismos control un gasto máximo de 2.26 cal/h, el día 5 (Fig. 34). Este gasto fue menor en días posteriores, de 1.58 cal/h y 1.34 cal/h los días 10 y 15, respectivamente. Aquellas tasas que significaron gastos energéticos superiores a los controles tuvieron un significado metabólico.

Los días 10 y 15, los ostiones expuestos a 0.080 mgCr/L, tuvieron un gasto metabólico por encima de los controles en un 73% y un 25%, respectivamente.

El metabolismo basal de los organismos expuestos a 0.180 mgCr/L, siempre fue inferior a la de los controles, representando entre 77% al 94% de la energía gastada por estos.

En los organismos expuestos a Cd, el metabolismo basal indicó que los ostiones expuestos a este metal, gastaron de un 17% a un 57% más de energía que el grupo control para mantenerse vivos el día 5, si bien en el día 10 el gasto fue inferior al control.

Los valores de gasto energético en el mantenimiento del metabolismo basal, tuvieron la fuerte influencia de casos extremos de tasas altas de filtración.

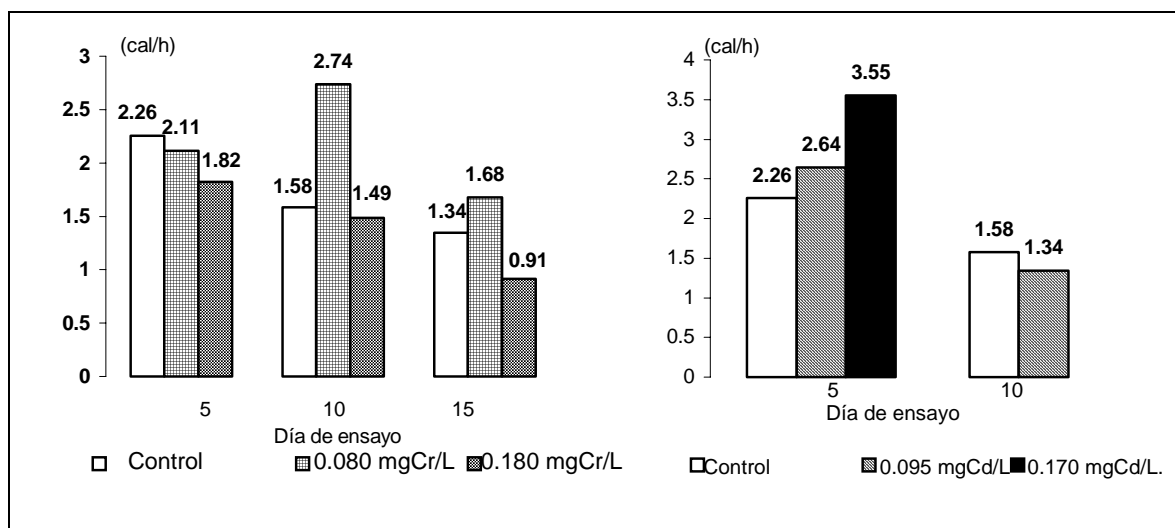


Figura. 34. Tasa metabólica basal (cal/h) obtenida a través de la relación del consumo de oxígeno y la tasa de filtración de *C. virginica* expuesta a Cr y Cd. Se grafican valores promedio.

Los valores de metabolismo basal, en el caso de los controles, indicaron una disminución paulatina en el gasto energético, lo cual parece coincidir con el

irregular consumo de oxígeno, tendiente a disminuir, así como el menor consumo y la menor producción de heces. En los organismos expuestos a 0.080 mgCr/L hubo mayor gasto de energía que en controles los días 10 y 15, pero en ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L, el gasto fue inferior al de los controles. Por otro lado, las determinaciones en organismos expuestos a Cd indican un fuerte gasto metabólico para sostener las actividades básicas de sobrevivencia de los organismos desde el día 5.

E. Modificación de las respuestas fisiológicas y FBC.

La concentración de Cr en los organismos del sistema de mantenimiento y los del grupo control fue similar. El metal acumulado generó concentraciones significativamente superiores. Aunque, si bien el Cr incorporado en tejido tuvo una relación directa con los niveles en agua ($r = 0.93$, $P < 0.05$, índice de correlación de Pearson), no se presentó una relación con el factor de bioconcentración (FBC), el cual fue cercano a 130 en todos los casos (tabla 33).

Tabla 33. Concentración de Cr en tejido posterior a la exposición y FBC. Se señalan promedio \pm desviación estándar.

	Sistema de mantenimiento	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L
Oyster ($\mu\text{gCr/g}$)	2.1 \pm 0.8	2.7 \pm 0.52	11.6 \pm 2.50 *	22.4 \pm 1.81 *
FBC	140.0 \pm 30.0	128.8 \pm 34.2	132.8 \pm 27.3	116.2 \pm 27.9

* Diferencias estadísticas entre organismos control y expuestos ($P < 0.05$, ANOVA).

En el caso de la exposición a Cd (tabla 34), el nivel en tejido de los ostiones control fue semejante al determinado en el sistema de mantenimiento ($P > 0.05$) y las

concentraciones acumuladas en los ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L fueron superiores. Nuevamente las concentraciones en agua se relacionaron directamente con los niveles incorporados ($r = 0.61$, $P < 0.05$), pero a diferencia del Cr, el FBC del Cd tuvo correlación positiva con la concentración en agua ($r = 0.86$, $P < 0.05$).

Tabla 34. Concentración de Cd en tejido posterior a la exposición y FBC (promedio \pm DE).

	En mantenimiento	Control	0.095 mgCd/L	0.170 mgCd/L
Ostión ($\mu\text{gCd/g}$)	3.9 \pm 0.8	2.8 \pm 1.2	59.5 \pm 28.6	71.7 \pm 26.1 *
FBC	280.0 \pm 50.0	107.8 \pm 42.4	1088.5 \pm 1269.7	478.5 \pm 632.9

* Diferencias estadísticas entre controles y expuestos ($P < 0.05$, ANOVA); FBC, Factor de Bioconcentración.

La relación de los niveles de los metales en tejido obtenidas al término del ensayo y las respuestas metabólicas, indicaron lo siguiente.

En los ostiones expuestos a Cr, solo la ingestión y la asimilación del alimento tuvieron relación directa con los niveles del metal en el agua ($r > 0.57$, $P < 0.05$), al igual que la tasa de filtración ($r = 0.62$, $P < 0.05$). Por otro lado, los valores altos de ingestión y asimilación, se asociaron a los FBC más bajos ($r = - 0.57$, $P < 0.05$).

Los niveles de Cr acumulados en tejido no se relacionaron con otras respuestas metabólicas y el FBC tampoco. Si bien la influencia del Cr no fue evidente en todas las respuestas, algunos aspectos indicaron que hubo daño asociable a la exposición, como la pérdida de peso.

Por otro lado, la asimilación mostró una correlación directa con la tasa de filtración, tanto en controles como en expuestos a Cr ($r > 0.51$, $P < 0.05$), a pesar de que, como se mencionó anteriormente, la tasa de filtración no mostró el efecto de la

exposición por ser similar a la de los controles. La presencia de una correlación significativa, implica que la mayor asimilación se asoció a las tasas de filtración más altas registradas en los organismos expuestos a este metal (Fig. 35).

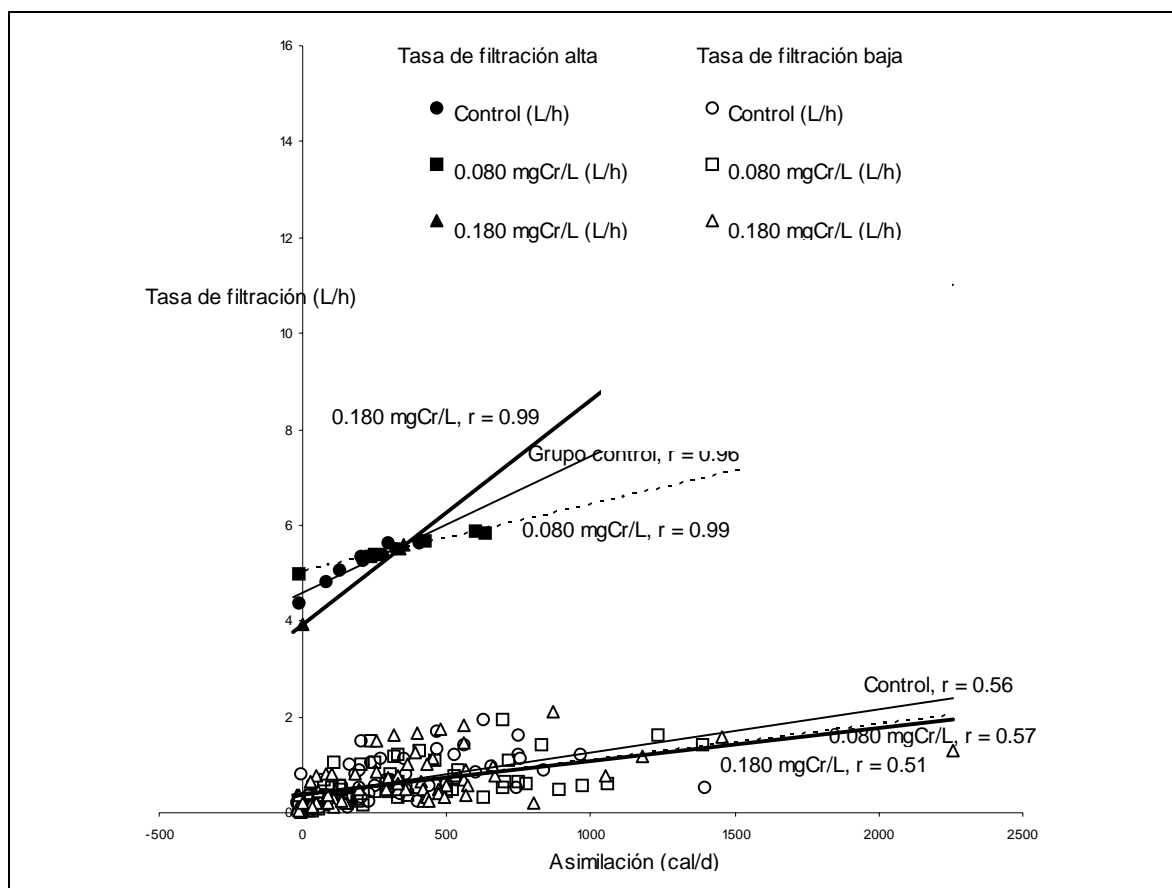


Figura. 35. Relación entre la tasa de filtración (L/h) y la asimilación del alimento (cal/d) en ostiones *C. virginica* expuestos al Cr. Se incluyen los coeficientes de correlación.

En el caso de los ostiones expuestos al Cd, el FBC tuvo una relación significativa ($P < 0.05$), solo con la tasa de filtración y la asimilación del alimento. La tasa de filtración promedio (incluyendo las tasas baja y alta) disminuyó conforme el FBC se incrementó ($r = -0.72$). Un comportamiento semejante se obtuvo con la asimilación del alimento, $r = -0.56$ (Fig. 36). También se observó que la asimilación se

incrementó conforme se incrementó la tasa de filtración, $r = 0.81$, y disminuyó conforme se incrementó el nivel de Cd en el tejido, $r = -0.47$. La eficiencia de asimilación no mostró relación con las respuestas. El peso seco de los organismos, obtenido al final del ensayo se relacionó linealmente con el consumo de células, $r = 0.51$ (Fig. 37), pero no con otras respuestas fisiológicas.

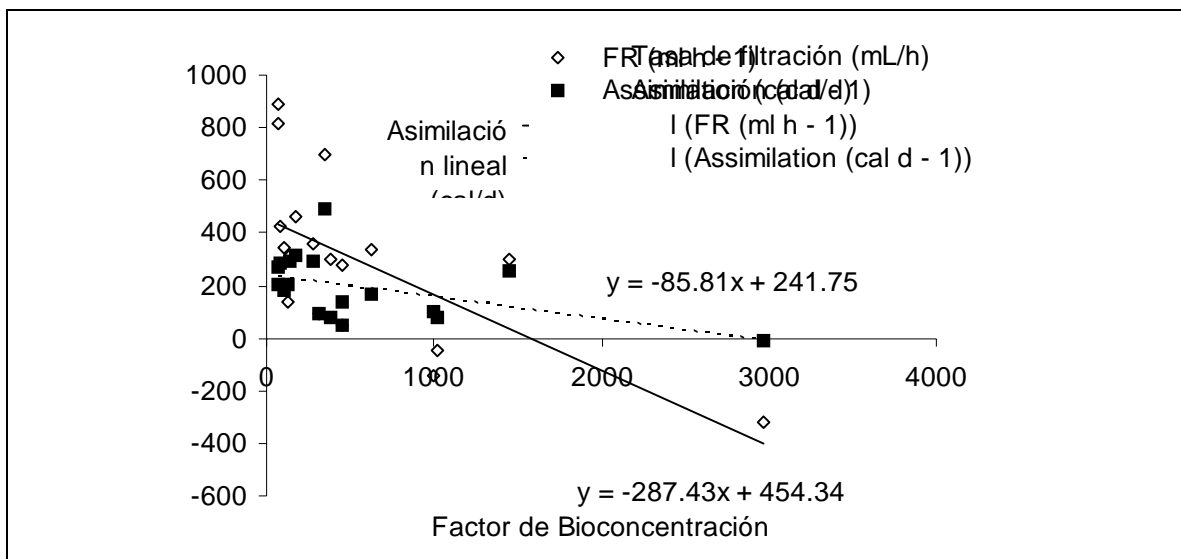


Figura. 36. Relación de la tasa de filtración (mL/h) y la asimilación (cal/d) con el FBC derivado de la exposición a Cd en *C. virginica*. Se incluyen las regresiones lineales respectivas.

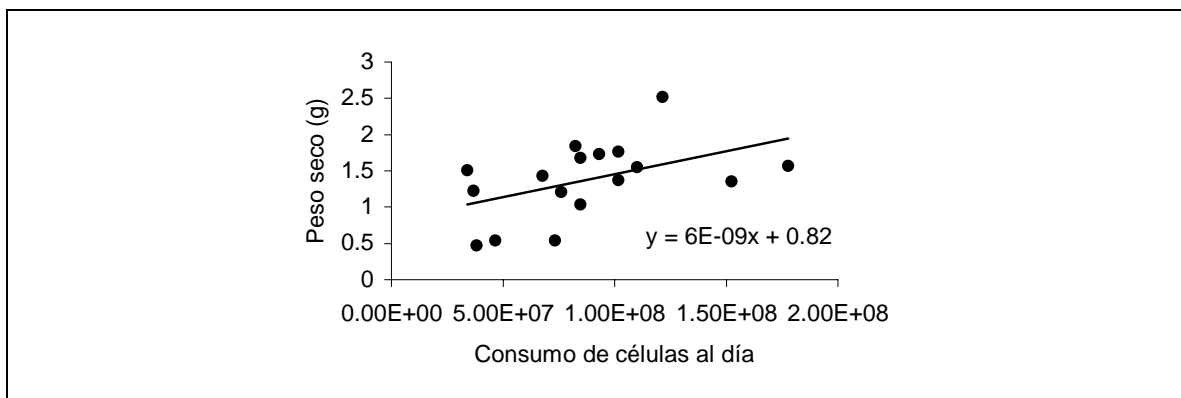


Figura. 37. Peso seco asociado al consumo de alimento en *C. virginica* expuesta a Cd. Se incluyen la regresión lineal.

3.3.5.4. INTEGRACIONES COMPLEJAS.

A. Campo de crecimiento.

Para la determinación del campo de crecimiento y todos los parámetros de la ecuación de balance energético se obtuvieron en cal/d considerando el peso seco de los organismos. El análisis se hizo individualmente. La tabla 35 muestra la síntesis de los valores obtenidos.

Tabla 35. Parámetros del campo de crecimiento (cal/d) calculado para *C. virginica* a los 5, 10 y 15 días de exposición al Cr y al Cd. Se indican promedios \pm desviación estándar.

Día y concentración (mg/L)		Ingestión I	Respiración R	Heces H	Excreción Nitrogenada N	Campo de crecimiento P	
5	Control	224.0 \pm 189.6	72.1 \pm 33.5 **	14.5 \pm 7.6	8.2 \pm 6.1	140.6 \pm 193.4	
	Cr	0.080	207.1 \pm 218.3	65.8 \pm 43.9	21.9 \pm 10.7 *	1.4 \pm 0.4	118.9 \pm 239.4
		0.180	367.8 \pm 249.5	73.0 \pm 30.8	30.5 \pm 17.2 *	7.1 \pm 13.7	259.1 \pm 235.5
	Cd	0.095	84.7 \pm 81.5 *	57.8 \pm 53.2	17.9 \pm 11.5	5.5 \pm 7.9	5.8 \pm 112.6
		0.170	77.2 \pm 210.2 *	89.5 \pm 79.8	22.5 \pm 23.6	9.0 \pm 15.2	-42.5 \pm 130.1 *
10	Control	175.0 \pm 170.8	31.8 \pm 13.5	10.5 \pm 7.9	4.8 \pm 2.5	130.5 \pm 176.7	
	Cr	0.080	298.1 \pm 349.4	73.9 \pm 32.5 *	23.7 \pm 8.4 *	12.1 \pm 13.8 *	194.4 \pm 369.3
		0.180	260.0 \pm 336.0	74.5 \pm 62.4 *	21.9 \pm 12.7 *	16.5 \pm 12.2 *	157.4 \pm 367.9
	Cd	0.095	124.0 \pm 207.8 *	47.4 \pm 53.9	12.4 \pm 6.2	10.5 \pm 9.4	57.2 \pm 206.8
15	Control	220.6 \pm 319.6	26.6 \pm 16.2	8.8 \pm 6.8	9.9 \pm 6.1	115.6 \pm 159.0	
	Cr	0.080	140.4 \pm 223.5	57.1 \pm 33.0	23.8 \pm 11.1 *	8.6 \pm 11.9	43.3 \pm 218.2
		0.180	252.6 \pm 310.7	57.8 \pm 47.9	20.6 \pm 8.7 *	6.9 \pm 5.3	129.3 \pm 299.4

*, Diferencias significativas entre el control y los expuestos a los metales; ** Mayor respiración ese día respecto a los demás ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis).

La ingestión de alimento fue similar entre los organismos que conformaron los lotes control y los expuestos a Cr ($P > 0.14$, Kruskal-Wallis). Sin embargo, los

expuestos a Cd, tuvieron una ingestión significativamente irregular ($P < 0.01$) dentro del lote, además de que fue inferior a los controles tanto el día 5, como el 10 ($P < 0.05$) (Fig. 38).

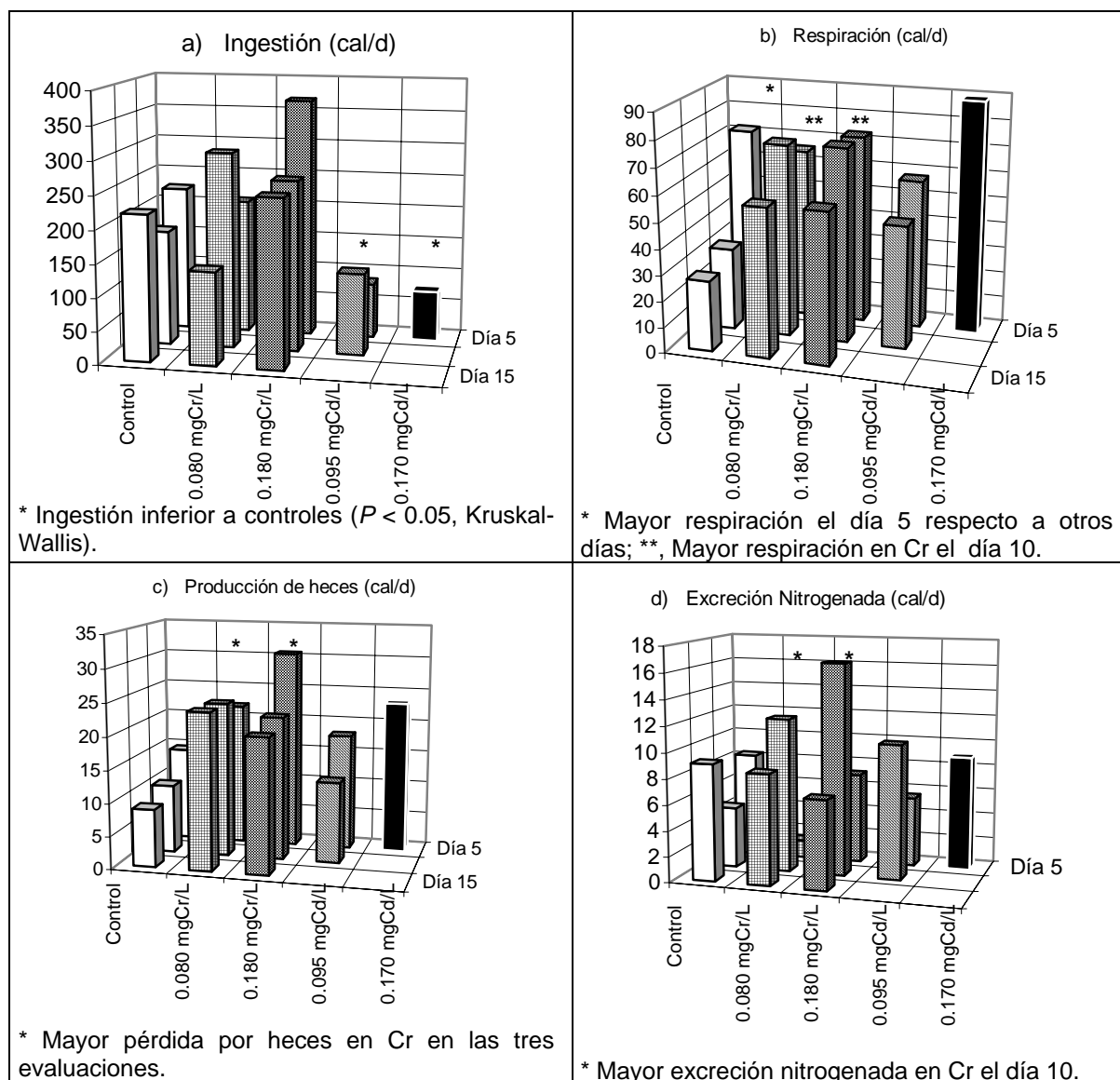


Figura. 38. Parámetros del campo de crecimiento (cal/d) de *C. virginica* expuesta a Cr y Cd: a) Ingestión, b) respiración, c) producción de heces y d) excreción nitrogenada. Se grafican valores promedio.

El gasto energético por respiración fue heterogéneo dentro de los grupos

expuestos a 0.080 mgCr/L y a 0.170 mgCd/L ($P < 0.03$). En los organismos del grupo control la energía canalizada a la respiración se redujo durante el transcurso de las pruebas, siendo este mayor el día 5, respecto a los días 10 y 15 ($P < 0.01$). El día 5 no se demostraron diferencias entre la respiración de los controles y expuestos a los metales. Sin embargo en el día 10, los ostiones expuestos a Cr canalizaron mayor energía a la respiración ($P < 0.01$), respecto a los controles. En el día 15 no se comprobaron diferencias estadísticas entre el grupo control y los expuestos a los metales, a pesar de los elevados valores en los expuestos a Cr.

La pérdida energética a través de las heces en los controles fue menor en cada período evaluado (14.50, 10.52 y 8.86 cal/d a los 5, 10 y 15 días del bioensayo, $P = 0.02$), lo que podría implicar un mejor aprovechamiento del alimento ingerido durante el transcurso de las pruebas. En contraste, los organismos expuestos a Cr tuvieron una pérdida similar en las tres evaluaciones, y en todas ellas la pérdida fue significativamente mayor a los controles ($P < 0.01$). Este comportamiento no se presentó en el caso del Cd en los que la pérdida energética por producción de heces fue similar al grupo control en todos los tiempos de evaluación.

La pérdida por excreción nitrogenada fue similar en las tres evaluaciones, con excepción de los ostiones expuestos a 0.080mgCr/L, que presentaron diferencias entre los días evaluados ($P < 0.01$) siendo más elevada la pérdida energética por excreción nitrogenada el día 10. Los ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L tuvieron, también el día 10, una pérdida mayor que los controles, solo que en esta concentración de exposición, los cambios en el tiempo no fueron significativos. La dispersión de los datos generó un fuerte sesgo en la interpretación y no se demostraron diferencias en organismos expuestos al Cd.

EL campo de crecimiento (P) obtenido con el modelo de balance energético, indicó que los organismos control e incluso los expuestos a Cr, mostraron valores que se asocian con la zona de tolerancia metabólica (Widdows, 1978). El campo de crecimiento fue similar en los controles y los expuestos a Cr, ninguno tuvo variaciones estadísticamente significativas en el tiempo.

En el campo de crecimiento, los valores cercanos a cero se asocian a la ración de mantenimiento, y los valores negativos, se ubican ya en la zona de resistencia (Widdows, 1978). En los organismos expuestos al Cd, se observó que los ostiones expuestos a 0.095 mg/L el día 5, se encontraban en niveles asociables a la ración de mantenimiento (5.80 cal/d), mientras que los expuestos a 0.170 mgCd/L, ya se encontraban en la zona de resistencia metabólica (-42.96 cal/d). Este valor fue menor ($P < 0.05$), respecto a los controles. El bajo campo de crecimiento de los ostiones expuestos a Cd los días 5 y 10, fue consecuencia principalmente de la menor incorporación de energía por la ingestión de alimento ($r = 0.94$, $P < 0.01$) (Fig. 39).

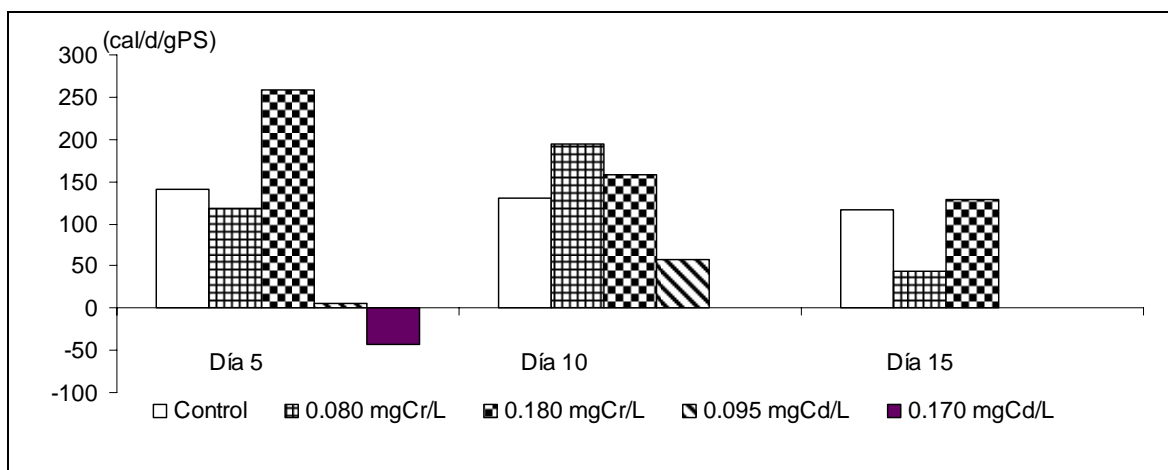


Fig. 39. Balance energético en el ostión *C. virginica* obtenido para los días 5, 10 y 15. Se presentan promedios.

B. Campo de crecimiento y FBC.

Los ostiones expuestos a Cr no mostraron correlaciones significativas entre el campo de crecimiento y el FBC, a pesar de que los efectos de la exposición a este metal si se manifestaron en algunos de los parámetros del campo de crecimiento.

Las correlaciones obtenidas entre el FBC, y el campo de crecimiento, así como cada uno de los parámetros relacionados al mismo, se presentan en la tabla 36.

La ausencia de correlaciones significativas en el caso del Cr apunta a la posibilidad de una regulación del metal a expensas de un gasto metabólico.

Algunas de las correlaciones significativas se obtuvieron en el caso de la exposición a Cd (tabla 36). En ostiones expuestos a 0.095 mgCd/L, las correlaciones indicaron que el FBC tuvo relación negativa con el campo de crecimiento y la ingestión de alimento, mientras que la relación fue positiva con el uso de la energía en respiración y la pérdida de energía a través de materiales de desecho, es decir, el mayor FBC se observó en organismos cuyo uso calórico en la respiración fue alto y en los que hubo mayor pérdida calórica por heces y excreción nitrogenada. Algunos de los cambios en los parámetros se manifestaron desde el día 5 (como la menor ingestión en ostiones expuestos a Cd), a pesar de que el primer organismo murió el día 8 en esa concentración. No se obtuvieron correlaciones relevantes en los ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L, a pesar del balance energético negativo obtenido el día 5, y dado que el primer organismo muerto en esa concentración se encontró el día 6, cabe la posibilidad de que la alteración de los parámetros se presentara desde antes, pero no quedó registrada

en el bioensayo debido a que el primer balance energético se generó cuando los organismos mostraban ya un deterioro importante e irreversible.

Tabla 36. Correlación entre el FBC y los parámetros del campo de crecimiento.

	Cr			Cd		
	Control	0.080 mgCr/L	0.180 mgCr/L	Control	0.095 mgCr/L	0.170 mgCr/L
Ingestión	-0.12	-0.29	0.57	-0.19	-0.90*	0.37
Respiración	-0.12	0.56	-0.59	0.22	0.89*	0.39
Heces	-0.33	0.36	0.38	-0.33	0.93*	-0.44
Excreción nitrogenada	-0.58	0.51	-0.31	0.01	0.80*	0.63
Campo de Crecimiento	-0.34	-0.19	0.4	-0.08	-0.96*	0.38

* Significativas.

4. DISCUSIÓN

4.1 CONCENTRACIONES DE METALES EN LA LAGUNA DE MANDINGA.

Las concentraciones obtenidas de los metales Cr y Cd en el agua de la laguna de Mandinga (0.080 mgCr/L y 0.078 mgCd/L promediando las colectas), fueron altas comparando con reportes anteriores. Rosas *et al.* (1983), registraron 0.004 mgCr/L y 0.002 mgCd/L y ya se consideraban por arriba de los límites permitidos para aguas estuarinas. Considerando además los límites establecidos por CNA en 2003 (0.0002 mgCd/L y 0.010 mgCr/L), las concentraciones detectadas en este estudio son mucho mayores. El rebasar dichos límites ya implica que pueden representar un riesgo para la biota.

En el presente estudio, el contenido corporal promedio en organismos colectados en Mandinga, de 1.2 $\mu\text{gCr/gPS}$, se consideró por debajo de los límites establecidos por FDA (1993), para el consumo de estos organismos (17 $\mu\text{gCr/g}$), si bien la comparación es relativa, ya que las normas de consumo indican los valores en peso húmedo. A su vez este contenido fue un poco menor al encontrado por Rosas *et al.* (1983), de 2.24 $\mu\text{gCr/gPS}$ y por Villanueva y Botello (1998), de 3.32 $\mu\text{gCr/gPS}$, en ostiones de la misma laguna. También fue inferior a los niveles detectados en la misma especie en otras zonas costeras del Golfo de México, como el canal de Chijol, donde se han registrado 20 $\mu\text{gCr/gPS}$ (Avila-Pérez y Zarazua-Ortega, 1993; Robledo, 1987) y en las lagunas de Sontecomapan, el Llano y la Mancha, donde han registrado entre 4.5 y 6.2 $\mu\text{gCr/gPS}$ (González-Fierro *et al.*, 1994; Villanueva y Botello, 1998). Asimismo, el Cr acumulado en ostión está

dentro del intervalo registrado por otros autores en varias localidades de la costa del Atlántico en Estados Unidos, cuyos valores fluctúan entre 0.12 $\mu\text{gCr/gPS}$ y 4.9 $\mu\text{gCr/gPS}$, como indica Roesijadi (1996a). Datos recientes sin embargo indican que el Cr acumulado en ostión de la laguna de Mandinga se ha incrementado a niveles tan altos como los mencionados en el Canal de Chijol, ya que se han registrado hasta 21.06 $\mu\text{gCr/gPS}$ en organismos extraídos entre 1998 y 1999 (Guzmán-Amaya, 2004).

