UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Región Poza Rica Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

Efecto de la temperatura en la bioacumulación de hidrocarburos en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971)

Que para obtener el título de:
Maestra en Ciencias del Ambiente

Presenta
Biol. María Luisa Salas Salazar

Director:
Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Co - Director:
Dr. Pablo San Martín del Ángel

Tuxpan, Ver. **Febrero, 2015**

El presente Trabajo de intervención titulado: **"Efecto de la temperatura en la bioacumulación de hidrocarburos en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971)"** realizada por la C. Biol. Maria Luisa Salas Salazar, bajo la dirección de la Dra. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA y asesoría del consejo particular del Dr. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

DRA. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA

DIRECTOR

DR. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL

CODIRECTOR

Tuxpan de Rodríguez Cano, Ver. diciembre 2014

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Maestría en Ciencias del Ambiente

Universidad Veracruzana

Revisión del trabajo de intervención de la alumna: **Maria Luisa Salas Salazar**

Nombre	Fecha	Dictamen	Firma
Marisela López Ortega	21 de Enero/2015	Aprobada	
Rodrigo Cuevas Glez	21 Enero/2015	Aprobada	
Ma. Alejandra López Jiménez	21 Enero/2015	Aprobada	

En la presente revisión se acordó que el trabajo de intervención denominado "Efecto de la temperatura en la bioacumulación de hidrocarburos en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971)" que presenta la sustentante para obtener el Título de Maestra, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

AGRADECIMIENTOS

Porque en cada trabajo se requiere de constancia y dedicación, además del apoyo de personas quienes gracias a sus conocimientos y experiencia colaboraron en la realización de este proyecto y me exhortaron día a día a culminar una etapa más de mi preparación profesional.

Por su exigencia en la calidad de este trabajo y el apoyo incondicional agradezco a mi directora de tesis la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera, pero sobre todo por la amistad brindada todos estos años al trabajar bajo su tutela y ser un ejemplo a seguir.

Por ser nuevamente parte en la formación de una etapa más en mi carrera profesional, agradezco al Dr. Pablo San Martín del Ángel por la asesoría brindada durante la elaboración de este trabajo.

A los integrantes de la comisión revisora por las observaciones realizadas en pro del mejoramiento de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

ÍNDICE **PAG.**

1 INTRODUCCIÓN 1
2 ANTECEDENTES 3
3 OBJETIVOS 11
3.1 Objetivo General 11
3.2 Objetivos particulares 11
4 MATERIALES Y MÉTODOS 12
4.1 Fase de Campo 12
4.1.1 Colecta de sedimento 12
4.1.2 Colecta de organismos 14
4.1.3 Proceso de purga de ostiones 14
4.2 Fase experimental 15
4.2.1 Implementación de microcosmos y tratamientos 15
4.2.2 Extracción y cuantificación de hidrocarburos 17
4.2.2.1 Sedimento 17
4.2.2.2 Organismos 17
4.2.3 Parámetros biológicos. 18
4.2.3.1 Determinación de tallas 18
4.2.3.2 Tasa de sobrevivencia 19
4.2.3.3 Peso promedio 19
4.2.3.4 Determinación de sexos 19
4.2.4 Análisis histológico 19
4.2.5 Análisis estadístico 20
5 RESULTADOS 21
5.1 Extracción y cuantificación de hidrocarburos 21
5.1.1 Extracción y cuantificación de hidrocarburos en sedimento 21
5.1.2 Extracción y cuantificación de hidrocarburos en organismos 21
5.2 Parámetros biológicos 25
5.2.1 Determinación de tallas 25
5.2.2 Tasa de sobrevivencia 26

5.2.3 Comparación de peso promedio 30
5.2.4 Determinación de sexos 32
5.3 Análisis histológico 33
5.3.1Desarrollo gonadal 33
6 DISCUSIÓN 40
7 CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA 49
8 BIBLIOGRAFÍA 52

ÍNDICE DE CUADROS

PAG.

Cuadro 1. Niveles característicos de PAHs presentes en el ambiente marino después de vertidos accidentales de petróleo. 4
Cuadro 2. Niveles de hidrocarburos dispersos en las aguas del Golfo de México y Mar Caribe (valores en gl). 7
Cuadro 3. Niveles de HAPs en moluscos bivalvos del Golfo de México. Valores en ug/g^{-1}. 9
Cuadro 4. Características de los tratamientos del bioensayo 1. 16

ÍNDICE DE FIGURAS

PAG.

