



Universidad Veracruzana

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Región Poza Rica-Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

El erizo de mar *Mellita quinquesperforata* (Leske, 1778)
como bioindicador de toxicidad de sedimentos
contaminados con hidrocarburos

Tesis para obtener el grado de Maestra en
Ciencias del Ambiente

Presenta:

Biol. Mar. Marian Alejandra Soto Reazola

Director:

Dr. Pablo San Martín del Ángel

Co-Director:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Abril de 2022

“Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz”



Universidad Veracruzana

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Región
Poza Rica-Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

*El erizo de mar Mellita quinquiesperforata (Leske, 1778)
como bioindicador de toxicidad de sedimentos
contaminados con hidrocarburos*

Tesis para obtener el grado de Maestra en
Ciencias del Ambiente

Presenta:
Biol. Mar. Marian Alejandra Soto Reazola

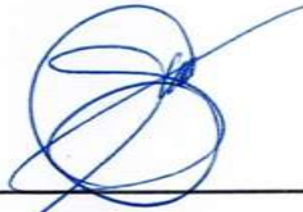
Director:
Dr. Pablo San Martín del Ángel

Co-Director:
Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Tuxpan de Rodríguez Cano Veracruz, a Abril de 2022.

El presente Trabajo de Intervención titulado: **El erizo de mar *Mellita quinquiesperforata* (Leske,1778) como bioindicador de toxicidad de sedimentos contaminados con hidrocarburos**, realizado por la C. **Marian Alejandra Soto Reazola**, bajo la Dirección del Dr. Pablo San Martin del Angel y de la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera, ha sido revisada y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE



Dr. Pablo San Martin del Angel



Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Agradecimientos

A **Dios**, por mi vida y darme la fuerza para salir adelante en todo momento.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por otorgarme la beca nacional con número de apoyo 750200, que me brindó sustento durante mis estudios del posgrado y parte del financiamiento de mi trabajo de intervención.

A la **Maestría en Ciencias del Ambiente** y su coordinador, **Dr. José Luis Alanís Méndez** por brindar el espacio y apoyo para la obtención de este grado académico. También al **Dr. Francisco Limón** y el equipo de la coordinación.

Mi infinito agradecimiento a la **Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera** y al **Dr. Pablo San Martín del Ángel**, por brindarme un espacio como tesista en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Así mismo, por guiarme con paciencia en la construcción de este trabajo. Ambos me han compartido generosamente sus conocimientos y apoyado en todo momento. ¡Los admiro mucho!.

Agradezco a los miembros de mi comisión revisora por su tiempo y valiosos consejos para mejorar y enriquecer mi trabajo: **Dra. Adriana Martínez Guevara** y **Dr. Rodrigo Cuervo González**. Especialmente a la **Dra. Maribel Ortiz Domínguez** porque, además, como tutora siempre estuvo apoyándome durante mi trayectoria académica y las dificultades en el ámbito personal.

Gracias a las personas que me apoyaron durante las diversas etapas de muestreos y análisis: **Ing. Irving Vidal Briseño**, por su valiosa ayuda en la recolección de sedimentos del estero; **Mtro. Néstor Daniel Romero García**, por todo el apoyo en el laboratorio y la recolección de organismos, **Dra. Rocío Rodríguez Cabrera**, por su paciencia al enseñarme a realizar los análisis de sedimentos en el Laboratorio de Suelos de la Facultad.

Finalmente agradezco a mi familia. A mis padres **C.P. Camila Reazola Arzola** y **Mario Arturo Soto González**, así como a mis hermanos **José Arturo** y **Diana Pamela**, quienes fueron mi equipo para recolectar las galletas de mar y otros insumos relacionados a los experimentos. A mi abuelo, **Don Arturo Soto del Ángel**, por facilitarme el vehículo para las salidas a la playa y a mi tía **Zita Deciré Soto González**, por recibirme en su casa los días en que el trabajo en el laboratorio se extendió por largas jornadas.

Dedicatoria

“Lo más importante es siempre creer en uno mismo, pero una pequeña ayuda de los demás es una gran bendición”. Iroh, ATLA.

A Dios.

Por guiar mi camino, bendecirme cada día y permitirme concluir este trabajo. Por cada milagro que me has concedido y por darme a la familia y los amigos que tengo.

A Mi familia.

Dedicada a mi Madre y mi Padre, por estar detrás de todos mis logros, ninguno de mis proyectos sería posible sin ustedes. A mis hermanos, el amor que les tengo y las ganas de compartir nuevas aventuras con ustedes son mis motivos para salir adelante. También a mis abuelitos, Arturo y Elizabeth por todo su cariño y apoyo.

Para las personas que han estado conmigo.

A Giovanni Hernández Licon, por apoyarme incondicionalmente desde el momento en que comenzó nuestra amistad. Gracias por tus consejos y actos de servicio. Deseo que la vida nos permita seguir compartiendo y celebrando cada éxito juntos.

Para mi compañera de viaje, Ayam Trejo Barrera, además de ser mi equipo también fuiste mi apoyo dentro y fuera de la maestría. Por todo lo que compartimos, muchas gracias.

A Maripaz Hernández Mendoza, porque me rescataste en varias ocasiones. Te agradezco por compartirme tus tips para sobrevivir al posgrado (y a la vida). Me siento muy afortunada de contar con tu amistad.

Para Mayte Cobos Madera. Tus consejos me dan otra perspectiva del mundo y de cómo sobrellevar cada situación. Te admiro y agradezco por tantos años de cariño y respaldo.

A Miguel Alcalá González, porque estuviste en cada etapa desde que ingresé a la maestría. Gracias a tu gran sentido del humor que me ha reconfortado en los momentos en que más lo necesitaba.

Para mi mamá, porque has sido fuerte por mí y mis hermanos en los momentos más complicados. Sin ti no hubiera podido llegar hasta aquí. Te amo.

“Una parte del viaje es el final”. T. S.

Índice

Agradecimientos	4
Dedicatoria	5
Índice.....	6
Índice de cuadros	8
Índice de figuras	9
Resumen	12
I. Introducción	13
II. Antecedentes	15
2.1 Generalidades de la especie <i>Mellita quinquesperforata</i>	15
2.2 Contaminación por hidrocarburos en ambientes marinos y costeros	18
2.3 Bioensayos de toxicidad con contaminantes.....	19
2.4 Teratogénesis.....	23
III. Objetivos.....	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos particulares	25
IV. Área de estudio	26
4.1 Área de recolección de sedimentos contaminados con hidrocarburos	26
4.2 Área de recolección de especímenes de <i>M. quinquesperforata</i>	27
V. Materiales y métodos.....	28
5.1 Toma de muestras de sedimentos	28
5.2 Análisis de los sedimentos y cuantificación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's)	29
5.3 Bioensayos de toxicidad	30
5.4 Respuestas observadas	33
VI. Resultados	35
6.1 Caracterización de los sedimentos estuarinos	35

6.2 Caracterización de los sedimentos marinos	35
6.3 Cuantificación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's).....	37
6.4 Éxito en la embriogénesis de <i>M. quinquiesperforata</i>	38
6.5 Longitud de las larvas de <i>M. quinquiesperforata</i>	39
6.6 Estado de desarrollo de <i>M. quinquiesperforata</i>	40
VII. Discusión.....	43
7.1 Caracterización de los sedimentos contaminados	43
7.2 Bioensayos de embriogénesis con <i>M. quinquiesperforata</i>	45
VIII. Conclusiones y aplicación práctica del trabajo	49
8.1 Conclusiones	49
8.2 Aplicación práctica del trabajo.....	50
IX. Referencias	52
X. Anexos	60
10.1 pH y salinidad de los elutriados	60
10.2 Nutrición de los organismos adultos de <i>Mellita quinquiesperforata</i> , cultivo de microalgas marinas.....	60
10.3 Diagrama triangular de las clases texturales	63

Índice de cuadros

Cuadro I. Condiciones para la realización de pruebas de toxicidad crónica con <i>M. quinquiesperforata</i>	20
Cuadro II. Resumen de los trabajos de Beiras.....	21
Cuadro III. Porcentajes por tipo de arena obtenidos mediante el método de la columna de tamices, muestra de sedimentos marinos.....	36
Cuadro IV. Concentraciones de HTP's obtenidas de las muestras de sedimentos contaminados.....	37
Cuadro V. pH y salinidad de los elutriados a los que se expusieron los embriones de <i>M. quinquiesperforata</i>	60

Índice de figuras

- Figura I. Vista aboral y oral de *M. quinquiesperforata*.** Tomada de: “Equinodermos del Caribe colombiano II: Echinoidea y Holothuroidea” por Borrero Pérez, G. H., Benavides Serrato, M., y Díaz Sánchez, C. M. 2012, Vista aboral y oral. Pág. 104. 15
- Figura II. Cangrejo *Dissodactylus crinitichelis* como simbionte de *M. quinquiesperforata*.** a) Dos cangrejos en una de las lúnulas (cara oral) de *M. quinquiesperforata*. b) Acercamiento a *Dissodactylus crinitichelis*. Tomada de: “New host for *Dissodactylus crinitichelis* (Decapoda, Pinnotheridae): First record of occurrence on *Mellita quinquiesperforata* (Echinodermata, Echinoidea)” por Lima, S. F. B., Queiroz, V., Bravo de Laguna, I. H., y Mioso, R. 2014, *Mellita quinquiesperforata* and *Dissodactylus crinitichelis*. Pág. 64..... 18
- Figura III. Larvas de *P. miliaris* en la etapa de pluteus de 4, 6 y 8 brazos.** Se observa morfología normal (A, D y G) y anormal (B, C, E, F y H). Las flechas indican la presencia de brazos cortos o anormales (B, C, E y F). Tomada de “Early life developmental effects of marine persistent organic pollutants on the sea urchin *Psammechinus miliaris*” por Anselmo, H. M., Koerting, L., Devito, S., van den Berg, J. H., Dubbeldam, M., Kwadijk, C. y Murk, A. J. 2011, *P. miliaris* larvae at the 4, 6, 8-armed pluteus stage with normal (A, D, and G, respectively) and abnormal morphology (B, C, E, F and H). Pág. 2184. 24
- Figura IV. Macro localización del estero y la playa Emiliano Zapata, ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.**..... 26
- Figura V. Macro localización geográfica de la zona de recolecta de *M. quinquiesperforata*.** Playa de Tuxpan Veracruz..... 27
- Figura VI. Trabajo de campo en el estero conectado a la playa Emiliano Zapata, ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.** a) Materiales para el muestreo. b) Localización de la coordenada mediante GPS. c) Extracción de los sedimentos contaminados con nucleador de PVC..... 28
- Figura VII. Proceso de elaboración de elutriados de sedimentos contaminados con hidrocarburos.** Elaborada a partir de: “Evaluación de la Toxicidad en Desechos y Suelos Petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L” por Infante, C. y Morales, G. F. A. 2012, Diagrama del desarrollo del bioensayo con semillas de *L. sativa*. Pág. 784. 31
- Figura VIII. Diseño experimental de los bioensayos de toxicidad con embriones de *M. quinquiesperforata*.** La letra R representa a cada repetición..... 33
- Figura IX. Larva pluteus normal desarrollada tras incubar los óvulos fecundados a 20° C durante 48 h, detalle a la línea lateral del cuerpo.** Tomada de: “Evaluación

biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar <i>Paracentrotus lividus</i> por Fernández, N. 2002, Larva pluteus normal desarrollada tras incubar los huevos fecundados a 20°C durante 48 h. Pág. 35.....	33
Figura X. Estado embrionario en el que se detiene el desarrollo en función de la concentración de un tóxico. Tomado de Fernández, 2002. Tomada de: "Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar <i>Paracentrotus lividus</i>" por Fernández, N. 2002, Estado embrionario en el que se detiene el desarrollo en función de la concentración de un tóxico. Pág. 36.....	34
Figura XI. Porcentaje por grupo de partículas en la muestra de sedimentos estuarinos del ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.	35
Figura XII. Porcentaje por grupo de partículas en la muestra de sedimentos marinos en el ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.....	37
Figura XIII. Porcentaje de éxito en la embriogénesis (larvas normales) de <i>M. quinquiesperforata</i> observado después de 48 h de incubación en los tratamientos experimentales. AM= agua de mar (control negativo), C= sustrato control, SM= sedimentos marinos, SE= sedimentos estuarinos. E10= elutriados en dilución al 10%, E25= elutriados en dilución al 25%, E100= elutriados puros o 100%. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).	38
Figura XIV. Comparación de la longitud alcanzada por las larvas pluteus de <i>M. quinquiesperforata</i>. Del tratamiento AM o control negativo (a) y del tratamiento SE E100 (b).....	39
Figura XV. Longitud promedio de <i>M. quinquiesperforata</i> observada después de 48 h de incubación en los tratamientos experimentales. AM= agua de mar (control negativo), C= sustrato control, SM= sedimentos marinos, SE= sedimentos estuarinos. E10= elutriados en dilución al 10%, E25= elutriados en dilución al 25%, E100= elutriados puros o 100%. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).....	40
Figura XVI. Desarrollo embrionario normal de <i>M. quinquiesperforata</i>. Microfotografías del gameto femenino de la galleta de mar y sus fases de división celular posteriores al proceso de fertilización: (a) óvulo fecundado; (b) estadio de 2 células; (c) estadio de 4 células; (d) estadio de 8 células; (e) estadio de 32 células; (f) mórula; (g) larva pluteus 24 h después de la fecundación; (h) larva pluteus 48 h posterior a la fecundación.	41
Figura XVII. Recuento de observaciones de <i>M. quinquiesperforata</i> por estado de desarrollo después de 48 h de incubación en elutriados E10, E25 y E100 de SM y	

estuarinos contaminados con hidrocarburos y un sedimento comercial como control. Longitud promedio de *M. quinquiesperforata* observado después de 48 h de incubación en los tratamientos experimentales. AM= agua de mar (control negativo), C= sustrato control, SM= sedimentos marinos, SE= sedimentos estuarinos. E10= elutriados en dilución al 10%, E25= elutriados en dilución al 25%, E100= elutriados puros o 100%. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)..... 42

Figura XVIII. Blástulas de *M. quinquiesperforata* observadas después de la exposición en los elutriados de sedimentos marinos: (a), (b) y (c) corresponden a blástulas que se expusieron al elutriado de sedimentos marinos en dilución del 25%; (d), (e) y (f), blástulas del elutriado de sedimentos marinos al 100%..... 42

Figura XIX. Etapas de cultivo de *Isochrysis* sp. (1) tubos de 15 ml, (2) frascos de vidrio de 700 ml, (3) frascos de 1L, (4) recipientes de 10L de capacidad..... 61

Figura XX. Imagen de individuos dispersos (izquierda) y células apiñadas de *Isochrysis* sp. (derecha) observadas de una muestra de la etapa 2 de cultivo... 62

Figura XXI. Células de *Isochrysis* sp. observadas de una muestra de la etapa 4 de cultivo..... 62

Figura XXII. Diagrama triangular de las clases texturales básicas del suelo según el tamaño de las partículas, elaborado a partir de Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura. FAO (Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura). 2020. [Actualizado 12 de diciembre de 2020].
Página electrónica
(http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm#top)..... 63

Resumen

La contaminación por hidrocarburos es un problema crítico y recurrente que afecta a los sedimentos de los ecosistemas marinos y costeros. En este sentido, los erizos de mar se han usado para estudiar la toxicidad de contaminantes, sin embargo, existe un reducido número de especies destinadas a ello. En esta investigación se realizaron bioensayos embriolarvarios de exposición con la especie *Mellita quinquesperforata*, para evaluar la toxicidad de sedimentos contaminados con hidrocarburos. Se recolectaron y caracterizaron dos muestras (sedimentos marinos=SM y sedimentos estuarinos=SE). Los tratamientos consistieron en elutriados puros o 100% (E100) y diluciones al 25% (E25) y 10% (E10) de SM, SE y un sustrato control (C), además un control negativo sólo con agua de mar (AM). Posterior a la exposición de óvulos fecundados, se registraron el éxito en la embriogénesis, la longitud de las larvas y la fase en la que se detuvo el desarrollo. Los SE presentaron 21,248.51 mg kg⁻¹ y los SM 8735.80 mg kg⁻¹ de HTP's, respectivamente. Por otra parte, el menor porcentaje de éxito en la embriogénesis (96.4%) y con diferencias significativas con AM ($p=0.0060$) lo mostró el tratamiento E100 de SM. El promedio máximo de longitud se registró en las larvas de AM con 385.92 μm y el mínimo (189.45 μm) fue en el E100 de SE. El 98.96% de los organismos alcanzó un desarrollo completo (larva pluteus de 4 brazos), no obstante, también se observó un 0.72% de blástulas (SM E100 y E25) y 0.32% de óvulos fecundados (SE E100 y E10), es decir, cuanto mayor la concentración de HTP's, más temprana fue la inhibición del desarrollo. Este trabajo contribuye al uso y conocimiento de los bioensayos embriolarvarios con *Mellita quinquesperforata*, especie de equinoideo que no se ha reportado para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos en sedimentos marinos o estuarinos.

Palabras clave: bioindicador, elutriados, embriogénesis, hidrocarburos, *Mellita quinquesperforata*, sedimentos.

I. Introducción

El petróleo crudo es una mezcla formada principalmente de hidrocarburos, los cuales son compuestos de carbono e hidrógeno en diversas proporciones, junto con otros elementos químicos (Silos, 2008). Se considera como un recurso energético, cuya creciente demanda en conjunto con sus derivados provoca la contaminación de ambientes marinos debido las fugas frecuentes ocurridas durante los procesos de exploración, producción, refinación, transporte y almacenamiento, representando así un problema internacional crítico (Bao *et al.*, 2014; Guarino *et al.*, 2017).

Los hidrocarburos de petróleo se liberan al agua a través de derrames o fugas que después experimentan procesos de estratificación y segregación impulsados por la densidad de las partículas; por ello, las fracciones más pesadas se acumularán en el sedimento en donde pueden persistir durante mucho tiempo (Kamalakkannan *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). En el caso de los sedimentos marinos, éstos sirven como sumidero para muchos contaminantes, en consecuencia, pueden alcanzar concentraciones superiores a las de la columna de agua; por ello la toxicología de los sedimentos representa un tema clave en las evaluaciones de salud de los ecosistemas litorales y marinos afectados por la emisión continua de contaminantes (Fernández *et al.*, 2006; Logemann *et al.*, 2019; Oliva *et al.*, 2019).