En el caso del Cd, los ostiones de la laguna de Mandinga tuvieron un promedio de 2.3 $\mu\text{gCd/gPS}$, con un máximo de 4.2 $\mu\text{gCd/gPS}$. Estos valores estuvieron dentro del intervalo de las concentraciones registradas en estudios anteriores en el sitio de estudio, de 1.5 $\mu\text{gCd/gPS}$ y 3.1 $\mu\text{gCd/gPS}$ (Rosas *et al.*, 1983; Villanueva y Botello, 1998, respectivamente). Asimismo, el contenido de Cd en los ostiones colectados fue similar al registrado en la especie, en las lagunas de Sontecomapan y la Mancha (González-Fierro *et al.*, 1994; Botello, 1994). Sin embargo, la norma mexicana (NOM-031-SSA1-1993, emitida por la Secretaría de Salud, 1994), indica valores límite de 0.5 $\mu\text{gCd/g PH}$, lo cual implicaría que todas las muestras analizadas tuvieron altos contenidos de Cd, particularmente las colectadas en septiembre de 1998, lo que las hace inadecuadas para consumo humano. Estudios recientes indican que los niveles de Cd en el ostión de la laguna de Mandinga no han aumentado, ya que entre 1998 y 1999 se han registrado en promedio 2.9 $\mu\text{gCd/gPS}$ (Guzmán-Amaya, 2004).

4.2 FASES EXPERIMENTALES.

4.2.1 Control de parámetros.

El monitoreo de los parámetros fisicoquímicos fue llevado a cabo con el fin de garantizar que los bioensayos se realizaran con el mayor control posible. El análisis detallado de su comportamiento se describe en el anexo 7.5.

Los parámetros se consideraron dentro del intervalo óptimo para el mantenimiento de la especie. El análisis global de las variaciones detectadas a lo largo de los bioensayos mostró que; el pH se encontró entre 8.15 y 8.35, tuvo un comportamiento muy estable, el oxígeno disuelto se encontró por arriba de 2.38 mg/L lo que significa que no representó un factor de estrés para los organismos, y las variaciones registradas en la salinidad, la temperatura, así como en el amonio total, no influyeron en las respuestas de los organismos. Además no se presentaron correlaciones significativas entre los parámetros.

4.2.2 Morfometría de los organismos sometidos a bioensayo.

Los organismos utilizados para las fases experimentales tuvieron una longitud promedio entre 66.2 y 71.95 mm. Los ostiones que conformaron los lotes fueron semejantes, al entrar a cada uno de los ensayos. Al final, los organismos más pesados (54.67 g), se asociaron a la prueba fisiológica. Lo cual es lógico si se considera que esa fue la prueba más larga y la única en la cual fueron alimentados

los animales en un plazo de 20 días. En las otras fases, además de no estar alimentados, hubo disminución en pesos húmedos y secos, atribuibles a la exposición a los metales, las cuales se discuten en los resultados de cada fase.

El índice de condición (IC), es un parámetro de control de uso común en el cultivo del ostión. Este indicó que al final de los ensayos los organismos se encontraban aún en buenas condiciones. El otro parámetro utilizado para evaluar la condición de los organismos, la relación longitud-peso seco, permitió determinar del peso seco esperado para los organismos de la talla utilizada en los bioensayos. Si bien los organismos recién colectados tenían un peso similar al esperado, los organismos sometidos a las fases experimentales generalmente tenían pesos secos inferiores. La mayor diferencia respecto a los datos esperados, se observó en los organismos expuestos a los metales. Se considera que, tanto el IC (Walne, 1984), como la relación longitud-peso seco (Powell *et al.*, 1992), proveen información complementaria, sin embargo pero esta última aportó resultados más consistentes que se pudieron asociar a la exposición a los metales.

En el presente trabajo no puede perderse de vista que los ejemplares de *C. virginica* sujetos a estudio, fueron extraídos de su ambiente natural, de talla comercial (adultos), y que fueron colectados en diferentes fechas, y por tanto, en diferentes épocas climáticas del año. Los organismos provenientes de estos sitios se encuentran sometidos a variaciones ambientales múltiples (Roesijadi, 1996) y no necesariamente presentan uniformidad genética. Frecuentemente los bioensayos con *C. virginica* se llevan a cabo con ostiones provenientes de granjas de cultivo y se manejan lotes de parentales controlados, cuya sensibilidad a los contaminantes puede diferir menos que en los organismos no cultivados. Pero, por otro lado, los

organismos de estas granjas, pueden ser más sensibles. Aunque se presenta cierta dificultad para obtener lotes homogéneos de *C. virginica*, los resultados basados en organismos provenientes de ambientes naturales pueden ser más realistas. De tal manera, en esta investigación se tomaron algunas precauciones, con el fin de tener el mejor control posible, como: extraer a los organismos siempre de un solo sitio, seleccionarlos de talla semejante, transportarlos cuidadosamente para evitar lesiones y considerar que el ambiente del cual fueron extraídos no presentara niveles importantes de contaminantes, particularmente de los metales sujetos a evaluación. Además se estableció un período de mantenimiento adecuado, en condiciones controladas de laboratorio a través de pruebas previas.

4.2.3 Efectos letales.

La evaluación del efecto letal de un tóxico bajo condiciones controladas provee información respecto a la sensibilidad intra e interespecífica de los organismos (Buikema *et al.*, 1982). En el presente estudio, los ostiones adultos de *C. virginica* fueron expuestos a Cr^{6+} (como $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), el cual representa la forma más tóxica de las especies químicas del metal. La $\text{CL}_{50-168\text{h}}$ determinada para la especie fue de 11.09 mgCr/L, similar a la $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ obtenida para embriones expuestos a Cr^{3+} , como $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10.3 mgCr/L) (Calabrece *et al.*, 1973). Estos resultados confirman que los adultos de la especie presentan mayor tolerancia que los estadios más tempranos de desarrollo, como ha sido descrito ampliamente para diversos bivalvos en la literatura (Zakrzewsky, 1997). A la vez, los resultados de la

CL_{50-168 h} sugieren *C. virginica* es más resistente a la exposición al cromo que otros moluscos como *M. edulis* (L.) y *C. gigas* (Thunberg), cuya CL_{50-96 h} es de 4.5 mgCr/L en ambas especies (Pawlisz *et al.*, 1997).

Se obtuvo en *C. virginica* una CLC_{50-168h} de 475.8 µgCr/gPS. Contrario a lo esperado, el FBC no fue menor en las concentraciones de exposición al Cr más elevadas, lo cual se puede relacionar con el comportamiento de acumulación de un metal esencial como el Cr. Así, si bien la mortalidad se asoció con el Cr incorporado en el tejido, la concentración corporal no se incrementó de manera proporcional a la del agua, presentándose una aparente regulación limitada del metal entre 8.2 y 21.4 mgCr/L, partir de la cual se incrementó nuevamente el Cr corporal; de tal manera, el FBC no se asoció visiblemente con la mortalidad y la CLC₅₀ del Cr no mostró claramente su utilidad. Al respecto Borgmann (2000) señala que la determinación de efectos basada en el balance corporal del metal, tiene ciertas limitaciones en el caso de metales esenciales, como es el caso del Cr, lo cual se corrobora con nuestros resultados.

No obstante, la elevada capacidad de bioacumulación del Cr registrada en *C. virginica*, sugiere que la especie puede fungir como biomonitor de la presencia de altos niveles del metal en el medio lagunar estuarino. Los niveles máximos corporales registrados (1244 µg/gPS) se consideran similares a los acumulados en otras especies, como *M. edulis* (de 400 a 1000 µgCr/gPS) expuesta a la emisión de agua contaminada con descargas de industrias de tenería (Walsh y O'Halloran, 1998). Diferentes especies de moluscos han sido consideradas como buenos biomonitores de acumulación del metal, como *M. californianus* (Mollusca;

Bivalvia) en Baja California, México (Muñoz-Barbosa *et al.*, 2000). *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) en Brasil (Silva, *et al.*, 2001) y *Crassostrea iridiscens* (Gray) en la bahía de Mazatlán, en la costa del Pacífico en México (Soto-Jiménez *et al.*, 2001).

En relación a la exposición al Cd, la $CL_{50-72\text{ h}}$ fue de 24.87 mg/L, valor que también corrobora la mayor resistencia de los adultos, respecto a los embriones de *C. virginica* (Calabrece *et al.*, 1973). Asimismo sugiere que la especie es más resistente a la exposición al Cd que *M. edulis*, cuya $CL_{50-96\text{ h}}$ es de 1.8 mgCd/L (Jorgensen *et al.*, 1991) y que el gasterópodo *Amnicola* sp., cuya $CL_{50-96\text{ h}} = 5.1$ mgCd/L (Rehwoldt *et al.*, 1973).

Las concentraciones de Cd acumuladas en el ostión durante el bioensayo fueron similares a las registradas en otros moluscos de zonas contaminadas (Köhler y Riisgard, 1982; Walsh y O'Halloran, 1998). Sin embargo, la acumulación corporal máxima del Cd fue de 700 $\mu\text{g/gPS}$, casi la mitad de la del Cr (1244 $\mu\text{g/gPS}$).

Varias especies del género *Crassostrea* han sido descritas como bioacumuladoras de metales, particularmente del Cd, en cuyo caso se han considerado como acumuladoras netas (Ruelas-Inzunza y Paez-Osuna, 2000; Silva *et al.*, 2001; Soto-Jiménez *et al.*, 2001). En *C. virginica* la acumulación de Cd ha sido relacionada con la concentración externa y el tiempo de exposición (Zaroogian, 1980; Zaroogian y Morrison, 1981). En este estudio, la incorporación de Cd en ostiones que murieron a las 72 horas (de 261.20 $\mu\text{g/gPS}$ a 508.80 $\mu\text{g/gPS}$), fue proporcional a la concentración del metal presente en el agua; estos organismos no regularon la

entrada del Cd y acumularon el metal hasta niveles de saturación, comportamiento similar al reportado para el Cd en *C. virginica* en otros estudios (Roesijadi, 1996).

Los valores registrados fueron diez veces mayores que los medidos en ostiones *C. virginica* (45.4 $\mu\text{g/gPS}$) expuestos a Cd en el Rio Patuxtent (Abbe, *et al.*, 2000). Sin embargo, la incorporación de Cd en *C. virginica* durante el ensayo, podría considerarse similar a la bioacumulación del metal en otros bivalvos, como *Perna viridis* L. (Patel y Anthony, 1991), así como a la de *M. edulis* (300-500 $\mu\text{gCd/g}$), expuesta a 0.2 mgCd/L (Köhler y Riisgard, 1982).

En el presente estudio, el FBC de Cd en *C. virginica* disminuyó en las concentraciones más altas del metal debido a que los organismos no incorporaron el metal tan rápidamente como aquellos expuestos a las concentraciones menores. No obstante y contrario a lo observado en los organismos expuestos al Cr, la concentración letal corporal del Cd ($\text{CLC}_{50-72 \text{ h}} = 502.2 \mu\text{g/gPS}$), constituyó una herramienta adecuada para evaluar el impacto biológico derivado de las concentraciones de exposición en el ambiente, ya que la acumulación del metal fue proporcional al daño causado por el mismo, tal y como lo plantea Borgmann (2000). El comportamiento de los parámetros de toxicidad aguda en *C. virginica* (CL_{50} y CLC_{50}), denotaron la mayor toxicidad del Cd, metal sin función biológica conocida, que el Cr, metal esencial. A la vez, las demás respuestas evaluadas denotaron este comportamiento diferencial. En los organismos expuestos al Cr en concentraciones mayores a 8.26 mg/L, la pérdida significativa de peso denota un estrés severo y fue una respuesta dependiente de la concentración de exposición del metal; no obstante el IC no fue modificado por el metal. En contraste, la pérdida de líquido

intervalvas, que impidió determinar en el IC y la pérdida de peso en los organismos expuestos al Cd, sugieren un mayor deterioro por efecto adverso de este metal. Una relación negativa entre la concentración de Cd en tejido y la pérdida del IC, ha sido registrada en poblaciones naturales de ostiones del Río Pauxtent (Riedel *et al.*, 1998).

La dificultad para obtener datos congruentes de mortalidad en las concentraciones altas de exposición tanto en Cr como en Cd, tiene que ver con el comportamiento de la especie, debido al cierre de valvas de los ostiones, el cual es proporcional a la concentración de los tóxicos en el agua, comportamiento ampliamente documentado por Galtsoff (1964) y Newell y Langdon (1996). De tal manera, la mortalidad se difiere en las concentraciones altas como resultado del cierre de valvas, y permite sugerir que los organismos expuestos en esas concentraciones estuvieron menos tiempo en contacto con el metal, por lo menos al inicio del ensayo.

La CL₅₀ obtenida en las pruebas experimentales es un dato que no puede ser extrapolado para determinar efectos en el ambiente (Riedel *et al.*, 1998; Webb, 1998). Debido a lo anterior, los estudios sobre el efecto letal de los tóxicos no son tan frecuentes en el presente, como en el pasado; de hecho se considera que concentraciones de 1.0 mgCd/L en agua marina son extremadamente altas, como para notar efectos por exposición en *C. virginica* (Roesijadi, 1996). Sin embargo, las respuestas de los organismos pueden variar en diferentes circunstancias y localidades, por lo que los estudios controlados de letalidad no deben obviarse. Es necesario conocer si las concentraciones de tóxicos que inciden en la sobrevivencia de una especie adaptada a cierto ambiente, generan resultados

similares en otro sitio, donde la especie se encuentra adaptada a otras condiciones. A la vez estas pruebas permiten seleccionar los niveles adecuados de los tóxicos para las pruebas de efectos subletales, las cuales pueden llevarse a cabo en plazos largos (de efectos crónicos) o cortos (de efectos subcrónicos). Estas últimas son más frecuentes debido a que una larga estancia en laboratorio involucra otras variables de estrés fisiológico que pueden afectar las respuestas (Wood *et al.*, 1997). De tal manera, es relevante evaluar tanto las respuestas letales, como las subletales, y dentro de éstas, las de expresión a corto y mediano plazo.

4.2.4 Efectos subletales.

En el presente estudio, las concentraciones seleccionadas para las pruebas de subletalidad (cerca a 0.100 y 0.200 mg/L para ambos metales), fueron inferiores a la CL_{1-168h} (0.222 mgCr/L) y a la CL_{1-72h} (0.497 mgCd/L) para el Cr y el Cd, respectivamente. Estas concentraciones fueron mayores que las registradas en agua de la laguna de Mandinga donde se extrajeron los ejemplares (en promedio 0.078 mgCd/L y 0.080 mgCr/L). Respecto al límite de emisión de ambos metales en agua residual a cuerpos de agua naturales, se encuentran debajo del mismo, en el caso del Cr es de 1.0 mgCr/L, aunque coincidieron con el límite de Cd, de 0.2 mgCd/L (DOF, 1997). No obstante, los niveles de los metales utilizados en las pruebas, están muy por encima de los niveles de protección en estuarios (0.01 mgCr/L y 0.0002 mgCd/L; CNA, 2003). Así, las concentraciones utilizadas

representaron valores intermedios entre los límites de emisión y los de protección en ambientes estuarinos y se encuentran por debajo de las CL₁ determinadas en la presente investigación. Es de interés que los resultados sean asociados a los límites aceptados en la legislación mexicana y comprobar si las concentraciones de prueba representan un riesgo para la especie y si las normas establecidas la protegen.

4.2.4.1 Respuestas bioquímicas. Metalotioneínas y estrés oxidativo.

Los indicadores biológicos de toxicidad, como las metalotioneínas, relacionados con la exposición son de gran utilidad para la protección ambiental (Goyer, 1991). La inducción de la síntesis de metalotioneínas en el funcionamiento normal de la célula, se vincula a los requerimientos de metales esenciales (Simkiss *et al.*, 1982; Klaassen y Eaton, 1991), expresión que en *C. virginica* está relacionada con la regulación y control homeostático del Zn y del Cu (Savva, 1999). Debido a su actividad en la regulación de estos metales, la inducción de las metalotioneínas en los bivalvos se asocia a mecanismos de desintoxicación y de protección celular a la presencia de metales tóxicos, principalmente aquellos sin función biológica conocida, o bien, cuando se presentan niveles excesivos de metales esenciales como el Zn, el Cu y el Cr (Köhler y Riisgard, 1982; Stegelman *et al.*, 1992; Roesijadi *et al.*, 1996; Viarengo *et al.*, 1997; Romeo *et al.*, 1997). Se han descrito otros roles de las metalotioneínas, incluyendo la protección a la radiación ionizante

y una defensa general antioxidativa. Así, organismos pre-expuestos a metales como el Cd, resisten en mayor grado al estrés oxidativo al atrapar los radicales hidroxilo y superóxido, y por lo tanto limitan sus efectos (Amiard *et al.*, 2006). Una cantidad excesiva de metales, sin embargo, no puede ser interceptada por los mecanismos que los secuestran, como es el caso de las metalotioneínas, y en forma iónica son capaces de unirse a otros sitios sensibles celulares, tales como enzimas y membranas, estimulando la producción de radicales libres, lo que puede resultar en la desestabilización de la membrana (Roesijadi, 1996).

La entrada de metales no esenciales a la célula, se lleva a cabo por difusión, en el caso del Cd, en forma de compuestos clorinados como el CdCl₂ (que fue la forma que se utilizó durante los bioensayos), como complejos quelados, o bien, a través de las bombas de iones (Souza *et al.*, 1996). Puede ser confundido con el Ca en la membrana e introducirse a la célula; ya dentro de esta, el Cd se confunde con otros metales esenciales con valencia 2+, como es el caso del Zn (Wood *et al.*, 1997). En la regulación normal de los metales, la unión con las metalotioneínas a través de grupos sulfhidrilos disminuye la toxicidad del mismo dentro de la célula (Klaassen y Eaton, 1991). En el ostión, las metalotioneínas asociadas a los metales tóxicos se encuentran en mayor cantidad en los órganos de función hepática y renal, donde ejercen acción tóxica (Simkiss *et al.*, 1982). Se sugiere que la nefrotoxicidad del Cd en el ostión se debe al metal no unido a la metalotioneína, cuando el nivel de Cd excede el de metalotioneína disponible. A la vez, la síntesis de metalotioneínas por presencia de Cd, también deriva en un efecto directo en la transcripción de DNA (Simkiss y Masson, 1983).

Diversas investigaciones han detectado en *C. virginica* el incremento de metalotioneínas por exposición a Cd en branquia, en manto y músculo abductor (Carpene, 1993; Roesijadi, 1994; Roesijadi y Klerks, 1989; Roesijadi, 1996; Roesijadi *et al.*, 1996).

En esta investigación, la inducción máxima de metalotioneínas en *C. virginica*, se presentó como resultado de la exposición a 0.110 mgCd/L y fue de 810.1 $\mu\text{g/g}$. Este valor fue superior al determinado por Viarengo *et al.* (1997), en *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck), (100 a 240 $\mu\text{g/g}$) bajo exposición al mismo metal, y también a los registrados en *M. edulis* (aproximadamente 500 $\mu\text{g/g}$) derivados de la exposición a 0.200 mgCd/L y 0.500 mgCd/L (Bebiano y Langston, 1991; Köhler y Riisgard, 1982). Langston y Zhou (1987), indican que *Macoma baltica* (L.) expuesta a 0.100 mgCd/L, incrementó la producción de metalotioneínas desde 35 $\mu\text{g/g}$ en controles, hasta 450 $\mu\text{g/g}$. En la almeja asiática (Baudrimont *et al.*, 1997), la inducción de metalotioneínas por exposición al Cd se ha incrementado hasta 2.5 veces, respecto a los valores de los controles.

Los resultados obtenidos en el presente estudio denotan de manera general, una mayor inducción de metalotioneínas en la glándula digestiva, respecto a la branquia y el músculo abductor en *C. virginica* por la exposición al Cr y al Cd. Si bien en los organismos expuestos al Cd no se observaron diferencias significativas con los grupos control, debido a la elevada dispersión de los datos y la variación temporal, la inducción de metalotioneínas en la glándula digestiva fue desde un 10% hasta 13.5 veces mayor respecto al grupo control. En la glándula digestiva, la mayor inducción de metalotioneínas se observó a las 72 h de exposición (810.1 $\mu\text{g/g}$ de

tejido) en ostiones expuestos a 0.110 mgCd/L. En esta concentración, la mayor inducción en branquia y músculo abductor se observó hasta las 96 h de exposición. En contraste, la exposición al Cr indujo significativamente la síntesis de metalotioneínas a las 6 h de exposición en la glándula digestiva (251.0 µg/g) y en el músculo abductor (182.5 µg/g de tejido). La mayor inducción de metalotioneínas en la glándula digestiva ha sido documentada en diversos bivalvos, particularmente por la exposición a Cd. Así, en *M. edulis* y *C. gigas* se ha determinado una mayor concentración en glándula digestiva, que en branquia (Geret *et al.*, 1997; 2000). De manera similar, en *M. edulis* expuesta por 21 días al Cd, la mayor concentración de metalotioneínas se asocia a la glándula digestiva, después a la branquia y hasta el final al músculo abductor (Köhler y Riisgard, 1982). En moluscos, la elevada concentración de metalotioneínas en glándula digestiva se relaciona con la elevada concentración de metales en ese órgano y su confinamiento en células epiteliales. Se considera que la fracción no unida a metalotioneínas se asocia a estructuras particuladas del tipo de los hemocitos granulares. Diferentes tipos de hemocitos se han relacionado con la excreción de materiales que son producto de la degradación y en actividades de desintoxicación, tal es el caso de las denominadas células café (Cheng, 1996). En ostión *C. virginica* de Mandinga se ha comprobado, que la exposición a 0.100 mgCd/L induce una producción masiva de células café en horas, las cuales migran a través del cuerpo del animal (Guzmán, 2001). Asimismo, se ha encontrado una relación entre valores elevados de Cd corporal y la atrofia de la glándula digestiva descrita por Kim *et al.* (1999).

En *C. virginica*, el incremento de metalotioneínas en la glándula digestiva y la branquia, registrado en la exposición al Cd, presentó una correlación positiva con el FBC del metal, es decir, un mayor FBC se asoció a la mayor inducción de metalotioneínas, lo cual sugiere una limitación para controlar los niveles del metal acumulado. El músculo abductor, pareció responder de manera pasiva a la acumulación del metal, ya que en este tejido no se presentaron correlaciones relevantes con el FBC. Esto parece lógico, debido a que la entrada del metal disuelto tiene contacto directo con las branquias y la glándula digestiva, a la vez, que esta última tiene una importante actividad en la acumulación y eliminación de los tóxicos, mientras que el músculo abductor no es un órgano blanco inmediato y se esperaría que la acumulación de los tóxicos en este tejido sea posterior.

En el caso del Cr, el incremento de las metalotioneínas por exposición al metal en la glándula digestiva y el músculo abductor, presentó una correlación negativa con el FBC, esto es, valores bajos del FBC se asociaron con los altos de metalotioneínas. Aparentemente, la producción de metalotioneínas refleja una cierta capacidad del organismo para la regulación y la posterior desintoxicación del metal, comportamiento particularmente claro en glándula digestiva.

No obstante, la interpretación del comportamiento de la inducción de las metalotioneínas en *C. virginica* por exposición al Cr es más limitado debido a que existe mucho menos investigación relacionada con este metal, respecto a la realizada con Cd. Dado que el Cr es un metal esencial, está involucrado en numerosas activaciones enzimáticas, uniéndose a los sitios activos de las enzimas, en reacciones redox con Fe y Cu. Los iones del Cr, sin embargo, son extremadamente reactivos, se unen a muchos grupos cargados en proteínas,

lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, y pueden afectar también la estructura secundaria de enzimas (Simkiss *et al.*, 1982). El Cr^{3+} promueve la acción de la insulina y es un nutriente esencial en el metabolismo de azúcares y grasas, desempeñando múltiples funciones en procesos vitales; sin embargo el Cr^{6+} es un agente oxidante y corrosivo (Albert, 1997), no asociado a funciones celulares y por lo mismo se relaciona más a estrés oxidativo celular. La entrada del Cr^{6+} a la célula se realiza a través del sistema transportador del sulfato. Una vez dentro de la célula es transformado por dos vías: una enzimática, que involucra al sistema del citocromo P450 y glutatión reductasa, en la cual se genera Cr^{3+} , y otra vía, no enzimática que transforma al Cr^{6+} en Cr^{5+} y Cr^{4+} por el ácido ascórbico. Estas formas del Cr generan especies oxígeno reactivas (Moreno, 2003).

De tal manera, la inducción de metalotioneínas como un mecanismo de protección celular y la inducción del estrés oxidativo celular son procesos relacionados en la exposición al Cr. No obstante, este estrés oxidativo se espera también por la exposición al Cd, ya que ambos metales favorecen la producción de especies oxígeno reactivas. A su vez, la presencia de radicales libres se relaciona con la peroxidación de lípidos de las membranas celulares (Klaassen y Eaton, 1991). La degradación oxidativa de los lípidos de la membrana, puede resultar en una fluidez alterada de la misma, entre otras modificaciones (Hewitt *et al.*, 1991). En glándula digestiva de mejillón se ha comprobado la pérdida de la estabilidad de la membrana lisosomal por la exposición al Cd; los lisosomas desempeñan a la vez un importante papel en la eliminación de las metalotioneínas (Paez, 1996a). Asimismo, se ha detectado peroxidación de lípidos en *C. virginica* expuesta a Cu (Ringwood *et al.*, 1998). Estudios más recientes indican que metalotioneínas y

lipoperoxidación se inducen por exposición al Cd en la almeja de agua dulce *Corbicula fluminea* (Legeay *et al.*, 2005).

Considerando el tiempo de expresión de los procesos de protección celular a la exposición a los metales y el papel que desempeñan los lisosomas en la desintoxicación de los metales, se espera primero la inducción de metalotioneínas y posteriormente el daño peroxidativo. Los resultados obtenidos en *C. virginica* expuesta al Cr apoyan este supuesto. El daño peroxidativo en la glándula digestiva por la exposición al metal se manifestó a las 72 h de exposición (día 3). En este período la producción de MDA en los ostiones expuestos (271.7 nmol/g de proteína) fue hasta 53% mayor que en el grupo control (179.0 nmol/g). Esta respuesta estuvo diferida respecto a la inducción de metalotioneínas que se presentó a las 6 h (día 1).

Sin embargo, el comportamiento observado en los organismos expuestos al Cd fue contrario a lo observado en la exposición al Cr. El daño peroxidativo se hizo evidente a las 6 h de exposición al Cd (día 1), período en que los ostiones llegaron a tener hasta 262.6 nmol/g, que fue 97% mayor que el del grupo control (133.5 nmol/g). En estos organismos la inducción en la síntesis de metalotioneínas fue apreciable hasta las 72 h (día 3), si bien, los valores entre los grupos expuestos y controles no mostraron diferencias estadísticas entre los tres días evaluados debido a la elevada dispersión de los resultados obtenidos.

Los resultados anteriores sugieren un comportamiento tóxico particular de cada metal. En el caso del Cd, aunque la mayor inducción de metalotioneínas se observó a las 72 h en la concentración 0.110 mgCd/L, es posible suponer que la elevada dispersión de los datos enmascaró la inducción temprana de

metalotioneínas, ya que se ha observado síntesis de metalotioneínas en branquia de *C. virginica* entre 1 y 4 días posteriores a la exposición a 0.050 mgCd/L (Roesijadi, 1996). De esta manera, la inducción temprana de metalotioneínas en concentraciones mayores que la mencionada, podría haberse presentado. El estrés oxidativo generado por la exposición al Cd, estaría indicando el mayor efecto tóxico derivado de las especies oxígeno reactivas producidas por la exposición al metal y que las metalotioneínas no protegen a la célula.

En el caso del Cr, la mayor inducción de metalotioneínas a las 6 h de exposición parece presentarse como un mecanismo inicial de protección celular y el daño peroxidativo a las 72 h sugiere una manifestación de daño posterior derivado de la producción de especies oxígeno reactivas.

4.2.4.2 Respuestas fisiológicas.

Para poder desarrollar e interpretar adecuadamente los modelos descriptivos del comportamiento de los metales tóxicos en el ambiente, es necesario conocer bien los efectos fisiológicos (Word *et al.*, 1997). El estrés fisiológico se presenta cuando los organismos sobrepasan su capacidad para compensar, resistir o adaptarse a los cambios ambientales (Dillon y Lynch, 1981). Para la exposición a mediano plazo al Cr y al Cd en *C. virginica*, las concentraciones seleccionadas de los metales se estimaron subletales; no obstante, llegó a presentarse mortalidad en los organismos expuestos a los metales a lo largo de prueba. Si bien todos los

organismos control sobrevivieron los 20 días de ensayo, los expuestos a Cd debieron ser retirados con anterioridad, ya que se presentó el 12.5% de mortalidad, al día 10 en la concentración alta del metal y al día 14 en la baja. En *C. virginica* se han realizado bioensayos en plazos mucho más largos, hasta de 20 semanas, con exposición a concentraciones de Cd similares a las utilizadas en este estudio (0.200 mgCd/L), sin registrar una mortalidad importante en ese plazo (Roesijadi, 1996). Tales diferencias podrían ser consecuencia tanto de la historia de vida, como de la aclimatación de los organismos en condiciones controladas de laboratorio, los cuales, pueden modificar los límites de tolerancia a los factores ambientales incluidos los contaminantes (Espina y Vanegas, 1996a).

A. Consumo de oxígeno.

La tasa metabólica de *C. virginica* sin exposición a los metales (0.37 mg/h/gPS) fue semejante a la determinada por Shumway y Koehn (1982) en la misma especie (0.42 mg/h/gPS; datos recalculados) evaluada entre 20 y 30 °C y 14 y 28 ‰. La exposición al Cr no modificó el consumo de oxígeno de los ostiones, presentando valores similares durante el transcurso del bioensayo, con valores promedio entre 0.45 mg/h/gPS y 0.52 mg/h/gPS. En contraste, la exposición al Cd, alteró significativamente la tasa respiratoria, dependiendo del tiempo y la magnitud de exposición al metal. Así, en los organismos expuestos a la mayor concentración (0.170 mgCd/L), el mayor consumo de oxígeno se observó el día 5 de exposición (0.88 mg/h/gPS); en los ostiones expuestos a la menor

concentración (0.095 mgCd/L) la máxima tasa metabólica (1.41 mg/h/gPS) se observó hasta el día 14.

El efecto del Cd en la tasa respiratoria de bivalvos es contradictorio. Así, niveles de 0.1 mgCd/L o menores, pueden no modificar la tasa respiratoria en *C. virginica* (Roesijadi, 1996) y *Mytilus californianus* (Lares y Orians, 2001), respectivamente; niveles de 0.10 a 0.100 mgCd/L pueden reducir la actividad metabólica en *M. baltica* (Duquesne *et al.*, 2004), o concentraciones mayores 0.095 a 0.170 mgCd/L, pueden incrementarle (este estudio). Estas discrepancias pueden relacionarse con las diferentes etapas de acción tóxica del metal en la respuesta fisiológica de los organismos, como lo plantean Gaudy *et al.* (1991) para crustáceos. En una primera etapa de la intoxicación al Cd la demanda de ATP se incrementa y en consecuencia la fosforilación oxidativa, incremento considerado adaptativo y relacionado con mecanismos compensatorios a la acción tóxica por el metal. En una segunda etapa, de intoxicación severa, la tasa respiratoria puede reducirse como consecuencia de la incapacidad del organismo de responder a las demandas de ATP, condición que en último término es letal.

En caso de los moluscos, el incremento en la tasa respiratoria se ha relacionado con el deterioro en los procesos de osmoregulación y la inhibición en el transporte de Ca (Sadiq, 1992), sin embargo no puede descartarse que también se presenten requerimientos energéticos que favorezcan su incremento. A la vez, la reducción de la tasa respiratoria por efecto de metales tóxicos obedece al deterioro estructural y funcional de la branquia y en consecuencia a la alteración en la captación, transferencia y transporte de oxígeno a los tejidos, así como a la inhibición de las enzimas involucradas en la respiración celular (Spicer y Weber,

1991). En *Macoma baltica* la reducción en la actividad metabólica de los organismos por la exposición a 0.01 mgCd/L se relaciona con la reducción en la tasa de filtración y el cierre de valvas, este último como mecanismo para reducir la bioacumulación del metal; niveles mayores (0.3 mgCd/L) redujeron significativamente las reservas de glucógeno y el índice de condición (Duquesne *et al.*, 2004).