Figura 1. Macro localización geográfica de la comunidad de San Jerónimo aledaña a la laguna de Tamiahua. 13
Figura 2.Valores promedio de bioacumulación de HC en organismos del tratamiento Blanco, Tt1 (26 °C) y T1 (30°C+HC). 22
Figura 3. Valores promedio de bioacumulación de HC en organismos del tratamiento Blanco, Tt2 (26 °C) y T2 (26°C +HC). 23
Figura 4. Valores promedio de bioacumulación de HC en organismos de los diferentes tratamientos 24
Figura 5. Talla promedio inicial de los organismos utilizados en los 26

diferentes tratamientos.

Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de los tratamientos blanco, Tt1 y T1. 27

Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de los tratamientos blanco, Tt2 y T2. 28

Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia de los diferentes tratamientos. 29

Figura 9. Peso promedio de los tratamientos expuestos a 30 °C. 30

Figura 10. Peso promedio de los tratamientos expuestos a 26 °C. 31

Figura 11. Porcentajes de identificación de sexos de los diferentes tratamientos. 32

Figura 12. Organismos expuestos a 30 °C donde se observa la ausencia de gónadas desarrolladas (punta de flecha), br; branquia, mv; masa visceral. A) Organismo perteneciente al TB donde se aprecia a simple vista la gónada, B) Organismo perteneciente al T1, C) Organismo perteneciente al TT1. 33

Figura 13. Organismos expuestos a 26 °C donde se puede observar la presencia de gónadas desarrolladas (punta de flecha), branquias; br, A) Organismo perteneciente al TB, B) Organismo perteneciente al TT2, C) Organismo perteneciente al T2. 34

Figura 14. *Crassostrea virginica* vista al microscopio, A) Hembra gametogénesis avanzada, B) Detalle de fig. 14A, C) hembra gametogénesis avanzada, D) Detalle de fig. 14C, E) macho gametogénesis inicial, F) gametogénesis avanzada; tc tejido conjuntivo, f folículos, ov ovocito, pf pared folicular, fa folículos anastomosados, eg espermatogonias, ep espermatocitos. H-E 36

Figura 15. *Crassostrea virginica* vista al microscopio organismos hembra, A) Gametogénesis inicial, B) Detalle de fig. 15 A, C) Gametogénesis inicial, D) Detalle de Fig. 15; tc tejido conjuntivo, f folículos, pf paredes foliculares. H-E 37

Figura 16. *Crassostrea virginica*, vista al microscopio. A y B) fase 39

indeterminada, C) gametogénesis inicial, D) Detalle de fig. 16B, E) Gametogénesis inicial, F) Detalle de Fig. 16E; tc tejido conjuntivo, cm célula mesenquimatosas, f folículo, pf pared folicular, ov ovocito. H-E

RESUMEN

El aumento de la temperatura a causa del calentamiento global es uno de los principales factores que afectan los ecosistemas. Debido a la disponibilidad de acumular contaminantes en sus tejidos el ostión americano *Crassotrea virginica* es considerado un bioindicador de los niveles de contaminación presentes en el ambiente, además de ser un recurso pesquero de importancia comercial en la región, en el presente trabajo se evaluó la influencia de la temperatura (26°C y 30 °C) en el proceso de bioacumulación de HC en ostión americano *Crassotrea virginica* determinando la talla, tasa de sobrevivencia (TS), peso y el desarrollo gonádico de los organismos. Los individuos expuestos a ambientes con 30 °C e HC (T1) obtuvieron los niveles más altos de bioacumulación con un promedio de 118 mg/kg HC y la TS más baja con un porcentaje del 53%. Mientras que los organismos expuestos a ambientes de 26 °C en presencia de HC (T2) presentaron un promedio de 83 mg/kg HC, con una TS del 93%. Los organismos testigo registraron diferencias significativas del T1 y T2 obteniendo un contenido de HC menor a 29 mg/kg en menos del 30% de los individuos obteniendo una TS superior al 93%. A nivel celular no se identificó algún tipo de histopatología no obstante el desarrollo gonádico fue afectado por la presencia de HC al observarse un escaso desarrollo gonadal, en el cual predominó la identificación de organismos indefinidos, esto contrastó con el desarrollo gonadal visible de los organismos testigo donde se definió la predominancia de organismos hembras y en menor proporción individuos machos dentro de las fases gametogénicas inicial y avanzada, observándose el desarrollo de ovocitos maduros y espermatocitos. Los pocos trabajos de investigación acerca de la influencia de la temperatura en la bioacumulación de HC en *C. virginica* hacen de este trabajo una herramienta para futuros estudios en áreas contaminadas con HC.

Palabras clave: bioacumulación, *Crassotrea virginica*, gametogénesis.