Por otra parte, los bioensayos de embriogénesis de erizo de mar se utilizan frecuentemente para la evaluación de la calidad ambiental de ecosistemas litorales (Fernández *et al.*, 2006). Dichos organismos presentan características que permiten que sean ampliamente utilizados en programas de monitoreo ambiental, como son una distribución cosmopolita y fácil recolecta de ejemplares adultos en campo, además de que de éstos se obtienen cantidades significativas de gametos para la fertilización *in vitro*, ya que poseen un proceso de fecundación rápido y se identifican fácilmente a los óvulos fertilizados (López-Ortiz y Sánchez, 2009). Cabe mencionar que son pocas las especies de erizos de mar que se han utilizado como animales de laboratorio, algunas de ellas han sido: *Strongylocentrotus purpuratus*, *Lytechinus variegatus*, *Arbacia punctulata*, *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Paracentrotus lividus* (Hamdoun *et al.*, 2018), las cuales son consideradas como erizos regulares, de acuerdo con las características descritas por Pawson (2007).

Para el caso de especies de erizos regulares, numerosas investigaciones han tipificado métodos para su uso en la evaluación de la toxicidad de lixiviados de sedimentos (Fernández, 2002; Cesar *et al.*, 2004; Losso *et al.*, 2007; Durán y Beiras, 2010; Beiras *et al.*, 2012; Khosrovyan *et al.*, 2013). Dentro de este contexto, en el presente trabajo se propone adaptar los protocolos establecidos para especies regulares de erizos de mar a una especie de erizo irregular: *Mellita quinquiesperforata* (Leske, 1778), la cual cuenta con presencia local y amplia distribución en la costa atlántica del continente americano (Borrero-Pérez *et al.*, 2012). De esta manera se podrá contribuir con el desarrollo de una herramienta accesible, confiable y de respuesta rápida para las evaluaciones ambientales referentes a la contaminación por hidrocarburos en sedimentos marinos y costeros.

II. Antecedentes

2.1 Generalidades de la especie *Mellita quinquiesperforata*

Los erizos de mar son antiguos invertebrados marinos de la clase Echinoidea dentro del filo Echinodermata (Borrero-Pérez *et al.*, 2012), los cuales tienen una rica historia como modelo experimental debido a la facilidad de la recolección de gametos y a la observación de sus embriones (Hamdoun *et al.*, 2018). Dentro de la clase Echinoidea existen dos grupos diferenciados por sus características morfológicas, los equinoideos regulares y los irregulares (Pawson, 2007). Los erizos irregulares bilateralmente simétricos incluyen a los conocidos comúnmente como galletas de mar o dólares de arena discoidales (Pawson *et al.*, 2009; Borrero-Pérez *et al.*, 2012). En este último grupo se ubica la familia Mellitidae (Stefanini, 1912), que suele habitar en la zona intermareal o submareal en sustratos de arena a los que están morfológicamente adaptados (Coppard, 2016).

Incluida en dicha familia se encuentra la especie *Mellita quinquiesperforata* (Leske, 1778) (Borrero-Pérez *et al.*, 2012). Esta especie se caracteriza morfológicamente porque presenta una testa mucho más ancha que larga, con un caparazón frágil discoidal, subcircular y elevado en la región anterior, generalmente truncado en la parte posterior; la región oral es plana; presenta cinco lúnulas, una interambulacral y cuatro ambulacrales; las lúnulas posteriores son cortas; posee cuatro poros genitales y su coloración va de marrón oscuro a pardo claro (Francisco y Pauls, 2008) (Fig. I).



Figura I. Vista aboral y oral de *M. quinquiesperforata*. Tomada de: "Equinodermos del Caribe colombiano II: Echinoidea y Holothuroidea" por Borrero Pérez, G. H., Benavides Serrato, M., y Díaz Sánchez, C. M. 2012, *Vista aboral y oral*. Pág. 104.

De acuerdo con Borrero-Pérez y colaboradores (2012), la especie *M. quinquiesperforata* tiene una amplia distribución, por lo que se puede encontrar desde México hasta Uruguay. Respecto a su hábitat, a estos organismos se les encuentra enterrados en los sedimentos de la zona intermareal, en un rango de profundidad que va de uno a cuatro metros (Francisco y Pauls, 2008). Cabe destacar que en México esta especie no se encuentra bajo alguna categoría de protección especial o riesgo establecido en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010).

Históricamente, los trabajos que se han realizado en nuestro país con *M. quinquiesperforata* datan del año de 1841, cuando el naturalista Louis Agassiz recolectó y analizó ejemplares de equinodermos, entre los cuales reportó la presencia de la mencionada especie en el Golfo de México. Posteriormente, en 1946, la Dra. María Elena Caso Muñoz, impulsora del estudio de los equinodermos en México, publicó el trabajo “Contribución al conocimiento de los equinoideos de México. Distribución y morfología de *Mellita quinquiesperforata*, *M. lata* y *M. longifissa*”. En dicha publicación se examinaron ejemplares procedentes de distintos sitios del estado de Veracruz: Nautla, Santecomapan, Mocambo y Boca del Río (Alvarado y Solís-Marín, 2013).

En un contexto actual, la presencia del erizo *M. quinquiesperforata* en ecosistemas arrecifales del norte de Veracruz se documenta en el trabajo de González-Gándara y colaboradores (2015), quienes lograron registrarla mediante censos visuales, específicamente en las zonas arenosas de la pendiente de sotavento, del arrecife Lobos. Por otra parte, Quirós-Rodríguez (2015) reporta a los equinodermos del sector Ahumadera, bahía de Cispatá, en el Caribe colombiano. En dicha investigación el objetivo fue comparar la diversidad y abundancia de equinodermos en dos estaciones de muestreo con sustrato y microhábitat contrastantes. Se encontró que *M. quinquiesperforata* habita en ambos sitios, esencialmente en el sustrato arenoso.

Respecto a su distribución espacial, García (1996) menciona que ésta se presenta en forma de un banco continuo, paralelo a la costa. Además, encontró la existencia de una separación por tamaño: los juveniles se encuentran lejos de los adultos, fenómeno que se explica por la depredación de parte de los adultos a los individuos jóvenes. Este trabajo también aborda la alimentación de *M. quinquiesperforata*. Algunos de los elementos

encontrados en el intestino de dichos erizos fueron partículas inorgánicas como granos de cuarcita, escombros y desechos orgánicos, asimismo, se encontraron diatomeas, dinoflagelados y foraminíferos. Se concluye que esta especie forma parte de la cadena trófica en el eslabón de los detritívoros, por lo que también existe el supuesto de que los dólares de arena se alimentan de la comunidad microbiana bentónica.

En la investigación de Tavares y Borzone (2006), se describió el ciclo reproductivo de *M. quinquesperforata*, en poblaciones de dos tipos de playas diferentes en el sur de Brasil: la playa de *Atami*, que está abierta al océano, y la playa de *Pontal do Sul*, una playa protegida, ambas con sedimentos compuestos de arena de cuarzo, con material fino por la proximidad del acceso a un estuario. Mediante métodos histológicos y de índice gonadal, se encontraron cinco fases en el proceso de gametogénesis de los individuos: etapa de crecimiento, etapa prematura, etapa madura, fase de agotamiento y etapa de reposo. Ambas poblaciones exhibieron un periodo reproductivo principal durante la primavera/verano y un periodo de almacenamiento de nutrientes durante los meses de otoño/invierno.

En cuanto a relaciones ecológicas con otras especies, los autores Bell y Stancyk (1983), y Bell (1988), mencionan que los individuos de *M. quinquesperforata* pueden ser huéspedes del cangrejo simbiótico *Dissodactylus mellitae*. Así mismo, Lima y colaboradores (2014) encontraron otro cangrejo que puede tener una simbiosis no obligatoria con *M. quinquesperforata*: la especie *Dissodactylus crinitichelis*, cuyos organismos asociados se encontraron pegados debajo de la superficie oral de los equinoideos, estrechamente unidos a las lúnulas (Fig. II). De acuerdo con los autores, esta relación se puede atribuir a que los especímenes de *M. quinquesperforata* funcionan como un sustrato o microhábitat que se mueve sobre la superficie del sedimento, lo que permite su fácil ocupación por *D. crinitichelis*.

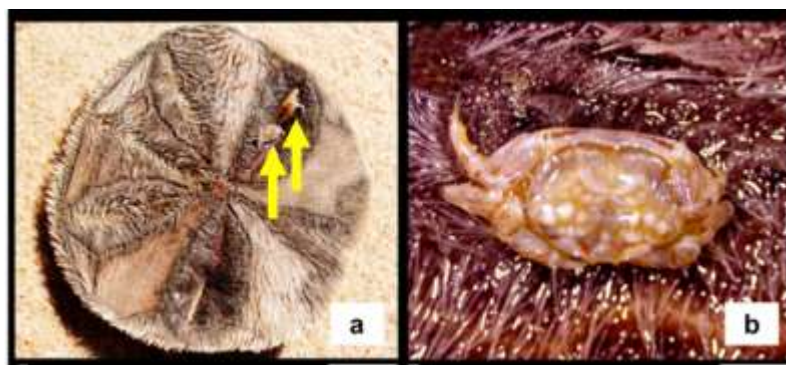


Figura II. Cangrejo *Dissodactylus crinitichelis* como simbiote de *M. quinquiesperforata*. a) Dos cangrejos en una de las lúnulas (cara oral) de *M. quinquiesperforata*. b) Acercamiento a *Dissodactylus crinitichelis*. Tomada de: “New host for *Dissodactylus crinitichelis* (Decapoda, Pinnotheridae): First record of occurrence on *Mellita quinquiesperforata* (Echinodermata, Echinoidea)” por Lima, S. F. B., Queiroz, V., Bravo de Laguna, I. H., y Mioso, R. 2014, *Mellita quinquiesperforata* and *Dissodactylus crinitichelis*. Pág. 64.

2.2 Contaminación por hidrocarburos en ambientes marinos y costeros

El petróleo crudo es un recurso indispensable para la economía mundial y el crecimiento industrial (Sakthipriya *et al.*, 2015). Por otra parte, las fuentes de hidrocarburos del petróleo mediadas por el hombre y consideradas como importantes causantes de contaminación local y crónica en las proximidades de estuarios, arroyos, puertos y asentamientos costeros incluyen la producción de petróleo en alta mar, el transporte marítimo, las deposiciones atmosféricas o aéreas de la combustión del carbón y la quema de gas, el vertido directo al océano, los desechos costeros, municipales e industriales y la escorrentía (Kamalakaran *et al.*, 2017). A continuación, se enlistan algunos de los acontecimientos mundiales de derrames de petróleo, así como de volumen derramado al mar (Cuadro I).

Cuadro I. Resumen de derrames de petróleo que han ocurrido en el mar.			
Año	Evento	Lugar	Volumen vertido (aprox.)
1978	Vertido del buque Amoco Cadiz	Costas de Bretaña	223,000 t
1979	Explosión del pozo Ixtoc-I	Sonda de Campeche	475,000 t
1979	Choque de los buques Atlantic Empress y Aegan Captain	Cerca de la isla de Tobago	287,000 t
1989	Desastre del petrolero Exxon Valdez	Frente a las costas de Alaska	37,000 t
1991	Derrame de la Guerra del Golfo	Golfo Pérsico	1,500,000 t

Elaborada a partir de los trabajos de Gill *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2014; Zapata-Pérez *et al.*, 2014; Acosta-González *et al.*, 2015.

2002	Hundimiento del buque Prestige	Costa Norte de España	64,000 t
2010	Explosión de la plataforma Deepwater Horizon	Golfo de México	700,000 t

2.3 Bioensayos de toxicidad con contaminantes

La toxicología del agua y los sedimentos representan temas clave en las evaluaciones de salud de los ecosistemas marinos que se ven afectados por la emisión continua de contaminantes de diferentes fuentes (Dahms *et al.*, 2016). A diferencia de los análisis químicos que permiten determinar el grado y la naturaleza de la contaminación, los bioensayos permiten la detección de los efectos de ésta, a través de la medición de la respuesta biológica de los organismos marinos (Oliva *et al.*, 2019). El término bioindicador hace referencia, precisamente, al uso de organismos que proporcionan información sobre la calidad del medio ambiente como herramientas de evaluación (Bonanno y Orlando-Bonacab, 2018).

Existen varias características que han contribuido al uso de los erizos de mar como organismos de monitoreo de la calidad del agua, por ejemplo: su distribución cosmopolita, la sencilla recolección de adultos en el campo, la posibilidad de obtener cantidades significativas de gametos para la fertilización *in vitro*, un proceso de fecundación rápido y la fácil identificación de los óvulos fertilizados (López-Ortiz y Sánchez, 2009). Asimismo, los bioensayos con estadios embrionarios y larvarios de invertebrados marinos como ostras y erizos de mar han sido frecuentemente utilizados para evaluar la calidad ambiental de muestras de sedimentos y son considerados un método rápido y sensible para la caracterización de la toxicidad de sedimentos marinos (Casado-Martínez *et al.*, 2006).

Como ejemplo de bioensayos de toxicidad que se han realizado a nivel mundial, se menciona el trabajo de Laitano y colaboradores (2008), quienes estudiaron la viabilidad de utilizar a *M. quinquesperforata* como organismo modelo ante experimentos crónicos de corta duración. Dichos autores utilizaron cuatro tóxicos de referencia: sulfato de zinc, dicromato de potasio, sulfato de cobre y dodecil sulfato de sodio (DSS) para evaluar la sensibilidad relativa de la especie, la cual no había sido comparada con la de la especie de erizo regular *Lytechius variegatus*. Los resultados determinaron que una metodología modificada a las características propias de la especie hace posible emplear a *M.*

quinquiesperforata en este tipo de experimentos. En dicho trabajo se incluye también un resumen de las condiciones generales necesarias para llevar a cabo pruebas crónicas con estadios embriolarvarios de *M. quinquiesperforata* (Cuadro II).

Cuadro I. Condiciones para la realización de pruebas de toxicidad crónica con <i>M. quinquiesperforata</i>.	
Requisito	
Organismo test	Óvulos de <i>M. quinquiesperforata</i>
Agua de dilución	Agua marina microfiltrada
Volumen mínimo de solución de prueba	10 ml
Número mínimo de réplicas por dilución	4
Número mínimo de organismos por réplica	10 óvulos/ml
pH	7.5 a 8.5
Salinidad	29 ± 2
Temperatura	25 ± 2°C
Fotoperiodo	12 h luz y 12 h oscuridad
Duración de la prueba	24 h
Fertilización mínima	70%
Efecto observado	Retraso o anormalidad de embriones y larvas
Validez de la prueba	Mínimo 70% de larvas pluteus normales en control

Tomada de: "Viabilidade do Uso da Bolacha-do-mar *Mellita quinquiesperforata* como Organismo Teste" por Laitano, K. S., Gonçalves, C. y Resgalla-Jr, C. 2008. *Resumo das condições gerais para a realização do teste crônico embrio-larval de curta duração com Mellita quinquiesperforata em comparação com Lytechinus variegatus, de acordo com os procedimentos estabelecidos na norma técnica da CETESB (1992)*. Pág. 13.

Un autor que ha contribuido con diversos artículos orientados a la utilización del bioensayo embriolarvario con erizos de mar para evaluar la contaminación, y que se ha centrado en investigaciones acerca de la toxicidad de sedimentos es Beiras, quien presenta estos experimentos como una herramienta útil tanto en evaluaciones *in situ* como *ex situ*. Además, propone el monitoreo integrado que incluya concentraciones químicas, efectos biológicos y mediciones de apoyo (e.g. Beiras *et al*, 2001; Fernández y Beiras, 2001; Beiras

et al., 2003a; Beiras *et al.*, 2003b; Beiras *et al.*, 2012). A continuación, se muestra un resumen de dichos trabajos (Cuadro III).

Cuadro II. Resumen de los trabajos de Beiras.	
Autores y año de publicación	Contenido del estudio
Beiras <i>et al.</i> , 2001	Bioensayos <i>in situ</i> , con óvulos fertilizados de erizo <i>P. lividus</i> para la evaluación de la calidad de agua de mar (ecosistema estuarino, Ría Pontevedra, España), en dos puntos: parte interna de la Ría (contaminado, datos químicos y toxicológicos) y otro en la parte externa (control).
Fernández y Beiras, 2001	Bioensayos <i>ex situ</i> , con óvulos fertilizados de <i>P. lividus</i> para conocer la toxicidad individual y combinada de mercurio disuelto, cobre, plomo y cadmio. Estudios para reconocimiento de sensibilidad de la especie a dichos contaminantes.
Beiras <i>et al.</i> , 2003a	Evaluación integradora de la calidad ambiental con muestras de las Rías Vigo, Pontevedra y Arousa, combinando la química analítica de agua de mar y sedimentos, bioacumulación en mejillones marinos y bioensayos de toxicidad de elutriados de sedimentos con embriones de <i>P. lividus</i> .
Beiras <i>et al.</i> , 2003b	Análisis de toxicidad de elutriados de sedimentos mediante bioensayos con <i>P. lividus</i> y el cordado <i>Ciona intestinalis</i> . Así mismo, se determinaron los contenidos de metales traza en agua de mar, sedimentos y mejillones, para realizar un escalado multidimensional según los valores de contaminación química.
Beiras <i>et al.</i> , 2012	Protocolo de bioensayos <i>ex situ</i> con embriones de <i>P. lividus</i> , para la evaluación los efectos biológicos de contaminantes mediante elutriados de sedimentos marinos. Método propuesto directamente aplicable a otras especies de equinoideos utilizados en ecotoxicología.

Elaborada a partir de los trabajos de Beiras *et al.*, 2001; Fernández y Beiras, 2001; Beiras *et al.*, 2003a; Beiras *et al.*, 2003b; Beiras *et al.*, 2012.