El incremento en el consumo de oxígeno en *C. virginica* expuesta al Cd no se asoció con la tasa de filtración, ni con el consumo de alimento, respuestas que fueron reducidas significativamente por la exposición al metal. En los organismos acuáticos, las alteraciones en la tasa respiratoria ocasionadas por la exposición subletal a los metales tóxicos depende en gran medida de los mecanismos de regulación y desintoxicación (Johnson, 1988). De tal manera, el incremento en la tasa respiratoria de los ostiones expuestos al Cd puede obedecer a los costos energéticos asociados a mecanismos de desintoxicación y protección celular al efecto tóxico del metal, tanto en la síntesis de metalotioneínas, como el estrés oxidativo ocasionado por el metal, evidenciado en las exposiciones a corto plazo. El incremento en el consumo de oxígeno se observó de 48 a 72 h después de que se manifestó el estrés oxidativo.

En el caso de los ejemplares de *C. virginica* expuestos al Cr, la tasa metabólica no evidenció los costos energéticos de la regulación homeostática del metal, ni la demanda energética asociada a la acción tóxica del Cr (como el estrés oxidativo) o a los mecanismos de desintoxicación y de protección celular al metal (como las metalotioneínas) como ha sido descrito en otros bivalvos (Amiard *et al.*, 2006).

B. Excreción nitrogenada.

Los bivalvos, y en particular *C. virginica*, son organismos estrictamente amoniotélicos, cuya proporción de amoníaco (NH_3) en la excreción nitrogenada es dominante (68%), sobre otros productos, los cuales pueden presentarse en forma de aminoácidos (21%), en forma de urea (8%) y como ácido úrico (1%) (Urich, 1994). Cualquier alteración en la excreción nitrogenada tiene una influencia importante en el metabolismo del ostión, ya que la liberación de amoníaco se relaciona con la depositación del carbonato de calcio de la concha de los organismos. La excreción nitrogenada permite, en condiciones normales, mantener el pH en condiciones óptimas entre 8.6 y 8.9 (Urich, 1994). En *C. virginica*, un fenómeno observado en la tasa de excreción nitrogenada fue su disminución paulatina a lo largo del bioensayo, en todos los organismos, tanto en los grupos control, como en los expuestos a los metales. Esta disminución coincidió con una reducción en la producción de heces y en el consumo de alimento, aspectos que se discuten más adelante.

En esta investigación, los controles y los organismos expuestos al Cd no mostraron cambios evidentes en la excreción nitrogenada, al igual que en el consumo de células ingeridas. En contraste, la alteración en la excreción nitrogenada, fue evidente en ostiones expuestos a 0.180 mgCr/L, cuya tasa (0.141 mg N-AT/h/gPS) fue superior al resto de los lotes el día 10. En los ostiones expuestos al Cr, las alteraciones en la excreción amoniacal no se relacionaron con el consumo de alimento, el metal no modificó el consumo de células ingeridas. Sin

embargo, en esta etapa del bioensayo (día 10), el sustrato energético utilizado por los organismos denotó un catabolismo estricto de proteínas (O:N = 0.7), lo cual sugiere una condición de estrés severo y la utilización de proteína corporal con fines energéticos y en consecuencia explica el aumento en la excreción amoniaca observado. Es bien conocido que el Cr ocasiona daños renales en mamíferos y el exceso genera necrosis en los túmulos proximales, alterando a la vez, la excreción de los productos nitrogenados (EPA, 1998: Hewitt *et al.*, 1991). Sin embargo, en *C. virginica* y *M. edulis* el exceso de Cr puede excretarse por manto y glándula digestiva (Espina y Vanegas, 1996 b), posiblemente reduciendo las alteraciones renales. La tasa de producción amoniaca se ha relacionado con la disponibilidad del alimento, en función tanto de la composición química de la dieta, como de la cantidad del alimento ingerido. Así, la relación directa entre la tasa de excreción nitrogenada y la cantidad de alimento ingerido ha sido reportada en bivalvos.

C. Relación O:N.

En los bivalvos, como en todos los organismos amoniotélicos, la relación O:N es una medida de integración de la tasa respiratoria y la excreción nitrogenada y refleja la naturaleza del sustrato metabolizado como fuente energética (Mayzaud y Conover, 1988). Este parámetro suele relacionarse además con condiciones de estrés en organismos, debido a la influencia de los factores ambientales (incluidos los contaminantes), en los procesos fisiológicos integrados en la relación O:N

(Windows y Donkin, 1991). Valores teóricos en la relación O:N entre 3 y 16 se asocian al catabolismo estricto de las proteínas: valores menores a 3, se vinculan al catabolismo de las proteínas corporales en ausencia de alimento; 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 (Mayzaud y Conover, 1988).

En *C. virginica*, los ejemplares del grupo control, presentaron valores de O:N uniformes en el tiempo, con promedio de 40. Estos podrían asociarse al catabolismo equilibrado de proteínas y lípidos esperado en organismos adultos de la especie. En los organismos expuestos a ambos metales, los valores de la relación O:N denotó diversas condiciones de estrés fisiológico a lo largo de los días evaluados.

En los organismos expuestos a 0.095 mgCd/L, los valores elevados de la relación O:N (227.7) del día 14, se asociaron al consumo de las reservas energéticas de los organismos (lípidos y carbohidratos), lo cual se relaciona con la elevada tasa respiratoria en ese mismo día, con valores promedio de 1.41 mg/h/gPS y que representó el consumo de oxígeno más alto de este bioensayo. El valor bajo de la relación O:N (2.3), obtenido desde el día 3 en ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L, se asoció con el consumo de las proteínas propias del animal y reflejó un severo estrés metabólico. La alteración de la relación O:N por la exposición al Cd indica que el efecto es dependiente de la concentración.

En los ostiones expuestos a 0.080 mgCr/L, los valores de la relación O:N mostraron alteraciones el día 5 (2.2). En estos organismos, así como los expuestos 10 días a 0.180 mgCr/L, los valores bajos de la relación O:N (0.7),

reflejaron la condición de estrés severo, los cuales se asocian con la degradación con fines energéticos de la proteína corporal de los organismos. Comparativamente, la respuesta en la relación O:N, al igual que en el caso del estrés oxidativo, primero se observó en Cd y después en Cr. Los valores bajos observados en este indicador de estrés fisiológico, que implican el consumo de las proteínas propias del animal, se presentó a pesar de que los organismos contaban con alimento disponible. El estrés energético en función de la relación O:N, por efecto de los metales tóxicos, ha sido documentada en bivalvos. En la almeja *Argopecten ventricosus* (Sowerby) valores de O:N de 30, se asociaron con condiciones nutricionales adecuadas, en tanto que la exposición a Cr, Cd y Pb, en ausencia de alimento genera relaciones O:N menores de 5 (Sobrino, 2001). A la vez, en *Macoma baltica*, la exposición a 0.3 mgCd/L reduce las reservas energéticas de glucógeno de los organismos (Duquesne et al., 2004).

D. Consumo de alimento y tasa de filtración.

La exposición a los metales no modificó significativamente el consumo de células de *T. suecica*, excepto el día 17, en el cual los organismos expuestos a 0.180 mgCr/L mostraron un consumo elevado, de $103 \pm 53 \times 10^6$ células. No obstante, durante el transcurso de los bioensayos se registraron consumos elevados de células en los organismos expuestos a los metales, sin embargo, la dispersión de los datos impidió comprobar diferencias.

En los bivalvos, la tasa de filtración se considera una medida indirecta del

consumo de alimento, la cual es modificada por factores exógenos como la temperatura y la concentración de partículas del alimento (Walne, 1972; Griffiths y Griffiths, 1987; Newell y Langdon, 1996; Sobral y Widdows, 2000). En la presente investigación, las partículas estarían representadas por las células de *T. suecica* utilizadas como alimento y cuyo suministro no fue excesivo, ya que los organismos solo produjeron heces y no pseudoheces. Cabe señalar que el alimento proporcionado a los ejemplares de *C. virginica* (que en promedio fue de 10,707 células/mL), se consideró similar a la ración proporcionada a otras especies de bivalvos sujetas a bioensayo (Bayne, 1973; Castrejón *et al.*, 1994). Si bien algunos autores consideran de poco valor nutritivo a *T. suecica* (Volkman *et al.*, 1989); otros, por el contrario, consideran que los bivalvos pueden crecer sostenidamente con *T. suecica* seca, y que como alimento vivo su aprovechamiento es bueno, si bien en etapas juveniles, en las cuales el crecimiento es algo lento, su valor nutritivo es moderado (Laing y Verdugo, 1991).

La tasa de filtración en *C. virginica* varía y se reporta desde cero hasta un valor cercano a 10 L/h (Jorgensen *et al.*, 1991). En el presente estudio, las tasas obtenidas en los grupos control pueden considerarse típicas para la especie, de 1.21 L/h, alimentados con 10,000 células/mL de *T. suecica*. Esta tasa es semejante a la tasa de filtración de *Mytilus chilensis* Hopé (1.87 L/h) alimentada con una concentración similar de células de *Dunaniella marina* (Navarro y Winter, 1982), así como a la reportada en otras especies. Tal es el caso de: *Tapes phillipinarum* (Adams y Reeve) cuya tasa de filtración va de 1.1 L/h a 2.4 L/h (Da Ros *et al.*, 1998); de *M. edulis*, con tasa cercana a 1.8 L/h, de *Ruditapes decussatus* (Cooper), con tasa de 2.4 L/h (Sobral y Widdows, 2000), o bien de

Argopecten purpuratus (Lamarck), con tasa de 1.5 L/h (Navarro y Gonzalez, 1998), la cual incluso presenta importantes variaciones, llegando a filtrar hasta 16 L/h (Navarro *et al.*, 2000).

La tasa de filtración en *T. phillipinarum* responde a los contaminantes y disminuye en organismos que se encuentran en sitios contaminados (Da Ros *et al.*, 1998). En *M. edulis* y *Mya arenaria* L. (Capuzzo y Sasner, 1977), se ha comprobado que la tasa de filtración disminuye como consecuencia de la exposición a Cr en sedimento. Sin embargo, en el presente estudio la influencia del Cr en la tasa de filtración promedio en *C. virginica* no fue demostrada. De tal manera, los valores determinados para el grupo control (1.21 L/h) y para los ostiones expuestos al Cr (1.07 L/h y 0.82 L/h) fueron similares, y por lo tanto, la tasa de filtración no fue un buen indicador del daño por la exposición a este metal.

En contraste, los ostiones expuestos a Cd, tuvieron en promedio 0.56 L/h y fue significativamente inferior a la del grupo control, no observándose cambios importantes en los días evaluados. A diferencia de lo observado en el grupo control, en los cuales se evidenciaron variaciones a lo largo del transcurso de las pruebas. En *C. virginica* la reducción de la tasa de filtración por efecto del Cd coincidió con un menor consumo de alimento e esto se tradujo en la obtención de pesos interiores a los esperados para la clase de talla utilizada en los bioensayos (Powell, *et al.*, 1992). En contraste con lo observado en los organismos expuestos al Cr, donde la reducción observada en el peso de los organismos no se asoció con modificaciones en la tasa de filtración. La reducción en la tasa de filtración de bivalvos por el efecto de la exposición subletal al Cd y su repercusión en la disminución en el IC de los organismos también, se ha demostrado en *Macoma*

baltica (Duquesne et al., 2004).

Cabe destacar que en *C. virginica* se observó la presencia de casos extremos en la tasa de filtración del grupo control, lo que evidenció la presencia de tasas altas y bajas de filtración, tal como lo indican Powell *et al.* (1992). Las tasas altas de filtración en los organismos del grupo control representaron el 13% de los datos, mientras que en los ostiones expuestos a Cr, correspondieron al 9% y al 4% de las tasas registradas en los organismos expuestos a 0.080 mgCr/L, y 0.180 mgCr/L, respectivamente. En los expuestos a 0.095 mgCd/LCd, solo un dato correspondió a este tipo de tasa.

En la especie *C. virginica* las dos tasas de filtración, alta y baja, cubren funciones complementarias, en caso de haber exceso o escasez de alimento, y responden a modificaciones abruptas de la salinidad, así como a otros factores. La tasa máxima está determinada parcialmente por el tamaño de la branquia y el peso del tejido (Newell y Langdon, 1996). Se asume que esta puede estar relacionada con el cierre de valvas, mecanismo importante para la protección de los individuos en condiciones ambientales adversas, incluyendo concentraciones anormales de contaminantes disponibles (Phillips, 1980) y concentraciones anormalmente altas de cationes (Shumway, 1996), como el Cd^{2+} o Cr^{6+} , en este caso. Sin embargo, el cierre de valvas puede ocurrir, aún en condiciones óptimas, con una adecuada disponibilidad de alimento. Los mecanismos involucrados aún no se comprenden completamente y existe controversia respecto a los mecanismos responsables en el cierre de las valvas.

No obstante, la frecuencia de la tasa alta de filtración (de 5.27 L/h) observada en el grupo control, puede ser utilizada como un indicador de buen estado fisiológico

en *C. virginica*. En contraste, la menor frecuencia registrada en los organismos expuestos al Cr, así como el hecho de que estuvieron prácticamente ausentes en los ostiones expuestos al Cd, sugieren que la reducción en la presencia de la tasa alta de filtración, puede constituir un indicador del deterioro de los mecanismos involucrados en el cierre de valvas como medida de protección para reducir la incorporación de los metales. La disminución en la tasa de filtración y en la tasa de ingestión del alimento en bivalvos expuestos al Cd, Cu y Zn, ha sido atribuida al efecto narcótico de los metales (Smith, 1985; Lin *et al.*, 1992), en los cuales la reducción de estas tasas fisiológicas se asocia con el incremento en la incorporación de los tóxicos (Windows *et al.*, 1990). Esta relación fue observada en el presente estudio en los ejemplares de *C. virginica* expuestos al Cd. Por otro lado, si el Cd modifica la estructura de la branquia, puede modificar también la actividad de filtración, y esta se relaciona con la alimentación de *C. virginica* por la interacción entre las branquias y los palpos labiales, que controlan la cantidad de partículas en suspensión que entran en la región bucal (Ward *et al.*, 1994).

Cabe señalar que en *C. virginica*, las tasas bajas de filtración no mostraron el efecto de la exposición a los metales.

A pesar de las ventajas que representan los estudios de laboratorio elaborados con *C. virginica* y otras especies estuarinas alimentadas con algas unicelulares, los resultados obtenidos en la tasa de filtración no pueden ser extrapolados a los organismos en su habitat natural estuarino (Newell y Langdon, 1996), en donde el alimento tiene gran variabilidad espacial, temporal y de calidad (Wang y Wong, 2003). Lo anterior podría explicar el hecho de que en *C. virginica* los valores observados en las tasas de filtración altas y bajas, fueron inferiores a los valores

esperados (7.56 L/h y 1.72 L/h, respectivamente) para organismos de la misma talla.

E. Asimilación y eficiencia de asimilación.

En los organismos acuáticos la asimilación del alimento ingerido se relaciona de manera directa con la eficiencia con la cual se absorben los componentes dietéticos (Condrey *et al.*, 1972). En los bivalvos marinos, las características del alimento, tamaño y tipo de partícula, así como su cantidad y calidad, tienen una relevancia elevada en la asimilación tanto de los componentes dietéticos, como de los metales incorporados en el alimento (Wang y Fisher, 1999; Li *et al.*, 2002; Wang y Wong, 2003). La eficiencia de asimilación puede modificarse con la calidad de las partículas suspendidas (Mac Donald *et al.*, 1998), independientemente de su concentración. Castagna *et al.* (1996) indicaron que las células de *T. suecica* (suministradas como alimento en el presente estudio) pueden ser almacenadas en refrigeración al menos por 30 días sin deterioro aparente en su calidad. Lo anterior se corroboró con el análisis energético de *T. suecica* y su comparación con los valores energéticos asociados a otras dietas algales en moluscos. Al respecto, dietas constituidas de *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudomona*, *Isochrysis galbana* (Parke) y *T. suecica* proporcionadas a diferentes especies de moluscos, suministran 23.5 J/mg (5,622 cal/gPS) (Windows, 1993), mientras que dietas exclusivas de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) aportan 3,900 cal/gPS (Widdows, 1978). En este estudio el

contenido energético de 2,048 cal/g en *T. suecica*, fue casi la mitad de los valores indicados. Sin embargo, el contenido calórico de *T. suecica* (3.91×10^{-6} cal/célula) es mayor al suministrado a *M. edulis* alimentada con *T. suecica* (50,000 células/h), para el cual representó 0.94×10^{-6} cal/célula (datos recalculados; Bayne, 1973), y que fue considerada energéticamente adecuada para los organismos.

Los valores de consumo de células transformados a cal, representan el alimento ingerido por un individuo en un día. La ingestión no mostró el efecto de los metales, si bien pudo apreciarse una disminución en la ingestión del grupo control a lo largo del período de prueba.

En *C. virginica*, la asimilación del alimento durante el transcurso de las pruebas, fue similar en el grupo control (236.5 cal/d) y en los expuestos al Cr (244.1 cal/d promedio), y al Cd (177.5 cal/d), excepto los días 6 y 7. En los ostiones expuestos al Cr la asimilación fue significativamente inferior a los controles el día 7 (377.6 y 190.5 cal/d) y los expuestos a Cd mostraron una asimilación inferior en ambos días, que fluctuó entre 26.6 cal/d y 176.6 cal/d. A partir del séptimo día, la exposición a los metales no modificó la asimilación del alimento ingerido, no obstante la disminución de los valores observados, particularmente en los ostiones expuestos al Cd, debido a la elevada dispersión de los datos.

La eficiencia de asimilación del alimento ingerido, representa la fracción de los elementos asimilados que se incorporan en el tejido biológico (Widdows y Donkin, 1991). La eficiencia de asimilación determinada en los ejemplares de *C. virginica* del grupo control alimentados con *T. suecica* (74%), se consideró adecuada y semejante a la obtenida en diversas investigaciones con *C. virginica* y otras

especies de moluscos, alimentados con diferentes especies algales. Así, *C. virginica* alimentada con *Thalassiosira pseudonana* tiene una eficiencia de asimilación de 72-74% (Romberger y Epifanio, 1981), mientras que en *M. edulis*, *Ruditapes philippinarum*, *Perna viridis*, *T. philippinarum* y *A. purpuratus* (Hustedt) se reportan valores entre el 65% el 85 % (Widdows, 1978; Da Ros *et al.*, 1998; Navarro y González, 1998; Li *et al.*, 2002).

La reducción en la eficiencia de asimilación en los ostiones expuestos al Cr, (63 y 64%) en relación al grupo control, se mantuvo uniforme a lo largo del bioensayo. Si bien, en los ostiones expuestos a Cd el comportamiento de la eficiencia de asimilación fue irregular, en estos hubo una evidente reducción significativa en los días 6 y 7, a niveles entre el 19 y el 50%, relacionados a su vez con la disminución paralela en la asimilación del alimento ingerido.

La eficiencia de asimilación del alimento ingerido se vincula con la composición química del alimento y con la asimilación de los componentes orgánicos de la dieta, de manera que los cambios en el contenido energético de las heces reflejan alteraciones en la asimilación de estos componentes orgánicos (Condrey *et al.*, 1972). A la vez, la disminución en la producción de heces puede relacionarse con una mayor retención del alimento, incrementando la eficiencia de la digestión del alimento y su absorción (Widdows, 1993) y en consecuencia con una mayor asimilación del alimento ingerido (Griscom *et al.*, 2002). En los ejemplares del grupo control el menor contenido energético de las heces sugiere un mejor aprovechamiento del alimento y se refleja en la elevada asimilación del alimento ingerido.

En los ostiones expuestos a los metales la tasa de producción de heces fue menor que en los organismos del grupo control. No obstante el aumento en el contenido energético de las heces (días 11 a 17), sugiere una menor asimilación y aprovechamiento de los componentes orgánicos de la dieta, lo cual explica a su vez la reducción en el peso de los organismos, al término de la exposición al metal. En los ostiones expuestos al Cd la producción de heces fue irregular, y solo fue significativamente mayor que el grupo control el día 12 de exposición, no reflejando, contrario a lo esperado, la reducción significativa observada en la eficiencia de asimilación. En los organismos expuestos al Cd, la disminución en la eficiencia de asimilación del alimento, podría relacionarse con el deterioro de la actividad digestiva derivado de la destrucción de la glándula digestiva. Se ha corroborado la atrofia de la glándula digestiva como consecuencia de la exposición a valores elevados de Cd corporal por Kim *et al.* (1999). Cabe recordar que fue la glándula digestiva órgano con mayores alteraciones en la inducción de metalotioneínas y que presentó daño oxidativo desde las 6 h de exposición al metal.

F. Metabolismo basal.

El metabolismo basal representa el costo energético de mantenimiento de los organismos y refleja la demanda de energía mínima para cubrir sus funciones vitales. El metabolismo basal es modificado por numerosas variables ambientales, además de las características metabólicas intrínsecas de cada especie. Tal es el

caso de *C. virginica*, que tiene un metabolismo aerobio y uno anaerobio, e incluso puede mostrar un metabolismo anaerobio parcial, simultáneo al aerobio (Griffiths y Griffiths, 1987). Ambos influyen en los valores que se obtienen como gasto metabólico, de manera que para asegurar la obtención de los valores confiables de gasto energético del metabolismo basal, sería necesario evaluar la demanda de energía asociada a la tasa de anaerobiosis, la cual no fue determinada en esta investigación, si bien con el propósito de impedir la interferencia de una actividad metabólica anaerobia simultánea a la aerobia, los organismos se sometieron a concentraciones adecuadas de oxígeno disuelto en el medio. El tipo de metabolismo que tiene en particular este tipo de ostiones, hace que la comparación con otras especies sea limitada. La disminución en el metabolismo basal de *C. virginica* en los grupos control a lo largo del bioensayo (en promedio de 2.26 cal/h, el día 5 a 1.00 cal/h, el día 19), coincidió con la disminución en la tasa de ingestión del alimento y la producción de heces, reducción que sugiere que el metabolismo basal de los ostiones puede estar modulado por la condición energética nutricional de los organismos. No obstante, el metabolismo basal de *C. virginica* fue similar al reportado en *M. californianus* 0.91 cal/h (Griffiths y Griffiths, 1987), comparable al registrado en los ostiones el día 19 del bioensayo.

En los organismos expuestos a 0.080 mgCr/L, el metabolismo basal se incrementó en relación al grupo controles del día 10 en adelante (2.74 cal/h, 1.68 cal/h y 1.25 cal/h) y fue previo a la mortalidad observada en los organismos, uno el día 12 y otro el día 18 de transcurrido el bioensayo. En contraste, en *C. virginica* expuesta a 0.180 mgCr/L, el metabolismo basal a lo largo de la exposición al metal fue

inferior al del grupo control, en este caso, el primer organismo muerto se detectó hasta el día 16 del bioensayo. En el grupo expuesto a 0.095 mgCd/L, los organismos muertos se detectaron al día 8 y 13 del bioensayo (uno en cada día) y en este grupo el metabolismo basal fue mayor que el del grupo control el día 5 (2.64 cal/h). De manera similar, en los ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L la mortalidad se observó el día 5 y el 9 del bioensayo (uno cada día) y en este grupo el metabolismo basal fue elevado los días 6 y 10 del bioensayo (3.55 y 3.48 cal/h). De esta manera, el incremento en el metabolismo basal previo a la mortalidad de los organismos sugiere el aumento en el gasto energético de mantenimiento de las funciones vitales del organismo producto de la acción tóxica del metal, mayor por efecto del Cd. No obstante, se desconoce la razón por la cual los ostiones expuestos a la concentración mayor de Cr, contrario a lo esperado, no mostraron un fuerte gasto energético en el metabolismo basal. Si bien, también se demostró la disminución significativa en el peso de estos organismos al término del bioensayo.

4.2.4.3 Integraciones complejas. Campo de crecimiento.

Las integraciones complejas como lo es el campo de crecimiento (P), proporcionan información valiosa sobre el comportamiento energético de los organismos. Cualquier perturbación que altere el balance energético metabólico de los individuos al interferir con los mecanismos estabilizadores de la homeostasis, implica una alteración cuantificable del estado fisiológico inducida

por un cambio ambiental que hace al individuo más vulnerable a nuevos cambios ambientales y compromete su sobrevivencia a largo plazo (Espina y Vanegas, 1996a). El conocimiento relativo a la manera en que se modifican los mecanismos fisiológicos y bioquímicos, permite conocer los límites homeostáticos de los organismos (Klaassen y Eaton, 1991) ante la presencia de estresores ambientales como los metales tóxicos. En este sentido el campo de crecimiento refleja el efecto global de la exposición a los tóxicos ambientales, razón por la cual se considera una integración compleja utilizada como indicador general de estrés (Widdows *et al.*, 1990).

En el grupo control de *C. virginica*, el balance energético denotó que, de la energía ingerida por el alimento se canalizó entre el 63 al 83% al crecimiento potencial de los organismos (Fig. 40). Las pérdidas energéticas constituyeron del 9 al 10% de la energía ingerida (excreción nitrogenada y producción de heces), en tanto que del 18 al 32% se canalizó a la respiración. Esta última representó un porcentaje similar al calculado por Dame (1976), para *C. virginica* (29%).

En los ostiones expuestos al Cr el balance energético fue modificado en el transcurso de la exposición al metal, donde si bien el campo de crecimiento como resultante no fue alterado por la exposición al metal, la energía asimilada destinada al crecimiento potencial de los organismos fue del 10 al 14% y del 36 al 56% menor que en el grupo control al día 10 y 15 de exposición al metal, respectivamente. Los cambios en la distribución de energía obedecieron tanto al incremento en las pérdidas energéticas, asociadas a la producción de heces (H) y a la excreción nitrogenada (N), como al aumento en las demandas energéticas del metabolismo respiratorio (R).

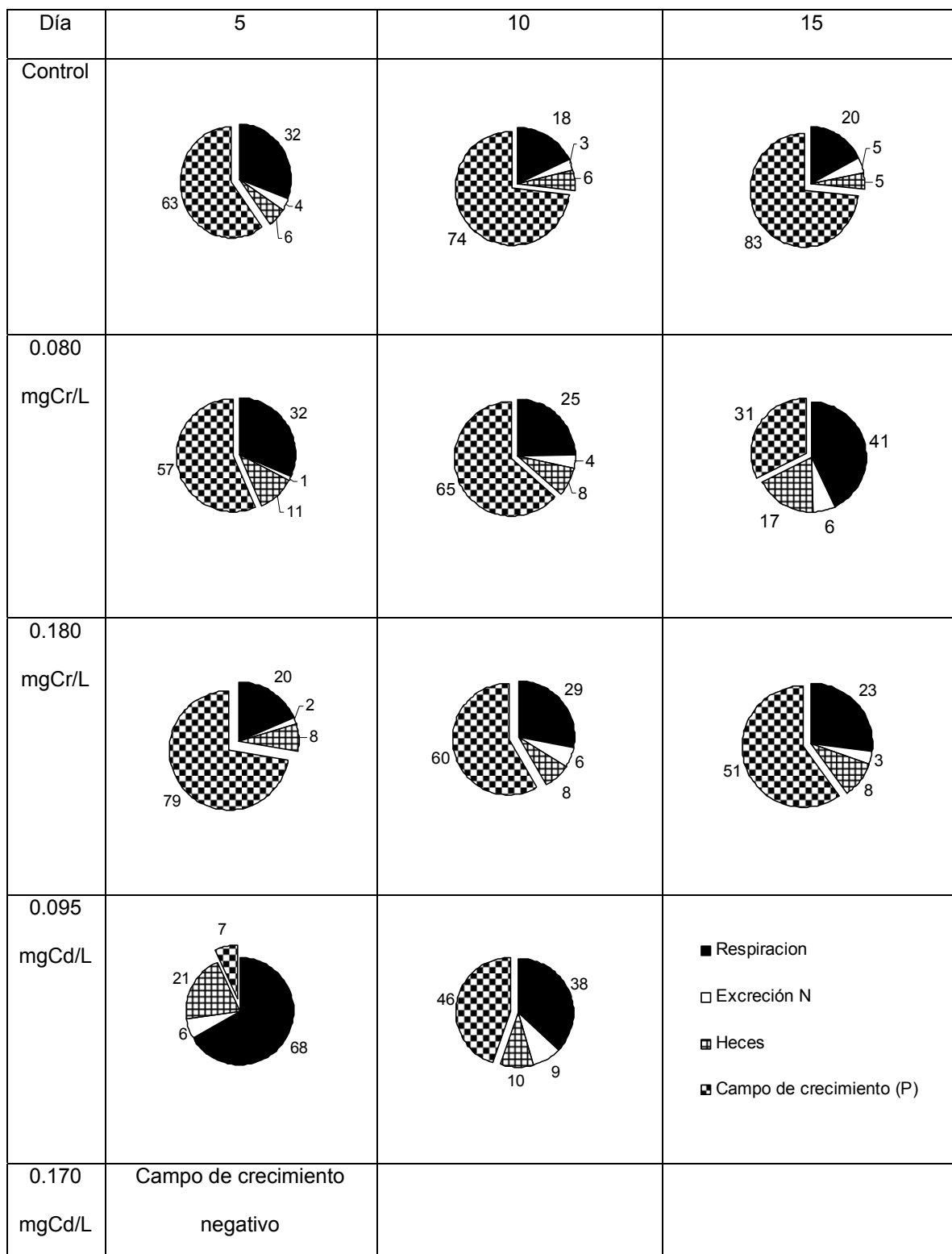


Figura. 40. Proporción de energía ingerida (100%) que es canalizada a las diferentes respuestas fisiológicas que se integran en el balance energético de *C. virginica*. Se presentan porcentajes.

Así, de la energía asimilada por el alimento ingerido (100%), las pérdidas energéticas (H + N), se incrementaron del 12 al 14 % al día 5 de la exposición, y del 11 al 23% al día 15 de la exposición al Cr. Si bien al día 10, la tasa metabólica (R) se incrementó por la exposición al metal, la proporción de la energía ingerida canalizada al metabolismo respiratorio fue similar a la detectada en el grupo control. En contraste, al día 15 de exposición, la energía asimilada canalizada a la respiración fue del 12 al 31% mayor que en el grupo control. De acuerdo a Widdows y Donkin (1991), el costo metabólico asociado a la respiración manifiesta algunos mecanismos mayores de intoxicación. Por ejemplo, en *M. edulis* la disminución de esta demanda energética se asocia con la inhibición del metabolismo oxidativo, mientras que un incremento, indica un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

En los ostiones expuestos al Cd, el balance energético fue significativamente alterado por la exposición al metal y reflejó una desventaja energética desde el principio de las pruebas. El campo de crecimiento resultante reflejó el compromiso energético de los organismos expuestos a 0.095 mgCd/L. Los valores sugieren condiciones de mantenimiento básicas, en tanto que en los expuestos a 0.170 mgCd/L, el déficit energético fue severo. Las alteraciones observadas en el crecimiento potencial de los ostiones obedecieron directamente a la reducción de la energía ingerida por el alimento. A la vez, obedeció a las alteraciones en la distribución energética del alimento ingerido. Así, al día 5 de la exposición al Cd, el 27% fueron pérdidas energéticas (H + N), en tanto que el 68% se canalizó al metabolismo, esto representó un gasto 36% más elevado que en los organismos

del grupo control. No obstante al día 10 de la exposición al metal, las pérdidas energéticas (H + N) fueron 9%, también superiores al grupo control, en tanto que la energía asimilada canalizada a la respiración fue 20% más elevada que en el grupo control.

En los organismos acuáticos la intoxicación por Cd se asocia inicialmente una mayor demanda de ATP, y en consecuencia a una mayor fosforilación oxidativa, hasta que el organismo ya no puede responder a la demanda energética y reduce el consumo de oxígeno, disminuyendo la ingestión y la capacidad de asimilación del alimento ingerido. El organismo requiere energía y no puede incorporarla del alimento (Espina y Vanegas, 1996 b). El curso de la intoxicación por los metales implica primero los efectos a nivel bioquímico, en el caso del Cr, se indujeron primero metalotioneínas y posteriormente estrés oxidativo, lo que implica la utilización de los recursos energéticos disponibles para la regulación del metal. En el caso del Cd, esta regulación no es posible por lo que la demanda energética se presenta junto con las respuestas, con un cambio en el uso de sustratos energéticos que se traduce en la reducción de los recursos globales y el deterioro del organismo. Los resultados del presente estudio parecen corroborar estos planteamientos, donde la significativa reducción en la energía ingerida influyó de manera determinante en el balance energético de los organismos expuestos al Cd.