Por otra parte, Fernández (2002) describe las bases para la realización de bioensayos toxicológicos que evalúen la calidad ambiental con la especie de erizo regular *P. lividus*. En este trabajo, las pruebas con sedimentos se basan en la obtención de lixiviados o elutriados (sobrenadante obtenido a partir de la mezcla de sedimento problema y agua de mar control, posterior a la agitación y decantación de la mezcla) y la exposición de embriones del erizo de mar a estos elutriados en estado puro y diluciones. Cabe hacer mención que este trabajo corresponde a una investigación de tesis doctoral.

Utilizando la misma metodología con elutriados y exposición de *P. lividus*, se encuentra la investigación de Fernández y colaboradores (2006), que se realizó para evaluar la toxicidad de los sedimentos afectados por el vertido del buque petrolero *Prestige*. Las muestras de sedimentos se tomaron en ocho puntos con respecto al grado de afección del vertido, y se analizaron para determinar la concentración de metales e hidrocarburos totales.

En la fase de bioensayos se expusieron óvulos fertilizados a elutriados puros y diluciones de los sedimentos de cada punto de muestreo. Posterior al periodo de incubación, se observó una elevada toxicidad en dos de las estaciones de muestreo, para las que el éxito en la embriogénesis de *P. lividus* fue completamente nulo, lo que significa que el desarrollo embrionario se detuvo debido a la toxicidad de los sitios.

En México, González (2007) utilizó la metodología de bioensayos de exposición para conocer la toxicidad de los sedimentos afectados por la industria petrolera, en seis sitios de Salina Cruz, Oaxaca. Para este caso, se caracterizaron los hidrocarburos aromáticos totales (HAT), material orgánico extraíble (MOE) así como los metales pesados y metaloides (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Hg, Pb, V y Zn). Las especies expuestas fueron *Artemia franciscana* y *Artemia sp.* Los resultados de los experimentos permitieron identificar la diferencia de toxicidad entre los sitios, siendo los sedimentos del Puerto-Antepuerto más tóxicos que los del estero La Ventosa y la zona costera. Finalmente, se concluye que, de las dos especies empleadas la más sensible fue *A. franciscana* y que en los sitios estudiados hay evidencia de impacto por descargas tanto industriales como domésticas.

En un contexto regional, en el Norte de Veracruz, Salas-Salazar y colaboradores (2017), utilizaron al ostión americano *Crassostrea virginica* como modelo por su capacidad de bioacumulación de contaminantes. El experimento consistió en exponer a los bivalvos a sedimentos de la Laguna de Tamiahua (recolectados en una zona caracterizada por la contaminación por hidrocarburos), además de la influencia de la variable temperatura. En los organismos expuestos a los sedimentos contaminados en combinación con una temperatura de 30° C se observó una mayor acumulación de hidrocarburos y la tasa de sobrevivencia más baja, además de que el desarrollo gonádico afectado por el contaminante, predominando los ejemplares indefinidos sexualmente. La importancia de esta investigación consiste en que fue el primer registro de este tipo de bioensayos para la región.

Es importante mencionar que no se han encontrado investigaciones previas realizadas en México, en donde se utilice la metodología de exposición a elutriados de sedimentos contaminados con hidrocarburos, para evaluar la respuesta sobre especies de equinoideos, en particular de la especie de erizo irregular *M. quinquiesperforata*.

2.4 Teratogénesis

En los últimos años, el tema de la contaminación marina ha tenido un creciente interés por parte de los científicos y personas en general, debido a que la ocurrencia de fenómenos de contaminación química ha provocado preocupación debido a las posibles consecuencias toxicológicas para la biota marina y, directa o indirectamente, también para la salud humana (De Flora *et al.*, 1991). En este sentido es importante introducir el concepto “teratogénesis”, que se traduce literalmente como “creación de monstruos”, ya que proviene de las palabras griegas *teras* (monstruo) y *génesis* (creación, formación) (Rojas *et al.*, 2015).

De acuerdo con Conley y Richards (2008), el concepto “teratógeno” refiere a cualquier agente natural o artificial que altera física o químicamente los procesos de desarrollo y produce deformidades en los organismos, además de los efectos en el comportamiento, la bioquímica y el aprendizaje, de acuerdo con las definiciones actuales. Los autores mencionan que, ecológicamente los defectos morfológicos son la anomalía más comúnmente encontrada y que para la vida silvestre se encuentran tres tipos de teratógenos: disruptores mecánicos (como parásitos y depredadores), contaminantes químicos (muchos de origen xenobiótico, como hidrocarburos clorados, metales e hidrocarburos aromáticos) y compuestos disruptores endocrinos o EDC, por sus siglas en inglés *Endocrine Disrupting Chemicals* (que alteran el equilibrio hormonal de los organismos).

Dentro de este contexto, Anselmo y colaboradores (2011), realizaron bioensayos de exposición en los que observaron la mortalidad, las anomalías morfológicas y las etapas de desarrollo larvario de embriones del erizo de mar regular *Psammechinus miliaris*, para observar la reacción al grupo de los contaminantes orgánicos persistentes (*Persistent organic pollutants* ó POPs), que incluyen a los bifenilos policlorados (PCB), entre otras sustancias. De acuerdo con los autores este grupo de compuestos tienden a acumularse en el sedimento y la red alimenticia, alcanzando así concentraciones que potencialmente pueden producir efectos tóxicos. El resultado del experimento mostró alteraciones morfológicas en las larvas expuestas durante las distintas etapas del desarrollo embrionario del erizo *P. miliaris* (Fig. III).

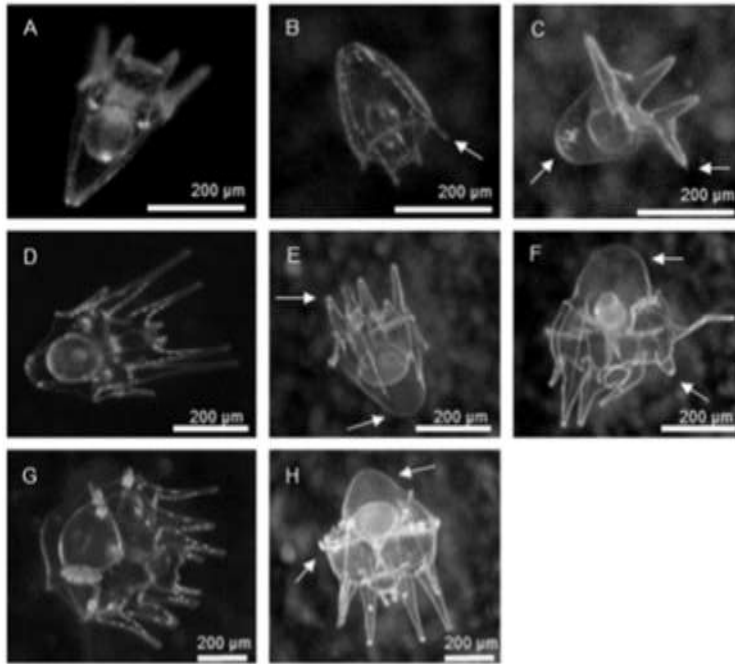


Figura III. Larvas de *P. miliaris* en la etapa de pluteus de 4, 6 y 8 brazos. Se observa morfología normal (A, D y G) y anormal (B, C, E, F y H). Las flechas indican la presencia de brazos cortos o anormales (B, C, E y F). Tomada de "Early life developmental effects of marine persistent organic pollutants on the sea urchin *Psammechinus miliaris*" por Anselmo, H. M., Koerting, L., Devito, S., van den Berg, J. H., Dubbeldam, M., Kwadijk, C. y Murk, A. J. 2011, *P. miliaris* larvae at the 4, 6, 8-armed pluteus stage with normal (A, D, and G, respectively) and abnormal morphology (B, C, E, F and H). Pág. 2184.

En el presente Trabajo de Intervención se propuso la realización de bioensayos utilizando como modelo a la especie de erizo irregular *M. quinquesperforata*. Esta investigación constituye un aporte al conocimiento del ensayo embriolarvario como herramienta en las evaluaciones de sedimentos contaminados por hidrocarburos, contando además con una especie de erizo de mar que antes no había sido propuesta para este tipo de estudios en el área del Golfo de México.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad de sedimentos contaminados con hidrocarburos mediante bioensayos embriolarvarios con el erizo de mar *M. quinquiesperforata* como indicadores de la contaminación de un ecosistema.

3.2 Objetivos particulares

- ❖ Caracterizar física y químicamente los sedimentos del estero y la playa Emiliano Zapata ubicados en el ejido el Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.
- ❖ Registrar el efecto teratogénico de los elutriados de sedimentos sobre el éxito en la embriogénesis, la longitud de las larvas y el estado de desarrollo de los embriones de *M. quinquiesperforata*.
- ❖ Comparar las respuestas observadas en los embriones de *M. quinquiesperforata* por cada tratamiento de exposición (elutriados puros y diluciones) y sitio de muestreo.

IV. Área de estudio

4.1 Área de recolección de sedimentos contaminados con hidrocarburos

El lugar de recolecta de sedimentos contaminados es el estero conectado con la playa Emiliano Zapata, del ejido El Sacrificio, perteneciente al municipio de Tuxpan, Veracruz, el cual se encuentra ubicado en las coordenadas geográficas: 20°48'34.5" N y 97°13'31.1" O. Limita al norte con la playa de Chile Frio y al sur con Cazones de Herrera. De acuerdo con los análisis fisicoquímicos llevados a cabo por Cervantes (2017), la clase textural de mayor ocurrencia en los sedimentos contaminados del estero es la clase franco arenoso y la cantidad de materia orgánica es considerada como extremadamente rica.

En el mapa se observa la ubicación de la Batería de Separación Punta de Piedra (Fig. IV), la cual recibe la producción de dos pozos productores: Marsopa-18/5, así como de las plataformas circundantes que descargan su producción al cabezal en la Plataforma Marina Marsopa (Aguilera *et al.*, 2016). Cabe destacar que, el día 22 de julio de 2018 ocurrió un derrame de hidrocarburo que se extendió desde la Plataforma Marina Marsopa hasta la Batería de Separación antes mencionada. Esto se debió a una fuga en el ducto que une ambas instalaciones (ASEA, 2018; Diario Vanguardia de Veracruz, 2018).

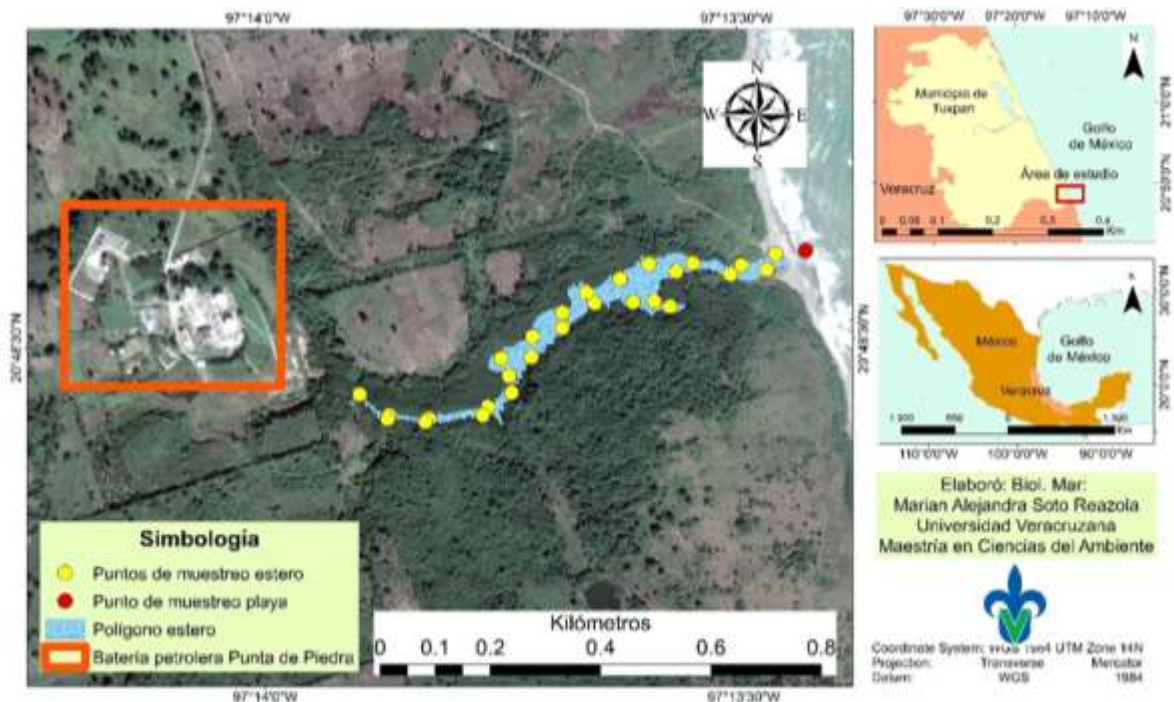


Figura IV. Macro localización del estero y la playa Emiliano Zapata, ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.

4.2 Área de recolección de especímenes de *M. quinquiesperforata*

La zona donde se recolectaron los organismos adultos de *M. quinquiesperforata* está ubicada en la franja submareal de la playa de Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz; frente al hotel Isla Tajín (N 21° 4' 7"; O 97° 21' 11") (Fig. V).

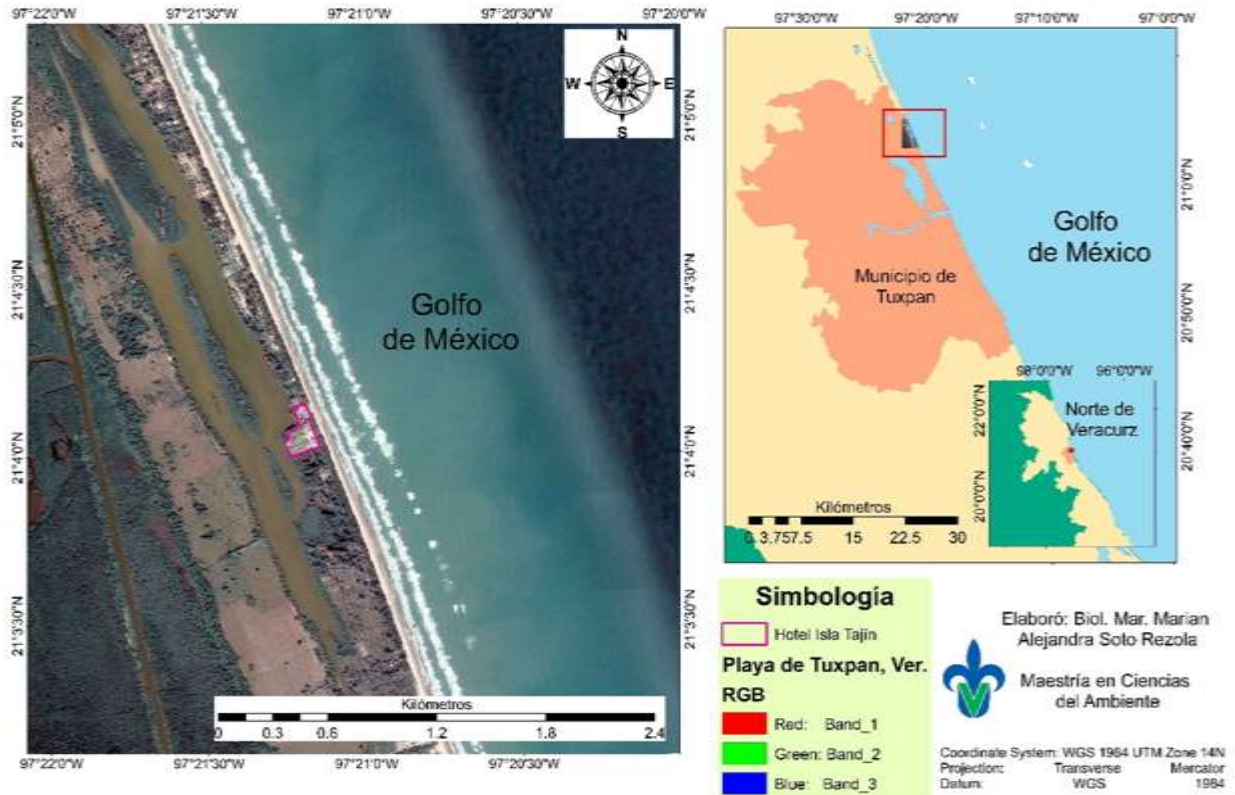


Figura V. Macro localización geográfica de la zona de recolecta de *M. quinquiesperforata*. Playa de Tuxpan Veracruz.

V. Materiales y métodos

5.1 Toma de muestras de sedimentos

Para la realización de este trabajo se empleó como sedimento control el sustrato comercial para acuarios Meridian™ de Seachem®, dado que es un material inerte sin ningún tipo de contaminación química (Seachem, 2021). Se trata de un sustrato natural de aragonita formado por granos esféricos para uso en acuarios marinos, de arrecife y tropicales, además el tamaño de sus gránulos tiene un diámetro de entre 0.25 y 0.50 mm.

En el estero se recolectaron un total de 27 submuestras en puntos aleatorios dentro del polígono, y a partir de éstas se formó una muestra compuesta. Las submuestras fueron recolectadas con ayuda de un nucleador de PVC (Fig. VI), así mismo se tomaron siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013).



Figura VI. Trabajo de campo en el estero conectado a la playa Emiliano Zapata, ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz. a) Materiales para el muestreo. b) Localización de la coordenada mediante GPS. c) Extracción de los sedimentos contaminados con nucleador de PVC.

Por otra parte, en el área de estudio se tomó una muestra de sedimentos marinos de la zona del litoral (playa Emiliano Zapata) adyacente al estero, en un punto perpendicular a dicho cuerpo de agua. La muestra de sedimentos fue recolectada con una pala cajuelera Truper serie T-2000. A continuación, la muestra fue guardada en bolsas plásticas de polietileno que a su vez fueron almacenadas dentro de bolsas negras para su posterior traslado

a laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana, Campus Tuxpan.

5.2 Análisis de los sedimentos y cuantificación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's)

Antes de llevar a cabo los análisis de los sedimentos, éstos fueron preparados de acuerdo con lo estipulado por la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002), para lo cual las muestras fueron secadas extendiéndolas sobre charolas de plástico y colocándolas a la sombra; posteriormente, se retiraron las rocas y materia orgánica visible para después hacer pasar los sedimentos por un tamiz de malla 10, ya que la citada norma describe que este grado de finiza es conveniente para la mayoría de los análisis requeridos. A continuación, los sedimentos de cada sitio fueron homogeneizados, es decir, se combinó el contenido de todas las bolsas con el sedimento estuarino, repitiendo el mismo proceso para los sedimentos marinos, haciendo girar en todas direcciones el sedimento de las bolsas donde fueron recolectados.

Con el objetivo de caracterizar los sedimentos estuarinos y marinos se realizaron las siguientes pruebas tomando de referencia los análisis de sedimentos de Fernández y colaboradores (2006): en cuanto a los análisis físicos, para los sedimentos estuarinos se determinó la clase textural por el hidrómetro de Bouyoucos siguiendo el método AS-09 establecido en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). Por otra parte, para los sedimentos marinos se empleó la técnica para determinar la cantidad de partículas retenidas por malla a través de una columna de tamices sobre 110 g de muestra seca, mediante un arreglo desde el tamiz número 10 (N10), a continuación, el número 20 (N20), número 50 (N50), número 100 (N100), el tamiz número 200 (N200) y una charola de fondo, procedimiento descrito por Cordero (2016). La caracterización química consistió en determinar para las dos muestras de sedimento el contenido de materia orgánica por el método AS-07 con la técnica de Walkley y Black (1934) (DOF, 2002).

Para conocer la cantidad de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's) se siguió lo descrito en el manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados (*sensu* Fernández *et al.*, 2006). Para ello primero se obtuvo el porcentaje de

humedad en las muestras de sedimento. Posteriormente, se extrajo el contaminante por reflujo con equipo Soxhlet, basada en los métodos de referencia D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540C y 3541 de la US EPA (1996, 1994). Una vez obtenido el concentrado orgánico se realizó la cuantificación de HTP's por el método gravimétrico, mediante el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\text{HTPs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

HTPs (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/ kg de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

5.3 Bioensayos de toxicidad

De cada muestra de sedimentos se obtuvieron elutriados mezclando 100 g de sedimento y 400 ml de agua de mar control (*sensu* Fernández, 2002) (Fig. VII), esta última se define como agua de mar filtrada, de características oceánicas y ausencia de contaminación química (Beiras *et al.*, 2012). La mezcla se preparó en recipientes de plástico cerrados con capacidad de 600 ml y se sometió a un proceso de agitación durante 30 minutos, después se dejó reposar durante la noche a 20° C en la oscuridad. A continuación, la fase líquida (elutriado) se recuperó en un vaso de precipitado y se aireó durante 10 minutos para eliminar cualquier rastro de ácido sulfhídrico (H₂S). Previo a las incubaciones, se verificó el pH y la salinidad en el elutriado (Anexo 10.1, Cuadro VI).

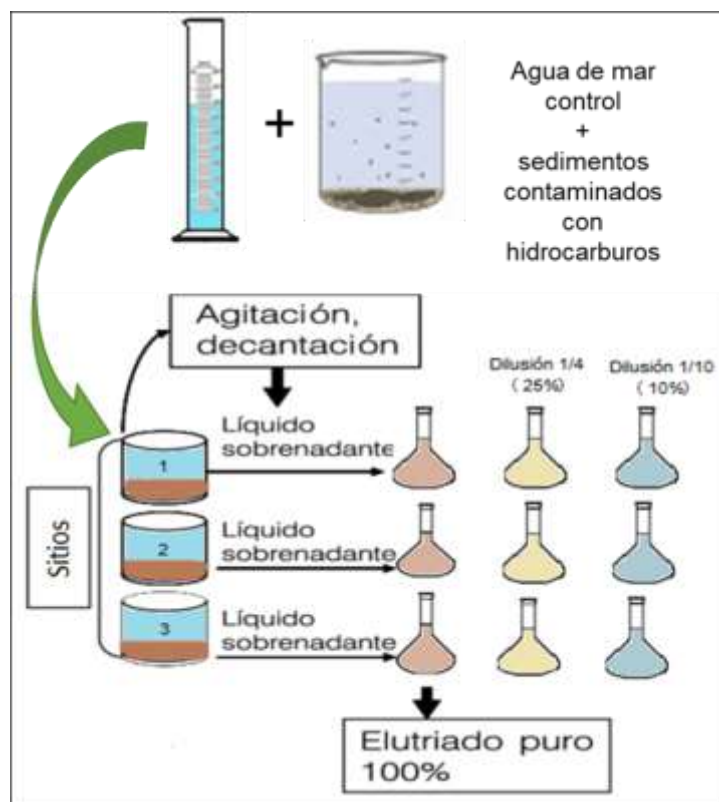


Figura VII. Proceso de elaboración de elutriados de sedimentos contaminados con hidrocarburos. Elaborada a partir de: "Evaluación de la Toxicidad en Desechos y Suelos Petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L" por Infante, C. y Morales, G. F. A. 2012, *Diagrama del desarrollo del bioensayo con semillas de L. sativa*. Pág. 784.

Los especímenes adultos de *M. quinquiesperforata* se recolectaron con la mano y se transportaron en cubetas con agua de mar al Laboratorio de Biotecnología Ambiental, donde se colocaron en acuarios con una cama de arena de 5 cm de espesor, provistos con aireación constante (*sensu* Olivares-Bañuelos *et al.*, 2012). Asimismo, se mantuvieron en un periodo de observación previo a los bioensayos para garantizar que no hayan sido afectados durante el transporte por el cambio de las condiciones ambientales, además de comprobar que no presentaran signos de daño o afección por parásitos (*sensu* Cuevas *et al.*, 2012). En 1992 la *American Public Health Association* (APHA), la *American Water Works Association* (AWWA) y la *Water Pollution Control Federation* (WPCF), estipularon que se debe alimentar diariamente a los individuos para asegurar su nutrición adecuada, por lo cual se les suministró 15,000 cél ml⁻¹ de *Isochrysis* sp. (*sensu* Olivares-Bañuelos *et al.*, 2012) (Anexo 10.2).

A partir de la metodología adaptada de Beiras y colaboradores (2012), se obtuvieron gametos de adultos maduros mediante el desove inducido por choque osmótico, inyectando 1 ml de cloruro de potasio (KCl) 1 M a través de la membrana peristomal en el celoma de los organismos. Las hembras se colocaron invertidas sobre un vaso de precipitado con agua de mar control mientras se liberaron los óvulos, identificados como gránulos rosados o rojizos. El esperma se aspiró "en seco" de los gonóporos de los machos, y no se diluyó hasta la fertilización. Posteriormente, la viabilidad de las células sexuales se evaluó en el microscopio, colocándolas en una gota de agua de mar control y comprobando la redondez del óvulo y la movilidad del esperma.

La fecundación *in vitro* se llevó a cabo en una probeta de 100 ml con agua de mar control, en donde se recolectaron los óvulos de una sola hembra a los que con una pipeta Pasteur se agregaron unos pocos microlitros de esperma sin diluir de un solo macho. Luego se suministró agitación suave para favorecer la fecundación y se tamizó a través de una malla de 90 μm de luz para remover el exceso de espermatozoides y prevenir la poliespermia. De esta preparación se tomaron cuatro muestras en una celda de recuento de 1 ml, para calcular la densidad de óvulos y el porcentaje de fecundación medio (identificando a los óvulos fertilizados por la membrana de fertilización). Con los datos obtenidos se calculó el volumen para colocar con una pipeta automática entre 20 y 40 óvulos fertilizados por ml^{-1} en placas Costar® de seis pocillos, con capacidad de cultivo de 3 ml (Beiras *et al.*, 2012).

Posteriormente, los óvulos fecundados se incubaron por 48 horas a 20° C en las placas de cultivo que contenían en los pocillos las soluciones de cada tratamiento. Los tratamientos de los bioensayos consistieron en los elutriados puros o al 100%, identificados como E100, y diluciones al 25% o 1/4 (E25) y al 10% o 1/10 (E10) del sustrato control (C); elutriado con el sedimento estuarino (SE) y elutriado con sedimento marino (SM), así como un control negativo que constó únicamente de agua de mar filtrada (AM). Cada tratamiento contó con cinco repeticiones (Fig. VIII). Transcurrido el periodo de exposición, los embriones se fijaron con unas gotas de formaldehído al 40%.

	Control negativo (AM)					Elutriado 100% (E100)					Elutriado 25% (E25)					Elutriado 10% (E10)				
Control (C)	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
Sedimentos estuarinos (SE)	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
Sedimentos marinos (SM)	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5

Figura VIII. Diseño experimental de los bioensayos de toxicidad con embriones de *M. quinquesperforata*. La letra R representa a cada repetición.

5.4 Respuestas observadas

Las respuestas biológicas que se registraron fueron las siguientes (Fernández, 2002):

- Éxito en la embriogénesis, es decir, el porcentaje de larvas pluteus normales (larva normal = aquella con los cuatro brazos bien separados) observadas después de la incubación.
- Longitud de las larvas, definida como la distancia desde el ápice hasta el extremo del brazo postoral siguiendo la línea lateral del cuerpo (Fig. IX).

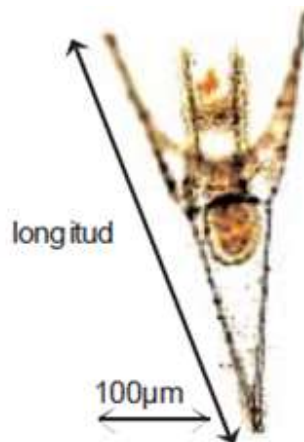


Figura IX. Larva pluteus normal desarrollada tras incubar los óvulos fecundados a 20° C durante 48 h, detalle a la línea lateral del cuerpo. Tomada de: "Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*" por Fernández, N. 2002, *Larva pluteus normal desarrollada tras incubar los huevos fecundados a 20°C durante 48 h*. Pág. 35.

- Estado de desarrollo de los embriones.

Se observó el estado embrionario a la que se detiene el desarrollo (mórula, blástula, gástrula y pluteus), tomando de ejemplo a Fernández (2002), que utilizó este parámetro de manera cualitativa para establecer el grado de toxicidad, ya que observó que el desarrollo embrionario de *P. lividus* se detuvo en fases cada vez más tempranas cuanto mayor era la concentración del tóxico (Fig. X).

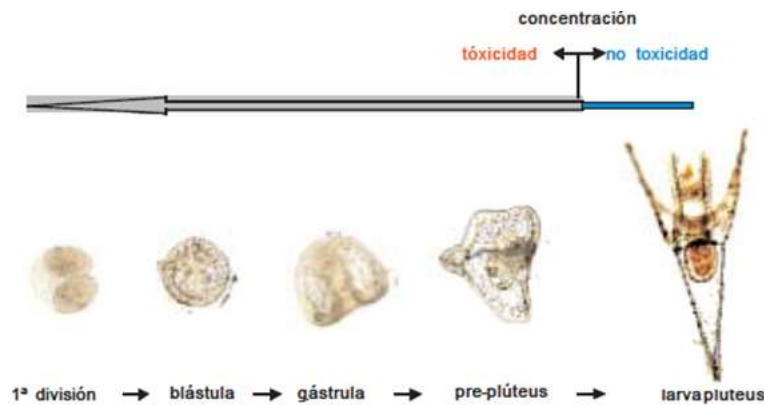


Figura X. Estado embrionario en el que se detiene el desarrollo en función de la concentración de un tóxico. Tomado de Fernández, 2002. Tomada de: "Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*" por Fernández, N. 2002, *Estado embrionario en el que se detiene el desarrollo en función de la concentración de un tóxico*. Pág. 36.

Después de la incubación se registraron las tres respuestas a partir de microfotografías. Por cada repetición se contabilizaron 50 individuos (en total 2500 organismos observados). Para obtener la medida de las larvas se utilizó el programa libre ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004). Las fases en las que se detuvo el desarrollo embrionario fueron determinadas comparando con las imágenes de desarrollo normal de *M. quinquesperforata* obtenidas en el presente trabajo (Fig. XV) asimismo usando como guía las fases descritas por Olivares-Bañuelos *et al.* (2012) para el erizo regular *Dendraster excentricus*.

Posteriormente, los datos obtenidos se analizaron mediante la aplicación de una prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad. En el caso del éxito en la embriogénesis dado en porcentaje, primero se transformaron los datos mediante el arcoseno. Finalmente, se aplicó una prueba ANOVA de un factor y test de Tukey, para la diferencia de

toxicidad entre los sitios de muestreo, mediante el programa Statistica 7 (StatSoft Inc., 2004) para Windows.

VI. Resultados

6.1 Caracterización de los sedimentos estuarinos

El resultado del análisis de la clase textural de la muestra de sedimentos estuarinos estableció que éstos se componen mayormente por arena (73.32%), seguida por limo (14.72%) y arcilla (11.96%) (Fig. XI). A partir de estos porcentajes se determinó la clase del sedimento resultando clasificada en la textura franco-arenosa, mediante el diagrama triangular de las clases texturales según el tamaño de las partículas de la Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Anexo 10.1, Fig. XVIII).

Respecto a los análisis químicos, los sedimentos estuarinos presentaron un porcentaje de materia orgánica (MO) de 6.76%, valor considerado como extremadamente rico en MO de acuerdo con la clasificación de Velasco (1983).

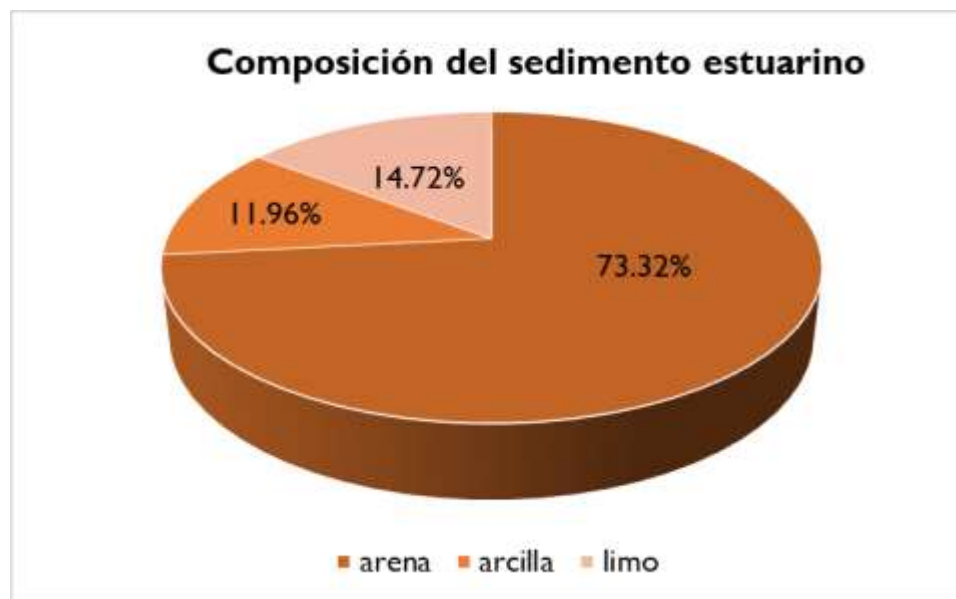


Figura XI. Porcentaje por grupo de partículas en la muestra de sedimentos estuarinos del ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.

6.2 Caracterización de los sedimentos marinos

En lo que respecta a los sedimentos marinos, éstos estuvieron conformados únicamente por partículas de arena de distinto tamaño de grano (Cuadro IV). La composición de esta muestra

se describe a continuación: la mayor porción es representada por granos de arena media, con un 80.41% (tamaño de partícula >0.297 mm), seguida por la arena fina con un 12.86% (partículas >0.149 mm) y la arena muy fina con 4.28% (<0.149 mm). Finalmente, las partículas de arena gruesa y muy gruesa fueron las proporciones más pequeñas, con 2.39% (>0.841 mm) y 0.06% (>2 mm) respectivamente (Fig. XII).

El contenido de materia orgánica obtenido para la muestra de sedimentos marinos presentó un valor de 0.47%, es decir, se trata de un sedimento extremadamente pobre en materia orgánica (Velasco, 1983).

Cuadro III. Porcentajes por tipo de arena obtenidos mediante el método de la columna de tamices, muestra de sedimentos marinos.

Tamiz	Peso retenido	Especificación	Porcentaje retenido por tipo de arena
10	0.0678	Arena muy gruesa (restos calcáreos)	0.06
20	2.6318	Arena gruesa	2.39
50	88.4537	Arena media	80.41
100	14.1415	Arena fina	12.86
200	4.6967	Arena muy fina	4.28
bandeja	0.0082		
peso total	109.9997		
% error	0.0004		

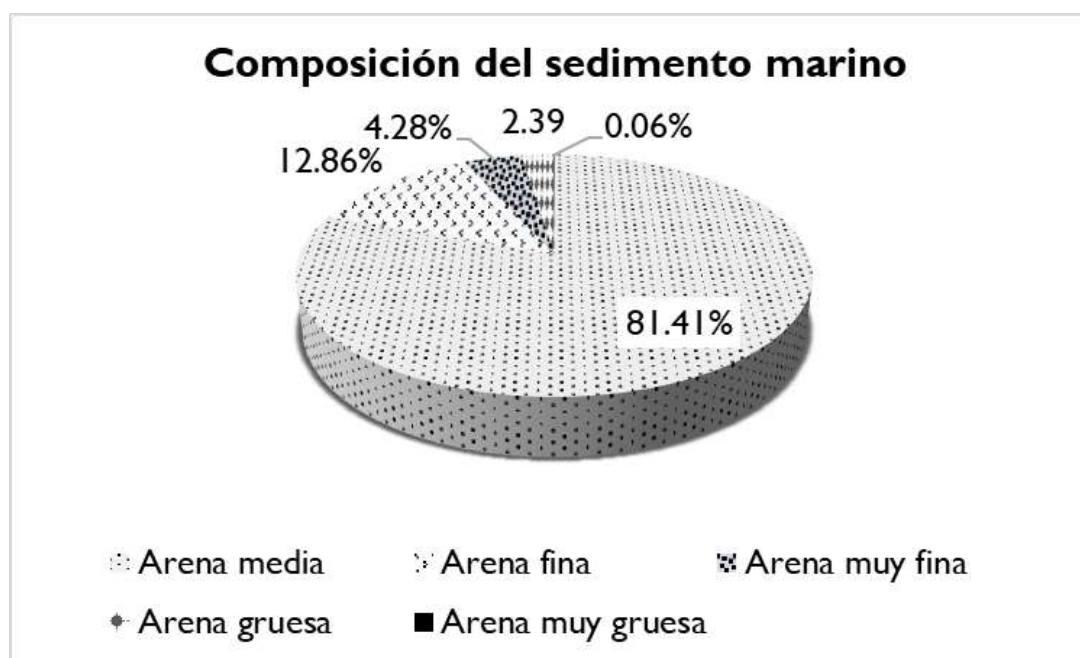


Figura XII. Porcentaje por grupo de partículas en la muestra de sedimentos marinos en el ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.