El campo de crecimiento de *M. edulis* en ambientes no contaminados, se ha estimado en 137.6 cal/d/gPS (24 J/g/h) (Widdows y Donkin, 1991), valor similar a los determinados en los organismos control de *C. virginica*, que tuvieron de 130.6 a 192.29 cal/d/gPS. La alteración en el campo de crecimiento por la exposición al Cd

también ha sido demostrada en *M. edulis* expuestos en sitios medianamente y muy contaminados con el metal, obteniéndose valores de 68.81 cal/d y 11.47 cal/d, respectivamente; comportamiento similar al obtenido en el presente estudio, donde la exposición de 5 y 10 días a 0.095 mgCd/L redujo el campo de crecimiento de *C. virginica* a 5.8 cal/d y 57.17 cal/d.

En *C. virginica* los efectos tóxicos ocasionados por los dos metales en las diferentes respuestas fisiológicas evaluadas e integradas en el balance energético de los organismos se reflejaron, en última instancia en dos aspectos fundamentales: la sobrevivencia y el crecimiento potencial de los ostiones. La reducción en el campo de crecimiento por efecto del Cr se asoció principalmente con el incremento en la energía canalizada al metabolismo, en tanto que en los ostiones expuestos al Cd, el campo de crecimiento se relacionó directamente con la limitación energética del alimento ingerido y con la reducción considerable en la energía canalizada a la respiración. No obstante el estrés tóxico ocasionado por la exposición al Cr, expresado por la mortalidad de los organismos, no se reflejó de manera evidente en el campo de crecimiento de los ostiones, en contraste con la acción tóxica del Cd, donde el desbalance energético se asoció con la mortalidad observada.

4.2.4.4 FBC del Cr y Cd asociado a las integraciones simples y el campo de crecimiento.

La incorporación de los metales en los ejemplares de *C. virginica* tuvo una

asociación diferencias con las respuestas evaluadas. Después de 20 días de exposición al Cr, tanto la acumulación corporal, como el factor de bioconcentración (FBC), sugieren que el ostión presenta una cierta capacidad de regulación metabólica del metal, comportamiento relacionado con el papel esencial del Cr en las proteínas de los organismos (Goyer, 1991).

Contrario a lo observado en *C. virginica* expuesta al Cr, el FBC del Cd en los organismos, fue proporcional a la concentración de Cd acumulada en el tejido corporal y la especie se comportó como un acumulador neto, comportamiento similar al descrito en diversas especies de bivalvos, como anteriormente se mencionó. Si bien, en *C. virginica*, el FBC del Cr no reflejó el incremento de las concentraciones del metal en el medio, en el caso del Cd, FBC fue proporcional al metal bioacumulado. No obstante, el FBC de ambos metales se correlacionó negativamente con las tasas de ingestión y de asimilación del alimento ingerido, esta última, relacionada a su vez directamente con la tasa de filtración. Este comportamiento sugiere un compromiso fisiológico por parte de los organismos, a fin de reducir los niveles de incorporación del metal, de manera similar al comportamiento reportado en *Macoma baltica* expuesta al Cd (Duquesne *et al.*, 2004).

Por otro lado, la acumulación y el FBC del Cr no se correlacionó con el campo de crecimiento de *C. virginica* expuesta al metal. En contraste, en los ostiones expuestos al Cd, tanto la bioacumulación, como el FBC del metal se correlacionaron de manera negativa con el campo de crecimiento.

Los resultados obtenidos permiten suponer que *C. virginica*, especie que ha sido ampliamente utilizada como biomonitora de los niveles de contaminantes, en

ambientes lagunares estuarinos del Golfo de México, puede considerarse como bioindicadora del nivel de Cd en el medio (no así en el caso del Cr).

La ausencia de una correlación entre el FBC del Cr respecto al campo de crecimiento, o con alguno de los parámetros que integran la ecuación del balance energético, sugiere que la especie es capaz de regular los niveles internos a expensas de un gasto metabólico. En contraste, la correlación negativa del FBC de Cd con el campo de crecimiento y los parámetros asociados al modelo, indica que a pesar del esfuerzo metabólico, los organismos no pudieron controlar la entrada del metal.

4.2.4.5. Integración general.

Los ostiones de la laguna de Mandinga utilizados en los bioensayos tuvieron concentraciones de Cr y Cd similares a las de estudios previos. Es conveniente comentar que en el sedimento de la laguna existe una tendencia a aumentar la concentración de Cr y Cd. El nivel de Cr en sedimento de la laguna, se ha incrementado de 7.43 $\mu\text{g/gPS}$ promedio (Rosas *et al.*, 1983) a 45.74 $\mu\text{g/gPS}$ (Botello, 1994). Concentraciones de 40 $\mu\text{gCr/gPS}$ en sedimentos estuarinos, son consideradas en el Reino Unido como un nivel de contaminación apreciable (Spencer, 2002). Los metales contenidos en el sedimento pueden tener un flujo significativo hacia la columna de agua, mediado por la actividad microbológica y así permanecer como fuente de metales, aun después de que la incorporación de estos en el ambiente ha cesado. (Ford *et al.*, 1998). La historia de la contaminación del sitio de colecta debe tomarse en cuenta cuando se evalúa la

sensibilidad de un organismo a determinado metal (Blackmore y Wang, 2002). Se ha calculado que en *C. virginica* la mínima acumulación del Cr desde el sedimento, con respecto al Cd, tiene una diferencia de tres órdenes de magnitud (Thomann *et al.*, 1995).

Un aspecto que no se tomó en cuenta en la evaluación de las respuestas del ostión, fue la preexposición al Cd, la cual podría ser importante. Estudios realizados con *Perna viridis* en la zona costera de Hong Kong, han demostrado que existe una importante influencia de la concentración y el tiempo de exposición previa al metal, sobre las respuestas fisiológicas que presentan los organismos en exposiciones posteriores, aun cuando se les someta a una depuración intermedia. La preexposición a Cd, incrementa la eficiencia de asimilación posterior al mismo metal. Además, se ha demostrado que ostiones de la especie *Crassostrea rhizophorae* no depuran de manera significativa al ser trasladados desde sitios contaminados por metales, a sitios no contaminados en lagunas costeras tropicales de Brasil (Rebouças *et al.*, 2005). Las condiciones de preexposición pueden tener una influencia determinante en la resistencia de las poblaciones de ostión de lagunas costeras como Mandinga a incrementos posteriores en los niveles de contaminación. La consideración de la sensibilidad de las poblaciones nativas permitiría establecer niveles adecuados para la protección ambiental en estos cuerpos de agua.

Los daños asociados a la exposición al Cd indicaron que la sensibilidad de las poblaciones naturales del ostión *C. virginica* de Mandinga, es similar a la que presenta la misma especie en latitudes mayores, en las cuales está distribuida la especie y en donde el clima es más frío o templado. Las condiciones

seleccionadas para llevar a cabo los bioensayos en la presente investigación, no son las que suelen utilizarse con la especie. La temperatura seleccionada (25 °C) se considera elevada (de acuerdo al Dr. Davies, comunicación personal). Sin embargo, la temperatura del agua de la laguna frecuentemente es superior a los 30 °C. Estas condiciones implican la posibilidad de que los ostiones nativos se encuentren más vulnerables al efecto de tóxicos en este ambiente acuático. La presente, es una de las primeras evaluaciones de las respuestas fisiológicas de la especie adaptada a condiciones tropicales. La temperatura, la salinidad y otros parámetros fisicoquímicos tienen un comportamiento particular en las lagunas costeras tropicales, lo que afecta la dinámica de los metales. Por ejemplo, la especiación del Cr se rige por variables fisicoquímicas como la temperatura y la salinidad (Wood *et al.*, 1997) y la toxicidad de este metal depende de la especie química. Los cambios en la concentración de Cr en agua de diversas lagunas costeras mexicanas podría estar relacionado con los niveles en el sedimento y los parámetros fisicoquímicos locales (Contreras, 1996) además, diferentes modelos han demostrado que pueden obtenerse correlaciones aceptables de la concentración de metal en el sedimento y la biodisponibilidad a la biota acuática (Mountouris *et al.*, 2002). La concentración de los metales en el ostión, está gobernada principalmente por las condiciones ambientales geoquímicas locales que determinan la especiación del metal en aguas costeras, por su biodisponibilidad y por procesos biológicos tales como la disponibilidad de alimento (Roesijadi, 1996a). En la laguna de Mandinga, además de que la temperatura es elevada, la salinidad fluctúa entre 4.58 a 29.05 ‰ en promedio, el oxígeno disuelto entre 1.73 y 4.22 mg/L y el pH entre 4.5 y 8.7 (Contreras y

Castañeda, 1995). En algunos bivalvos (almejas), se ha comprobado que la acumulación del Cr está influenciada por cambios en la salinidad (Adler-Ivanbrook y Breslin, 1999). En Mazatlán, México, la concentración máxima de Cr, detectada en *Crassostrea cortesiensis* (Hanley), fue encontrada en agua tibia (29-31 °C) con una salinidad relativamente reducida (26 ‰) (Ruelas-Inzunza y Paez-Ozuna, 2000).

Algunos autores consideran que la acumulación de metales en moluscos es proporcional a la concentración ambiental, independientemente de la especiación química (Simkiss *et al.*, 1982). El incremento del Cr en tejido, proporcional a la concentración externa, es conocido en *C. virginica* desde 1969 (Simkiss *et al.*, 1982). Sin embargo en especies, como *M. edulis*, se ha demostrado que la acumulación es el resultado de la presencia de Cr^{6+} en fase disuelta (Wang y Fisher, 1999). Además, tanto la salinidad, como la temperatura influyen en las respuestas fisiológicas del ostión. Por ejemplo, *C. virginica* del Rio Patuxent expuesta a concentraciones de 0.08 ± 0.03 mgCd/L, en agua de temperatura relativamente elevada (35.3 °C) y salinidad relativamente baja (16 ‰), se incorporó en promedio 45.4 ± 4.3 µgCd/gPS (Abbe, *et al.*, 2000). En el caso del Cd, también la formación de especies químicas se relaciona con los parámetros fisicoquímicos. La formación de complejos de Cd con Cl es común en el agua de mar, pero la forma soluble del Cd^{2+} se incrementa con la disminución de la salinidad (Sadiq, 1992), la cual en lagunas costeras tropicales varía mucho a lo largo del año. Senthilnathan y Balasubramanian (1998), consideran que las concentraciones de Cd en *C. madrasensis* (Preston) están correlacionadas con

cambios ambientales como la estación de monzón y Cheggour *et al.*, (1999) indicaron que el Cd en *C. gigas* se relaciona con diversos factores ecológicos.

La protección de las especies en el ambiente, frecuentemente se apoya en la legislación ambiental. Las concentraciones seleccionadas para los ensayos de subletalidad se encuentran cercanas a los valores límite para descargas de aguas residuales en cuerpos de agua naturales, en sitios donde realiza actividad pesquera, de acuerdo con las normas mexicanas (DOF, 1997). Muchas veces se interpreta la protección ecológica de una especie a través de criterios sanitarios, desde una óptica antropocéntrica, asumiendo que la concentración aceptable para el consumo humano implica que la especie no se encuentra en riesgo. La exposición a 0.080 mgCr/L generó un incremento en tejido de 11.60 µgCr/g. El esfuerzo metabólico fue evidente incluso en estos organismos. Avila-Pérez y Zarazúa-Ortega (1993), han indicado que ostiones de Canal de Chijol en Veracruz, ya tienen 20 µgCr/gPS. Estudios recientes en Mandinga indican que se han registrado 21 µgCr/gPS promedio durante un ciclo anual en ostión de la laguna (Guzmán-Amaya, 2004). Concentraciones de 17 µgCr/g están en el límite aceptable para que el ostión sea consumido por el hombre (FDA, 1993). Concentraciones de 22.40 µgCr/gPS, en tejido, generadas con la exposición a 0.180 mgCr/L durante 20 días, ya indicaban dificultades para compensar los efectos del metal. De hecho, el Cr está considerado como un radiotrazador inerte para evaluar eficiencia de asimilación en almejas por el radio ^{14}C : ^{51}Cr (Wang y Fisher, 1999), pero los resultados obtenidos en *C. virginica* indican que el Cr interfiere en el metabolismo. La conveniencia de utilizar al Cr como un

radiotrazador inerte debe ser cuestionada. La regulación metabólica por si misma, puede ser considerada como un disturbio del metabolismo normal, dado que la estabilización interna de las concentraciones de metal, respecto al incremento en la concentración externa, requiere un mayor gasto energético (Amiard *et al.*, 1987), lo cual queda corroborado por nuestros resultados.

En países como Estados Unidos, las normas dependen de múltiples aspectos, tales como el uso del agua, las ramificaciones sociales, las legales, las económicas, la severidad de los límites permitidos, las determinaciones de químicos en el ambiente, la extrapolación de bioensayos, el valor económico de la especie y la sensibilidad de la misma, (Wood, *et al.*, 1997). De acuerdo con Walker y Gobas (1999), es necesario relacionar la concentración corporal con el efecto, los protocolos sobre protección ambiental deberían incluir las concentraciones internas, así como las de exposición, asociadas al efecto tóxico. Sin embargo, en México, escasamente dependen del uso del agua. Los límites están establecidos con base en criterios internacionales, no en pruebas con especies nativas mexicanas, además de apoyarse en las escasas investigaciones sobre químicos en el ambiente realizadas hasta ahora. De acuerdo con Lenwood *et al.* (1998), una concentración de 0.0233 mgCd/L en el agua salina de la bahía de Chesapeake realmente ya representa riesgo ecológico para especies bentónicas entre las que se incluye a *C. virginica*. Nuestros resultados indican que las normas mexicanas no protegen a las poblaciones nativas de ostión.

Ringwood *et al.* (1999) mencionan que la biota puede ser afectada por un enriquecimiento de bajo nivel con múltiples contaminantes que actúan en combinación y que los efectos crónicos pueden amenazar el éxito o

sustentabilidad de las poblaciones de *C. virginica*. El incremento de contaminantes hace susceptible a *C. virginica* a infecciones de manera dosis dependiente (Chu y Hale, 1994). Algunos contaminantes como en Cd están disminuyendo en el Golfo de México, en la zona costera de Estados Unidos (Kim *et al.*, 1999), pero en las costas de México parecen estar aumentando.

Los bivalvos dominan la macrofauna en muchos sistemas estuarinos, su papel ecológico es crucial para analizar la productividad y el flujo de energía en esas áreas (Griffith y Griffith, 1987). Es importante evaluar los efectos crónicos con una base energética de los taxa significativos ecológicamente. Considerar solo a las especies “más sensibles” no necesariamente implica la protección a la mayoría de las especies, los taxa residentes son los expuestos y apropiadamente sensibles (Chapman, 2002). Versteeg *et al.* (1999) sugirieron que los estudios crónicos generados con una especie pueden utilizarse para establecer concentraciones de protección de ecosistemas para efectos globales.

La importancia de los organismos filtradores como centinelas y el estudio de los efectos de diferentes sustancias, son básicos en la evaluación del estado que guardan los sistemas acuáticos en relación a la creciente contaminación. Los organismos filtradores provenientes de un sistema, que nacieron y crecieron en el mismo, como es el caso de *C. virginica* proveniente de la laguna de Mandinga, aportan información básica sobre la resistencia que puede tener este sistema al impacto de los contaminantes. Para ello, la información generada deberá vincularse con los estudios descriptivos del sistema, y con el estudio de la distribución y abundancia de la especie, así como de otras especies vinculadas a esta. La tasa de filtración tiene significado ecológico porque se relaciona con la

eliminación del detritus del agua. El número de organismos filtradores y su comportamiento son un indicador de la salud de sistemas acuáticos. La mayoría de los bivalvos tiene una anatomía básicamente similar desde el punto de vista estructural y funcional. La actividad filtradora permite registrar la acumulación y el uso del tejido de la branquia. En almeja, concentraciones de Cd de 0.2 mgCd/L (como utilizadas en este estudio, modifican suave pero evidentemente la actividad del sifón (Salanki *et al.*, 1991). Especies como *C. gigas*, han sido utilizadas como filtro biológico para disminuir el contenido de fitoplancton de ambientes coralinos, donde se han incrementado los nutrientes (Shpigel y Blaylock, 1991). De ahí la importancia de estudiar los efectos en la tasa de filtración. Por otro lado, la información relativa a respuestas integrales como el campo de crecimiento, es relevante desde el punto de vista ecológico porque al caracterizar los efectos en crecimiento y el gasto de energía, se puede determinar si la distribución y abundancia del organismo en el ecosistema podrían verse afectados. La medición del estrés fisiológico puede ser útil porque puede verse afectado el balance energético de la comunidad (Espina y Vanegas, 1996 b).

Las técnicas para evaluar efectos letales y subletales son reconocidas y están muy avanzadas en otros países. La FAO ha publicado manuales de técnicas cuya finalidad es difundir diferentes formas de acercamiento a este tipo de evaluación (FAO, 1981 a y 1981 b). El PNUMA indica que los moluscos bivalvos son útiles en estudios ecotoxicológicos por su capacidad de acumulación.

Finalmente, debido a que *C. virginica* tiene interés comercial en México, los resultados obtenidos son de importancia adicional por sus implicaciones en un recurso de explotación local y nacional. Asimismo el campo de crecimiento puede

tener relevancia económica, ya que indica si la especie puede ser explotada como un recurso en condiciones que garanticen la obtención de un producto de calidad. La presente investigación constituye una propuesta nueva de evaluación de riesgo para la especie, que recaba la información a partir de la evaluación integral de biomarcadores múltiples y describe los mecanismos de acción tóxica en función de la bioacumulación, estableciendo a la vez la relevancia de la integración y la relación de las respuestas biológicas evaluadas considerando diferentes niveles de organización biológica.

Es necesario efectuar estudios a diferentes niveles de organización biológica en función de las concentraciones del medio y la acumulación corporal. Esta investigación aporta elementos que proporcionan información sólida para la protección de *C. virginica* y es recomendable que en otras especies de los ecosistemas acuáticos mexicanos se consideren, para la propuesta de una normatividad ambiental tendiente a la regulación de emisiones en niveles seguros para los ambientes del país.

5. CONCLUSIONES.

Las pruebas de letalidad en *C. virginica* como resultado de la exposición a Cr y Cd corroboraron la mayor toxicidad del Cd. La $CL_{50-168\text{ h}}$ del Cr fue de 11.09 mg/L, mientras que la $CL_{50-72\text{ h}}$ del Cd fue de 24.87 mg/L. Los efectos del Cd fueron evidentes desde antes de las 96 h. Los efectos del Cr estuvieron diferidos, pero también fueron letales.

La $CLC_{50-168\text{ h}}$ de Cr de 560.98 $\mu\text{g/gPS}$, indicó una acumulación de este metal, que alcanzó hasta 1,200 $\mu\text{gCr/gPS}$. La acumulación de Cr tejido no se relacionó de una manera clara a la mortalidad, pero las altas concentraciones en tejido y la pérdida de peso apuntaron a un esfuerzo metabólico relacionado con el control de las concentraciones en el interior del animal. La $CLC_{50-168\text{ h}}$ y el FBC señalan que *C. virginica* no es un acumulador neto de Cr.

En contraste, la $CLC_{50-72\text{ h}}$ del Cd de 502.25 $\mu\text{g/gPS}$ del Cd y el FBC permitieron considerar al ostión *C. virginica* como acumulador neto de Cd. Las concentraciones corporales se ajustan al planteamiento de Borgmann (2000), en el sentido de que las concentraciones del metal en el tejido pueden usarse como indicadoras de daño por exposición al involucrar la biodisponibilidad del tóxico. La sensibilidad del ostión procedente de Mandinga al Cd fue similar a la descrita en la especie *C. virginica* en otros estudios, a pesar de que los organismos sometidos a las pruebas se desarrollan en condiciones tropicales. La CLC_{50} podría representar una herramienta útil en la evaluación de los efectos del Cd en poblaciones nativas de ostión.

En la exposición letal al Cr y al Cd, los parámetros morfométricos auxiliaron en la interpretación del daño generado, siendo la pérdida de peso total, húmedo y seco,

el deterioro más evidente en la exposición al Cd. En contraste, el efecto tóxico de la exposición a Cr solo se evidenció en el peso húmedo y seco. El índice de condición (IC), indicador de uso muy frecuente, no fue adecuado para evidenciar el deterioro, ya que no mostró disminución significativa por exposición a los metales. Además, en la prueba de efectos letales con Cd, el IC no pudo ser determinado debido a que los organismos no cerraban las valvas completamente y el líquido intervalvas se perdió. El incompleto cierre de valvas es un efecto de la exposición a Cd en concentraciones elevadas.

Las concentraciones seleccionadas para las pruebas de subletalidad, ligeramente superiores a las detectadas en la laguna de Mandinga, y generaron respuestas de estrés fisiológico en la exposición a ambos metales manifestadas desde las 6 h por la exposición al Cr, a través de la inducción de metalotioneínas en glándula digestiva (hasta 251.0 $\mu\text{g/g}$) y músculo abductor (hasta 182.5 $\mu\text{g/g}$). La correlación negativa entre los niveles de metalotioneínas y el FBC apuntan a un esfuerzo metabólico para controlar la concentración interna del metal. Si bien la inducción de metalotioneínas por exposición a Cd no fue estadísticamente diferente de los controles debido a la amplia dispersión de los datos, se presentaron variaciones significativas en el tiempo, alcanzándose niveles de 810.1 $\mu\text{g/g}$ en tejido de glándula digestiva, sugiriendo que la inducción de metalotioneínas es mayor por exposición Cd. La correlación directa con el FBC indica la incapacidad del organismo para controlar los niveles de Cd acumulados.

El daño peroxidativo derivado de la exposición a los metales se presentó a las 6 h de exposición en ostiones expuestos a Cd, mientras que los expuestos a Cr

manifestaron el daño hasta las 72 h. La inducción de metalotioneínas a las 6 h y de daño peroxidativo a las 72 h en ostiones expuestos a Cr, implican que las primeras actúan como un mecanismo protector, y el estrés oxidativo puede atribuirse a la generación de radicales libre por el exceso de Cr. Confrontando la respuesta en ostiones expuestos al Cr, con el hecho de que el daño peroxidativo en ostiones expuestos a Cd se presentó a las 6 h, la respuesta apunta a la posibilidad de que la inducción de metalotioneínas por exposición a Cd se podría haber presentado antes de las 6 h.

En la fase de evaluación de respuestas fisiológicas, que duró 20 días, la relación O:N como indicador de estrés metabólico, manifestó el efecto de la exposición a ambos metales, ya que, mientras los organismos control mostraron valores atribuibles a un catabolismo equilibrado de proteínas y lípidos, con promedio de 40; los expuestos a los metales indicaron un daño proporcional a la concentración de exposición. En la concentración más elevada de Cr, 0.180 mgCr/L, la relación O:N fue de 0.7 al décimo día de iniciados los bioensayos. Este valor se asocia al consumo de las proteínas propias del animal. Por otro lado, los expuestos a 0.080 mgCr/L mostraron una relación O:N de 223.5, el día 19, que indica que el organismo consumía sus reservas. La evaluación de la respiración como respuesta aislada, no demostró el efecto del Cr. La variación en la relación O:N, principalmente se atribuyó a la excreción nitrogenada que manifestó el efecto de exposición a 0.180 mgCr/L, el día 10, en el cual se registró 0.14 mg N-AT/h/gPS, superando a los controles y a los expuestos a Cd. En el caso de la exposición a Cd, la relación O:N indicó un severo estrés metabólico, resultante de la exposición , con valores muy bajos, de 2.3, con consumo de las proteínas propias del animal,

desde el tercer día de exposición a 0.170 mgCd/L. Sin embargo, el consumo de oxígeno de los ostiones expuestos al Cd presentó variaciones en los días evaluados, con un fuerte consumo el día 5, en organismos expuestos a 0.170 mgCd/L y los efectos estuvieron diferidos hasta el día 14 en los expuestos a 0.095 mgCd/L, día en que el consumo alcanzó 1.41 mg/h/gPS, mientras que ese día 14, la relación O:N fue de 227.7. Así, el estrés metabólico manifestado por la relación O:N fue dependiente del metal y la concentración, presentándose primero en el Cd (metal sin función biológica conocida) y después en el Cr (metal esencial), a pesar de no manifestarse un consumo de oxígeno muy elevado, los resultados implican un esfuerzo metabólico con un incremento en el consumo de oxígeno y posteriormente con el consumo de las proteínas propias del animal.

La tasa de filtración aparentemente no fue afectada por la exposición al Cr, sin embargo, la presencia de casos extremos en el grupo control, evidenció que el 13% de los valores determinados correspondieron a tasas altas de filtración (mayores a 4 L/h), tasas que fueron menos frecuentes en los organismos expuestos al Cr, que se determinaron, a pesar de que el consumo de alimento fue similar en todos los dispositivos experimentales, con excepción del día 17 en organismos expuestos a 0.180 mgCr/L, cuyo consumo fue superior al de controles. Las tasas altas de filtración generaron las diferencias entre controles y expuestos a Cd. La ausencia de tasas altas de filtración en los organismos expuestos a este metal es indicativa de un estrés fisiológico, ya que las tasas bajas de filtración (menores a 2 L/h) fueron similares en el grupo de organismos control y los expuestos a los dos metales. Por otro lado, los valores bajos en el consumo de alimento y la tasa de filtración de estos organismos derivó en una ingestión del

alimento significativamente baja. La asimilación del alimento y eficiencia de asimilación como indicadores del efecto de ambos metales, proporcionaron una información limitada sobre el efecto del Cr. Si bien no se demostraron diferencias significativas entre los controles y los organismos expuestos al Cr en la ingestión del alimento, el comportamiento calórico de las heces producidas por estos organismos indica que no hubo un aprovechamiento adecuado del alimento, lo que podría explicar la importante pérdida de peso en estos organismos. En el caso de la exposición a Cd, tanto la asimilación, como la eficiencia de asimilación mostraron irregularidad, registrándose 41% de eficiencia (148.6 cal/d), en organismos expuestos a 0.095 mgCd/L, respecto a los controles, con 76% (286.4 cal/d), mientras que los expuestos a 0.170 mgCd/L presentaron valores tan bajos como 19% (26.6 cal/d). Los ostiones expuestos a Cd, que duraron menos en exposición, mostraron este efecto de manera menos evidente y la disminución de peso no fue marcada.

Las modificaciones de estos indicadores de estrés fisiológico (relación O:N, tasa de filtración, asimilación del alimento y eficiencia de asimilación), implican mayores requerimientos energéticos, que podrían asociarse al gasto ejercido para el mantenimiento de la tasa basal. Estos requerimientos en organismos control, disminuyó a lo largo de los 20 días que duraron los bioensayos y coincidió con la paulatina disminución en el consumo de alimento y la producción menor también, de heces. Los ostiones expuestos a 0.080 mgCr/L tuvieron mayor gasto metabólico, a pesar de alimentarse bien, tener respiración comparable a los controles y producción de heces similar en peso, pero de mayor valor calórico. En la concentración superior de este metal (0.180 mgCr/L), los organismos mostraron

menor gasto en el mantenimiento del metabolismo basal el día 10, pero tuvieron una fuerte excreción nitrogenada ese día. A pesar de que la tasa metabólica basal no mostró un gasto proporcional a la concentración de Cr, el daño ya era evidente en esta concentración y la pérdida de peso de estos organismos, podría asociarse al esfuerzo metabólico. En la exposición a Cd los ostiones colocados en 0.170 mgCd/L tuvieron un fuerte gasto en el mantenimiento de su metabolismo basal desde los primeros días evaluados. El día 5, fue de 3.55 cal/h, el día 10 fue 3.48 cal/h. Los expuestos a 0.095 mgCd/L también gastaron más que los controles el día 5 (2.64 cal/h). En este caso el gasto en el mantenimiento del metabolismo basal fue proporcional a la concentración el día 5. El gasto de energía mayor a los controles en el mantenimiento de la tasa basal de los organismos expuestos, tanto al Cr como al Cd, siempre antecedieron a la mortalidad registrada en estos bioensayos, cual se registró de uno a tres días después del registro de estas tasas elevadas en ambos metales.

La interpretación de todas las respuestas fisiológicas en el campo de crecimiento, ubicaría a los controles y expuestos a Cr, en tolerancia metabólica. Si bien los gastos energéticos de los controles fueron comparables a otros estudios realizados con *C. virginica*, y la respuesta aislada del consumo de oxígeno no mostró diferencias con los ostiones expuestos al Cr, en estos se redujo la energía destinada al crecimiento potencial de estos organismos en el plazo comprendido entre el día 10 y el 15. Esto se debió a una pérdida constante de energía en heces fecales y excreción nitrogenada, así como a un incremento en la energía derivada al consumo respiratorio. El efecto del Cd en el campo de crecimiento fue considerable. Los organismos expuestos a 0.095 mgCd/L, se encontraban en

condiciones de estrés metabólico severo desde el día 5, y los valores se asociaron a la ración de mantenimiento, producto de la reducción en el consumo y asimilación del alimento. Estos animales no contaban con energía disponible para crecimiento. Los ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L, ya se encontraban en condiciones de resistencia metabólica, con una ingestión mínima del alimento desde el día 5, y la energía gastada ya no podía ser compensada.

La relación de las respuestas fisiológicas y metabólicas con la acumulación de los metales indicaron que el FBC en la exposición a Cr se mantuvo bajo, a expensas de un incremento en la ingestión y mayor asimilación del mismo, siendo la asimilación proporcional a la tasa de filtración, a pesar de que estos parámetros no mostraron diferencias estadísticas con los controles. El FBC de Cr no se asoció a ninguno de los parámetros del campo de crecimiento.

El FBC tuvo relación directa con el Cd acumulado en el tejido del ostión, a la vez con la disminución en la tasa de filtración y la asimilación de alimento, parámetros que estuvieron directamente relacionados entre si. Si bien no hubo diferencias en el peso de los organismos respecto a los controles, los ostiones expuestos a 0.170 mgCd/L tuvieron un peso menor al esperado y este peso fue proporcional al consumo de células. El FBC de Cd tuvo valores altos asociados a un mayor gasto respiratorio, excreción nitrogenada y pérdida calórica por heces, mientras que también se asoció a la menor ingestión y finalmente al menor campo de crecimiento.

La mayor y más rápida toxicidad del Cd, respecto al Cr en *C. virginica* implica que la especie tiene una capacidad de regulación de los niveles internos de Cr, a expensas de un gasto energético considerable y que los efectos derivados de la

exposición a 0.080 mgCr/L, que prácticamente representa los niveles detectados en Mandinga, también se asoció a modificaciones en los parámetros mencionados, si bien estas fueron menores, o estuvieron diferidas. Aunque los resultados no pueden ser extrapolados, los niveles actuales de Cr en Mandinga podrían representar un riesgo si se presentan factores estresantes adicionales. La exposición a 0.080 mgCr/L generó una acumulación de 11.60 $\mu\text{gCr/g}$ y en exposición a 0.180 mgCr/L, se acumularon 22.40 $\mu\text{gCr/g}$. Las normas de consumo consideran aceptable una concentración en ostión de 17 mgCr/g. Los resultados indican que ambas concentraciones generan un estrés fisiológico en esta especie. La respuesta de *C. virginica* de Mandinga a la exposición a Cd, fue muy evidente en el indicador bioquímico de exposición (metalotioneínas) y rápida en el se efecto (estrés oxidativo), ya que se presentó a las 6 h de exposición. Las respuestas fisiológicas se manifestaron que desde el tercer día de exposición, los organismos no consumían el alimento y ya consumían sus propias proteínas en la concentración 0.170 mgCd/L. En esta concentración la mayor parte de los indicadores fisiológicos hicieron evidente el efecto el día 5 y en la concentración de 0.095 mgCd/L, los efectos se vieron entre el día 10 y el 14. Los organismos mostraron un fuerte gasto energético en el mantenimiento de su tasa basal, que precedió a la mortalidad registrada en los lotes. El campo de crecimiento disminuyó en organismos expuestos al Cd, como consecuencia de una disminución en la ingestión de alimento aunada a un incremento en el consumo respiratorio y la excreción nitrogenada y por heces. El campo de crecimiento en la concentración 0.095 mgCd/L indica ausencia de energía disponible para el

crecimiento, y en la concentración 0.170 mgCd/L indica que el organismo se encontraba en resistencia metabólica desde el día 5. Con los niveles de Cd detectados actualmente en la laguna de Mandinga, las variaciones ambientales que generan estrés metabólico pueden hacer vulnerable a la especie, así como las variaciones que hagan biodisponibles a los metales ya acumulados.