6.3 Cuantificación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's)

A partir de la extracción y cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo se obtuvieron los siguientes valores promedio: para los sedimentos estuarinos se registró un promedio de 21,248.51 mg kg⁻¹, mientras que para los sedimentos marinos el valor promedio fue de 8,835.80 mg kg⁻¹ (Cuadro V) estas concentraciones de HTP's representan la contaminación en los elutriados elaborados a partir de los sedimentos estuarinos y marinos, a los que estuvieron expuestos los óvulos fecundados de *M. quinquiesperforata*. En ambos casos la concentración de HTP's superó el límite máximo permisible en las tres fracciones de hidrocarburo, de acuerdo con el uso de suelo del área. Se utilizó la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 que indica los límites máximos permisibles de Hidrocarburos para el suelo, dado que no hay una norma específica para sedimentos.

Cuadro IV. Concentraciones de HTP's obtenidas de las muestras de sedimentos contaminados.

Muestra	% humedad	Media HTP's en mg kg ⁻¹	Límite máximo permisible en mg kg ^{1*}			
			Fracción ligera	Fracción media	Fracción pesada	Uso de suelo**
Sedimentos estuarinos	2.02	21248.51	200	1200	3000	Reserva turística/Reserva industrial

Sedimentos marinos	0.07	8735.80	200	1200	3000	Residencial/Recreativo
--------------------	------	---------	-----	------	------	------------------------

Nota: *Valores de referencia tomados de la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013). **De acuerdo con el Programa de Desarrollo Urbano del centro de población de Tuxpan, Veracruz (Gaceta oficial del Estado de Veracruz, 2012).

6.4 Éxito en la embriogénesis de *M. quinquiesperforata*

Respecto al éxito en la embriogénesis, se observó que en todos los tratamientos se superó el 95% de larvas normales (Fig. XIII). Por su parte, el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($F=3.69$; $p=0.0013$). Mediante la prueba de Tuckey se designaron los siguientes grupos de acuerdo con las diferencias estadísticamente significativas: **a**, conformado por los tratamientos C E10, C E25, SM E25, SE E10, SE E25 y SE E100, en los cuales se obtuvo un éxito de entre el 98 y 99.6%. Por otra parte, el grupo **ab** integrado por AM, C E100 y SM E10, en los cuales se alcanzó un 100% de éxito; finalmente el tratamiento SM E100, identificado como **ac**, en el cual se observó el menor porcentaje de éxito (96.4%) y que, además, presenta diferencias significativas con el control negativo AM y el resto del grupo **ab**.

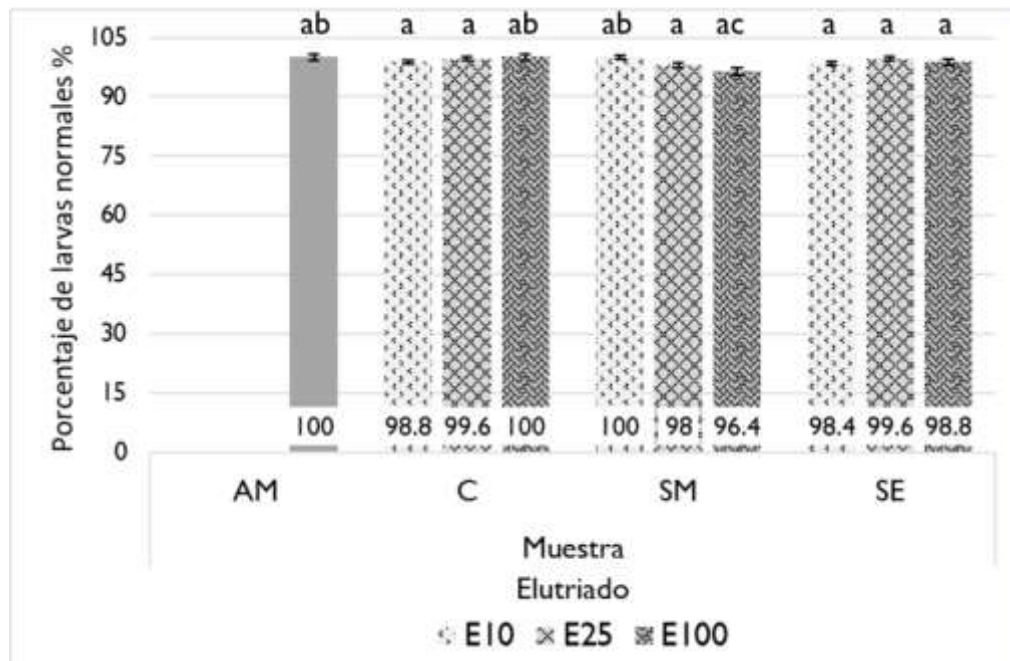


Figura XIII. Porcentaje de éxito en la embriogénesis (larvas normales) de *M. quinquiesperforata* observado después de 48 h de incubación en los tratamientos experimentales. AM= agua de mar

(control negativo), C= sustrato control, SM= sedimentos marinos, SE= sedimentos estuarinos. E10= elutriados en dilución al 10%, E25= elutriados en dilución al 25%, E100= elutriados puros o 100%. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.5 Longitud de las larvas de *M. quinquiesperforata*

En el caso de este parámetro, el efecto tóxico de los elutriados fue evidente en la disminución de la longitud de los organismos con respecto al tratamiento AM, incluso en los elutriados del sustrato control C. El promedio de mayor longitud alcanzada después de la incubación se registró en las larvas de AM, con $385.92 \mu\text{m}$ (Fig. XIV) (a), mientras que el promedio de longitud mínima ($189.45 \mu\text{m}$) se presentó en SE E100 (f), es decir, la muestra la mayor concentración de hidrocarburos. El ANOVA indica diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 81.5920$; $p = 9.39\text{E-}27$). El análisis post-hoc muestra que todos los tratamientos tienen diferencias significativas respecto al control negativo AM, excepto la longitud promedio alcanzada en SM E25 (ad) (Fig. XV).



Figura XIV. Comparación de la longitud alcanzada por las larvas pluteus de *M. quinquiesperforata*. Del tratamiento AM o control negativo (a) y del tratamiento SE E100 (b).

Siguiendo con esta variable respuesta, se observó que después del promedio de longitud de AM, el grupo en donde se encontraron las larvas de mayor talla fueron los de SM. El tratamiento SM E25 fue el segundo con mayor longitud promedio registrada, con $351.87 \mu\text{m}$ (ad), seguido por SM E10 (de) con $338.15 \mu\text{m}$ y, por último, SM E100 (bd) con $301.24 \mu\text{m}$. El siguiente grupo en orden de longitud fue el de C, con el tratamiento C E10 (bd), con un promedio de $265.55 \mu\text{m}$. A continuación, con una longitud de $261.07 \mu\text{m}$ y $245.60 \mu\text{m}$, los tratamientos C E25 (bc) y C E100 (b) respectivamente. Finalmente, el grupo de SE, en donde se observó un efecto de disminución de la longitud promedio de las larvas

en relación con la concentración del elutriado: en el tratamiento de menor concentración, es decir SE E10 (**bc**), se registró un promedio de 292.03 μm ; en SE E25 (**b**) fue de 268.59 μm y, para concluir, en el elutriado SE E100 (**f**), se observó el menor promedio de longitud alcanzado en todos los tratamientos.

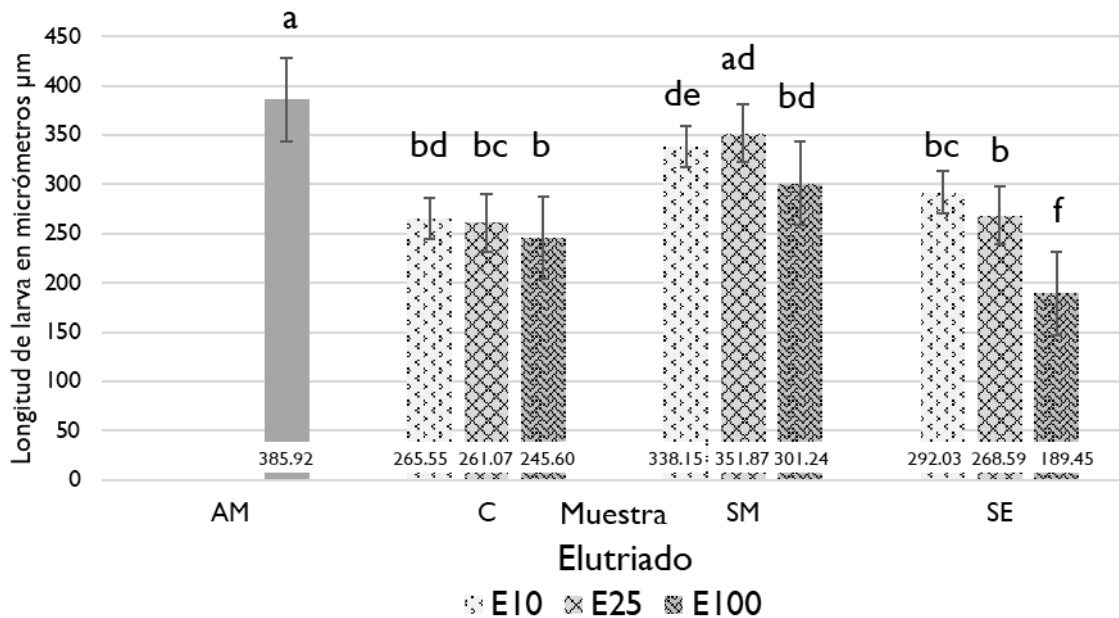


Figura XV. Longitud promedio de *M. quinquiesperforata* observada después de 48 h de incubación en los tratamientos experimentales. AM= agua de mar (control negativo), C= sustrato control, SM= sedimentos marinos, SE= sedimentos estuarinos. E10= elutriados en dilución al 10%, E25= elutriados en dilución al 25%, E100= elutriados puros o 100%. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.6 Estado de desarrollo de *M. quinquiesperforata*

A continuación, se presentan las fases del desarrollo normal de *M. quinquiesperforata* observadas a partir de óvulos fecundados depositados en agua de mar. Se fotografiaron ocho fases del desarrollo (Fig. XVI), iniciando con el óvulo fecundado (a) y seguido de las divisiones que dieron lugar al estado de dos (b), cuatro (c), ocho (d) y 32 células (e), respectivamente. Consecutivamente se identificó la fase de mórula (f), la larva pluteus de 24 horas posterior a la fecundación (g) y finalmente, la larva pluteus a las 48 horas post fecundación (h).

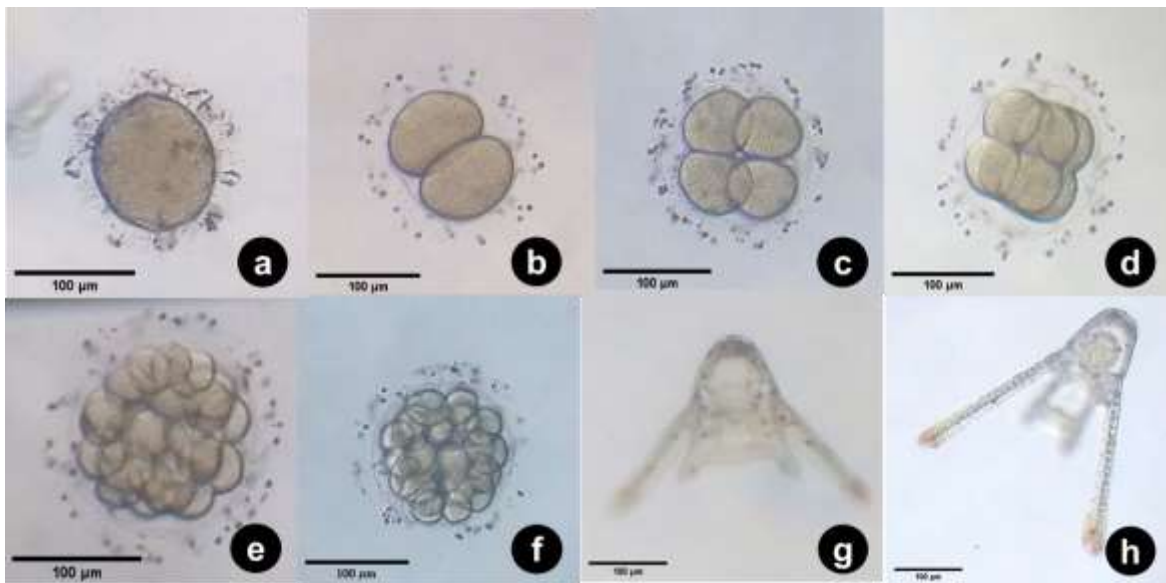


Figura XVI. Desarrollo embrionario normal de *M. quinquiesperforata*. Microfotografías del gameto femenino de la galleta de mar y sus fases de división celular posteriores al proceso de fertilización: (a) óvulo fecundado; (b) estadio de 2 células; (c) estadio de 4 células; (d) estadio de 8 células; (e) estadio de 32 células; (f) mórula; (g) larva pluteus 24 h después de la fecundación; (h) larva pluteus 48 h posterior a la fecundación.

Posterior a la incubación, se registraron tres de las fases de desarrollo de *M. quinquiesperforata* (Fig. XVII): de las 2500 muestras observadas en el presente trabajo, el 98.96% correspondieron a la fase de larva pluteus de cuatro brazos, es decir, presentaron un desarrollo completo. Por otra parte, el estado de blástula conforma el 0.72% y el óvulo fecundado fue el estado observado con menos frecuencia, con el 0.32%, del total. Se observó que el desarrollo embrionario de *M. quinquiesperforata* se detuvo en las fases más tempranas conforme la concentración del contaminante presente en los sedimentos, como se describe en los siguientes casos: en SM E25 se encontraron 5 blástulas y en el tratamiento de SM E100 se observaron 9. Cabe mencionar que la fase de blástula no se observó durante el registro para la guía de desarrollo normal, pero se presentó después de la exposición en los tratamientos experimentales (Fig. XVIII). Respecto a los tratamientos de SE (mayor concentración de HTP's), se encontraron 4, 1 y 3 óvulos fecundados en los elutriados E10, E25 Y E100, respectivamente.

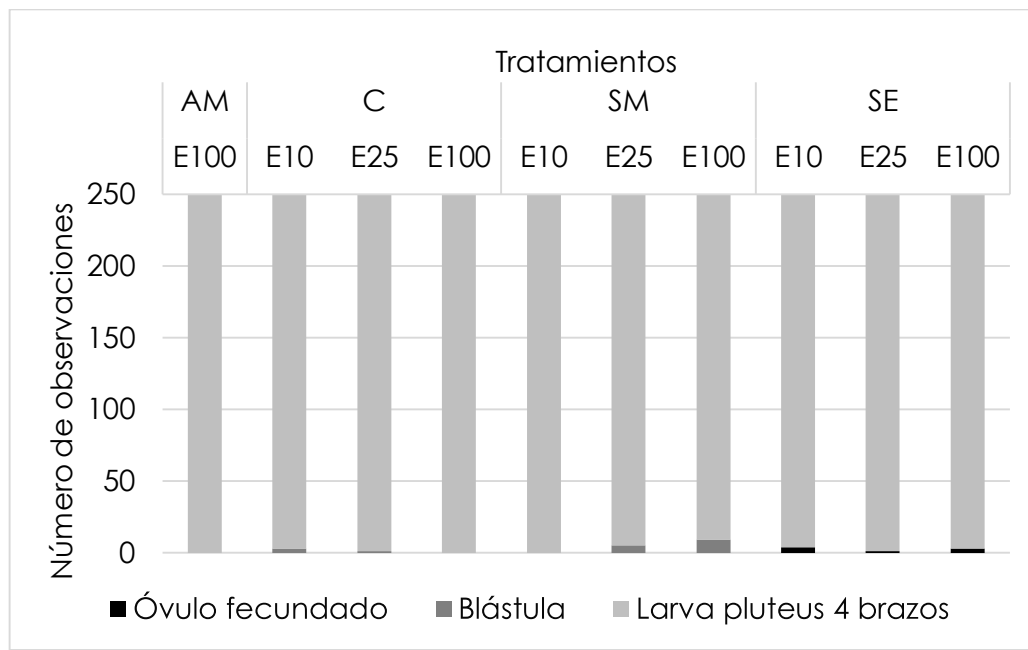


Figura XVII. Recuento de observaciones de *M. quinquiesperforata* por estado de desarrollo después de 48 h de incubación en elutriados E10, E25 y E100 de SM y estuarinos contaminados con hidrocarburos y un sedimento comercial como control. Longitud promedio de *M. quinquiesperforata* observado después de 48 h de incubación en los tratamientos experimentales. AM= agua de mar (control negativo), C= sustrato control, SM= sedimentos marinos, SE= sedimentos estuarinos. E10= elutriados en dilución al 10%, E25= elutriados en dilución al 25%, E100= elutriados puros o 100%. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

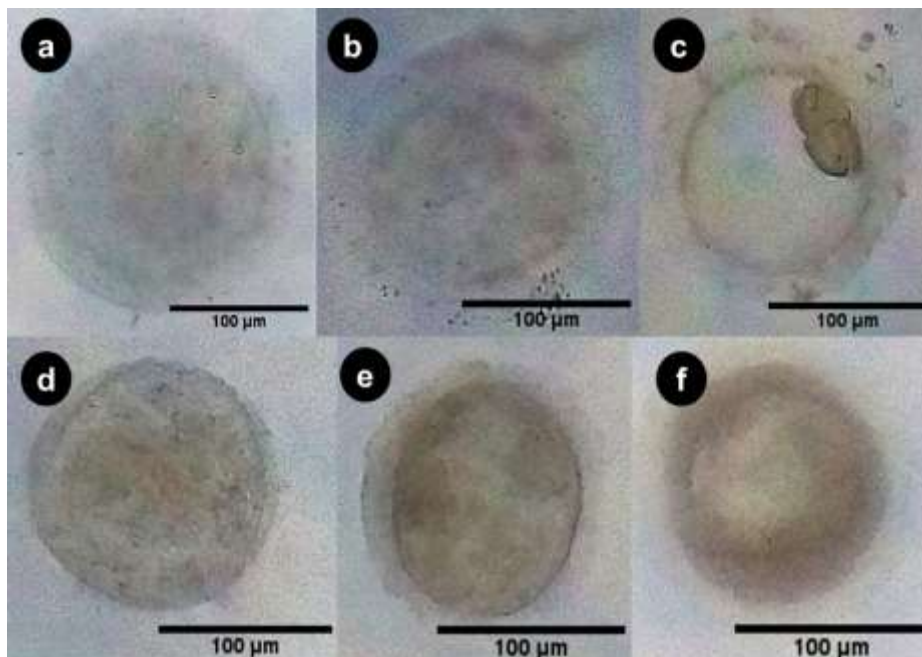


Figura XVIII. Blástulas de *M. quinquiesperforata* observadas después de la exposición en los elutriados de sedimentos marinos: (a), (b) y (c) corresponden a blástulas que se expusieron al elutriado de sedimentos marinos en dilución del 25%; (d), (e) y (f), blástulas del elutriado de sedimentos marinos al 100%.