La evaluación de efectos en diferentes niveles de organización biológica son necesarios, ya que la detección del daño temprano a través de indicadores bioquímicos no es suficiente para indicar el riesgo que corre una especie por exposición a tóxicos. Las respuestas fisiológicas que conectan el nivel celular con el individual se manifiestan posteriormente, pero permiten evidenciar modificaciones de funciones relacionadas con las condiciones de los organismos, muchas de las cuales definen su papel ecológico. Esta información es necesaria para hacer propuestas de manejo ambiental realista y representan puntos clave a observar en los ecosistemas. Para que estas medidas pudieran ejercerse, es necesaria la articulación de sectores vinculados con el uso y explotación de los recursos naturales, incluyendo los biológicos.

6. REFERENCIAS.

- Abbe, G. R., G. F. Riedel, J.G. Sanders. 2000. Factors that influence the accumulation of copper and cadmium by transplanted eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Patuxent River, Maryland. *Mar. Environ. Res.* 49: 377-396.
- Adler-Ivanbrook, L., V.T. Breslin. 1999. Accumulation of copper, chromium and arsenic in blue mussels (*Mytilus edulis*) from laboratory and field exposures to wood treated with chromated copper arsenate type C. *Environ. Toxicol. and Chem.* 18 (2): 213-221.
- Albert, L.A. 1997. Cromo. *In*: Albert, L.A. (Ed.). Introducción a la toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS, OMS, LIMUSA, Gob. Edo. De México, Secretaría de Ecología, México: 227-246.
- American Public Health Association (APHA). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation. Washington, D.C.: 8-1 – 8-47.
- Amiard, J.C., C. Amiard-Triquet, B. Berthet, C. Metayer. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106: 73-89.
- Amiard, J.-C., C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P.S. Rainbow. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates : Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76 (2) : 160-202.
- Aminot, A., M. Chaussepied. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre National pour l'Exploitation des Océans, France, 395 p.
- Avila-Pérez, P., G. Zarazúa-Ortega. 1993. Concentración de metales pesados en ostiones (*Crassostrea virginica* Gmelin), del canal del Chijol, Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 9(2): 53-64.
- Badillo, G.J.F. 1990. Cadmio. *In*: Albert, L.A. (Ed.) Curso Básico de Toxicología Ambiental. Cap. 9. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS, OMS, LIMUSA, México: 145-169.
- Baird, D.J., L. Maltby, P.W. Grieg-Smith, P.E.T. Douben. 1996. Putting the "eco" into ecotoxicology. *In*: Baird, D.J., L. Maltby, P.W. Grieg-Smith, P.E.T. Douben, (Eds.). Ecotoxicology: Ecotoxicological dimensions. Ecotoxicology Series 4. SETAC. Chapman & Hall, N. Y.: 1-4.
- Bayne, B. 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Netherlands J. Sea Res.* 7: 399-410.

- Bayne, B.L. 1998. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: an introduction to the Plymouth TROPHEE workshop. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219: 1-19.
- Bedsworth, W.W., D.L. Sedlak. 1998. Uses and abuses of metal speciation in the development of alternative water quality criteria. 19th Annual Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry. N.C., U.S. 352: p. 78.
- Blackmore, G., W. X. Wang. 2002. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal preexposure. *Environ. Sci. Technol.* 36: 989-995.
- Borgmann, U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: Bioaccumulation-toxicity relationships water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3: 277-289.
- Botello, A.V. 1994. Estudio geoquímico y diagnóstico ambiental de las lagunas de los alrededores de la central nucleoelectrónica de Laguna Verde, Veracruz. Informe Final 1992-1993. Comisión Federal de Electricidad/ICMyL/UNAM, México, 128 p.
- Baudrimont, M., J. Metivaud, R.F. Maury-Brachet, A. Boudou. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. and Chem.* 16 (10): 2096-2105.
- Bucio, L., V. Souza, A. Albores, E. Chavez, M.C. Gutiérrez. 1995. Cadmium and mercury toxicity in the WRL-68 cells. *Toxicology* 99 (3): 153-167.
- Buikema, Jr.A.L., B.R. Niederlehner, J. Cairns. 1982. Biological monitoring. Part IV Toxicity testing. *Water Res.* 16: 239-262.
- Calabreze, A., R.S. Collier, D.A. Nelson, J.R. MacInnes. 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 18: 162-166.
- Camacho. E., F.M.R. Palacios, G.J.M. Cortina, T.J.E. Aguilar, S.H. Zamudio, G.H.E. García. 1980. Cultivo de ostión. 2° Simposio Latinoamericano de Acuicultura, México: 897-942.
- Capuzzo, J.M., J.J. Sasner. 1977. The effect of chromium on filtration rates and metabolic activity of *Mytilus edulis* L. and *Mya arenaria* L. In: Vernberg, F.J., A. Calabreze, F.P. Thurberg, W.B. Vernberg (Eds.). Physiological responses of marine biota to pollutants. Academic Press, N.Y.: 225-237.
- Carpené, E., 1993. Metallothionein in marine molluscs. In: Dallinger, R., P. Dainbow. (Eds.). Ecotoxicology of metals in invertebrates proceedings. Lewis Publishers, Florida, 461 p.

- Castagna, M., M.C. Gibbons, K. Kurkowski. 1996. Culture: Application. *In: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble. (Eds.). The eastern oyster Crassostrea virginica. A Maryland Sea Grant Book College Park, Maryland: 675-690.*
- Castrejón, O.L., D.D. Porras, S.Ch. Band. 1994. Cultivo de alimento vivo para acuicultura. Instituto Nacional Indigenista. Universidad del Mar, Oaxaca, México, 118 p.
- Chapman, P.M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 7-15.
- Cheggour, M. A. Chafick, H. Texier, A. Bouhallaoui, N. Gharbi, A. Boumezzough, J. Elattar. 1999. Bioaccumulation of some metallic elements by the cultivated oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Oualidia Lagoon (Morocco); the role of ecological factors. *Haliotis* 28: 31-44.
- Cheng, T.C. 1996. Hemocytes: Forms and functions. *In: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (Eds.). The eastern oyster Crassostrea virginica. A Maryland Sea Grant Book College Park. Maryland, U.S.: 299-333.*
- Chu, F.L.E., R.C. Hale. 1994. Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 38: 243-256.
- Comisión Nacional del Agua (CNA). 2003. Ley federal de derechos normas aplicables en materia de Aguas Nacionales y sus bienes públicos inherentes 2003. Diario Oficial de la Federación, diciembre 31, México, 259 p.
- Condrey, J.G. Gosselink, H.J. Bennet. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.* 70: 1282-1291.
- Connors, D.E., A.H. Ringwood. 1997. The effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity on oysters (*Crassostrea virginica*). 18th Annual Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry, San Francisco, Ca.: p. 327.
- Contreras, E.F. 1985. Las Lagunas Costeras Mexicanas. Centro de Ecodesarrollo, Secretaría de Pesca, México, 263 p.
- Contreras, E.F. 1996. (Responsable). Evaluación geoquímica ambiental y diagnóstico de la zona costera de Veracruz: Lagunas de Tamiahua, Pueblo Viejo y Tampamachoco. Informe Final de proyecto de investigación CONACYT, Clave 3232-T9308. UAM-I, México, 285 p.
- Contreras, E.F., C.O. Castañeda. 1995. Los ecosistemas costeros del Edo. de Veracruz. Gobierno Edo. De Veracruz. Secretaría de Desarrollo Agropecuario,

- Forestal y Pesquero, México: 81-88.
- Cooper, T.G. 1977. Biochemistry. John Wiley and Sons, N.Y.: 53-55.
- Creed, J.T., P.D. Martin. 1997. Methods for the determination of chemical substances in marine and estuarine environmental matrices. EPA/600/R-97-072 Sept. 97. Method 200-12. Determination of trace elements in marine water by stabilized temperature graphite furnace atomic absorption. Environmental Protection Agency, Washington: 200.12-1 – 200.12-21.
- Da Ros, L., M.G. Marin, N. Nesto, S.E. Ford. 1998. Preliminary results of a field study on some stress-related parameters in *Tapes philippinarum* naturally infected by the protozoan *Perkinsus* sp. *Mar. Environ. Res.* 46: 249-252.
- Dame, R.F. 1976. Energy flow in an intertidal oyster population. *Estuarine Coastal Mar. Sci.* 4: 243-253.
- Dillon, M.T., M.P. Lynch. 1981. Physiological responses and determinants of stress in marine and estuarine organisms. *In: Darrett G.W., R. Rosenberg (Eds.). Stress effects on natural ecosystems.* John Wiley and Sons LTD, N.Y.: 227-241.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente Recursos naturales y Pesca, México, enero 6: 68-86.
- Duquesne, S., M. Liess, D.J. Bird. 2004. Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma baltica*. *Mar. Environ. Res.* 58: 245-250.
- Elliot, J.M., W. Davidson. 1975. Equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia* 19: 195-201.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1998. Toxicological review of hexavalent chromium CAS N° 18540-29-9, US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Environmental Protection Series (EPS). 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Report EPS1/RM/12. Environmental Protection Series, Canada, 85 p.
- Espina, S., C. Vanegas. 1996a. Ecofisiología y contaminación. *In: Botello, A.V., J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez, D. Zarate-Lomelí (Eds.). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias.* EPOMEX. Serie Científica 5. Univ. Auton. de Campeche, México: 45-68.
- Espina, S. y C. Vanegas. 1996b. Ecotoxicología y contaminación. *In: Botello, A.V.,*

- J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez y D. Zarate-Lomelí (Eds.). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. EPOMEX. Serie Científica 5. Univ. Auton. de Campeche, México: 69-106.
- Figueroa, N.A. 1990 Cromo. *In*: Albert, L.A. (Ed.) Curso Básico de Toxicología Ambiental. Cap. 10. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS, OMS, LIMUSA, México: 171-183.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1981a. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4. Bases para la elección de ensayos biológicos para la evaluación de la contaminación marina. Documentos Técnicos de Pesca N° 164 FIRI/T164 (ES), FAO, ONU, 34 p.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1981b. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 6. Ensayos de toxicidad. Documentos Técnicos de Pesca N° 185 FIRI/T185, FAO, ONU, 24 p.
- Food and Drug Administration (FDA). 1993. Guidance document for chromium in shellfish. Washington, United States Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, 29 p.
- Forbes E.V. y M. Depledge. 1996. Environmental Stress and the Distribution of Traits within Populations I. *In*: Baird, D.J., L. Maltby, L.P.W. Greig-Smith y P.E.T. Douben (Eds.). Ecotoxicology. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Chapman & Hall: 89 p.
- Ford, T., J. Sorci, R. Ika, J. Shine. 1998. Interactions between metals and microbial communities in New Bedford, Massachusetts. *Environmental Health Perspectives* 106 (Supl 4): 1033-1039.
- Franco, J., A. Borja, O. Solaun, U. Pérez. 2002. Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): results from an 11-year monitoring programme. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 973 - 976.
- Galtsoff, P.S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. U.S. Department of the Interior. U.S. Government Printing Office. Washington, 480 p.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Ed. Larrios, S.A., México, 252 p.
- Gaudy, R., J.P. Guerin, P. Kerabrum. 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: Mysidacea). *Mar. Biol.* 109: 493-501.
- Geret, F., F. Rainglet, R.P. Cosson. 1997. Comparison between two protocols for the isolation of metallothioneins within mussel *Mytilus edulis*. *J. Recherche Oceanographique* 22:151-156.

- Geret, F., F. Rainglet, R.P. Cosson. 1998. Comparison between isolation protocols commonly used for purification of mollusc metallothioneins. *Mar. Environ. Res.* 46(1-5): 545-550.
- Geret, F., R.P. Cosson. 2000. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique: variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea gigas*. *Oceanol. Acta* 23: 261-271.
- González-Fierro, A., A. Vázquez-Botello, S. Villanueva-Fragoso, G. Ponce-Vélez. 1994. Presencia de metales en sedimentos recientes y organismos de la laguna de Sontecomapan, Ver., México. *Hidrobiológica* 4(1-2): 35-43.
- Goyer, R.A. 1991. Toxic effects of metals. *In*: Amdur, M.O., J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.). *Casarett and Doull's Toxicology*. Pergamon Press, N.Y.: 623-680.
- Griffiths, C.L., R.J. Griffiths. 1987. Bivalvia: *In*: Pandian, T.J., F.J. Vernberg (Eds.). *Animal Energetics 2*, Academic Press, N.Y., 88 p.
- Griscom, S.B., N.S. Fisher, R.C. Aller, L. Byeong-Gweon. 2002. Effects of gut chemistry in marine bivalves on the assimilation of metals from ingested sediment particles. *J. Mar. Res.* 60: 101-120.
- Guzmán-Amaya, P. 2004. Contaminación por metales en ostión de las lagunas de Alvarado, Mandinga y Tamiahua. Tesis de M. en C. Fac. Ciencias, UNAM, México, 122 p.
- Guzmán-García, X. 2001. Toxicocinética de cadmio y daño histopatológico en ostión *Crassostrea virginica* en condiciones de ayuno y alimentación. Tesis de M. en B. E., UAMI, México, 65 p.
- Hewitt, W.R., R.S. Goldstein, J.B. Hook. 1991. Toxic Responses of the Kidney. *In*: Amdur, M.O., J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.). *Casarett and Doull's Toxicology*. Pergamon Press, Toronto: 354-382.
- Hodgson, E., P.E. Levi. 1987. *A textbook of modern toxicology*. Elsevier, N.Y., 386 p.
- Huan, S.Ch.T. 1994. General guidelines for the acid digestion of fish and shellfish. Reference 83. Method number NIEA C303.01T. *Executive Yuan Environmental Protection Agency Republic of China Official Gazette* 7 (5): 1-6.
- Jorgensen S.E., S.N. Nielsen, L.A. Jorgensen. 1991. *Handbook of ecological parameters and ecotoxicology*. Elsevier, N.Y.: 523-524.
- Johnso, I. 1988. The effects of combinations of heavy metals, hypoxia and salinity on ion regulation in *Crangon crangon* (L.) and *Carcinus maenas* (L.). *Com. Biochem. Physiol.* 91 C (2): 459-463.

- Kemmer, F.N., J. McCallion. 1989. Manual del agua. Su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Tomo I. NALCO Chemical Company. McGraw Hill, México: 6-1 - 6-26.
- Kim, Y., E.N. Powell, T.L. Wade, B.J. Presley, J.M. Brooks. 1999. Influence of climate change on interannual variation in contaminant body burden in Gulf of Mexico oysters. *Mar. Environ. Res.* 48: 459-488.
- Klaassen, C.D., D. L. Eaton. 1991. Principles of toxicology. *In*: Amdur, M.O., J. Doull, C.D. Klaassen (Eds.). Casarett and Doull's Toxicology. Pergamon Press, Toronto: 12-49.
- Koeman, J.H. 1991. From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 7-10
- Köhler, K., H.U. Riisgard. 1982. Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 66: 53-58.
- Laing, I., C.G. Verdugo. 1991. Nutritional value of spray-dried *Tetraselmis suecica* for juvenile bivalves. *Aquaculture* 92: 207-208.
- Lam, P.K.S., J.S. Gray. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 182-186.
- Langdon, Ch.L., R.I.E. Newell. 1996. Digestions and nutrition in larvae and adults. *In*: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (Eds.). The eastern oyster *Crassostrea virginica*. A Maryland Sea Grant Book College Park. Maryland. U.S.: 231-270.
- Langston, W.J., M.J. Zhou. 1987. Cadmium accumulation distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica*: neither metallothionein nor metallothionein-like proteins are involved. *Mar. Environ. Res.* 21: 225-237.
- Lares, M.L., K.J. Orians. 2001. Differences in Cd elimination from *Mytilus californianus* and *Mytilus trossulus* soft tissues. *Environ. Pollut.* 112 : 201-207.
- Legeay, A., M. Achard-Joris, M. Baudrimont, J.-Ch. Massabuau, J.-P. Bourdineaud. 2005. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology* 74 (3): 242-253.
- Lenwood, W.H.J., M.C. Scott, W.D. Killen. 1998. Ecological risk assessment of cooper and cadmium in surface waters of Chesapeake bay watershed. *Environ. Toxicol. and Chem.* 17 (6): 1172-1189.

- Li, S.Ch., W.X. Wang, D.P.H. Hsieh. 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarens* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 53: 145-160.
- Lin, W., A.R. Mitchel, P.K Chien. 1992. The effects of copper, cadmium and zinc on particle filtration and uptake of glycine in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C: 181-187.
- Lind, O. 1985. Handbook of common methods in limnology. Kendal/Hunt. U.S., 199 p.
- Mac Donald, B., G.S. Bacon, J.E. Ward. 1998. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten Magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles II. Absorption efficiency and scope for growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219 (1-2): 127-141.
- Marques de Cantú, M.J. 1991. Probabilidad y estadística para ciencias quimicobiológicas. McGraw-Hill, México, 657 p.
- Mayzaud, P., R.J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplakton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 289-302.
- Metcalf y Eddy Inc. 1991. Wastewater Engineering. McGraw-Hill International. N.Y., 1334 p.
- Mountuoris, A., E. Voutsas, D. Tssios. 2002 Bioconcentration of heavy metals in aquatic environments: the importance of bioavailability. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 1136-1141.
- Moreno G. M. D. 2003. Toxicología ambiental. McGraw Hill, México, 370 p.
- Muñoz-Barbosa A., E.A. Gutiérrez-Galindo, G. Flores-Muñoz. 2000. *Mytilus californianus* as an indicator of heavy metal on the northern coast of Baja California, México. *Mar. Environ. Res.* 49: 123-144.
- Navarro, J.M., J.E. Winter. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Mar. Biol.* 67: 255-266.
- Navarro, J.M., G.E. Leiva, G. Martínez, C. Aguilera. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247: 67-83.
- Navarro, M., C.M. González. 1998. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture* 167: 315-327.

- Newell, R.I.E., Ch.J. Langdon. 1996. Mechanisms and physiology of larval and adult feeding. *In: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (Eds.). The eastern Oyster Crassostrea virginica. A Maryland Sea Grant Book College Park, Maryland, U.S.: 185-228.*
- Neff, J.M. 2002. Bioaccumulation in marine organisms- Elsevier, N.Y., 452 p.
- Paez, O.F. 1996a. Fuentes de metales en la zona costero marina. *In: Botello, A.V., J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benitez, D. Zarate-Lomeli (Eds.). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. EPOMEX Serie Científica 5, Univ. Auton. de Campeche, México:. 297-308.*
- Paez, O.F. 1996b. Efectos de los Metales. *In: Botello, A.V., J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez, D. Zarate-Lomelí (Eds.). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. EPOMEX. Serie Científica 5. Univ. Auton. de Campeche, México: 349-361.*
- Palacios-Fest, M., R. Vargas-Rangel. 2002. Pesquería de ostión. *In: Guzmán, A.P., B.C. Quiroga, L.C. Díaz, C.D. Fuentes, C.M. Contreras, L.G. Silva (Eds.). La pesca en Veracruz. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de la Pesca y Universidad de Veracruz, México: 235-241.*
- Patel, B., K. Anthony. 1991. Uptake of cadmium in tropical marine lamelibranch and effects on physiological behavior. *Mar. Biol.* 108: 457-470.
- Pawlisz, A.V., R.A. Kent, U.A. Schreider, C. Jefferson. 1997. Canadian water quality guidelines for chromium. *In: Liu, D.L., B.J. Dutka (Eds.). Environmental toxicology and water quality. An International Journal (Formerly Toxicity Assessment) CCC 1053-4725/97/020/23-61. John Wiley and Sons, Canada 12(2): 123-183.*
- Phillips, D.J.H. 1980. Quantitative aquatic biological indicators. Applied Science Publishers, LTD, London.
- Powell, E.N., E.E. Hofmann, J.M. Kinck, S.M. Ray. 1992. Modeling oyster populations I. A commentary on filtration rate is faster always better? *Jour. of Shellfish Res.* 11 (2): 387-398.
- Ramírez, A. 1989. Curso Regional de entrenamiento de sobre ensayos biológicos y pruebas de toxicidad como bases técnicas para formular un Criterio de Calidad de agua costera en la región del Gran Caribe. Proyecto Regional. INDERENA/PAC/PNUMA/FAO/COI, Ministerio de Agricultura, Colombia, 24 p.
- Rebouças do Amaral, M.C., M. Freitas-Rebelo, J.P. Machado-Torres, W.Ch. Pfeiffer. 2005. Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) Transplanted to and from a

- contaminated tropical coastal lagoon. *Mar. Environ. Res.* 59 (4): 277-285.
- Rehwoldt, R., L. Lasko, Ch. Shaw, E. Wirhowski. 1973. The acute toxicity of some heavy metal ions toward benthic-organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 291-293.
- Rendón, O.V., P.L.F. Cabrera, G.J. García. 1995. Las necesidades de un sistema de monitoreo ambiental en el complejo lagunar de Alvarado, Veracruz, México. *Jaina* 6: 14-15.
- Riedel G.F., J.G. Sauders, D.L. Breitburg. 1998. The effects of multiple stressors on estuarine ecosystems: the influences of nutrient enrichment on trace element cycling. 19th Meeting Society of Environmental Toxicology and Chemistry, N.C., pp. 26.
- Ringwood, A.H., D.E. Conners, C.J. Keppler. 1999. Cellular responses of oysters *Crassostrea virginica* to metal-contaminated sediments. *Mar. Environ. Res.* 48: 427-437.
- Robledo, M.F. 1987. Evaluación de la calidad del agua y calidad sanitaria del ostión *Crassostrea virginica* en la laguna de Pueblo Viejo, Ver., México. Esc. Cien. Biol. Univ. Tampico, 58 p.
- Roesijadi, G., 1994. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. *Mar. Environ. Res.* 38: 147-168.
- Roesijadi, G. 1996. Environmental Factors: Response to Metals. In: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (Eds.). The eastern oyster *Crassostrea virginica*. A Maryland Sea Grant Book College Park. Maryland, U.S.: 515-537.
- Roesijadi, G., P.L. Klerks. 1989. Kinetic analysis of Cd binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exp. Zool.* 251: 1-12.
- Roesijadi, G., K.M. Hansen, M.E. Unger. 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol. Appl. Pharm.* 140: 356-363.
- Romberger, H.P., C.E. Epifanio. 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon the assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture* 25: 89-94
- Romeo, M.R., P. Cosson, M. Gnassia-Barelli, Ch. Risso, X. Stein, M. Jafaurie. 1997. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Mar. Environ. Res.* 44 (3): 275-284.
- Rosas, C., T. Castañeda, G. Barrera. 1989. Niveles de Pb, Cr y Cd en *Callinectes sapidus* y *C. Similis* y su relación con la concentración de estos en el agua y en

- el sedimento. *Rev. Inv. Marinas. Univ. De la Habana* 10(1): 71-88.
- Rosas, I., A. Baez, R. Belmont. 1983. Oyster (*Crassostrea virginica*) as an indicator of heavy metal pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico. *Water Air Soil Poll.* 20: 127-135.
- Ruelas-Inzunza, J.R., F. Paez-Ozuna. 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter feeder organisms in a subtropical coastal environment. (Southeast Gulf of California). *Environ. Pollut.* 107: 437-444.
- Sadiq, M. 1992. Toxic metal Chemistry in Marine Environments. Marcel Dekker, N.Y., 390 p.
- Salanki, J., T.M. Turpaev, M. Nicaeva. 1991. Mussel as a test animal for assessing environmental pollution and the sublethal effect of pollutants. *In: Jeffrey, D.W., B. Madden (Eds.). Bioindicators and environmental management.* Academic Press, London: 235-244.
- Savva, D., 1999. Cloning and analysis of the metallothionein gene of the shore crab *Carcinus maenas*. Consiglio nazionale della recherche università degli studi di Siena, Italia, Siena: 92-94.
- Scheuhammer, A.M., M.G. Cherian. 1991. Quantification of metallothionein by silver saturation. *In: Methods in enzymology.* Vol. 205. Academic Press: 78-82.
- Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE). 1986. Reglamento para la Prevención y Control de la Contaminación de las aguas. Serie: Normatividad Ecológica N° 4. Colección Los Básicos, México, 40 p.
- Secretaría de Pesca (SEPESCA). 1988. Manual Técnico para la Operación de Centros Acuícolas de Producción de Ostión. SEPESCA, México, 324 p.
- Secretaría de Salud, 1994. Norma Oficial Mexicana NOM - 031 - SSA1 - 1993, Bienes y Servicios. Productos de pesca. Moluscos Bivalvos Frescos-Refrigerados y Congelados. Especificaciones Sanitarias. Diario Oficial de la Federación, noviembre 29, México.
- Secretaría de Pesca (SEPESCA). 1988. Manual Técnico para la operación de centros acuícolas de producción de ostión. SEPESCA, México, 324 p.
- Senthilnathan S., T. Balasubramanian. 1998. Heavy metal concentration in oyster *Crassostrea madrasensis* (Bivalvia/Anisomyaria) from the Uppanar, Vellar and Kaduviar estuaries of southeast coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* 27: 211-216.
- Servos M. 2000. Deadman Dance. *Env. Tox. Chem.* 19: 2621-2622.
- Shpigel, M., R.A. Blaylock. 1991. The pacific oyster *Crassostrea gigas* as a

- biological filter for a marine fish aquaculture pond. *Aquaculture* 92: 187-197.
- Shumway, S. 1996. Natural Environmental Factors. *In*: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (Eds.). The eastern oyster *Crassostrea virginica*. A Maryland Sea Grant Book College Park. Maryland, U.S.: 467-513.
- Shumway, S.E., R.K. Koehn. 1982. Oxygen consumption in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9: 59-68.
- Silva, C.A.R., P.S. Rainbow, B.D. Smith, Z.L. Santos, 2001. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi Estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Res.* 35 (17): 4072-4078.
- Simkiss, K., A.Z. Masson. 1983. Metal ions: Metabolic and toxic effects. *In*: Environmental Biochemistry and Physiology. Vol. 2. The Mollusca. Academic Press Inc., U.S.: 101-164.
- Simkiss, K., M. Taylor, A.Z. Mason. 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Biol. Letters* 3. 187-201.
- Smith, J.R. 1985. Copper exposure and ciliary function in gill tissue of *Mytilus Californianus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 556-563.
- Sbral, P., J. Widdows. 2000. Effects of increasing current velocity, turbidity and particle size selection on the feeding activity and scope for growth of *Ruditapes decussatus* from Ria Formosa, southern Portugal. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 245, 111-125.
- Sobrino, F.A.S. 2001. Efecto de los metales Cd, Cr, Pb y sus mezclas en la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842), (Bivalvia, Pectinidae). Tesis Doctor en Ciencias Marinas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, México, 180 p.
- Sokal, R.R., F.J. Rohlf. 1979. Biometría, principios y métodos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones, Madrid, 680 p.
- Soto-Jiménez, M., F. Paez-Osuna, F. Morales-Hernández. 2001. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridiscens*) and sediments from the discharge zone of the estuarine sewage outfall in Mazatlan Bay (southeast Gulf of California): chemical fractions and bioaccumulation factors. *Environ. Pollut.* 114: 357-370.
- Souza, V., L. Bucio, M.C. Gutiérrez, E.Ch. Cossio. 1996. Acumulación de cadmio y su efecto en el transporte de calcio en las células WRL-68. *In*: Albert, A.L., L.S. Osorio (Eds.). La toxicología en México. Estado actual y perspectivas. Sociedad Mexicana de Toxicología, México: 63-66.

- Spencer, K.L. 2002. Spatial variability of metals in the Inter-tidal sediments of the Medway Estuary, Kent, UK. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 933-944.
- Spicer, I.I. R.E. Weber, 1991. Respiratory impairment in crustaceans and mollusks due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol* 100 C (3): 339-342.
- Stegeman, J.J., M. Browner, R.T. Giulio, L. Förlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders, P.A. Van Veld. 1992. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical Exposure effect. *In: Hugget, R.J., R.A. Kimerle, P.M. Mehrle, H.L. Bergman (Eds.). Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress.* Lewis Pub. Chelsea, MI: 235-336.
- Thomann, R.V., J.D. Mahony, R, Mueller. 1995. Steady-state model of biota sediment accumulation factor for metals in two marine bivalves. *Environ. Toxicol. and Chem.* 14(11): 1989-1998.
- Tuckey, J. W. 1977. Exploratory data analysis. Addison-Wesley Co. Massachusetts, 688 pp.
- Urich, K. 1994. Comparative animal biochemistry. Springer-Verlag, Germany, 782 p.
- Vanegas, P.R.C. 1996. Efectos subletales del cadmio y zinc en *Penaeus setiferus*. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Fac. Ciencias, UNAM, México, 118 p.
- Versteeg, D.J., S.E. Belanger, G.J. Carr. 1999. Understanding single-species and model ecosystems sensitivity data-based comparison. *Environ. Toxicol. and Chem.* 18: 1329-1346.
- Viarengo, A., E. Ponzano, F. Dondero, R. Fabbri. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to mediterranean and antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44(1): 69-84.
- Villanueva, F.S., A.V. Botello. 1992, Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano: una revisión. *Rev. Int. Contam. Amb.* 8(1): 46-61.
- Villanueva, F.S., A.V. Botello. 1998. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 157: 53-94.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.L. Rogers, C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.
- Walker, S.L., F.A.P.C. Gobas, 1999. An investigation of the application of the canadian water quality guidelines. *Environ. Toxicol. and Chem.* 18 (6): 1323-1328

- Walne, P.R. 1972. The influence of current speed, body size and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *J. Mar. Biol.* 52: 345-374.
- Walne, P.R. 1984. Cultivo de moluscos bivalvos. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 206 p.
- Walsh, A.R., J. O'Halloran. 1998. Accumulation of chromium by a population of mussel (*Mytilus edulis* (L.) exposed to leather tannery effluent. *Environ. Toxicol. and Chem.* 17 (7): 1429-1438.
- Wang, W.X., N.S. Fisher. 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environ. Toxicol. and Chem* 18(9): 2034-2045.
- Wang, W.X., N.S. Fisher, S.N. Luoma. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Series* 140: 91-113.
- Wang, W.X., R.C.K. Wong. 2003. Combined effects of food quantity and quality on Cd, Cr, and Zn assimilation to the green mussel, *Perna viridis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 290: 46 - 69.
- Ward, J. E., R. I. E. Newell, R. Thompson, B.A. Mac Donald. 1994. *In vivo* studies of suspension feeding processes in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* 186: 221-244.
- Webb, S.F. 1998. Intraespecific differences in Zn accumulation in the littoral gastropod *Littorina saxatilis*. 19th Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. N.C., p.97.
- Widdows, J. 1978. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 58: 125-142.
- Widdows, J. 1993. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. *In*: Calow, P. (Ed.). Handbook of ecotoxicology. Blackwell Scientific Publications, London, 478 p.
- Widdows, J., K.A. Burns, N.R. Menon, D.S. Page, S. Soria. 1990. Measurement of physiological energetics (scope for grow) and chemical contaminants in mussels (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138: 99-117.
- Widdows, J., P. Donkin. 1991. Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol.* 100(1/2): 69-75.
- Wood, Ch.M., W.J. Adams, D.R. DiBona, S.N. Luoma, R.C. Playle, W.A. Stubblefield, H.L. Bergman, R.J. Erickson, J.S. Mattice y Ch.E. Schlekat. 1997.

- Environmental toxicology of metals. *In*: Bergman H.L., E.J. Dorward-King (Eds.). Reassessment of metals criteria for aquatic life protection. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Florida: 31-56.
- Zakrzewski, P. 1997. Principles of environmental toxicology. ACS Monograph 190, Washington, 320 p.
- Zar, J.H. 1998. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood.
- Zarogian, G.E. 1980. *Crassostrea virginica* as an indicator of cadmium pollution. *Mar. Biol.* 58: 275-284.
- Zarogian G.E., G. Morrison. 1981. Effect of cadmium body burdens in adult *Crassostrea virginica* on fecundity and viability of larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 344-348.

7. ANEXOS

7.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ADECUADAS DE MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS PREVIAS A LOS BIOENSAYOS.

Para desarrollar adecuadamente los bioensayos fue necesario realizar pruebas del sistema de mantenimiento de los organismos en condiciones de laboratorio, de su alimentación, y también se estableció el período adecuado durante el cual, los ostiones debían permanecer en el sistema antes de la experimentación. Estas pruebas permitirían que los organismos se mantuvieran en condiciones óptimas, y que el período fuera suficientemente largo para que ya no presentaran estrés derivado de la colecta.