VII. Discusión

7.1 Caracterización de los sedimentos contaminados

En el presente estudio se analizaron dos muestras de sedimentos con diferentes composiciones. La muestra de SE, integrada principalmente por arena y con menores porcentajes de limo y arcilla, además es rica en materia orgánica (MO). Por otra parte, los SM en los que predominan las arenas medias y bajo porcentaje de MO, lo que coincide con lo reportado para otras playas mexicanas del Golfo de México (Rocha-Ramírez *et al.*, 2016; Bojórquez-Sánchez *et al.*, 2018; Guerra-Castro *et al.*, 2020; Vázquez, 2020). De acuerdo con Rosas-Mendoza y López-Monroy (2014) el tamaño de los sedimentos influye en los materiales orgánicos presentes, ya que establecen que, con menor tamaño de grano mayor es la acumulación de MO. Este fue el caso de las muestras estudiadas: los SM conformados por las arenas de mayor tamaño de grano (Fournier, 1993) presentaron menor contenido de MO en comparación con los SE, que contienen limo y arcilla de menor tamaño de partícula por lo que propician un mayor contenido de MO. Además, Marín y colaboradores (2016), afirman que esta carga es un atributo característico de los ecosistemas de manglares, como el observado en los márgenes del estero del ejido Emiliano Zapata en Tuxpan, Veracruz.

En relación con la presencia del contaminante, la muestra de SE fue la de mayor concentración cuantificada en comparación con la de SM, ya que se observó una diferencia de 12,512.71 mg kg⁻¹ de HTP's entre ambas. Esta variación se puede relacionar a que los bosques de manglar funcionan como trampas de sedimentos que reducen los flujos de marea e inducen la sedimentación de las partículas en la marea baja (Barrantes y Cerdas, 2015); por el contrario, en la zona marina, el efecto de los vientos y las velocidades de las corrientes se involucran con los procesos de transporte y destino de los derrames de petróleo (Otero-Díaz *et al.*, 2014). La composición de los sedimentos también puede ser un factor que influye en la concentración de los HTP's, ya que es más probable que los hidrocarburos se acumulen en sedimentos de grano fino con alto contenido de carbono orgánico (Baali y Yahyaoui, 2019), como es el caso de los SE, mientras que en los SM se observó una menor concentración, relacionado a las partículas de arena de mayor tamaño (Fournier, 1993).

Los autores Fernández y colaboradores (2006), cuantificaron la concentración de hidrocarburos totales en sedimentos afectados por el derrame del *Prestige*. En cuatro de las

ocho estaciones muestreadas los valores estuvieron por debajo del límite de detección ($< 0.01 \text{ mg kg}^{-1}$), mientras que en los demás se obtuvo un valor máximo de 260 mg kg^{-1} y un mínimo de 1.30 mg kg^{-1} . Dichas cantidades se encuentran muy por debajo de las obtenidas en el presente estudio. Se podría atribuir esta diferencia al tiempo transcurrido desde el evento de derrame y la frecuencia en que éstos suceden. Por ejemplo, el desastre del *Prestige* ocurrió en el año 2002 y los sedimentos se recolectaron en el 2006, lapso en el que pudieron ocurrir distintos mecanismos de degradación del contaminante (Otero-Díaz *et al.*, 2014). Por otra parte, los SM y SE del ejido el Sacrificio, son afectados constantemente debido a la conexión con instalaciones petroleras (Aguilera *et al.*, 2016; ASEA, 2018; Diario Vanguardia de Veracruz, 2018).

Por otra parte, Ramos y colaboradores (2012) expusieron larvas del camarón *Litopenaeus vannamei* a sedimentos marinos afectados directamente por una refinería petrolera en Venezuela. Los autores cuantificaron concentraciones de HTP's relativamente elevadas ($>10,000 \text{ mg kg}^{-1}$) en los sedimentos aledaños a la refinería. Ellos mismos establecen que las refinerías de la zona noroeste de Venezuela procesan un volumen alto de barriles de hidrocarburos diariamente (940,000 barriles) y operan desde hace 60 años, por lo que los sedimentos de la zona se pueden considerar impactados por dicho tráfico. En contraste, en el presente estudio se obtuvieron valores de HTP's menores a los observados por los autores mencionados. Esta variación podría atribuirse al tiempo en que ha estado en funcionamiento cada instalación petrolera y el volumen manejado, además de los factores ambientales que pudieran intervenir en la dispersión del combustible al momento del derrame (Otero-Díaz *et al.*, 2014).

De acuerdo con Marín y colaboradores (2016), el estudio de los sedimentos contaminados es crucial dado que este compartimento ambiental funciona como trampa natural y es el principal reservorio de sustancias de origen antrópico. En este sentido es importante mencionar que en México no existe una ley o normativa oficial que regule los límites máximos permisibles de contaminación por hidrocarburos en sedimento. En el ámbito internacional existe la referencia establecida por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO, 1976), que indica un límite máximo permisible de $70 \mu\text{g/g}$ de hidrocarburos totales en sedimentos, sin embargo, se trata de un valor guía y no tiene una aplicación estricta como en el caso de una norma o ley (Valenzuela

et al., 2005). En el presente estudio se utilizó de referencia la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (que establece los límites máximos de hidrocarburos permisibles en suelos); ambas muestras superaron los límites para las fracciones ligera, media y pesada del hidrocarburo, lo que destaca la necesidad de una norma que regule la contaminación por hidrocarburos en sedimentos marinos y costeros. Los hidrocarburos pueden ocasionar un severo daño biológico al tratarse de ecosistemas importantes para la reproducción, alimentación y cría de organismos, además de ser zonas productivas para la pesca, lo que lo convierte en un problema de salud pública (Recabarren-Villalón *et al.*, 2019).

7.2 Bioensayos de embriogénesis con *M. quinquiesperforata*

La especie de erizo de mar *M. quinquiesperforata* ha sido estudiada desde varios enfoques: descripción morfológica (Francisco y Pauls, 2008), relaciones filogenéticas (Coppard *et al.*, 2013; Coppard y Lessios, 2017), distribución, diversidad y abundancia (García, 1996; Borrero-Pérez *et al.*, 2012; González-Gándara *et al.*, 2015; Quirós-Rodríguez, 2015), relaciones simbióticas (Bell y Stancyk, 1983; Bell, 1988; Lima *et al.*, 2014), índice gonadal con métodos histológicos (Tavares y Borzone, 2006), e incluso se han sentado las bases para su uso como organismo modelo (Laitano *et al.*, 2008) mediante las cuales más recientemente, se ha evaluado el efecto tóxico de agentes anticancerígenos (Mello *et al.*, 2020). A pesar de dichos antecedentes, la toxicidad de sedimentos contaminados por hidrocarburos no había sido reportada con anterioridad. Además, en el presente trabajo se aporta el registro de las primeras fases del desarrollo embrionario de esta especie, en las que se observó similitud con el desarrollo de *D. excentricus*, otra especie de equinoideo regular característico de las costas del Pacífico (Olivares-Bañuelos *et al.*, 2012).

Respecto a los resultados de los bioensayos, en el elutriado E100 de los SE, es decir, de la muestra de sedimentos con la mayor concentración de HTP's cuantificados, fue en el que se presentó la mayor toxicidad para el desarrollo de *M. quinquiesperforata*, con el 3.6% de inhibición sobre el desarrollo embrionario. El pH del elutriado fue de 8.27, este valor se encuentra dentro del rango establecido por Laitano y colaboradores (2008) como condición óptima para las pruebas de toxicidad con esta especie; en cambio la salinidad estuvo unos puntos por encima del requisito ($33.85 > 29 \pm$), sin embargo, es cercano al valor de 31 UPS reportado para el área de la playa de Tuxpan (Gallegos *et al.*, 2018), en donde los organismos

adultos fueron recolectados. Al cumplir los requerimientos de los bioensayos, la toxicidad observada en este elutriado podría atribuirse principalmente a la contaminación por hidrocarburos (Fernández *et al.*, 2006).

Por su parte, Fernández y colaboradores (2006), evaluaron el desarrollo de *Paracentrotus lividus* expuesto a lixiviados de sedimentos con diferentes grados de contaminación por petróleo crudo; a diferencia del presente trabajo ellos observaron que el desarrollo embrionario fue nulo en los tratamientos donde se utilizaron las muestras de dos de las estaciones con los niveles de hidrocarburos más altos. En el caso de Lukyanova *et al.* (2017), utilizaron al erizo irregular *Scaphechinus mirabilis* como bioindicador de la calidad de agua de zonas marinas y costeras en donde se extrae petróleo y gas. Los resultados presentaron un bajo o nulo porcentaje de éxito en el desarrollo embrionario después de la incubación en los sitios con los niveles más altos de hidrocarburos del petróleo y donde también persisten otros contaminantes.

La diferencia entre los estudios anteriores en donde el desarrollo embrionario fue afectado por la toxicidad del contaminante al grado de interrumpir el proceso, en comparación con la presente investigación en donde se alcanzó un alto porcentaje de larvas desarrolladas en todos los tratamientos experimentales puede atribuirse a dos causas: la presencia de otros contaminantes y la diferencia en la biodisponibilidad de la fracción tóxica del contaminante (Fernández *et al.*, 2006; Jiménez y Guerra, 2016). Esto en consecuencia de la transferencia efectiva de la fracción más tóxica de los hidrocarburos de los sedimentos a la columna de agua en los estudios de Fernández *et al.* (2006) y Lukyanova *et al.* (2017), mientras que en el presente estudio la transferencia podría ser menos efectiva. En este sentido, se entiende por biodisponibilidad a la facilidad relativa con la que un compuesto puede ser usado, biotransformado o degradado por un organismo e implica dos aspectos: la tasa de transporte de masa desde el medio ambiente hasta el organismo, además de la fracción de contaminantes que realmente atraviesan la membrana celular (Jiménez y Guerra, 2016; Chen *et al.*, 2019).

La propuesta anterior tiene fundamento en que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son el principal grupo de contaminantes que causan la toxicidad de los combustibles sobre los organismos marinos (Pelletier *et al.*, 1997). Cabe mencionar que la

biodisponibilidad de éstos depende de otros factores relacionados con los mismos compuestos (propiedades fisicoquímicas), los organismos (tipo y condición) y las características del sedimento contaminado (Fernández *et al.*, 2006). Dadas la hidrofobicidad y baja solubilidad que presentan, los HAP's tienden a adsorberse a las partículas en función de su contenido de materia orgánica y tamaño de grano: los de alto peso molecular son menos solubles, se adsorben/asocian con mayor facilidad a las partículas suspendidas en la columna de agua y terminan depositándose en el fondo e integrándose a los sedimentos (no presentan toxicidad aguda pero si efectos subletales después de exposiciones crónicas), en cambio los HAP's de bajo peso molecular son más solubles y dominan la fase disuelta del agua (toxicidad aguda) (Recabarren-Villalón *et al.*, 2019).

Las características físicas y químicas de los sedimentos también influyen en el comportamiento de los contaminantes. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede afectar la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos, siendo las partículas finas especialmente susceptibles para asociarse con los contaminantes (Vaezzadeh *et al.*, 2019). Por otra parte, el alto contenido en carbono orgánico disminuye la disponibilidad de los compuestos hidrofóbicos, particularmente los HAP's se adsorben fuertemente a la fracción orgánica de los suelos y no penetran profundamente en ellos, limitando la lixiviación y la disponibilidad para ser absorbidos (Abdel-Shafy y Monsour, 2016). Otra condición que interviene en la disponibilidad de los tóxicos es la degradación de los compuestos con respecto al tiempo. En los sedimentos/suelos y la parte más alta de la columna de agua, la degradación de los HAP's, en específico los de menor peso molecular, se produce mediante fotooxidación (Baali y Yahyaoui, 2019). En consecuencia, el vertido se enriquece de compuestos de alto peso molecular, que son menos solubles y de baja toxicidad aguda para los organismos de la columna de agua (Fernández *et al.*, 2006).

Ahora bien, en el presente trabajo el menor porcentaje de éxito en la embriogénesis lo produjo el elutriado E100 de SM. Esta muestra al conformarse por partículas de arena media y ser pobre en materia orgánica (Fig. 13) es poco susceptible a la adsorción de los HAP's de mayor peso molecular, por lo tanto, su efecto puede relacionarse a la toxicidad aguda de la fracción soluble de los hidrocarburos policíclicos aún presentes en la muestra. Lo anterior considerando que la zona donde fueron recolectados dichos sedimentos fue afectada por un derrame de hidrocarburos por fuga en un ducto entre una plataforma marina

y una batería de separación en tierra (ASEA, 2018; Diario Vanguardia de Veracruz, 2018) aproximadamente un año antes de la toma de la muestra.

Referente a la longitud de *M. quinquiesperforata*, se observó una reducción significativa de la talla alcanzada por las larvas después de la incubación en el control negativo (AM) y los tratamientos de sedimentos. La diferencia máxima ocurrió entre las larvas de AM y las expuestas al elutriado E100 de SE. En este caso, los sedimentos son ricos en materia orgánica y se ven influenciados por un ecosistema de manglar que propicia la sedimentación de los hidrocarburos contaminantes, por lo que teóricamente se puede tratar de HAP's de mayor peso molecular. Dichos contaminantes se caracterizan por los efectos subletales, lo que explicaría el por qué no se inhibió totalmente el éxito en la embriogénesis, pero sí hubo un efecto negativo en la longitud de larvas. Cabe mencionar que se necesitan análisis complementarios para determinar la fracción específica de hidrocarburos que está presente en los sedimentos estudiados en la presente investigación, debido a que los HTP's incluyen tanto a los hidrocarburos alifáticos como a los aromáticos (Ponce y Botello, 2005).

Finalmente, en el recuento del estadio de desarrollo de los organismos después de la exposición se observaron las etapas de óvulo fecundado y blástula, además de la larva pluteus de cuatro brazos. De acuerdo con Fernández-Rodríguez (2002), el desarrollo embrionario se detiene en fases cada vez más tempranas cuanto mayor es la concentración del tóxico. Aplicando ese razonamiento a la presente investigación, se entiende por las concentraciones de HTP's cuantificadas en cada muestra de sedimentos, que en los SE la concentración del tóxico es mayor que en los SM, sin embargo, desde el punto de vista de la respuesta biológica, en los SM la toxicidad se presentó con efectos letales, ya que los tratamientos de esta muestra se presentaron los menores porcentajes de éxito en la embriogénesis, mientras que en los SE los efectos observados son de tipo subletal, ya que aunque si se alcanzó el estado de larva de cuatro brazos, se observó una notable reducción de la longitud de las larvas en comparación con el control C.

VIII. Conclusiones y aplicación práctica del trabajo

8.1 Conclusiones

En el presente trabajo de intervención se realizaron bioensayos de exposición de embriones del erizo irregular *M. quinquesperforata* a elutriados de sedimentos contaminados con hidrocarburos. En lo que respecta al análisis físico de los sedimentos, se concluye que las dos muestras de sedimentos contaminados utilizados para la fase experimental son diferentes entre sí, dadas sus características físicas y químicas (porcentaje de humedad, porcentaje de materia orgánica, concentración media de HTP's, clase textural y composición granulométrica). Estas diferencias, además, son atribuibles al ambiente de origen de ambos tipos de sedimento. Cabe mencionar que la caracterización de los sedimentos permite relacionar el efecto de los contaminantes sobre los organismos en los bioensayos de toxicidad, obteniendo una evaluación completa en los estudios de contaminación ambiental.

En cuanto al desarrollo embrionario de *M. quinquesperforata*, el menor porcentaje de desarrollo se observó en el elutriado E100 de SM (96.4%). En cuanto a la respuesta de longitud de las larvas, se observó una diferencia significativa (menor longitud) en las larvas expuestas al elutriado E100 de SE, en comparación con las larvas del control negativo AM. Por otra parte, en el recuento de organismos por estado en el que se detuvo el desarrollo durante la exposición a los elutriados, se encontró que el 98.96% alcanzó la etapa de larva pluteus de 4 brazos. Sin embargo, se evidenció que el estadio de óvulo fecundado, siendo la etapa más temprana alcanzada, se presentó en los tratamientos con mayor concentración de HTP's, es decir, los elutriados de sedimentos estuarinos SE. En la presente investigación no se registraron malformaciones durante el desarrollo embrionario de *M. quinquesperforata*.