Se probó el sistema de alimentación con *Spirulina* spp. y *Tetraselmis suecica* (Kyllin), bajo las mismas condiciones que se utilizaron en las fases experimentales (salinidad 22 ‰, 25 °C y aireación, constante).

Los organismos colectados en octubre de 1996 fueron colocados en un acuario de 200 L (Fig. A.1) y se alimentaron con *Spirulina* spp. Se observó durante el período más largo posible su sobrevivencia, y adaptación al laboratorio para determinar el tiempo adecuado de mantenimiento previo a los bioensayos.

Los colectados en mayo de 1997 fueron colocados en el sistema definitivo de 600 L y se realizaron las pruebas de alimentación con *Tetraselmis suecica*. En este caso se escaló el cultivo en el mes de marzo de 1997 y simultáneamente se probaron las técnicas para el conteo de células. Se utilizó espectrofotometría de luz elaborando la curva patrón con células vivas y congeladas, y también hemocitómetro con células

congeladas. Los conteos fueron realizados por tres personas, con tres réplicas, utilizando diferentes métodos para colocar la muestras en el hemocitómetro. Los organismos fueron alimentados por una hora, durante la cual se suspendía la aireación, reanudándola posteriormente.

Los resultados de esta pruebas fueron los siguientes. En la primera colecta, 50 ostiones se colocaron en el sistema de 200 L, el cual resultó no ser adecuado para el mantenimiento de los organismos, ya que contaba con un filtro biológico que requería atención. Sin embargo, gracias a esta fase, se diseñó el sistema de mantenimiento de 600 L. Esta primera prueba duró 60 días.



Figura A.1. Primer sistema de mantenimiento de ostiones de 200 L con aireación continua y filtro biológico de arena.

Dentro de los primeros 10 días, se registró 10% de mortalidad. Aunque la mortalidad siguió incrementándose, se estableció una meseta con el 88% de sobrevivientes durante 25 días más. Posteriormente, la mortalidad se incrementó paulatinamente, y se

estableció una nueva meseta con el 74% de sobrevivientes hasta los 50 días. Únicamente el 44% de los organismos llegó al final del período de prueba (Fig. A.2). Esta prueba permitió establecer que un período de mantenimiento de entre 10 y 28 días era adecuado antes de someter a los organismos a la experimentación.

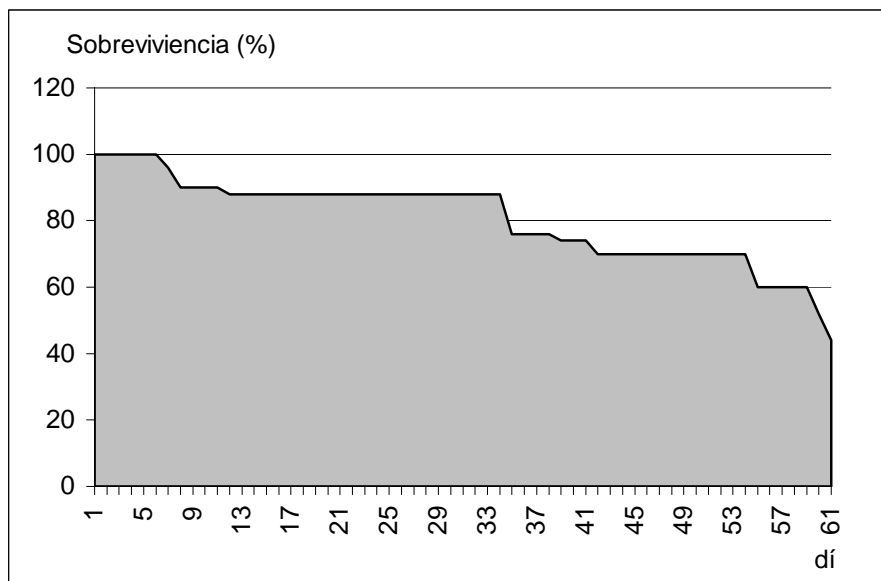


Figura. A.2. Supervivencia del ostión durante las pruebas de mantenimiento en el sistema de 200 L.

En las pruebas de conteo de células, el análisis de varianza indicó que hubo diferencias significativas entre los conteos llevados a cabo por diferentes métodos ($F = 4.32$, $P < 0.01$), independientemente de la persona que realizara el conteo (Fig. A.3). Las pruebas de conteo de células permitieron definir que el método más adecuado era por hemocitómetro, colocando 0.2 mL de la muestra directamente en este y posteriormente el cubreobjeto. Se eliminó el análisis por espectrofotómetro de luz, ya que este requería de conteos por hemocitómetro para la elaboración de curva patrón en cada ocasión y no era conveniente fijar de las muestras porque esto modificaba el volumen final y por

lo tanto el conteo. Se estableció además que era indispensable realizar el conteo el mismo día que se obtuvieran las muestras.

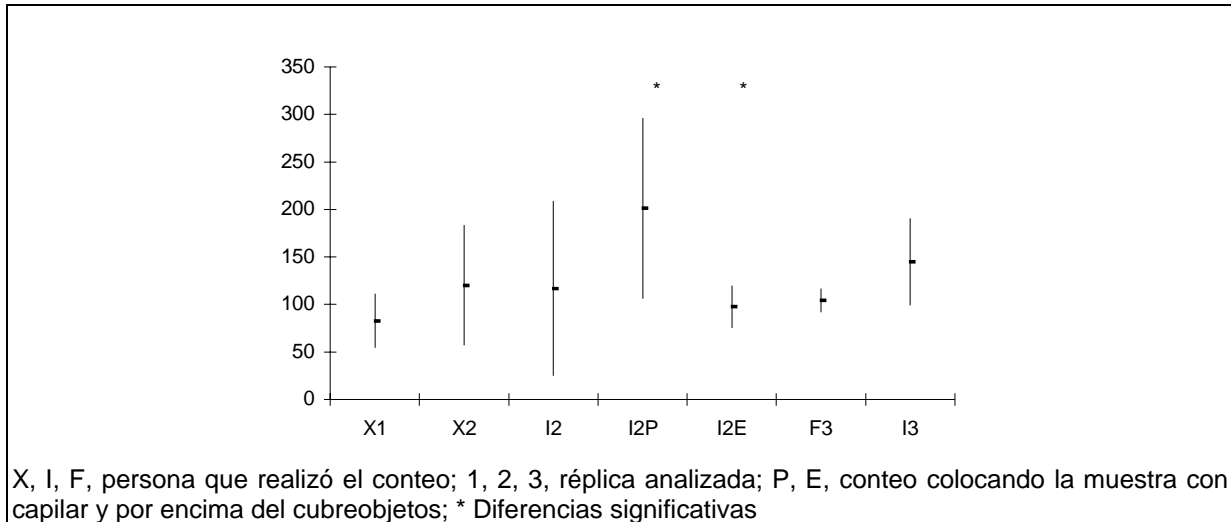


Figura. A.3. Conteo de células de *T. suecica* por hemocitómetro, llevados a cabo por diferentes personas (promedio \pm DE).

Las pruebas de alimentación permitieron comprobar que un intervalo de una hora, era suficiente para incorporar el número de células necesario para el mantenimiento de los ostiones. Este período aseguraba la obtención de heces bien conformadas y no de pseudoheces, las cuales son difíciles de coleccionar, y podrían dificultar, y a la vez enmascarar, los resultados relacionados con las respuestas fisiológicas. Se observó que, con una concentración mayor de 25,000 cel/L, los organismos producían pseudoheces, identificables por el color verdoso y la escasa consistencia. Se concluyó que la concentración recomendada por Castrejón *et al.* (1994), de 10,000 cel/L, era adecuada para los organismos.

7.2 ASPECTOS METODOLÓGICOS COMUNES

A TODAS LAS FASES.

Lavado de material.

La cristalería y acuarios, así como el material de disección y recipientes para muestras fueron lavados de acuerdo al método indicado por APHA (1995), con detergente libre de fosfatos (Extran), agua, ácido nítrico 5% y agua destilada (dos veces). Antes de cada ensayo se enjuagaron con el agua de la prueba. Después del bioensayo, fueron enjuagados con ácido, agua, detergente, cloro, agua y agua destilada.

Manejo de desechos.

El agua utilizada en los ensayos fue desechada de la siguiente manera. En las pruebas de letalidad, en las cuales se utilizaron las concentraciones más altas de metales, se utilizó sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), para reducir al cromo de Cr^{+6} a Cr^{+3} (Metcalf y Eddy, 1991; Pawlisz *et al.*, 1997) y para precipitar el cadmio (Kemmer y McCallion, 1989), se utilizó bicarbonato de sodio (NaHCO_3). En ambos se aplicó una proporción de 1 g por cada 10 L de agua. Se decantó el sobrenadante a drenaje con dilución y el precipitado se dispuso a través del Manejo de Desechos Tóxicos de la UAMI. En las pruebas de subletalidad, el agua residual fue desechada por el drenaje previa dilución 1:5 por lo menos, ya que las concentraciones utilizadas se encuentran en el límite, o son inferiores, a las permitidas en la legislación para desechos de tipo

industrial a cuerpos receptores.

Digestión de tejido de ostión previo a la lectura de metales.

La secuencia de ajuste definitiva para adecuarlo al horno CEM-MDS-81D, fue la siguiente: se molieron las muestras ya secas en morteros. Se adicionaron 5 mL de ácido nítrico y 5 mL de agua desionizada. Se dejaron 5 min en campana de extracción y se taparon los vasos. Se llevaron a cabo dos digestiones, la primera se fijó con 5 min a 60 % de potencia, 7 min a 80 %, 2 min de reposo, 7 min a 80 %. Se enfriaron los vasos, se destaparon en campana de extracción 5 min. Se adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno. La segunda digestión se llevó a cabo por 10 min a 80 % de potencia. Se enfriaron los vasos. En caso necesario las muestras fueron filtradas por filtro rápido Whatman. El aforo se realizó a 25 mL y se hicieron diluciones posteriores solo en caso necesario.

7.3 ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS METALES EN EL AGUA DE LAS PRUEBAS.

Fase de evaluación de efectos letales.

Las concentraciones de Cr y Cd detectadas en el agua y las colocadas para los bioensayos de efectos agudos se presentan en la Fig. A.4. Se observó precipitación en las concentraciones más altas en ambos metales. La forma utilizada de Cd para los bioensayos fue CdCl_2 , que en concentraciones altas podría implicar una modificación de la clorinidad. Como ya se describió, la salinidad de los acuarios tuvo un incremento

de 22.2 a 23.8 ‰. Si bien, este no se consideró de relevancia biológica, ya que los niveles se recuperaron en las siguientes 24 horas y posteriormente se mantuvieron constantes. Bedsworth y Sedlak (1998), indican que el Cd es más soluble en aguas con salinidad de 10 ‰ y disminuye a salinidades por encima o por debajo de esta. En salinidades altas el Cd puede formar complejos, con fuertes ligandos, entre otros, $-Cl^+$, $-Cl_2$, y $-Cl_3$. Bedsworth y Sedlak (1998), indican que no existen suficientes estudios como para modelar la toxicidad asociada a ciertas formas de especiación, pero ciertos complejos cloro-metálicos pueden ser más tóxicos que el Cd por sí solo y las formas de especiación sí influyen en la mortalidad. La acumulación de metales en moluscos, sin embargo, se considera proporcional a la concentración ambiental, independientemente de la especiación química, (Simkiss *et al.*, 1982).

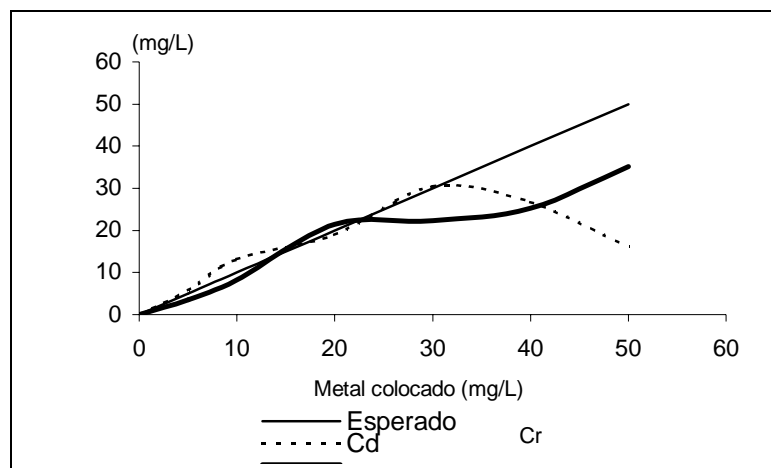


Figura. A.4. Concentraciones de Cr y Cd (mg/L) en agua determinadas en la fase letal.

Por otro lado, además de la precipitación del Cd, la salinidad del agua generó una interferencia de matriz, dando lugar a lecturas negativas en controles. En el "Método para determinación de sustancias químicas en ambientes marinos y estuarinos EPA/600/R-97-072 SEP 97" (Creed y Martin, 1997), indican que la absorbancia

apreciable por espectro de absorción atómica disminuye en algunos metales en función de la salinidad. Los datos proporcionados por EPA para la disminución de la absorbancia en el caso del Cd, se ajustan a la ecuación: $y = 92(0.97266)^X$. La salinidad de 22.2‰, utilizada durante los bioensayos, implica que la absorbancia leída pudo ser el 77.2‰, respecto a la lectura que podría determinarse en agua dulce con la misma concentración del metal. Debido a esto, se realizaron los ajustes necesarios en las lecturas. Las modificaciones implicaron, en términos generales, menos del 10% de diferencia, comparando con la concentración determinada automáticamente por el aparato.

La precipitación también se observó en el caso del cromo, esta sin embargo, no presentó diferencias tan marcadas. Creed y Martin (1997), no indican alteraciones en las lecturas de agua marina con cromo. Debido a lo anterior, la cantidad del metal a la que los organismos fueron expuestos en altas concentraciones pudo no ser constante, de manera que se eliminaron los datos correspondientes a los dispositivos que presentaron mayor problema, que fueron los de concentraciones más altas, en las que además, la desviación estándar también fue mayor (tabla A.1).

Tabla A.1. Concentraciones registradas de Cr y Cd (mg/L) en agua, durante los bioensayos para evaluar respuestas letales (promedio \pm DE).

Concentración colocada (mg/L)	Cromo (mg/L)	Cadmio (mg/L)
0.00	0.00	0.05 \pm 0.04
5.00	3.52 \pm 0.82	5.75 \pm 0.06
10.00	8.26 \pm 3.06	13.05 \pm 3.41
20.00	21.48 \pm 2.28	18.85 \pm 3.86
30.00	23.69 \pm 9.89*	30.50 \pm 13.60
40.00	25.2 \pm 1.09	26.75 \pm 11.22*
50.00	35.2 \pm 1.70	16.13 \pm 6.00*

* Concentración eliminada del análisis

Fueron eliminados los resultados de las concentraciones colocadas: 40 mgCd/L y 50 mgCd/l, así como 30 mgCr/L.

Fase de evaluación de efectos subletales, pruebas bioquímicas.

Las lecturas de Cd presentaron algunas interferencias de matriz que generaron valores negativos. Estas fueron eliminadas; las restantes, sobre todo en los acuarios control derivaron en valores promedio de Cd elevados (Fig. A.5), aunque con bajas desviaciones estándar (tabla A.2). No fue posible demostrar si las interferencias de matriz tuvieron relación con la alteración de la salinidad, que a su vez fue consecuencia de una variación de temperatura. La interpretación de las concentraciones de Cd en los acuarios control fue más difícil, debido a que las lecturas se encontraban muy cerca del límite de detección del aparato. A pesar de las interferencias, las concentraciones de Cd fueron muy cercanas a las esperadas, tanto en las lecturas iniciales, como en las finales. En esta fase también hubo cierta precipitación en la concentración Cr₂, sobre todo en la segunda prueba. En contraste, los acuarios control tuvieron valores promedio bajos, de 0.019 mgCr/L. Las concentraciones en el agua fueron similares a las esperadas en las dos pruebas realizadas ($P > 0.20$ por prueba de t). Las concentraciones iniciales y finales de los dos ensayos se consideraron iguales, (t de student, $P > 0.2$), para ambos metales (tabla A.2). Por lo anterior, para la interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas, las concentraciones representaron los promedios, quedando: Cr₁ = 0.090 mgr/L, Cr₂ = 0.144 mg/L, Cd₁ = 0.110 mg/L y Cd₂ = 0.210 mg/L; (Fig. A.6).

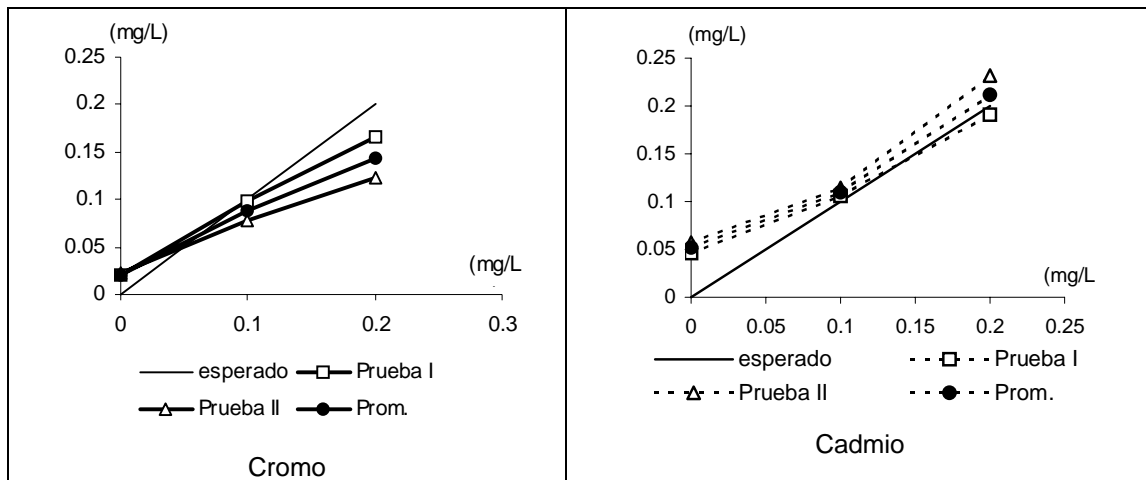


Figura. A.5. Metales en el agua (mg/L) de los acuarios de los dos bioensayos para pruebas bioquímicas.

Tabla A.2. Concentraciones de Cr y Cd (mg/L) registradas en el agua en los dos bioensayos para evaluar respuestas bioquímicas (promedio ± DE).

Concentración	Metal colocado (mg/L)	Ensayo I (mg/L)	Ensayo II (mg/L)	Promedio (mg/L)
Control	0.000	0.019	0.022	0.021 ± 0.02
Cr1	0.100	0.097	0.078	0.088 ± 0.012
Cr2	0.200	0.166	0.122	0.144 ± 0.028
Control	0.000	0.046	0.057	0.052 ± 0.005
Cd1	0.100	0.106	0.114	0.110 ± 0.028
Cd2	0.200	0.191	0.232	0.211 ± 0.053

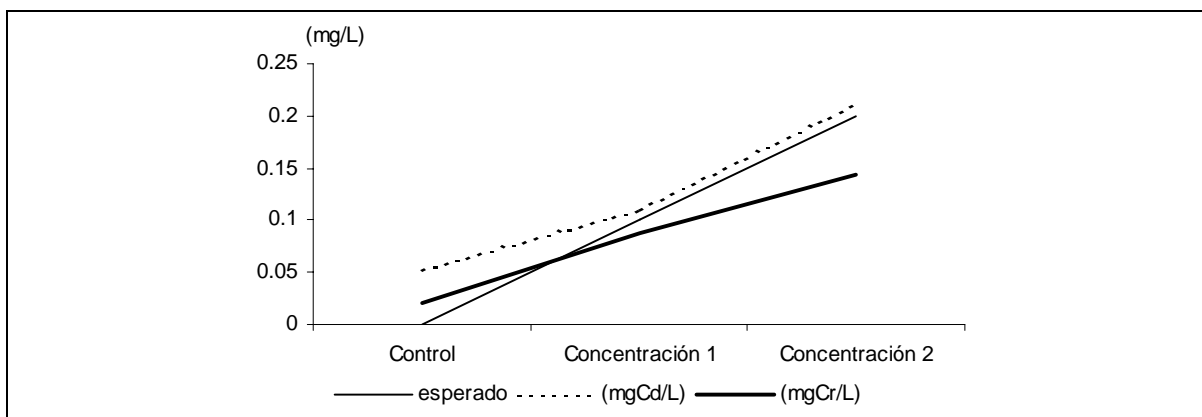


Figura. A.6. Concentraciones de Cr y Cd (mg/L) en agua, consideradas para la interpretación de las respuestas bioquímicas.

Fase de evaluación de efectos subletales, pruebas fisiológicas.

La precipitación de los metales fue mínima (Fig. A.7). El Análisis Exploratorio indicó que las determinaciones fueron confiables. Algunas lecturas de Cd presentaron interferencias de matriz, pero no se presentó correlación entre las variaciones de la salinidad y la concentración del metal. Estos datos fueron eliminados y los resultados se interpretaron con los promedios (tabla A.3).

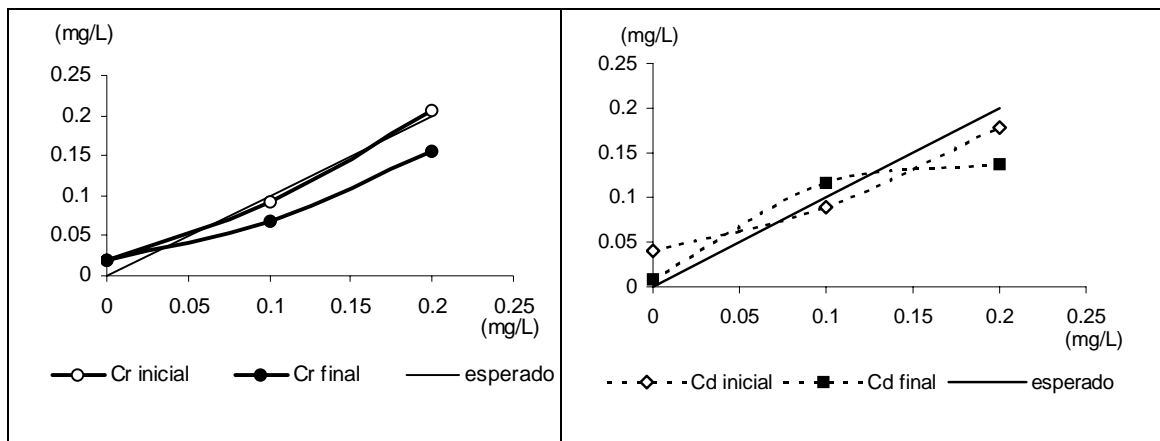


Figura. A.7. Concentraciones de Cr y Cd (mg/L) en agua durante la evaluación de efectos fisiológicos.

Tabla A.3. Concentraciones de los metales (mg/L) en el agua, al inicio y al final de los bioensayos para evaluar respuestas fisiológicas (promedio \pm DE).

Concentración	Metal colocado (mg/L)	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)	Promedio (mg/L)
Control	0.000	0.018 \pm 0.018	0.019 \pm 0.006	0.018 \pm 0.006
Cr1	0.100	0.092 \pm 0.035	0.068 \pm 0.026	0.080 \pm 0.031
Cr2	0.200	0.207 \pm 0.036	0.156 \pm 0.042	0.180 \pm 0.039
Control	0.000	0.040 \pm 0.020	0.008 \pm 0.019	0.024 \pm 0.019
Cd1	0.100	0.089 \pm 0.056	0.117 \pm 0.043	0.095 \pm 0.050
Cd2	0.200	0.171 \pm 0.066	0.136 \pm 0.042	0.170 \pm 0.054

7.4 ANÁLISIS EXPLORATORIO DE DATOS

Fase de mantenimiento.

La mayor parte de los datos de parámetros fisicoquímicos registrados durante las fases de mantenimiento, fueron normales y aditivos (tabla A.4), sin embargo, en pocas ocasiones fueron independientes, y las varianzas se consideraron heterogéneas.

Tabla A.4. Análisis exploratorio (AED) de los parámetros fisicoquímicos registrados en las fases de mantenimiento.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)								
Fase	PH		Oxígeno disuelto		Salinidad		Temperatura	
	Ts	g.l.	ts	g.l.	ts	g.l.	ts	g.l.
Montaje del sistema de alimentación	-4.93*	21	-5.15*	22	-4.79*	27	-6.4*	26
Bioensayo letal para Cadmio	-4.35*	14	1.69	3	-4.60*	24	-8.19*	28
Bioensayo letal para Cromo	-2.53*	20	-5.23*	20	-5.23*	20	-4.69*	20
Bioensayo subletal, pruebas Fisiológicas	-3.34*	17	-2.75*	17	-5.70*	17	-6.29*	17
Bioensayo subletal, pruebas Bioquímicas	-4.36*	23	-6.86*	23	-4.36*	23	-3.86*	23
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)								
Fase	PH		Oxígeno disuelto		Salinidad		Temperatura	
	Dmax	N	Dmax	n	Dmax	n	Dmax	n
Montaje del sistema de alimentación	0.168	22	0.174	23	0.086	28	0.177	27
Bioensayo letal para Cadmio	0.420*	15	0.245	4	0.188	25	0.226	29
Bioensayo letal para Cromo	0.163	21	0.158	21	0.178	21	0.171	21
Bioensayo subletal, pruebas Fisiológicas	0.301	18	0.144	18	0.172	18	0.261	18
Bioensayo subletal, pruebas Bioquímicas	0.141	24	0.203	24	0.180	24	0.208	24
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)								
χ^2 obtenida	PH		Oxígeno disuelto		Salinidad		Temperatura	
	171.68*		115.58*		255.00*		213.46*	
$\chi^2_{(0.05, 4)}$	11.14		11.14		11.14		11.14	
Evaluación de aditividad (Tuckey)								
Fs	PH		Oxígeno disuelto		Salinidad		Temperatura	
	0.117		-0.001		-0.016		-0.005	
							0.03	

* No se ajusta a la hipótesis; Dmax, Desviación Máxima; g.l., grados del libertad; n, Número de datos

La falta de independencia, en el caso de la temperatura y la salinidad se asociaron a ajustes requeridos para alcanzar las condiciones adecuadas para los bioensayos. Debido a lo cual se decidió analizarlos con la prueba de Kruskal-Wallis.

Los datos morfométricos de los organismos del sistema de mantenimiento, se consideraron aditivos (tabla A.5), pero no fueron independientes y solamente los datos de altura de los ostiones, pudieron considerarse normales y homocedásticos. Desde luego, al ser seleccionados de una talla específica, la longitud tendría que haber

mostrado tendencias. Aparentemente también hubo una tendencia a seleccionar organismos de anchos similares, evitando los más delgados. El peso estuvo relacionado con la talla.

Tabla A.5. AED de la morfometría de *C. virginica* en las fases de mantenimiento.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)					
ts por fase	g.l.	Longitud	Ancho	Alto	Peso total
Previo a la prueba letal para Cadmio	120	-7.78*	-7.13*	-5.60*	-7.56*
Previo a la prueba letal para Cromo	112	-5.94*	-3.24*	-5.72*	-4.59*
Previo a la prueba subletal fisiológica	147	-14.1*	-3.03*	-5.33*	-4.71*
Previo a la prueba subletal bioquímica	132	-8.00*	-4.64*	-5.25*	-7.41*
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)					
Dmax para todas las fases	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	
Dmax esperada 0.0601 (n=512)	0.0692* P<0.05	0.0676* p<0.05	0.0507 p<0.15	0.0413	p>0.20
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)					
χ^2 para todas las fases	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	
$\chi^2_{(0.05, 3)} = 9.348$	23.51*	10.99*	2.05	11.29*	
Evaluación de aditividad (Tuckey)					
F _s	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	
	0.0727	-0.0430	-0.0007	-0.0770	

* No se ajusta a la hipótesis; Dmax, Desviación Máxima; g.l., grados del libertad; n, Número de datos.

El parámetro menos controlado, desde el punto de vista de la selección fue el alto, por este motivo solo este presentó normalidad y similitud entre las varianzas de esta característica en todas las fases. Lógicamente se requirió de un análisis no paramétrico de la morfometría.

Fase letal.

Los parámetros fisicoquímicos mostraron tendencias evidentes durante las pruebas agudas, que indicaron falta de independencia. Los datos no se pudieron considerar normales, pero si fueron aditivos y, salvo algunas excepciones, particularmente las relacionadas con la temperatura, se consideraron homocedásticos (tabla A.6). También fue necesario un análisis no paramétrico en estos datos.

Tabla A.6. AED de los parámetros fisicoquímicos registrados en la fase letal.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)					
Ts	PH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura	
Bioensayo letal para Cadmio (111 g.l.)	-13.41*	-13.86*	-14.08*	-7.76*	
Bioensayo letal para Cromo (103 g.l.)	-8.45*	-6.33*	-10.56*	-11.73*	
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)					
Desviación máxima	PH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura	
Bioensayo letal para Cadmio (n=112)	0.2033*	0.2857*	0.3266*	0.1838*	
Bioensayo letal para Cromo (n=104)	0.1926*	0.6077*	0.2859*	0.5178*	
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)					
	PH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura	Turbidez
$\chi^2_{obtenida}$ para Cadmio (3 g.l.)	1.2770	0.9186	0.9946	8.9347	25.636*
$\chi^2_{obtenida}$ para Cromo (3 g.l.)	3.6685	1.3960	1.5358	25.600*	-
Evaluación de aditividad (Tuckey)					
	PH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura	Turbidez
Fs para Cadmio	-0.0005	0.0029	0.00048	-0.01887	-0.9999
Fs para Cromo	-0.0001	-0.00641	0.00625	-0.00171	-

* No se ajusta a la hipótesis; g.l., grados del libertad; n, Número de datos

Los datos morfométricos en esta fase no fueron independientes, con excepción de la longitud de los ostiones en el bioensayo con cadmio, así como el alto y peso total de los organismos del bioensayo con cromo (tabla A.7). A pesar de lo cual, los datos podían considerarse normales, homocedásticos y aditivos. Solo hubo una excepción, la longitud de los ostiones del bioensayo con cadmio no se consideró aditiva. Esto pudo deberse al hecho de que los organismos tuvieron cierto sesgo al ser colocados en los acuarios; primero los más largos, y después los más cortos, lo cual generó lotes muy homogéneos entre las diferentes condiciones experimentales, pero con un sesgo en el análisis. Este problema se evitó en el bioensayo con cromo, en el cual, la colocación fue aleatoria. Tomando en cuenta el AED, se consideró que podía utilizarse estadística paramétrica.

El análisis exploratorio de los datos de concentración de metales indicaron que, desde luego no había independencia, pero su comportamiento era normal, aditivo, y había homocedasticidad de varianzas, con excepción de los datos de cadmio en agua, que fueron heterocedásticos, se aplicaron pruebas paramétricas (tabla A.8).

Tabla A.7. AED de los datos morfométricos obtenidos al final de la fase letal.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)						
Ts	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	Peso húmedo	Peso seco
Bioensayo letal para Cadmio (63 g.l.)	-1.30	-4.31*	-5.51*	-6.11*	-4.01*	-3.71*
Bioensayo letal para Cromo (63 g.l.)	-3.71*	-5.21*	-1.90	-1.30i y -2.81*f	-3.41*	-5.51*
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)						
Desviación máxima	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	Peso húmedo	Peso seco
Bioensayo letal para Cadmio (n=64)	0.068	0.093	0.074	0.102	0.114	0.126
Bioensayo letal para Cromo (n=64)	0.088	0.159	0.098	0.104i y 0.131f	0.125	0.111
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)						
	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	Peso húmedo	Peso seco
χ^2 obtenida para Cadmio (3 g.l.)	4.128	9.001	4.009	7.393	7.953	9.135
χ^2 obtenida para Cromo (3 g.l.)	4.001	2.732	6.704	4.470i y 8.799f	7.733	4.599
Evaluación de aditividad (Tuckey)						
	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	Peso húmedo	Peso seco
Fs para Cadmio	-0.220	0.535	-0.312	0.962	0.023	0.007
Fs para Cromo	4.036*	-0.014	-0.0115	0.186i y -0.671f	-0.007	-0.004

* No se ajusta a la hipótesis; g.l., grados del libertad; n, Número de datos; i, inicial; f, final.