El análisis de las tres respuestas biológicas registradas concluye en que en los sedimentos marinos la toxicidad se manifiesta con efectos letales al reducir en la embriogénesis, mientras que en los estuarinos los efectos son subletales al presentarse la reducción de la longitud de las larvas. Relacionado al estado de desarrollo, la concentración del tóxico es mayor en los sedimentos del estuario que la de los sedimentos de la playa.

Finalmente, se concluye que se cumplieron los tres objetivos particulares planteados originalmente en el trabajo, aportando el conocimiento metodológico y práctico en el

desarrollo de esta herramienta de evaluación ambiental en la que se propuso utilizar como bioindicador a un erizo irregular específicamente para este tipo de experimentos en donde se busca evaluar la toxicidad de sedimentos contaminados con hidrocarburos. Así mismo, se incluye una guía fotográfica de las primeras fases de desarrollo embrionario de *M. quinquesperforata*, como punto de comparación para este tipo de bioensayos. Cabe destacar que se trata de un estudio integral, que combina los datos del efecto biológico observado, la cuantificación de los contaminantes y la caracterización de la matriz ambiental en la que se llevó a cabo la investigación.

8.2 Aplicación práctica del trabajo

Los derrames y liberaciones de hidrocarburos del petróleo en ecosistemas marinos y costeros son problemas recurrentes en el escenario mundial contemporáneo. Este tipo de contaminantes se acumula en el sedimento del fondo de la columna de agua, afectando a los organismos que se alimentan o habitan allí. Es una necesidad latente el desarrollo de métodos estandarizados de evaluación y monitoreo de los efectos biológicos de la contaminación ambiental, empleando especies sobre las que se tenga suficiente conocimiento. Cabe recalcar la necesidad de monitorear los efectos de estos derrames, no sólo determinando cuantitativamente la concentración del contaminante, si no también observando los efectos de estas sustancias sobre los organismos que habitan los ecosistemas afectados y la toxicidad que representan para éstos.

La información generada en el presente trabajo es de interés académico, técnico y científico, puesto que a partir de este tipo de experimentos pueden surgir nuevas líneas de investigación, ya que se trata de un ámbito poco explorado en nuestro país. Así también, el desarrollo del proyecto expande el campo de aplicación de la biotecnología ambiental, al representar una herramienta de monitoreo de accesible, rápida y confiable que permite estudiar la contaminación por hidrocarburos en sedimentos marinos y costeros. Un punto para destacar es que se generó el registro fotográfico de desarrollo normal de las larvas de *M. quinquesperforata* para complementar las observaciones del efecto tóxico del hidrocarburo. Esto no se ha observado en otros trabajos publicados por lo que representa una aportación destacada.

Los bioensayos de toxicidad contribuyen al conocimiento de los efectos concretos de una sustancia tóxica sobre un organismo modelo. Estos pueden manifestarse en la generación de anomalías morfológicas de los organismos, el impedimento del desarrollo embrionario o la mortalidad de los embriones. Todos estos conocimientos ayudan al entendimiento de las repercusiones del tóxico no sólo a nivel de la especie, sino que también brindan información sobre los posibles efectos en otros organismos pertenecientes al ecosistema afectado, lo que implica la posibilidad de visibilizar los efectos de la contaminación. Otro aspecto relevante es que, el continuo desarrollo e innovación de las sustancias de uso industrial, médico, agrícola o pecuario, también implica el aumento de sustancias con algún potencial tóxico. En este sentido, los bioensayos de toxicidad utilizando embriones del erizo *Mellita quinquiesperforata* son una herramienta con potencial de uso en el estudio de aquellas sustancias con efectos tóxicos desconocidos.

IX. Referencias

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36–42.
- Acosta-González, A., Martirani-von Abercron, S.-M., Rosselló-Móra, R., Wittich, R.-M., & Marqués, S. (2015). The effect of oil spills on the bacterial diversity and catabolic function in coastal sediments: a case study on the Prestige oil spill. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(20), 15200–15214.
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA). 1996. Método 3540C. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical method.
- Agencia de Seguridad, Energía y Ambiente (22 de Julio de 2018). Moviliza ASEA personal que participa en la atención de fuga de hidrocarburo en Tuxpan, Veracruz. Recuperado el 12 de septiembre de 2019, de Gobierno de México website: <https://www.gob.mx/asea/prensa/moviliza-asea-personal-que-participa-en-la-atencion-de-fuga-de-hidrocarburo-en-tuxpan-veracruz?idiom=es>
- Aguilera, N. L. F., Ramírez Rodríguez, A., Torres Meza, G., Castro Ríos, L. A. M., Inciarte Fermín, G. R., & Robles Cortés, J. F. (2016). Procedimiento innovador en sitio para el reacondicionamiento de árboles y cabezales en plataformas marinas para el desarrollo de campos maduros en el Golfo de México. *Ingeniería petrolera*, 56(8), 444–452.
- Alvarado, J. J., & Solís-Marín, F. A. (2013). Echinoderm research and diversity in Latin America. En J. J. Alvarado & F. A. Solis-Marin (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America* (pp. 1–9). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) y Water Pollution Control Federation (WPCF). (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Anselmo, H. M. R., Koerting, L., Devito, S., van den Berg, J. H. J., Dubbeldam, M., Kwadijk, C., & Murk, A. J. (2011). Early life developmental effects of marine persistent organic pollutants on the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(8), 2182–2192.
- ASTM D5369-93. 2003. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using soxhlet extraction. Environmental Assessment, Book of Standards. Vol. 11, 04.
- Baali, A., & Yahyaoui, A. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their influence to some aquatic species. En M. Ince, O. Kaplan Ince, & G. Ondrasek (Eds.), *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials* (pp. 199–218). IntechOpen.
- Bao, M., Pi, Y., Wang, L., Sun, P., Li, Y., & Cao, L. (2014). Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environmental Science Processes & Impacts*, 16(4), 897–903.
- Barrantes, L. R. M., & Cerdas, S. A. (2015). Distribución espacial de las especies de mangle y su asociación con los tipos de sedimentos del sustrato, en el sector estuarino del Humedal Nacional Terraba-Sierpe, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 47–60.

- Beiras, R., Bellas, J., Fernández, N., Lorenzo, J. I., & y Cobelo-García, A. (2003). Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine environmental research*, 56(4), 531-553.
- Beiras, R., Fernández, N., Bellas, J., Besada, V., González-Quijano, A., & y Nunes, T. (2003). Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere*, 52(7), 1209-1224.
- Beiras, R., Vázquez, E., Bellas, J., Lorenzo, J. I., Fernández, N., Macho, G., ... Casas, L. (2001). Sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52(1), 29-32.
- Beiras, R.; Durán, I.; Bellas, J. y Sánchez-Marín, P. (2012) *Biological effects of contaminants: Paracentrotus lividus sea urchin embryo test with marine sediment elutriates*. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 51, 13 pp. DOI: <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-262>
- Bell, J. L., & Stancyk, S. E. (1983). Population dynamics and reproduction of *Dissodactylus mellitae* (Brachyura: Pinnotheridae) on its sand dollar host *Mellita quinquesperforata* (Echinodermata). *Marine ecology progress series*, 13, 141-149.
- Bell, Janice L. (1988). Distribution and abundance of *Dissodactylus mellitae* Rathbun (Pinnotheridae) on *Mellita quinquesperforata* (Leske) (Echinodermata). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 117(2), 93-114.
- Bojórquez-Sánchez, S., Marmolejo-Rodríguez, A. J., Ruiz-Fernández, A. C., Sánchez-González, A., Sánchez-Cabeza, J.-A., Bojórquez-Leyva, H., ... Hascibe., L. (2018). Enriquecimiento natural de níquel y vanadio en núcleos de sedimento cercanos a sitios de extracción de crudo en el Golfo de México. *Revista Internacional de Contam*, 34(4), 713-723.
- Bonanno, G., & Orlando-Bonaca, M. (2018). Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 209-221.
- Borrero-Peréz, G. H., Benavides-Serrato, M., & Díaz-Sánchez, C. M. (2012). *Equinodermos del Caribe colombiano II: Echinoidea y Holothuroidea*. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR.
- Cabrera, M. H. (1975). Origen y transporte de sedimentos en estuarios. *Ciencias Marinas*, 2(1), 106-113.
- Casado Martínez, M. C., Fernández, N., Lloret, J., Marín, A., Martínez Gómez, C., López, I. R., ... del Valls Casillas, T. A. (2006). Ejercicio interlaboratorio con bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros. III. Bioensayo con embriones del erizo de mar "*Paracentrotus lividus*". *Ciencias marinas*, 32(1), 139-147.
- Cervantes, A. S. A. (2017). *Evaluación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) de sedimentos contaminados del estero Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz*. Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz.

- Cesar, A., Marín-Guirao, L., Vita, R., & Marín, A. (2004). Amphipod and Sea Urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. *Scientia marina*, *68*(S1), 205–213.
- Chen, C.-H., Liu, P.-W. G., & Whang, L.-M. (2019). Effects of natural organic matters on bioavailability of petroleum hydrocarbons in soil-water environments. *Chemosphere*, *233*, 843–851. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.202
- Conley, J. M., & Richards, S. M. (2008). Teratogenesis. En S. Jørgensen & B. D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology* (pp. 3528–3536). Massachusetts, Estados Unidos: Academic Press.
- Coppard, S. E. (2016). A new genus of mellitid sand dollar (Echinoidea: Mellitidae) from the eastern Pacific coast of the Americas. *Zootaxa*, *4111*(2), 158–166.
- Coppard, S. E., & Lessios, H. A. (2017). Phylogeography of the sand dollar genus *Encope*: implications regarding the Central American Isthmus and rates of molecular evolution. *Scientific Reports*, *7*(1), 11520. doi:10.1038/s41598-017-11875-w
- Coppard, S. E., Zigler, K. S., & Lessios, H. A. (2013). Phylogeography of the sand dollar genus *Mellita*: cryptic speciation along the coasts of the Americas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *69*(3), 1033–1042. doi:10.1016/j.ympev.2013.05.028
- Cordero, V. C. Y. (2016). *Determinación de Granulometría y Textura de Suelos de Matehuala, San Luis Potosí Contaminados con Arsénico*. Universidad Tecnológica de Tabasco, Parrilla, Centro, Tabasco México.
- Cuevas, D. M. D. C., Pinette, M. G., López, H. A. M., Cruz, S. J. S., & Nieto, P. M. D. L. (2012). Requerimientos de control de calidad en bioensayos. En D. M. D. C. Cuevas, R. G. Espinosa, H. C. A. Ilizaliturri, & C. A. Mendoza (Eds.), *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos* (pp. 127–137). México, D. F. : Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.
- Dahms, H.-U., Won, E.-J., Kim, H.-S., Han, J., Park, H. G., Souissi, S., ... Lee, J.-S. (2016). Potential of the small cyclopoid copepod *Paracyclops nana* as an invertebrate model for ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *180*, 282–294.
- De Flora, S., Bagnasco, M., & Zancchi, P. (1991). Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research*, *258*(3), 285–320.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Publicado el 31 de diciembre.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Publicado el 30 de diciembre.

- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Publicado el 10 de septiembre.
- Diario Vanguardia de Veracruz (Ed.). (2018). *Contienen derrame de hidrocarburo en altamar*. Recuperado de <https://www.vanguardiaveracruz.mx/contienen-derrame-de-hidrocarburo-en-altamar/>
- Durán, I., & Beiras, R. (2010). Assessment criteria for using the sea-urchin embryo test with sediment elutriates as a tool to classify the ecotoxicological status of marine water bodies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(5), 1192–1198.
- ESRI Inc. 2016. ArcGIS Desk (Version 10.5.0.6491). Esri Inc. <https://www.esri.com/en-us/arcgis/products/arcgis-pro/>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura). 2020. [Actualizado 12 de diciembre de 2020]. Página electrónica (http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm#top).
- Fernández, L. L. C., Rojas, A. N. G., Roldán, C. T. G., Ramírez, I. M. E., Zegarra, M. H. G., Uribe, H. R., ... D. y Arce O. J. M., F. H. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*.
- Fernández, N., & Beiras, R. (2001). Combined Toxicity of Dissolved Mercury with Copper, Lead and Cadmium on Embryogenesis and Early Larval Growth of the Paracentrotus lividus Sea-Urchin. *Ecotoxicology*, 10(5), 263–271.
- Fernández, N., Cesar, A., González, M., & DelValls, T. A. (2006). Nivel de contaminación de sedimentos afectados por el vertido del Prestige y sus efectos sobre el desarrollo embrionario del erizo de mar. *Ciencias Marinas*, 32(2B), 421–427.
- Fernández, Nuria. (2002). *Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar Paracentrotus lividus*. Universidad de Vigo, España.
- Fournier, O. L. A. (1993). *Recursos naturales*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia EUNED.
- Francisco, V., & Pauls, S. M. (2008). Especies del Orden Clypeasteroidea (Echinodermata: Echinoidea) de las costas de Venezuela. *Revista de biología tropical*, 215–228.
- Gaceta Oficial del Estado de Veracruz. 2012. Programa Municipal de desarrollo Urbano de Tuxpan, Veracruz. Tomo CLXXXVI. Núm. Ext. 403. Publicado el 21 de noviembre.
- García, T. Y. A. (1996). *Ecología poblacional de Mellita quinquiesperforata Leske, 1778 (Echinodermata: echinoidea: clypeasteroidea) em diferentes praias do litoral do Parana, Brasil*. Universidad Federal de Paraná, Brasil.
- Gill, D. A., Picou, J. S., & Ritchie, L. A. (2012). The Exxon Valdez and BP oil spills: A comparison of initial social and psychological impacts. *The American Behavioral Scientist*, 56(1), 3–23.

- González, L. M. C. (2007). *Evaluación de la toxicidad de sedimentos de cuerpos acuáticos receptores de PEMEX-refinación en Salina Cruz, Oaxaca*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, La Paz, Baja California Sur.
- González-Gándara, C., Solís-Marín, F. A., de la Cruz-Francisco, V., Granados-Barba, A., Salas-Pérez, J. de J., Argüelles-Jiménez, ... Escárcega-Quiroga, P. A. (2015). Riqueza y distribución de equinodermos en los arrecifes del norte y sur de Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 63(2), 183-193.
- Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation e Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10-16.
- Guillard, R. R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Pp 26-60. *En: Culture of marine invertebrate animals*. Smith, W. L. y Chanley, M. H. (eds.). Plenum Press, New York, E. U.
- Guerra-Castro, E., Hidalgo, G., Castillo-Cupul, R. E., Muciño-Reyes, M., Noreña-Barroso, E., Quiroz-Deaquino, J., ... Simoes, N. (2020). Sandy Beach macrofauna of Yucatán state (Mexico) and oil industry development in the gulf of Mexico: First approach for detecting environmental impacts. *Frontiers in marine science*, 7. doi:10.3389/fmars.2020.589656
- Hamdoun, A., Schrankel, C. S., Nesbit, K. T., & Espinoza, J. A. (2018). Sea urchins as lab animals for reproductive and developmental biology. En M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)* (pp. 696-703). Academic Press.
- Infante, C., & Morales, G. F. A. (2012). Evaluación de la Toxicidad en Desechos y Suelos Petrolizados empleando semillas de Lactuca sativa L. *Interciencia*, 37(10), 782-788.
- Jiménez, H. V., & Guerra, S. R. (2016). Obtención de un medio enriquecido para hacer más eficiente la biodisponibilidad de los hidrocarburos intemperizados en un suelo costero. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 32(4), 413-424. doi:10.20937/rica.2016.32.04.05
- Kamalakaran, K., Balakrishnan, S., & Sampathkumar, P. (2017). Petroleum hydrocarbon concentrations in marine sediments along Nagapattinam - Pondicherry coastal waters, Southeast coast of India. *Marine pollution bulletin*, 117(1-2), 492-495.
- Khosrovyan, A., Rodríguez-Romero, A., Salamanca, M. J., Del Valls, T. A., Riba, I., & Serrano, F. (2013). Comparative performances of eggs and embryos of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) in toxicity bioassays used for assessment of marine sediment quality. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2), 204-209.
- Laitano, K. S., Gonçalves, C., & Resgalla-Jr, C. (2008). Viabilidade do Uso da Bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata* como Organismo Teste. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 3(1), 9-14.
- Lima, S. F. B., Queiroz, V., Bravo de Laguna, I. H., & Mioso, R. (2014). New host for *Dissodactylus crinitichelis* (Decapoda, Pinnotheridae): First record of occurrence on *Mellita quinquesperforata* (Echinodermata, Echinoidea). *Spixiana*, 37(1), 61-68.

- Logemann, A., Schafberg, M., & Brockmeyer, B. (2019). Using the HPTLC-bioluminescence bacteria assay for the determination of acute toxicities in marine sediments and its eligibility as a monitoring assessment tool. *Chemosphere*, 233, 936–945.
- López-Ortiz, E. B., & Sánchez, A. (2009). Efecto del aumento de salinidad en la fertilización de óvulos de erizos *Strongylocentrotus franciscanus* y *Lytechinus anamesus*. *Hidrobiológica*, 19(2), 181–184.
- Losso, C., Picone, M., Novelli, A. A., Delaney, E., Ghetti, P. F., & Ghirardini, A. V. (2007). Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(2), 220–226.
- Lukyanova, O. N., Zhuravel, E. V., Chulchekov, D. N., & Mazur, A. A. (2017). Sea urchin embryogenesis as bioindicators of marine pollution in impact areas of the sea of Japan/East Sea and the sea of Okhotsk. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(2), 322–333. doi:10.1007/s00244-017-0388-7
- Marcovecchio, J., & Freije, R. H. (2013). *Procesos Químicos en Estuarios*. Argentina: Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional – edUTecNe.
- Marín, A., Gonzalez, V. H., Lapo, B., Molina, E., & Lemus, M. (2016). Niveles de mercurio en sedimentos de la zona costera de El Oro, Ecuador. *Gayana (Concepción)*, 80(2), 147–153.
- Mello, L. C., da Fonseca, T. G., & Denis Moledode de Souza, A. (2020). Ecotoxicological assessment of chemotherapeutic agents using toxicity tests with embryos of *Mellita quinquesperforata*. *Marine Pollution Bulletin*, 159(111493), 111493. doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111493
- Núñez-useche, F., Barragán, R., & Canet, C. (2014). Sedimentación carbonatada, silícica y otros sedimentos químicos en los ambientes marinos profundos. En P. A. Low & E. Peters (Eds.), *La frontera final: el océano profundo* (pp. 57–83). México, D. F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC).
- Oliva, M., Manzini, C., Bontà Pittaluga, G., Kozinkova, L., De Marchi, L., Freitas, R., ... Pretti, C. (2019). *Ficopomatus enigmaticus* larval development assay: An application for toxicity assessment of marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 139, 189–196.
- Olivares-Bañuelos, T., Figueroa-Flores, S., & Carpizo-Ituarte, E. (2012). Índice gonadal y desarrollo larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) en Baja California, México. *Ciencias marinas*, 38(2), 411–425.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2006. Criadero de bivalvos. Un manual Práctico. FAO. 206 pp. Roma, Italia.
- Otero-Díaz, L., Pierini, J. O., Chambel-Leitao, P., Malhadas, M., Ribeiro, J., Chambel-Leitao, J., & Restrepo, J. (2014). Three-dimensional oil spill transport and dispersion at sea by an event of blowout. *Dyna*, 81(186), 42. doi:10.15446/dyna.v81n186.37951
- Pawson, D. L. (2007). Phylum Echinodermata. En Z. Q. Zhang & W. A. Shear (Eds.), *Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy* (pp. 749–764). Zootaxa Magnolia Press.

- Pawson, D. L., Vance, D. J., Messing, C. G., Solís-Marin, F. A., & Mah, C. L. (2009). Echinodermata of the Gulf of Mexico. En D. L. Felder & D. K. Camp (Eds.), *Gulf of Mexico origin, waters, and biota* (pp. 1177–1204). College Station, TX, Estados Unidos de América: Texas A & M University Press.
- Pelletier, M.C., Burgess R. M., Ho, K T., Kuhn, A., Mckinney, R. A. y Ryba, S. A. 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16: 2190–2199.
- Ponce, V. G., & V. Botello, A. (2005). Niveles de Hidrocarburos en el Golfo de México. En A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot, & C. Agrsz-Hernández (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (pp. 269–298). México, D. F. : Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.
- Quirós Rodríguez, J. A. (2015). Equinodermos en fondos someros del sector la Ahumadera, bahía de Cispatá, Córdoba, Caribe Colombiano. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 101–108.
- Ramos, R., Bastidas, C., & García, E. (2012). Toxicity assays of marine sediments from western Venezuela. *Ciencias marinas*, 38(1A), 119–127. doi:10.7773/cm.v38i1a.1939
- Recabarren-Villalón, T., Orazi, M. M., Ronda, A. C., Marcovecchio, J. E. y Arias, A. H. 2019. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en ambientes marinos: Una revisión de América. *JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático*. 1(2): 19–40.
- Rocha-Ramírez, A., Chávez-López, R., Antillón-Zaragoza, I., & Fuentes-Mendoza, F. A. (2016). Variación nictemeral de los ensamblajes de macrocrustáceos en una playa arenosa del centro-norte de Veracruz, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(1), 92–100. doi:10.1016/j.rmb.2016.01.025
- Rojas, L. I., García, G. S. A., & Bárcenas, I. A. (2015). Teratogénesis; consideraciones y actualización. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(9), 1–16.
- Sakthipriya, N., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2015). Bioremediation of Coastal and Marine Pollution due to Crude Oil Using a Microorganism *Bacillus subtilis*. *Procedia Engineering*, 116, 213–220.
- Salas Salazar, M. L., San Martin Del Angel, P., Cuervo González, R., Jiménez Torres, A. C., & Hernández Herrera, R. I. (2017). Efecto de la temperatura sobre la bioacumulación de hidrocarburos en el Ostión americano *Crassostrea virginica*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(11), 299.
- Seachem - Meridian. (s/f). Recuperado el 20 de noviembre de 2021, de Seachem.com website: <https://www.seachem.com/meridian.php>
- Silos, R. J. M. (2008). *Manual de lucha contra la contaminación por hidrocarburos*. Cádiz, España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- Soto, L. A., Botello, A. V., Licea-Durán, S., Lizárraga-Partida, M. L., & Yáñez-Arancibia, A. (2014). The environmental legacy of the Ixtoc-I oil spill in Campeche Sound, southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in marine science*, 1, 1–9. doi:10.3389/fmars.2014.00057

- Tavares, Y. A. G., & Borzone, C. A. (2006). Reproductive cycle of *Mellita quinquesperforata* (Leske) (Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting beach environments. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23(2), 573–580.
- UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura).1976. Guide to operational procedures for the IGOSS Pilot Project on marine pollution (petroleum). Monitoring manual and guides No. 7.
- US EPA 3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods.
- US EPA 3541. 1994. Automated soxhlet extraction. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods.
- Valenzuela, E. E. 2013. Manual de prácticas de laboratorio de cultivos de apoyo. Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Ensenada, Baja Clifornia, México. 57 pp.
- Valenzuela, S. I. S., Gold-Bouchot, G., & Ceja, M. V. (2005). Hidrocarburos en agua y sedimentos de la Laguna de Chelem y Puerto Progreso, Yucatán, México. En A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot, & C. Agrsz-Hernández (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (pp. 311–328). México, D. F. : Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.
- Vazquez E., R. I. (2020). *Estructura de la comunidad de crustáceos bentónicos de la zona intermareal en playas arenosas de Tuxpan, Veracruz, golfo de México*. Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz.
- Velasco, M. H. A. (1983). *Uso y manejo del suelo: Estudio de campo, determinaciones físicas y químicas, prácticas de recuperación y manejo*. México, D. F. : Limusa.
- Walkley, A. y Black, I. A. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29–38
- Yuan, L., Han, L., Bo, W., Chen, H., Gao, W., & Chen, B. (2017). Simulated oil release from oil-contaminated marine sediment in the Bohai Sea, China. *Marine pollution bulletin*, 118(1–2), 79–84.
- Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J. A., & Patiño-Suárez, M. V. (2014). Evaluación y monitoreo de los efectos biológicos por derrames de petróleo en el medio marino. En A. V. Botello, J. Rendón von Osten, A. Benítez, & G. Gold-Bouchot (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. (p. 1176). UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida.
- Zhang, B., Matchinski, E. J., Chen, B., Ye, X., Jing, L., & Llee, K. (2019). Marine Oil Spills—Oil Pollution, Sources and Effects. En C. Sheppard (Ed.), *World Seas: an Environmental Evaluation (Second Edition)* (pp. 391–406). Academic Press.

X. Anexos

10.1 pH y salinidad de los elutriados

Una vez que se prepararon los elutriados a los que se expusieron los óvulos fertilizados de *M. quinquesperforata* y previo a la realización de los bioensayos, se les tomaron los parámetros de pH y salinidad. Lo anterior con el fin de comprobar que dichas características permitan el desarrollo de los embriones (Cuadro VI). En cuanto al pH todos los valores se mantienen en el rango de ligeramente alcalino, mientras que la salinidad varía entre un valor promedio máximo de 33.91 PSU a un mínimo de 33.40 PSU.

Cuadro V. pH y salinidad de los elutriados a los que se expusieron los embriones de *M. quinquesperforata*.

Muestra	pH	Salinidad (PSU)
Agua de mar control	8.33	33.40
Elutriado sedimento control	8.26	33.91
Elutriado sedimento playa	8.28	33.95
Elutriado sedimento estero	8.27	33.85

10.2 Nutrición de los organismos adultos de *Mellita quinquesperforata*, cultivo de microalgas marinas

Los organismos recolectados de *M. quinquesperforata* se mantuvieron en un periodo de observación antes de realizar los bioensayos, por lo que para asegurar que mantengan una salud óptima debe tomarse en cuenta el aspecto de la alimentación. Para ello, durante el primer semestre del programa de estudio (agosto-diciembre 2019), se implementó un cultivo de microalgas marinas, con el fin de que éstas funjan como alimento una vez que se recolecten los ejemplares.

La especie de microalgas marinas cultivadas fue *Isochrysis* sp. (Parke, 1949). Ésta fue obtenida del Laboratorio de Cultivo de Microalgas (LCM) del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Para la obtención de un cultivo unialgal se siguió la metodología descrita en el Manual de Prácticas de Laboratorio de Cultivos de Apoyo de la misma institución (Valenzuela, 2013).

El proceso se inició cultivando la microalga en tubos de 15 ml con tapa, en una proporción de 9:1 de volumen en ml del medio de cultivo F2 de Guillard por cantidad de cepa (Guillard, 1975). A continuación, se realizaron resiembras sucesivas de *Isochrysis* sp. en recipientes de vidrio transparentes, aumentando el volumen del cultivo cada vez hasta alcanzar un volumen de siete litros (en este punto se utilizaron garrafas transparentes con capacidad de 10 litros) (Fig. XIX). Mediante la observación del cambio en el medio de cultivo (turbidez, coloración verdosa-marrón) se dio seguimiento a la cepa.

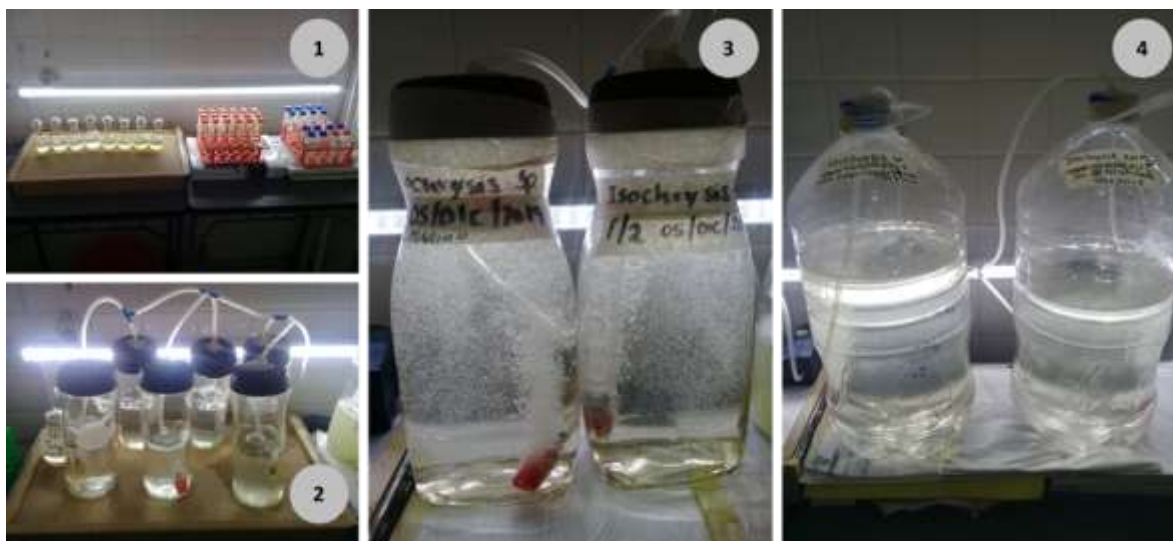


Figura XIX. Etapas de cultivo de *Isochrysis* sp. (1) tubos de 15 ml, (2) frascos de vidrio de 700 ml, (3) frascos de 1L, (4) recipientes de 10L de capacidad.

Cabe mencionar que el agua con la que se preparó el medio fue agua marina de procedencia natural, la cual pasó por un proceso de reposo, microfiltración (0.22 μm) y esterilización. Así también, las condiciones de siembra y resiembra que se siguieron fueron de esterilidad, tanto de los materiales como del ambiente, ya que todos los procesos involucrados con el traslado de cepa a nuevos recipientes y las tomas de muestra para observación al microscopio se hicieron en una campana de flujo laminar.

El cultivo de microalgas se ubicó en un cuarto acondicionado con una lámpara de luz LED de 18 w, la cual proporcionó constantemente luz a los recipientes de cultivo. Además, a partir de la segunda resiembra (etapa en donde se comenzaron a utilizar recipientes de vidrio para el cultivo), se implementó el suministro de aire a cada unidad que contenía las

microalgas, mediante un sistema de aireación impulsado por dos bombas de aire para acuario elite 802.

Posteriormente, se realizaron observaciones al microscopio en la segunda y cuarta etapa de cultivo, para comprobar la presencia de la microalga *Isochrysis* sp. Se examinó la presencia de la microalga, así como su forma y color característico, tomando como referencia la imagen del manual práctico de cría de bivalvos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA o FAO, por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization) (FAO, 2004). De estas observaciones, se obtuvieron dos fotografías en las que se muestran distintos individuos dispersos y un grupo de varias células apiñadas (Fig. XX).

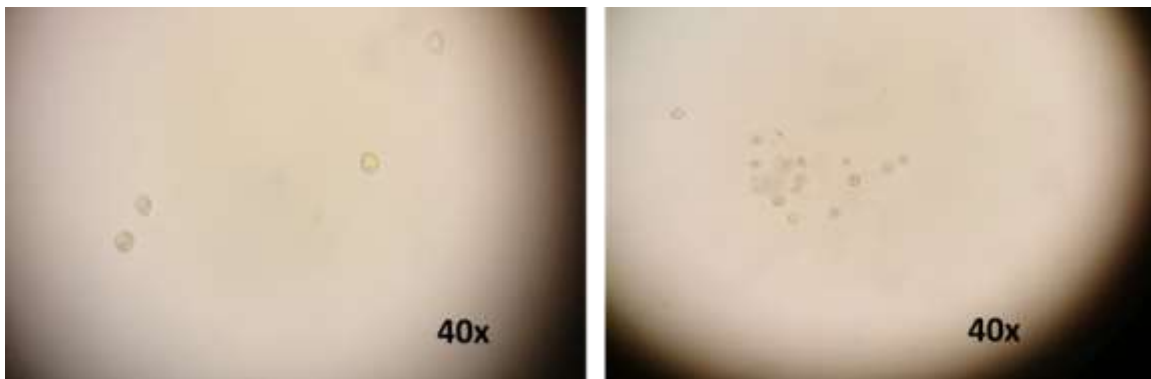


Figura XX. Imagen de individuos dispersos (izquierda) y células apiñadas de *Isochrysis* sp. (derecha) observadas de una muestra de la etapa 2 de cultivo.

La segunda observación realizada en microscopio correspondió a muestras tomadas del cultivo de siete litros de volumen, en donde el agrupamiento de células corresponde a un número mayor de individuos, tal y como se aprecia en la figura XXI.

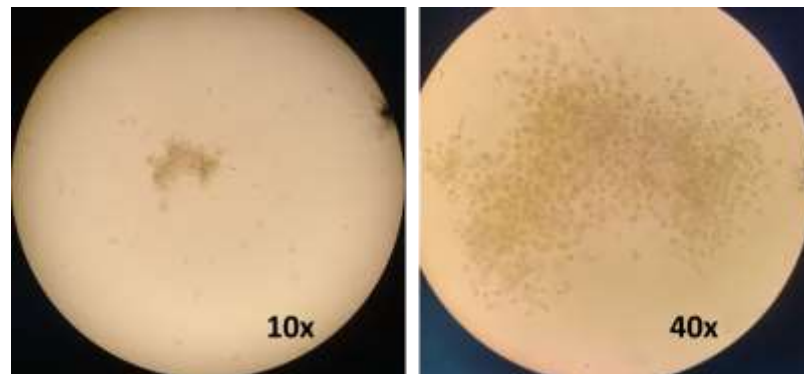


Figura XXI. Células de *Isochrysis* sp. observadas de una muestra de la etapa 4 de cultivo.

10.3 Diagrama triangular de las clases texturales

A partir de los porcentajes de arena, limo y arcilla de los sedimentos estuarinos, se determinó su clase textural utilizando el diagrama triangular de las clases texturales según el tamaño de las partículas, de la Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2020). El punto naranja representa la textura de la muestra, determinada como franco-arenosa (Fig. XXII).

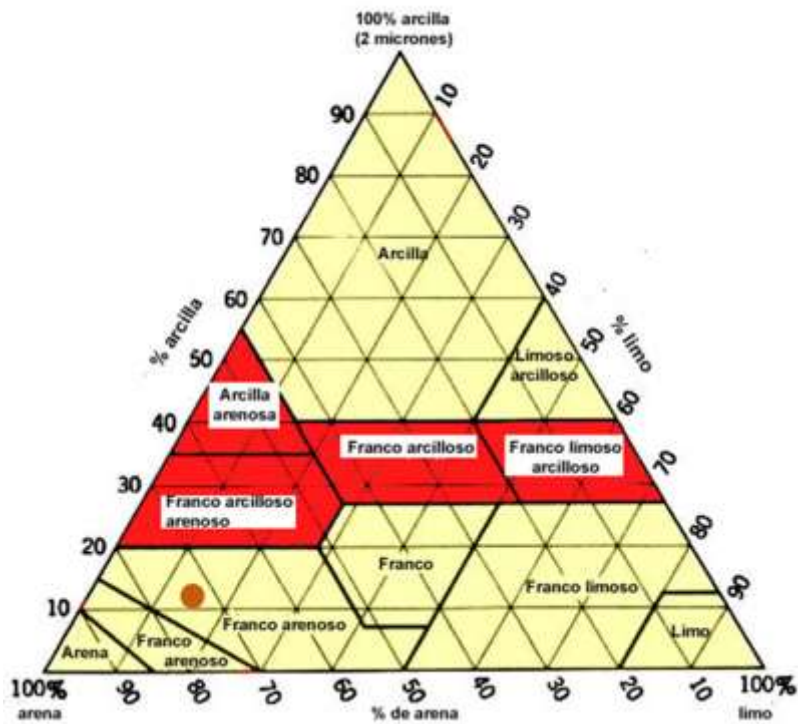


Figura XXII. Diagrama triangular de las clases texturales básicas del suelo según el tamaño de las partículas, elaborado a partir de Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura. FAO (Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura). 2020. [Actualizado 12 de diciembre de 2020]. Página electrónica (http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm#top).

“Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz”

www.uv.mx