Tabla A.8. AED de las concentraciones de metales en la fase letal.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)		
Ts	Cadmio	Cromo
Agua (41 g.l.)	-5.113*	-7.358*
Ostión (55 g.l.)	-4.99*	-6.44*
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)		
Desviación máxima	Cadmio	Cromo
Agua (n=31)	0.165	0.157
Ostión (n=32)	0.195	0.139
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)		
	Cadmio	Cromo
χ^2 obtenida para agua (6 g.l.)	18.19*	5.94
χ^2 obtenida para ostión (13 g.l.)	2.86	4.033
Evaluación de aditividad (Tuckey)		
	Cadmio	Cromo
Fs para agua	-0.998	-0.999
Fs para ostión	-1.0	-1.0

* No se ajusta a la hipótesis; g.l., grados del libertad; n, Número de datos.

Fase de respuestas bioquímicas.

El análisis de los parámetros de control durante la fase de evaluación de respuestas a nivel bioquímico se presenta a continuación, iniciando con el pH.

Durante los bioensayos, los datos de pH fueron aditivos y normales, pero se consideraron heterocedásticos por algunas fluctuaciones. Los datos fueron independientes para los controles, por lo que se usaron pruebas paramétricas para el

análisis estadístico. Las respuestas dependientes se presentaron solo en dispositivos experimentales con organismos expuestos a los metales y se asume que se asociaron con la presencia de estos. Esta falta de independencia se registró en los organismos expuestos a Cd1, en el primer ensayo y en ambas concentraciones de Cr, en el segundo (tabla A.9).

Tabla A.9. AED de los datos de pH en la evaluación de respuestas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo I	Bioensayo II
Independencia	Ts	-2.35* en Cd1	-2.72* en Cr1 -2.36* en Cr2
Test de ciclos	t	2.23	2.18
Homocedasticidad	χ^2	14.90*	14.88*
Prueba de Bartlett	P	<0.01	<0.01
Normalidad	D max	0.15	0.15
Kolmogorov-Smirnov	P	0.15	0.10
Aditividad Tuckey	Fs	-0.00002	-0.0001

* No se ajusta a la hipótesis.

El oxígeno disuelto, tuvo datos aditivos y normales durante los bioensayos. Los datos de concentración de oxígeno disuelto en los acuarios con organismos no expuestos fueron independientes; aunque se presentó dependencia en acuarios con organismos expuestos a Cd1 y Cr1 en el primer ensayo y a cromo en el segundo. Se presentó heterocedasticidad en los acuarios con organismos expuestos a cromo (tabla A.10).

Tabla A.10. AED de los datos de oxígeno disuelto en las pruebas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo I	Bioensayo II
Independencia	ts	-2.35* en Cd1 -2.35* en Cr1	-2.72* en Cr1 -2.36* en Cr2
Test de ciclos	t	2.23	2.18
Homocedasticidad	χ^2	42.80*	10.54*
Prueba de Bartlett	P	<0.01	0.03
Normalidad	D max	0.14	0.10
Kolmogorov-Smirnov	P	0.20	0.20
Aditividad Tuckey	Fs	-0.0001	-0.0001

* No se ajusta a la hipótesis.

La salinidad presentó el siguiente comportamiento: los datos no fueron independientes, lo cual indicó que en el bioensayo I pudo haber tenido alguna influencia externa, que se pensó pudo ser la temperatura. Este punto se analizó en detalle en la sección correspondiente. Los datos fueron aditivos, pero no fueron normales, aparentemente las fluctuaciones del parámetro fueron marcadas, igualmente la heterocedasticidad del segundo bioensayo pudo reflejar estas fluctuaciones (tabla A.11).

Tabla A.11. AED de la salinidad en las pruebas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo 1	Bioensayo 2
Independencia	ts	-2.35* en T y Cd	3.91* en Cr
Test de ciclos	t	2.23	-3.39* en Cd
			-3.07* en Cr
Homocedasticidad	χ^2	1.57	9.57*
Prueba de Bartlett	P	0.91	0.05
Normalidad	D max	0.24*	0.28*
Kolmogorov-Smirnov	P	<0.01	<0.01
Aditividad Tuckey	Fs	-0.0119	0.00007

* No se ajusta a la hipótesis.

Los datos de la temperatura fueron normales y aditivos, pero heterocedásticos. Las variaciones obtenidas en las varianzas se debieron a modificaciones de la temperatura en algunos dispositivos experimentales. Estos datos se analizaron en detalle, ya que, además hubo falta de independencia de los datos (tabla A.12), que además de estar asociados a las variaciones en el parámetro, a su vez tenían la posibilidad de afectar los resultados, si no era posible comprobar fehacientemente la ausencia de interferencia de la temperatura en las respuestas fisiológicas.

Tabla A.12. AED de la temperatura en la evaluación de respuestas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo I	Bioensayo II
Independencia	ts	-2.34* en Cd1	-2.72* en Cr2
Test de ciclos	t	2.23	2.16
Homocedasticidad	χ^2	31.23*	31.69*
Prueba de Bartlett	P	<0.01	<0.01
Normalidad	D max	0.17	0.14
Kolmogorov-Smirnov	P	0.10	0.15
Aditividad Tuckey	Fs	-0.0002	-0.0054

* No se ajusta a la hipótesis.

El análisis exploratorio del amonio total, indicó que las poblaciones de datos fueron normales, homocedásticas, aditivas e independientes, con una excepción en Cr1 del segundo bioensayo, que se consideró de poca importancia, se aplicaron pruebas paramétricas (tabla A.13).

Los datos morfométricos no fueron independientes. Esto era de esperarse dado que se seleccionaron los organismos más homogéneos posibles (tabla A.14). Sin embargo, los datos fueron normales, homocedásticos y aditivos, de un comportamiento muy regular. No se determinó peso seco más que en muestras puntuales, debido a que los organismos fueron separados en secciones para realizar los análisis bioquímicos, sin embargo, se obtuvo el peso seco de los tejidos procedentes de los organismos en los

que se leyó la concentración e metales, y de estos se hizo el análisis.

Tabla A.13. AED del amonio total en la evaluación de respuestas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo I	Bioensayo II
Independencia	ts	ts<2.57	-2.36* en Cr1
Test de ciclos	t	2.57	2.31
Homocedasticidad	χ^2	8.14	7.47
Prueba de Bartlett	P	0.09	0.11
Normalidad	D max	0.0326	0.0326
Kolmogorov-Smirnov	P		
Aditividad Tuckey	Fs	-0.002	0.002

* No se ajusta a la hipótesis.

Tabla A.14. AED de la morfometría en la evaluación de respuestas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo I					Bioensayo II				
		T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2	T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2
Independencia	ts	-3.1*	-0.9	-3.7*	-3.1*	-5.5*	-5.4*	-3.0*	-2.5*	-4.9*	-3.6*
Test de ciclos	t=2.00										
		Long		Ancho		Alto		PT		PH	
Homocedasticidad	χ^2	0.44	2.17	11.40	0.23	0.81					
Prueba de Bartlett	P	0.93	0.54	<0.01	0.97	0.85					
Normalidad	Dmax	0.088	0.092	0.095	0.047	0.067*					
Kolmogorov-Smirnov	P	>0.20	0.20	<0.15	>0.20	>0.20					
Aditividad Tuckey	Fs	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-0.974					

* No se ajusta a la hipótesis; Long, Longitud; PT, Peso Total; PH, Peso Húmedo.

Los datos de producción de metalotioneínas eran independientes, aditivos y normales, aunque había casos importantes de heterocedasticidad, en músculo abductor en el primer ensayo, y en branquia y glándula digestiva en el segundo. A pesar de cumplir con las hipótesis fundamentales en general (Anexo A.15), se aplicó estadística no paramétrica como consecuencia de las consideraciones anteriores.

Los datos de daño peroxidativo fueron normales y aditivos en todas las condiciones experimentales, pero fueron heterocedásticos y hubo cierta falta de independencia en los dos ensayos. Esta se presentó en testigos y expuestos a Cr2 en el primer ensayo, y en todas las condiciones experimentales, excepto Cd2, en el segundo ensayo (tabla A.16). Los datos no permitían la aplicación de estadística paramétrica, además, la falta de independencia en los datos de controles manifiesta ciertas tendencias que podrían estar relacionadas o no con la exposición del metal. Razón por la cual, se consideró adecuado aplicar estadística no paramétrica

Tabla A.15. AED de las metalotioneínas de las pruebas bioquímicas.

Branquia											
Prueba		Bioensayo I					Bioensayo II				
		T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2	T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2
Independencia	ts	1.33	-2.66	-2.66	-1.33	-1.33	0	-1.33	-1.33	0	-2.14
Test de ciclos	t	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	3.18
Homocedasticidad	χ^2	3.13					9.47* por Cr alto				
Prueba de Bartlett	P	0.53					0.05				
Normalidad	Dmax	0.29	0.19	0.24	0.36	0.30	0.28	0.17	0.27	0.35	0.27
Kolmogorov-Smirnov	P	>0.20	>0.20	>0.20	<0.15	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	<0.15	>0.20
Aditividad Tuckey	Fs	0					-1.0				

* No se ajusta a la hipótesis.

Músculo abductor											
Prueba		Bioensayo I					Bioensayo II				
		T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2	T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2
Independencia	ts	-2.66	0	-1.33	-2.66	-1.33	1.07	0	-2.66	0	0.53
Test de ciclos	t	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	3.18
Homocedasticidad	χ^2	16.12* por Cd1					2.04				
Prueba de Bartlett	p	<0.01					0.73				
Normalidad	D max	0.28	0.39	0.14	0.28	0.15	0.22	0.16	0.21	0.14	0.22
Kolmogorov-Smirnov	p	>0.20	<0.10	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20
Aditividad Tuckey	Fs	0					-1.0				

* No se ajusta a la hipótesis.

Glándula digestiva											
Prueba		Bioensayo I					Bioensayo II				
		T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2	T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2
Independencia	ts	-2.66	-2.66	-1.33	-2.66	0	-2.66	-2.66	-1.33	-2.66	0
Test de ciclos	t	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77	2.77
Homocedasticidad	χ^2	3.71					26.9* por Cd1				
Prueba de Bartlett	p	0.44					<0.01				
Normalidad	D max	0.14	0.21	0.22	0.23	0.16	0.28	0.32	0.27	0.30	0.18
Kolmogorov-Smirnov	p	>0.20	>0.20	>0.20	>0.23	>0.20	>0.20	<0.20	>0.20	>0.20	>0.20
Aditividad Tuckey	Fs	0					-1.0				

* No se ajusta a la hipótesis.

Tabla A.16. AED de la lipoperoxidación de las pruebas bioquímicas.

Prueba		Bioensayo I					Bioensayo II				
		T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2	T	Cd1	Cd2	Cr1	Cr2
Independencia	ts	-2.76	-1.10	-1.10	-0.55	-2.76	-2.39	-1.09	-2.39	-4.35	-3.05
Test de ciclos	t	2.26*	2.26	2.26	2.26	2.26*	2.14*	2.14	2.14*	2.14*	2.14*
Homocedasticidad	χ^2	61.46									
Prueba de Bartlett	P	0.01*									
Normalidad	Dmax	0.18	0.18	0.23	0.25	0.15	0.16	0.27	0.23	0.26	0.23
Kolmogorov-Smirnov	P	>0.20	>0.20	>0.20	>0.23	>0.20	>0.20	<0.20	>0.20	>0.20	>0.20
Aditividad Tuckey	Fs	0					-1.0				

* No se ajusta a la hipótesis.

Fase de evaluación de efectos fisiológicos.

El comportamiento de los parámetros fue semejante al de la fase aguda, en el sentido de que los datos no fueron normales, pero si aditivos. A diferencia de estos, no presentaron homocedasticidad (tabla A.17). La heterogeneidad de varianzas en todos los parámetros en esta fase, podría relacionarse con el hecho de que hubo una descompostura en el multianalizador Horiba y fue necesario cambiar el equipo de medición de parámetros fisicoquímicos a los cinco días de haber iniciado el bioensayo. El uso de otro equipo implicó una menor resolución de medida en la salinidad (de ± 0.05 ‰ con el equipo Horiba, a ± 1.0 ‰, con el refractómetro de mano), y en la temperatura (de ± 0.05 °C con el equipo Horiba a ± 0.5 °C, por el uso de un termómetro de cubeta). En el caso del oxígeno disuelto y el pH, fue necesario utilizar un oxímetro YSI y un potenciómetro manual Coleman, ambos de tipo analógico, que requieren de mayor tiempo para su estabilización. De manera que, a pesar de que en estos parámetros la resolución es similar a la del multianalizador el factor humano puede implicar una diferente forma de medición. Se llevó a cabo un análisis comparativo de las mediciones realizadas con ambos métodos por t y Wilcoxon, que indicó diferencias entre los métodos empleados, esto se tomó en consideración en el análisis de resultados.

Tabla A.17. AED de los parámetros fisicoquímicos en la fase fisiológica.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)				
	pH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura
Ts	-24.35*	-25.84*	-39.41*	-40.69*
N	1012	1016	705	896
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)				
	pH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura
Desviación máxima	0.069*	0.093*	0.174*	0.252*
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)				
	pH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura
χ^2 obtenida (5 g.l.)	85.06*	40.22*	129.72*	32.35*
Evaluación de aditividad (Tuckey)				
	pH	Oxígeno disuelto	Salinidad	Temperatura
Fs	-0.00006	0.003	-0.0001	-0.0551

*No se ajusta a la hipótesis; g.l., grados del libertad; n, Número de datos

Las concentraciones de amonio total, constituyeron poblaciones normales, excepto el

día 3 y el día 10. Sin embargo, solo los valores de las cámaras sin organismos fueron independientes ($t_s = 1.54$, del test de ciclos por encima y debajo de la mediana). Las poblaciones tuvieron heterogeneidad de varianzas, únicamente los valores de cámaras con organismos expuestos a Cd2 fueron homocedásticos (tabla A.18). A pesar la aditividad y la normalidad de los datos, que se presentó en todas las condiciones experimentales, se consideró adecuado aplicar estadística no paramétrica.

Tabla A.18. AED de las concentraciones iniciales de amonio total.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)										
	Día					Condición				
	3	5	10	14	19	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
Ts	-8.60*	-5.64*	-5.63*	-6.70*	-4.10*	-4.87*	-5.80*	-5.11*	-6.70*	-4.10*
T	2.01	2.01	2.02	2.01	2.08	2	2	2.01	2.01	2.04
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)										
D max	0.22*	0.12	0.22*	0.15	0.13	0.13	0.15	0.07	0.14	0.11
P	< 0.01	>0.2	< 0.01	>0.2	>0.2	>0.2	>0.15	>0.2	>0.2	>0.2
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)										
χ^2_{obt}	49.18*	16.93*	35.03*	17.99*	0.45	17.87*	26.51*	23.29*	36.68*	0.05
P	< 0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.79	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.97
Evaluación de aditividad (Tuckey)										
Fs	-0.9261									

* No se ajusta a la hipótesis.

El análisis exploratorio de la morfometría, indicó que todos los datos fueron independientes al inicio del bioensayo, con excepción del peso total. Las poblaciones fueron normales y homocedásticas., además de aditivas. Al final del bioensayo, solo el ancho y el alto se consideraron independientes (tabla A.19). Sin embargo, se pensó adecuado aplicar estadística paramétrica en el análisis de los datos, por lo que las tendencias en el peso se asociaron a los resultados.

Las determinaciones de metales en agua realizadas durante la fase de evaluación de efectos fisiológicos fueron muy confiables, los datos fueron normales, homocedásticos y aditivos, desde luego no fueron independientes (tabla A.20), estas conclusiones se obtuvieron tanto en el análisis de agua, como en el de ostión.

Tabla A.19. AED de la morfometría en la evaluación de efectos fisiológicos.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)										
	Inicial				Final					
	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	Longitud	Ancho	Alto	Peso total	Peso húmedo	Peso seco
T _s	-1.45	-0.52	-1.76	-2.87*	-2.69*	-1.76	-1.45	-3.32*	-3.94*	-4.56*
n	60	60	60	42	60	60	60	60	60	60
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)										
Desviación máxima (p>0.2)	0.099	0.0678	0.087	0.135	0.088	0.09 2	0.06 3	0.109	0.054	0.085
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)										
χ^2 obtenida (5 g.l.)	1.26	1.55	5.24	2.39	2.10	1.15	0.56	5.22	2.11	5.88
Evaluación de aditividad (Tuckey)										
F _s	-1.0	-1.0	-1.0	0.00017	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0

* No se ajusta a la hipótesis; g.l., grados del libertad; n, Número de datos

Tabla A.20. AED de las concentraciones de metales en agua y ostión en la evaluación de efectos fisiológicos.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)						
	Cd inicial	Cd final	Cd Ostión	Cr inicial	Cr final	Cr Ostión
t _s	-5.76*	-4.52*	-6.88*	-7.57*	-5.95*	-69.37*
N	36	18	24	36	36	24
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)						
Desviación máxima	0.214	0.157	0.189	0.175	0.191	0.195
P	<0.1	>0.2	>0.2	>0.2	<0.15	>0.2
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)						
χ^2 obtenida (2 g.l.)	12.62	2.67	23.43	27.15	24.40	11.23
Evaluación de aditividad (Tuckey)						
F _s	0.00058	-0.001	0	0	0	0

* No se ajusta a la hipótesis; g.l., grados del libertad; n, Número de datos

Las concentraciones previas al registro del consumo de oxígeno, constituyeron poblaciones cuyos datos se encontraron en el límite entre el comportamiento aditivo y el mutiplicativo, si bien, aún pueden considerarse aditivos. Las poblaciones fueron normales los días 5 y 10, presentándose homocedasticidad el día 5 solamente (tabla A.21). Debido a que este día, que fue el primero evaluado, los datos eran normales y homocedásticos, se aplicaron pruebas paramétricas.

El análisis exploratorio indicó que, por un lado, los datos del oxígeno consumido por los organismos tuvo un comportamiento normal en todas las condiciones experimentales. Se presentó heterogeneidad de varianza en los ostiones testigo y los expuestos a Cd1. Los datos de organismos no tuvieron un comportamiento normal el día 5, ni el 10, esto implica que, a pesar de que los días 14 y 19 si mostraron normalidad y de que los datos fueron aditivos, no puede aplicarse estadística paramétrica para interpretar el consumo de oxígeno de los ostiones (tabla A.22).

Tabla A.21. AED de las concentraciones iniciales de oxígeno disuelto.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)									
	Día				Condición				
	5	10	14	19	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
Ts	-6.60*	-7.84*	-7.61*	-6.41*	-4.07*	-2.33*	-6.73*	-5.38*	-3.61*
T	2	2	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.03	2.09
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)									
D max	0.101	0.091	0.160*	0.227*	0.073	0.102	0.206*	0.119	0.200
P	<0.15	>0.2	<0.01	<0.01	>0.2	>0.2	<0.05	>0.2	>0.2
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)									
χ^2_{obt}	3.49	10.27*	20.87*	13.86*	10.18	8.44	3.39	7.63	1.04
P	0.48	0.04	<0.01	<0.01	0.51	0.67	0.98	0.66	0.99
Evaluación de aditividad (Tuckey)									
Fs	-1.001								

* No se ajusta a la hipótesis.

Tabla A.22. AED del consumo de oxígeno estandarizado (mg/h*gPS).

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)									
	Día				Condición				
	5	10	14	19	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
Ts	-6.12*	-3.33*	-8.32*	-1.26	-3.45*	-4.92*	-3.76*	-2.35*	-2.53*
T	2	2.01	2.01	2.05	2.04	2.02	2.02	2.06	2.08
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)									
D max	0.211*	0.215*	0.200	0.157	0.203	0.148	0.198	0.199	0.260
P	<0.05	<0.05	<0.15	>0.2	>0.15	>0.2	<0.15	<0.2	<0.1
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)									
χ^2_{obt}	8.92	19.89*	11.49*	10.53*	18.04*	6.13	6.00	6.04*	2.87
P	0.06	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.10	0.11	0.05	0.09
Evaluación de aditividad (Tuckey)									
Fs	-0.911								

* No se ajusta a la hipótesis.

Los datos de excreción nitrogenada fueron aditivos, pero no presentaron independencia, con excepción de la evaluación del día 3 en que se realizó la primera medición. Las concentraciones Cr2 y Cd2, y las cámaras sin organismos (SO), generaron una t_s fue de 0.39, contra una t esperada de 2.13 (test de ciclos). En contraste, estas cámaras SO no tuvieron datos normales ($p < 0.01$), ni homocedásticos ($p < 0.01$). Las cámaras con organismos, si tuvieron un comportamiento normal, con excepción del día 14, en que hubo heterogeneidad de varianzas en los datos de organismos expuestos a cromo y en los días 10 y 14 (tabla A.23). Principalmente por la frecuente falta de homocedasticidad, se determinó usar estadística no paramétrica.

Tabla A.23. AED de la excreción nitrogenada del bioensayo fisiológico.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)									
	Día				Condición				
	5	10	14	19	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
Ts	-1.18	-4.53*	-3.15*	-3.35*	-3.99*	-4.36*	-1.64	-3.33*	-1.22
T	2.18	2.04	2.05	2.13	2.02	2.07	2.06	2.09	2.12
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)									
D max	0.25	0.24	0.30*	0.21	0.21	0.25	0.22	0.21	0.25
P	<0.2	<0.1	<0.01	>0.2	0.15	<0.1	>0.12	>0.2	>0.2
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)									
χ^2_{obt}	5.05	14.8*	11.77*	2.74	7.47	4.57*	11.18*	2.69	5.04
P	0.28	<0.01	<0.01	0.25	0.06	0.01	0.01	0.26	0.28
Evaluación de aditividad (Tuckey)									
Fs	-0.1175								

* No se ajusta a la hipótesis.

Los conteos iniciales de células en las cámaras sin organismos fueron independientes al inicio, pero dejaron de serlo al aumentar proporcionalmente el número de células en las cámaras, las cuales no fueron consumidas y como resultado hubo un incremento neto de células en cada cámara. La depositación sin embargo, fue constante por lo cual fue independiente. Los datos fueron normales, homocedásticos y aditivos entre las diferentes cámaras colocadas. Por estos motivos se aplicó estadística paramétrica. La falta de homogeneidad de varianzas en los diferentes días en que se evaluó la depositación, también pudo asociarse al creciente número de células dentro de las cámaras (tabla A.24).

Tabla A.24. AED de las células colocadas como alimento en cámaras sin organismos en las pruebas fisiológicas.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)								
	Conteo inicial				Depositación			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
ts	0.39	-0.77	-3.09*	-3.09*	1.54	-0.77	-0.77	-1.93
n	6	6	6	6	6	6	6	6
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)								
Dmáx (p>0.2)	0.16				0.098			
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)								
χ^2_{obtenida} (5 y 3 g.l.)	Entre cámaras		Entre días		Entre cámaras		Entre días	
	3.78		11.56*		4.07		10.13*	
P	0.58		<0.01		0.54		0.02	
Evaluación de aditividad (Tuckey)								
Fs	-3.75				-0.32			

* No se ajusta a la hipótesis; n Número de datos

Los conteos de células iniciales “i”, se esperaba que fueran carentes de independencia. En términos generales, pudieron considerarse normales, homocedásticos y aditivos. Algunos casos en que estas hipótesis no se cumplieron, como es el caso de la falta de normalidad del día 17, en que ya habían sido retirados los organismos expuestos a cadmio 2, en todos estos casos hubo razones específicas para las variaciones (tabla A.25).

Tabla A.25. AED del conteo inicial de células en el bioensayo fisiológico.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)								
Día de ensayo	6	7	8	11	12	15	16	17
Consumo	1	2	3	4	5	6	7	8
Ts	-2.69*	-3.45*	-2.69*	-2.47*	-3.33*	-2.88*	-4.12*	-4.94*
N	59	59	58	47	46	35	34	34
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)								
Desviación máxima (p>0.2)	0.12 >0.20	0.12 >0.20	0.11 >0.20	0.10 >0.20	0.13 >0.20	0.19 <0.10	0.11 >0.20	0.26* <0.01
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)								
χ^2 obtenida	7.58	5.52	4.24	9.54*	7.34	9.07	1.69	60.4*
Evaluación de aditividad (Tuckey)								
Fs	-3.75							

* No se ajusta a la hipótesis; n Número de datos

A diferencia de los datos obtenidos en las cámaras sin organismos, el análisis exploratorio indicó, que la mayor parte de los datos de consumo de células no fueron independientes, esto, desde luego se asoció al consumo diferencial de los organismos. A pesar de esto, los datos de consumo fueron normales, homocedásticos y aditivos (tabla A.26), por lo que se decidió aplicar estadística paramétrica.

Tabla A.26. AED del consumo de células en la fase fisiológica.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)								
Día de ensayo	6	7	8	11	12	15	16	17
Consumo	1	2	3	4	5	6	7	8
ts	-5.18*	-4.08*	-1.69	-2.46*	-2.82*	-3.11*	-1.89	-4.73*
n	59	59	58	47	46	35	34	34
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)								
D max (p>0.2)	0.09	0.10	0.11	0.07	0.16 (<0.2)	0.10	0.12	0.14
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)								
χ^2 obtenida (4 g.l.)	0.78	4.06	5.54	1.41	7.66	5.92	4.34	2.14
Evaluación de aditividad (Tuckey)								
Fs	-0.32							

* No se ajusta a la hipótesis; n Número de datos

La determinación gravimétrica de la producción diaria de heces indicó lo siguiente (tabla A.27). Las cámaras sin organismos (SO), presentaron datos independientes, normales ($D_{max} = 0.24$, $p > 0.2$), aditivos y en ocasiones homocedásticos. Las cámaras con organismos, tuvieron datos no independientes, pero si aditivos, en su gran mayoría normales y homocedásticos, por lo que se aplicó estadística paramétrica.

Tabla A.27. AED de la gravimetría de heces fecales del ensayo fisiológico.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)																			
Condición experimental	T		Cr1			Cr2			Cd1			Cd2			SO				
	-12.5*		-12.5*			-12.1*			11.2*			-9.16*			-1.45				
	1.97		1.97			1.97			1.97			1.98			2.05				
ts																			
t																			
Evaluación de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) $D_{max} \times 10^2$																			
Día	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D max	9	7	12	7	8	8	14	13	8	7	12	15	13	10	21	20	18	28*	82*
$P > 0.05$																		<0.01	<0.01
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)																			
Día	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
χ^2_{obt}	5	5	5	10	7	2	10	3	19*	2	8*	10*	2	2	6	12*	1	25*	11*
P									0.01		0.04	0.02				0.01		0.01	0.01
Evaluación de aditividad (Tuckey)																			
Fs	0.257																		

* No se ajusta a la hipótesis

El radio O:N, indicó que los días 3 y 5 los datos fueron independientes, y que los días 10, 14 y 19, manifestaron ya tendencias definidas. Así mismo, los organismos expuestos a cadmio mostraron un comportamiento independiente. Es decir, las tendencias presentes fueron más obvias en los organismos expuestos a cromo y en los controles. El radio O:N en los organismos control tuvo un comportamiento normal, igual en Cd1, pero los valores en otras concentraciones, así como en varios de los días evaluados (3 y 14), tuvieron comportamientos no normales. Esto, aunado a la falta de homocedasticidad, orientó hacia un análisis no paramétrico. Por otro lado, a diferencia de todos los datos analizados previamente, el comportamiento fue no aditivo ($F_s = -2.15$). Se asume que el comportamiento es resultado de la exposición a los metales y quizá la influencia de algún parámetro con control pobre, todo lo cual se analizó en la sección correspondiente, no hubo interacción posible entre los organismos, dado que estaban en cámaras individuales, (tabla A.28).

Tabla A.28. AED de la relación O:N del bioensayo fisiológico.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)										
	Día					Condición				
	3	5	10	14	19	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
ts	-0.90	-0.49	-4.64*	-4.62*	-2.72*	-2.16*	-3.34*	-2.29*	-1.93	-1.36
t	2.08	2.20	2.07	2.13	2.16	2.11	2.08	2.08	2.26	2.16
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)										
Dmax	0.34*	0.34	0.22	0.37*	0.29	0.22	0.39*	0.27*	0.37	0.37*
P	<0.01	<0.10.	<0.15	<0.05	>0.2	0.2	<0.01	<0.05	>0.1	>0.05
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)										
χ^2_{obt}	7.99*	2.95	22.15*	21.62*	5.08	7.86*	34.34*	27.48*	5.43	20.29*
P	0.05	0.40	<0.01	<0.01	0.08	0.05	0	<0.01	0.14	<0.01
Evaluación de aditividad (Tuckey)										
Fs	-2.1501*									

* No se ajusta a la hipótesis.

La tasa de filtración se constituyó por poblaciones de datos no normales, ni homocedásticas (tabla A.29). Es decir, su comportamiento fue muy diferente al de las poblaciones de datos de consumo de alimento que si lo fueron. La falta de normalidad e independencia orientaban hacia un análisis no paramétrico.

Tabla A.29. AED de la tasa de filtración o aclaramiento (todos los datos).

Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)					
Condición	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
D max	0.28*	0.27*	0.22*	0.29*	0.19
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.20
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)					
χ^2_{obtenida} (4 g.l.)	59.01*	54.03*	50.74*	25.7*	6.13*

* No se ajusta a la hipótesis.

Las tasas altas de filtración, ya separadas de las tasas previamente descritas, fueron independientes, homocedásticas, aditivas y normales (tabla A.30).

Las tasas bajas de filtración conformaron poblaciones de datos aditivas, los organismos expuestos a cadmio tuvieron datos independientes, las poblaciones fueron normales, excepto en los organismos expuestos a Cd1, y únicamente los controles fueron homocedásticos. A pesar de los casos en que no se cumplieron las hipótesis, se consideró que los datos podían ser analizados por pruebas paramétricas, apoyándose en el comportamiento de los controles (tabla A.31).

Tabla A.30. AED de las tasas altas de filtración.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)					
Día de ensayo	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
ts	0.55	-0.77	-1.45	ND	ND
t	2.26	2.57	4.30		
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)					
D max ($P > 0.2$, n=20)	0.198 Se unieron todos los datos				
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)					
χ^2 obtenida (4 g.l.)	3.63				
Evaluación de aditividad (Tuckey)					
Fs	-1.0037				

*No se ajusta a la hipótesis; ND, No se detectaron

Tabla A.31. AED de las tasas bajas de filtración.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)					
Día de ensayo	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
ts	-4.21*	-4.87*	-3.75*	-1.36	-0.33
t	1.99	2.00	2.00	2.04	2.07
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)					
D max ($P > 0.2$)	0.148 (<0.15)	0.162 (<0.10)	0.143 (<0.15)	0.247* (<0.05)	0.197 (>0.20)
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)					
χ^2 obtenida (4 g.l.)	7.27	17.28*	17.78*	9.37*	6.13*
Evaluación de aditividad (Tuckey)					
Fs	-2.58				

* No se ajusta a la hipótesis.

Los datos de la tasa de asimilación pudieron considerarse normales, fueron homocedásticos los controles y los expuestos a cadmio, sin embargo, no fueron independientes, ni aditivos (tabla A.32). Lo cual parece lógico dado que esta tasa asocia dos parámetros medidos independientemente.

Tabla A.32. AED de la tasa de asimilación del bioensayo fisiológico.

Evaluación de la independencia (Test de ciclos)					
Condición					
	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2
ts	-4.03*	-2.89*	-7.24*	-3.09*	-2.23*
t	2.00	2.00	2.00	2.01	2.03
Evaluación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov)					
D max	0.076	0.089	0.101	0.088	0.19
P	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	<0.15
Evaluación de homocedasticidad (Bartlett)					
χ^2 obt	12.65	24.07*	36.30*	3.87	3.92
P	0.08	<0.01	<0.01	0.42	0.14
Evaluación de aditividad (Tuckey)					
Fs	-5.2078*				

* No se ajusta a la hipótesis.

El campo de crecimiento, determinado para los días 5, 10 y 15 del bioensayo, tuvieron datos independientes en su mayoría, normales y aditivos, con cierta heterocedasticidad en testigos y expuestos a Cr1 en las tres ocasiones (tabla A.33). A pesar de lo cual, se consideró adecuado el uso de estadística paramétrica.

Tabla A.33. AED del campo de crecimiento obtenido en el bioensayo fisiológico.

	Día 5					Día 10				Día 15		
	T	Cr1	Cr2	Cd1	Cd2	T	Cr1	Cr2	Cd1	T	Cr1	Cr2
Ts	0.55	-0.95	-1.24	-1.56	-2.35*	-1.91	-1.93	-1.91	-2.43	-0.53	-1.11	-2.66
T	2.26	2.36	2.2	2.22	2.22	2.6	2.57	2.36	2.44	3.18	2.26	2.77
Dmax	0.13	0.231	0.243	0.327	0.273	0.181	0.219	0.134	0.203	0.313	0.201	0.229
P	>0.20	>0.20	>0.20	<0.15	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20	>0.20
Fs	-1.0					-1.0				-1.001		
χ^2_{obt}	7.83*	6.68*	3.97	0.68								
P	0.02	0.03	0.14	0.41								

Ts, estadístico del Test de ciclos; D Estadístico de la prueba de Kolmogorov-Smirnov; Fs, estadístico de la prueba de Tuckey; χ^2_{obt} estadístico de la prueba de Bartlett.

7.5 COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DURANTE LAS FASES EXPERIMENTALES.

Fase letal.

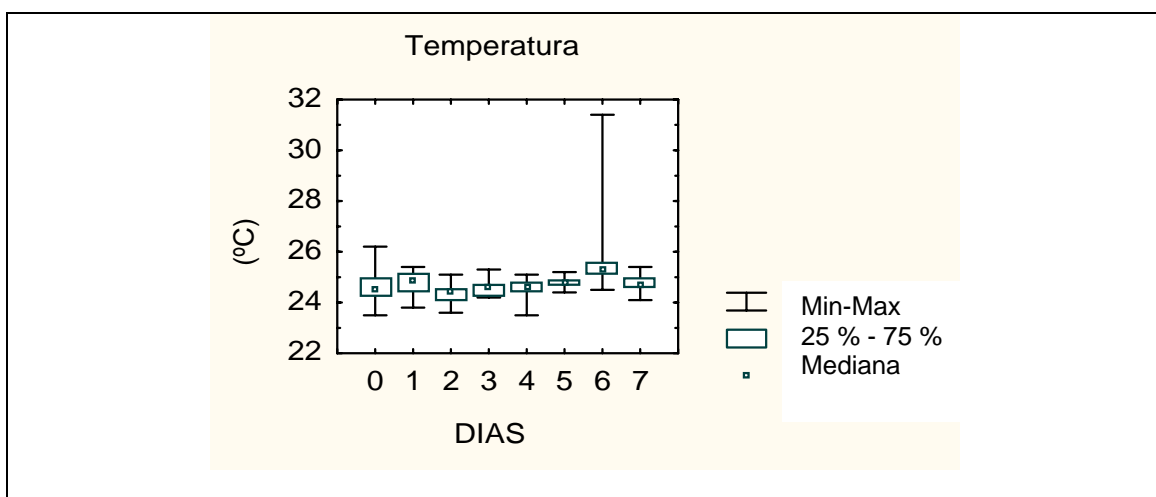
En esta fase (tabla A.34) indicaron lo siguiente: el pH tuvo valores promedio de, 8.35, con fluctuaciones máximas alrededor de 0.5 y 0.6. Estos valores se consideraron adecuados para el ostión. El registro mínimo de oxígeno disuelto promedio fue 3.01 mg/L en el bioensayo con Cd. La salinidad, en promedio de 21.9 ‰, tuvo pocas fluctuaciones, alrededor de 0.8 ‰ a 1.2 ‰. La temperatura promedio fue 24.4 °C, pero se presentaron desviaciones alrededor de 1.1 °C y 1.6 °C. El amonio total fue inferior a 0.1 mg/L promedio. La turbidez, fue generalmente menor a 1 UT.

Tabla A.34. Parámetros fisicoquímicos medidos durante la fase letal (promedio \pm DE).

Bioensayo	pH	O.D. (mg/L)	Salinidad (‰)	Temperatura (°C)	Amonio total (mg/L)
Cr	8.37 \pm 0.05	4.80 \pm 0.32	21.4 \pm 0.5	24.6 \pm 0.9	0.08 \pm 0.07
Cd	8.34 \pm 0.21	3.97 \pm 1.07	22.5 \pm 0.5	24.3 \pm 0.7	0.06 \pm 0.04

Los parámetros fisicoquímicos se consideraron semejantes entre los acuarios con organismos control y los expuestos a los metales. Hubo sin embargo, algunos valores presentaron variaciones en el tiempo ($P < 0.01$ por Kruskal-Wallis).

En el bioensayo con exposición a Cr, se observaron registros altos de temperatura. Algunos acuarios alcanzaron valores de 26.1 °C en el primer día de ensayo, pero llegó a registrarse hasta 30.6 °C, el sexto día, en un acuario con organismos control, y en otro con ostiones expuestos a 35.2 mgCr/L, cuyo posible efecto en los resultados tuvo que ser considerado en la evaluación de la mortalidad y la acumulación (Fig. A.8).

**Figura A.8. Comportamiento de la temperatura durante la fase letal con exposición al Cr.**

Otras tendencias fueron asociadas principalmente a la introducción de los organismos

en los acuarios, como fue el caso del oxígeno disuelto y la turbidez.

En el bioensayo con exposición a Cd, se presentaron variaciones en la concentración de oxígeno disuelto, el cual disminuyó de 6.94 a 3.76 mg/L cuando se introdujeron los organismos, alcanzando hasta 3.15 mg/L el tercer día de exposición. Posteriormente hubo una ligera recuperación y los valores permanecieron alrededor de 3 a 4 mg/L, durante el resto del experimento (Fig. A.9). La turbidez aumentó paulatinamente después de introducir a los organismos, hasta las 96 horas, disminuyendo posteriormente. Este cambio fue más claro en los ostiones control.

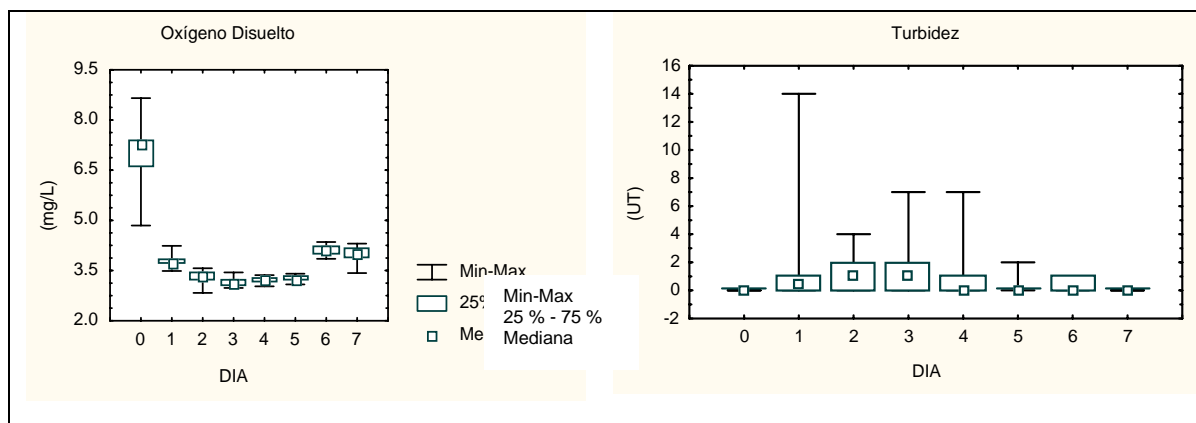


Figura. A.9. Comportamiento del oxígeno disuelto y la turbidez durante la fase letal con exposición a Cd.

Si bien el amonio total, se mantuvo por debajo de 0.1 mg/L, en las cámaras control, los valores se incrementaron en cámaras con organismos expuestos a los metales, a pesar de los recambios diarios de agua, hacia el final de ambos bioensayos llegando a superar los 0.1 mg/L, particularmente en el agua de los organismos expuestos a 25.2 mgCr/L (Fig. A.10). A pesar de ello, los incrementos se consideraron dentro de los límites aceptables.

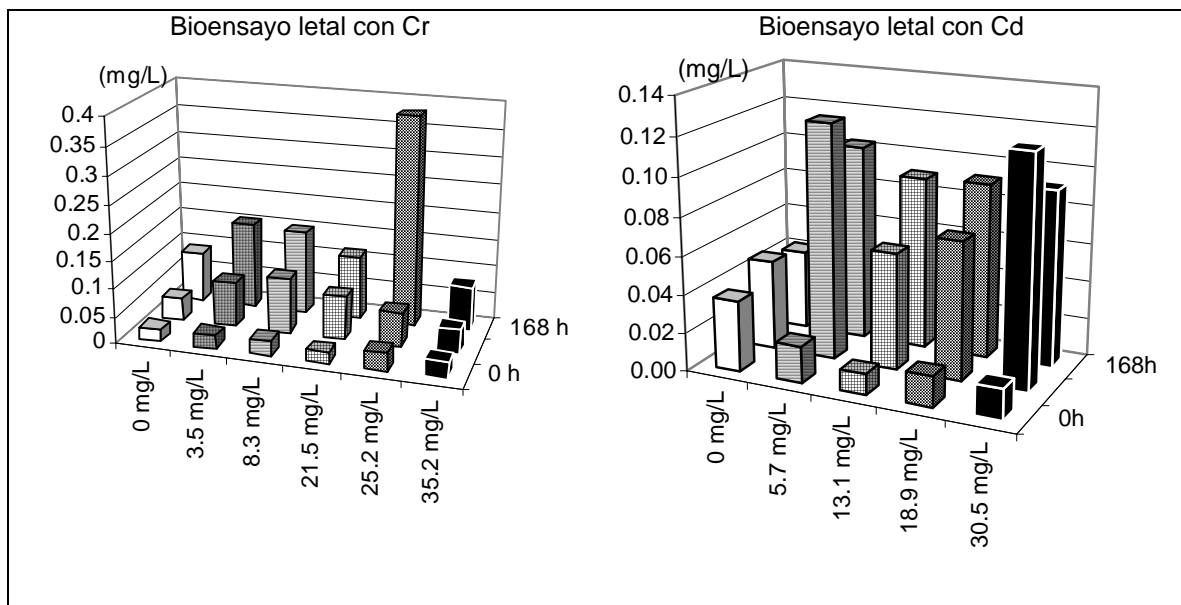


Figura. A.10. Concentración del amonio total (mg N-AT/L) en agua a las 0, 96 y 168 h de exposición al Cr y Cd en la fase letal.

Los parámetros no presentaron correlaciones entre sí. Los coeficientes de correlación de Spearman fueron $r < 0.5$ ($P < 0.05$), así, la posible interferencia de la temperatura o el amonio total con otros parámetros se descartó. Este análisis, incluyó también los registros previos y posteriores a los recambios de agua. Ninguno de los parámetros fisicoquímicos, se asoció con mortalidad, ni con la concentración de los metales en el agua o en el ostión, en ninguno de los dos bioensayos, de manera que no hubo interferencias de las variaciones observadas en los parámetros con la acción tóxica de los metales.

Fase subletal. Pruebas bioquímicas.

Los valores de pH, oxígeno disuelto y amonio total de las dos pruebas realizadas se presentan en la tabla A.35.

Tabla A.35. Parámetros fisicoquímicos (promedio ± DE) determinados durante las pruebas bioquímicas.

	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)	Amonio total (mg N-AT/L)				
			Ensayo.I	Max	Ensayo.II	Max	Promedio
Control	8.31 ± 0.10	4.75 ± 0.015	0.13 ± 0.01	0.21	0.15 ± 0.01	0.22	0.14 ± 0.01
0.088 mgCr/L	8.18 ± 0.26	4.78 ± 0.29	0.11 ± 0.01	0.15	0.13 ± 0.01	0.17	0.12 ± 0.01
0.144 mgCr/L	8.23 ± 0.22	4.78 ± 0.30	0.07 ± 0.01	0.18	0.13 ± 0.01	0.15	0.10 ± 0.01
0.110 mgCd/L	8.40 ± 0.13	4.76 ± 0.12	0.18 ± 0.01	0.27	0.10 ± 0.01	0.14	0.13 ± 0.01
0.212 mgCd/L	8.37 ± 0.22	4.81 ± 0.18	0.10 ± 0.06	0.29	0.13 ± 0.01	0.16	0.11 ± 0.01
Promedio	8.30 ± 0.21	4.77 ± 0.23	0.12 ± 0.02		0.13 ± 0.01		0.12 ± 0.01

El pH, fue homogéneo. Los valores se consideraron iguales entre los dos bioensayos ($P = 0.15$ por t de student). La concentración promedio de oxígeno disuelto fue 4.77 mg/L, considerando ambos bioensayos. Los valores mínimos fueron 4.16 mg/L y 4.12 mg/L, en el primer y el segundo ensayo, respectivamente. Los valores de los acuarios con ostiones control y expuestos fueron iguales, en ambos bioensayos. Las réplicas de los dispositivos experimentales fueron semejantes ($P > 0.05$).

La concentración de amonio total fue semejante en ambas pruebas, pero con frecuencia rebasó el valor de 0.1 mg/L. Los valores se mantuvieron altos a pesar de haber llevado a cabo cada 24 h los recambios de la cuarta parte del volumen del agua de los acuarios. Los valores máximos llegaron a 0.29 mg/L, lo que implica que pudieron llegar a rebasarse 20 µg/L de amoniaco en acuarios con organismos expuestos a Cd durante el primer bioensayo y en controles en el segundo. Las desviaciones estándar demostraron poca variación. Las concentraciones fueron similares en acuarios con organismos control y expuestos, no variaron en el tiempo y fueron iguales entre las réplicas ($P > 0.05$).

La turbidez tuvo valores muy bajos en ambos ensayos, casi siempre de cero.

En contraste con los parámetros descritos, la salinidad y la temperatura presentaron un comportamiento anómalo (tabla A.36). Los valores mínimos de salinidad fueron 22.5 ‰ y 22.2 ‰, los máximos alcanzaron 25.1 ‰ y 23.6 ‰, para cada ensayo, respectivamente. Los valores se consideraron similares entre ambos bioensayos ($t = 1.41$, $P = 0.17$).

Tabla A.36. Salinidad y temperatura en las pruebas bioquímicas (promedio \pm DE).

	Salinidad (‰)	Temperatura (°C) Bioensayo I**	Temperatura (°C) Bioensayo II
Control	23.1 \pm 0.4	24.5 \pm 0.4	25.1 \pm 0.3
0.088 mgCr/L	23.4 \pm 0.5	25.4 \pm 1.5*	24.6 \pm 0.4
0.144 mgCr/L	23.3 \pm 0.3	24.6 \pm 0.9*	25.2 \pm 1.3***
0.110 mgCd/L	23.2 \pm 0.3	24.8 \pm 0.4*	24.7 \pm 0.8*
0.212 mgCd/L	23.1 \pm 0.4	24.2 \pm 0.4	24.7 \pm 0.7*

* Diferencias entre días evaluados; ** Diferencias entre controles y expuestos; *** diferencias entre réplicas ($P < 0.04$ por ANOVA).

Durante el primer bioensayo, las réplicas, así como los valores de acuarios con organismos control y expuestos fueron semejantes, sin embargo, la salinidad tuvo un incremento el tercer día, con una posterior recuperación. En el segundo bioensayo, se apreciaron diferencias en los acuarios con organismos control ($P < 0.01$ por ANOVA) (Fig. A.11).

Los datos de salinidad indicaron ausencia de independencia (previamente examinada en el Anexo 7.3 de análisis exploratorio de datos), lo cual manifiesta alguna influencia externa sobre este parámetro, posiblemente atribuible al comportamiento de la temperatura.

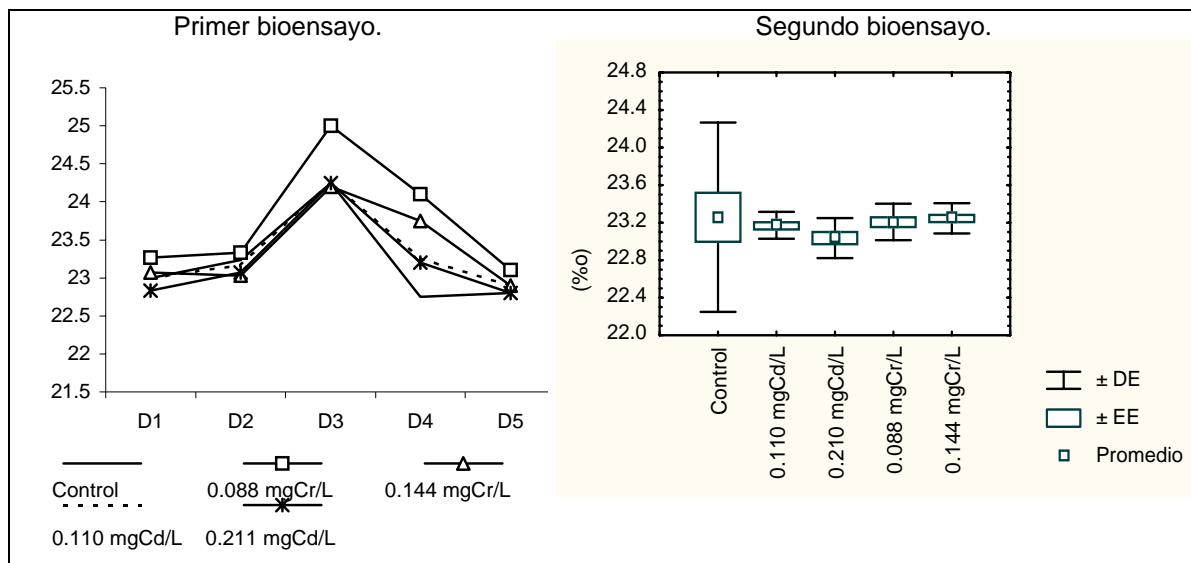


Fig. A.11. Comportamiento de la salinidad (‰) en los dos bioensayos para evaluación de respuestas bioquímicas.

Las temperaturas mínimas fueron de 23.6 °C y 23.1 °C, y las máximas de 28.1 °C y 27.5 °C, en el primer y segundo ensayo, respectivamente. Las réplicas de acuarios fueron semejantes, con algunas excepciones, pero hubo diferencias en el tiempo ($P < 0.05$). En el primer bioensayo, la temperatura representó un factor a considerar en las respuestas de los organismos a partir del día 2. En el segundo, aunque se consideraron semejantes los acuarios con organismos control y expuestos ($P > 0.05$), la diferencia entre los valores máximos y mínimos de los acuarios con organismos expuestos a Cr₂, fue importante ($P < 0.05$) (Fig. A.12).

Se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson, entre la salinidad y la temperatura con los datos pareados de cada día, pero este indicó una asociación pobre. Se procedió a desfasarlos, para asociar las variaciones de temperatura del día 2, con los cambios en la salinidad del día 3. Se comprobó así, que las variaciones de temperatura modificaron la salinidad, en el primer ensayo ($R = 0.61$, $P < 0.05$).

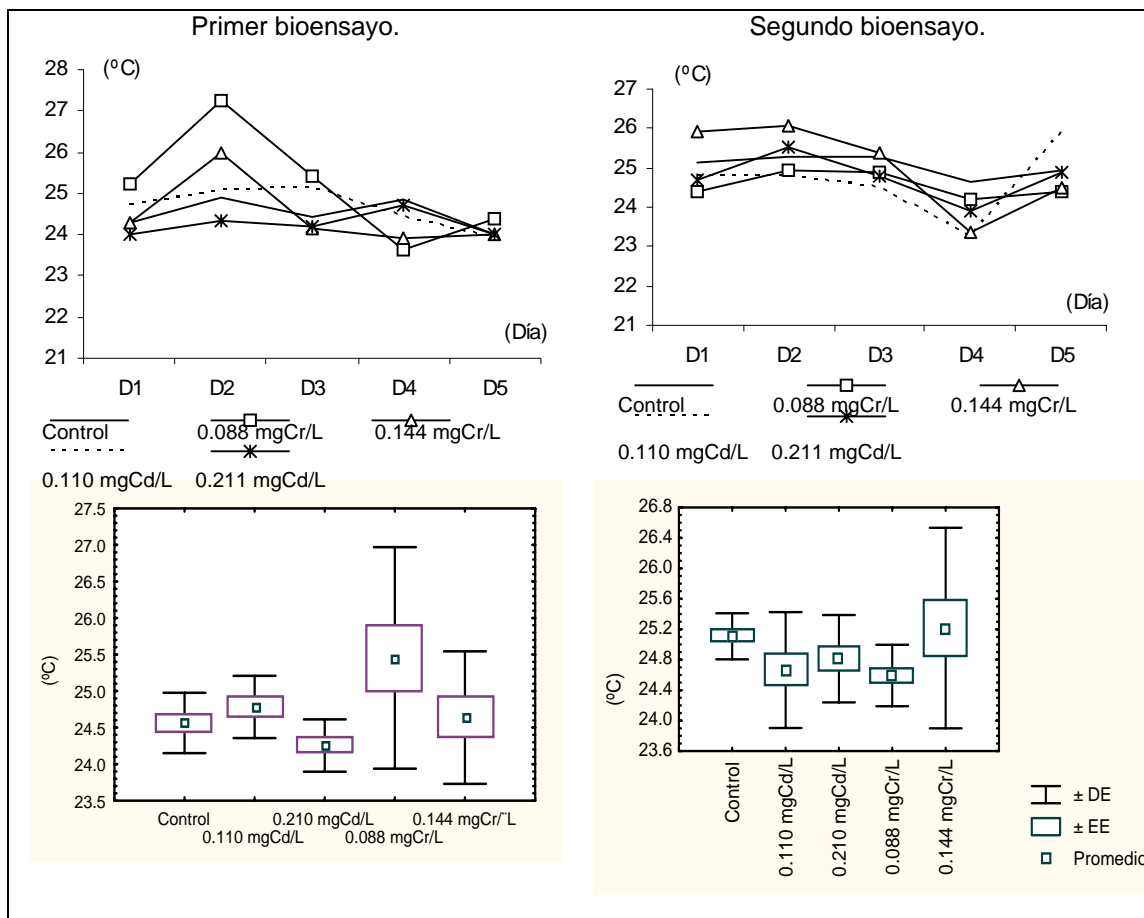


Fig A.12. Comportamiento de la temperatura (°C) en los bioensayos bioquímicos.

Debido a que, las variaciones en estos parámetros tendrían la posibilidad de modificar la biodisponibilidad de los metales, los datos de acuarios cuyas temperaturas superaron los 26°C fueron retirados del análisis definitivamente. Esto implicó, eliminar los resultados de organismos expuestos al Cr a partir del segundo día, en el primer ensayo, y en el segundo la eliminación de una réplica de organismos expuestos a 0.144 mgCr/L, así como los expuestos a 0.110 mgCd/L del quinto día. Después de eliminar los datos anómalos, los valores de temperatura quedaron de la siguiente manera (tabla A.37).

Tabla A.37. Temperaturas (°C) de las pruebas bioquímicas, una vez eliminados los datos de los acuarios con valores anómalos (promedio ± DE).

	Bioensayo I	Min	Max	Bioensayo II	Min	Max	General
Control	24.6 ± 0.4	23.9	25.1	25.1 ± 0.3	24.3	25.4	24.9 ± 0.4
0.088 mgCr/L	24.4 ± 0.3	24.2	24.7	24.6 ± 0.4	23.8	25.2	24.5 ± 0.4
0.144 mgCr/L	24.3 ± 0.4	23.9	24.5	24.6 ± 0.8	23.1	25.8	24.4 ± 0.6
0.110 mgCd/L	24.8 ± 0.4	23.9	25.2	24.5 ± 0.7	23.1	25.7	24.7 ± 0.5
0.212 mgCd/L	24.2 ± 0.4	23.9	24.7	24.8 ± 0.6	23.7	26.2	24.6 ± 0.5

Se realizaron nuevamente las pruebas estadísticas. Las diferencias entre temperaturas mínimas y máximas se hicieron menores de 0.7 °C y 1.5 °C alrededor de los valores promedio en cada ensayo.

Fase subletal. Pruebas fisiológicas.

Los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados diariamente en cada cámara, se presentan en la tabla A.38. fluctuación máxima del pH fue de ± 0.55 alrededor de los valores promedio. Las diferencias en este parámetro se consideraron irrelevantes. Las concentraciones de oxígeno disuelto estuvieron en general por arriba de 3.60 mg/L, aunque las cámaras con Cr presentaron valores menores al resto ($P < 0.05$), de alrededor de 3.77 mg/L. Las cámaras control y con Cd, presentaron en promedio más de 4.08 mg/L. El amonio total, frecuentemente rebasó 0.10 mg/L. Las concentraciones más bajas, se midieron en las cámaras control, 0.09 mg/L, mismas que también tuvieron la menor desviación estándar (0.06). Los valores fueron iguales entre los organismos que conformaron cada lote ($P > 0.05$).

Tabla A.38. Parámetros fisicoquímicos (promedio \pm DE) determinados en el bioensayo para evaluar respuestas fisiológicas.

	pH	Oxígeno disuelto (mg/L) **	Salinidad (‰) ***	Temperatura (°C) ***	Amonio total (mg/L) *
Control	8.14 \pm 0.19	4.08 \pm 0.62	21.7 \pm 1.3	24.5 \pm 0.6	0.09 \pm 0.06
0.080 mgCr/L	8.12 \pm 0.21	3.90 \pm 0.84	21.6 \pm 1.3	24.5 \pm 0.6	0.15 \pm 0.11
0.180 mgCr/L	8.18 \pm 0.22	3.64 \pm 0.95	21.7 \pm 1.5	24.4 \pm 0.6	0.13 \pm 0.10
0.095 mgCd/L	8.15 \pm 0.30	4.14 \pm 0.85	22.0 \pm 1.3	24.4 \pm 0.6	0.11 \pm 0.09
0.170 mgCd/L	8.23 \pm 0.27	4.14 \pm 0.75	21.6 \pm 0.9	24.9 \pm 0.7	0.15 \pm 0.09

* Diferencias entre controles y expuestos a ambos metales, ** entre controles y expuestos a Cr y *** entre controles y expuestos a Cd (por prueba de Kruskal-Wallis, $P < 0.02$).

En el caso de los organismos expuestos a Cd, la salinidad y la temperatura de las cámaras con organismos experimentales, fueron diferentes de las control ($P < 0.05$). La salinidad tuvo valores estables los primeros cinco días con pocas fluctuaciones alrededor del promedio (entre 0.1 ‰ a 0.5 ‰). Sin embargo, a partir del día nueve, se presentaron variaciones. El día 14 varias cámaras presentaron 26 ‰, de manera que se realizó un recambio total del agua para un ajuste que mantuvo estable a 22 ‰ la salinidad, hasta el final del bioensayo. La descompensación en la salinidad no se correlacionó con la mortalidad, ni con las concentraciones de ambos metales en agua y tejido, ni con las variaciones de los demás parámetros, por lo que se considera que no afectaron las respuestas fisiológicas derivadas de la exposición a los metales.

La temperatura presentó valores promedio que fluctuaron de 0.25 °C a 0.5 °C. Algunas variaciones se presentaron en los primeros dos días de ensayo, en seis de las cámaras con organismos expuestos a Cd que tardaron en estabilizarse, fluctuando alrededor del promedio hasta en 1.5 °C y 2.0 °C. Esta situación ya no se presentó en el resto del experimento.

Las cámaras sin organismos (SO), presentaron valores similares en los parámetros fisicoquímicos, excepto en el amonio total, ya que tuvieron niveles relativamente altos de, 0.15 \pm 0.02 mg/L. Estos valores, se atribuyeron al hecho de que en estos

dispositivos, se incorporó alimento diariamente para determinar la tasa de depositación de las células, mismo que pudo estar expuesto a degradación natural bacteriana, ya que no fue consumido.

Comportamiento global de los parámetros fisicoquímicos.

Es recomendable que durante la realización de bioensayos el pH no varíe más de 0.4 respecto al promedio general (APHA, 1995). La importancia de conservar niveles adecuados del pH, así como del oxígeno disuelto, es limitar la posibilidad de que el metabolismo anaerobio de los ostiones interfiera en las respuestas. Por ejemplo, se ha comprobado que a pH 7.5-8.5 el metabolismo es aerobio, y entre 5-6 ya es anaerobio (Simkiss y Masson, 1983).

Para el trabajo experimental con ostión, la concentración de oxígeno disuelto no debe estar por debajo del 40% de saturación (APHA, 1995). Considerando la salinidad, la temperatura, así como la altura sobre el nivel del mar, en la cual se realizaron los bioensayos (Cd. de México), la concentración esperada de oxígeno en saturación, sería 6.04 mg/L, lo que implica que el 40 % de saturación se encontraría alrededor de 2.38 mg/L. A pesar de no existir la certeza de que niveles inferiores a este representar una situación de estrés para los ostiones, se eliminaron los datos generados en cámaras con menos de 2.38 mg/L de oxígeno disuelto.

APHA (1995), no especifica las condiciones óptimas de salinidad para bioensayos con *C. virginica*. Otros experimentos se han realizado a 10, 20 y 30 ‰ (Roesijadi, 1996a). La especie usualmente vive entre 5 ‰ y 40 ‰. Las condiciones óptimas se ubican entre 14 ‰ y 28 ‰. Este valor puede variar geográficamente, por ejemplo, en la bahía de

Chesapeake se considera que el óptimo para la especie está entre 15 ‰ y 22.5 ‰ (Shumway, 1996). Por lo anterior, un intervalo de salinidad entre 18 ‰ y 26 ‰ puede considerarse adecuado para bioensayos y por ello el presente estudio se realizó en 22 ‰.

El registro detallado de los parámetros fisicoquímicos fue sometido a un análisis exploratorio de los datos, al igual que todas las variables de control y de respuesta. Este análisis se presentó en el anexo 7.3 y con él se justifica el uso de estadística paramétrica o no paramétrica en el análisis.

El control de parámetros fisicoquímicos durante la fase en la que se evaluó el efecto letal de los metales, indicó que se presentaron algunas variaciones en la salinidad durante el bioensayo con Cr. En el caso del ensayo con Cd hubo variaciones en el oxígeno disuelto y la turbidez. Así mismo, en ambos ensayos llegó a superarse el nivel de 0.1 mg/L de amonio total. El análisis del comportamiento de los parámetros demostró que no hubo interferencia entre ellos, ni influencia de los mismos en la mortalidad de los organismos, la cual derivó por tanto de la exposición a los metales. Los datos generados en las cámaras que presentaron estas alteraciones fueron descartados, incluyendo las respuestas del organismo.

Durante el desarrollo de las pruebas subletales para evaluación de respuestas bioquímicas el seguimiento de los parámetros fisicoquímicos indicó también algunas variaciones. En este caso, se consideró importante, hacer un análisis profundo de su posible interferencia en los resultados. Éste análisis llevó a concluir, que era necesario eliminar los datos de algunos dispositivos experimentales. Una vez que llevó a cabo esta eliminación, nuevamente se evaluó el comportamiento de los parámetros,

concluyéndose que los dispositivos eran suficientes y con información confiable para interpretar las respuestas a nivel bioquímico.

Durante los bioensayos de efectos subletales para la evaluación de respuestas fisiológicas, se detectaron variaciones en la salinidad, así como bajas concentraciones de oxígeno disuelto en algunas cámaras. No pudo descartarse la posibilidad de que hubiera un efecto sinérgico entre la salinidad y otros parámetros, ya que también se observaron valores elevados de amonio total. Estos cambios se presentaron los primeros días del bioensayo únicamente, pero debieron considerarse en la evaluación de los efectos fisiológicos, a pesar de que, posteriormente, se encontraron dentro de un intervalo aceptable.

7.6 PUBLICACIÓN ACEPTADA.

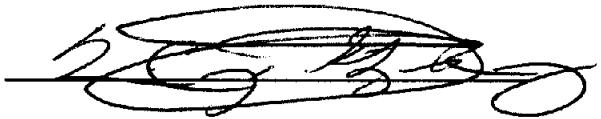
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Guadalupe Barrera Escorcía

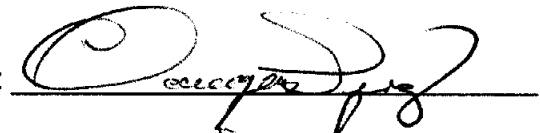
El día 16 de marzo de 2006.

Jurado:

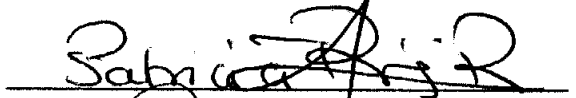
Directora: Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz



Asesora: Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez



Asesora: Dra. Patricia Ramírez Romero



Sinodal: Dra. Irma Rosas Pérez



Sinodal: Dr. Fernando Martínez Jerónimo