INTRODUCCIÓN

La evolución del clima a lo largo de la historia de la Tierra ha experimentado numerosos cambios que obedecen a ciclos dinámicos naturales. Sin embargo, al observar esta evolución en el último siglo, se puede determinar que el aumento de la temperatura, en su mayoría, se deriva de actividades antropogénicas como las emisiones de gases de efecto invernadero y la destrucción de la capa de ozono. Existe una tendencia a aumentar la temperatura global del planeta, que puede relacionarse con el aumento de dichas emisiones (Lorente *et al*., 2004). El aumento de la temperatura en el planeta afecta particularmente a los ecosistemas acuáticos provocando aumentos de temperatura que sobrepasen el grado de tolerancia de muchas especies, a la vez pueden darse cambios químicos importantes en el agua, como disminución del oxígeno disuelto y aumento en la salinidad (EPA, 2002), se considera que el aumento de 2 grados centígrados en la temperatura promedio del planeta, causaría daños catastróficos en todos los ambientes.

El aumento de la temperatura en el ambiente no solo afecta a los ecosistemas y procesos naturales, a su vez influye en las diversas externalidades negativas generadas de actividades antropogénicas y un ejemplo de esto es la contaminación por derrame de hidrocarburos, se ha determinado que el aumento de la radiación UV y la temperatura afecta las reacciones fotoquímicas de los hidrocarburos (fotólisis), generando foto productos más tóxicos que sus compuestos originales (Bertilsson y

Widenfalk, 2002), lo cual representa un peligro para los organismos que entren en contacto con el contaminante.

Los hidrocarburos son contaminantes orgánicos hidrofóbicos, que pueden ingresar a los ambientes acuáticos y asociarse con partículas y coloides en la columna del agua, floculan y sedimentan hacia la interface agua-sedimento, de esta forma los sedimentos y las partículas asociadas a los contaminantes están disponibles para la biota y se bioacumulan en el tejido lipídico de los organismos (Pereira *et al.,* 1999).

Desde mediados de 1970, diversos programas de monitoreo ambiental han utilizado moluscos bivalvos como bioindicadores para estimar los tipos y cantidades relativas de los contaminantes presentes en ambientes acuáticos, esto debido a su distribución cosmopolita y a la habilidad y disponibilidad de bioacumular contaminantes hasta niveles altos por encima de la concentración en el ambiente (Bayne *et al*., 1980; Borbidge *et al.,* 1993; Meador *et al.*, 1995; Oliver *et al.,* 2001; Neff, 2002; Torres *et al*., 2012).

Debido a la importancia comercial y económica que representan los moluscos bivalvos para la población, el presente estudio propone determinar el efecto de la temperatura en la bioacumulación de hidrocarburos en ostión americano (*Crassostrea virginica*), ya que alteraciones en su ambiente, como derrames de hidrocarburos aunado a un aumento de la temperatura ambiental podría causar afectaciones en los organismos que representarían una gran amenaza para el sector ambiental y económico de nuestro país.

ANTECEDENTES

Existen numerosos estudios realizados mediante simulación que tratan de dar información sobre la evolución futura del clima en la Tierra y prevén un mayor incremento de las temperaturas. Se han observado otros cambios en la circulación del aire atmosférico, en las precipitaciones, en el nivel del mar y en el desarrollo de glaciares (Walther *et al*., 2002).

Las alteraciones en pocos grados de la temperatura del mar pueden acarrear importantes alteraciones tróficas. En las islas Galápagos, durante el fenómeno del Niño de 1997-1998, la superficie del agua aumentó su temperatura y gran número de organismos filtradores murieron a consecuencia de la disminución del plancton del que se alimentaban (Benchuey, 1999; Doubilet, 1999).

Se ha determinado que los animales ectodermos, que constituyen más del 99% de las especies acuáticas, son susceptibles a cambios de temperatura en el ambiente, afectando directamente sus reacciones químicas y fisiológicas (Hochachka y Somero, 2002; Gordon, 2005; Ivanina, 2008; Sokolova y Lanning 2008)

Uno de los problemas de contaminación ambiental más importantes a nivel mundial es el vertido de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) en ecosistemas acuáticos y terrestres (Rahman *et al.,* 2003), estos ecosistemas se han visto altamente afectados por este tipo de contaminación, siendo dignos de mencionarse por su magnitud, los

derrames provocados por las embarcaciones “Florida” en Buzzard, Massachusetts (630 toneladas), el “Arrow” en Chedabucto Bay, Nova Scotia (10,000 toneladas), el “Amoco Cadiz” en las costas de Francia (50,000 toneladas), “Exxon Valdez” en las costas de Alaska (> 1000,000 toneladas) (Botello *et al*., 2005) entre otros (Cuadro 1).

Cuadro 1. Niveles característicos de PAHs presentes en el ambiente marino después de vertidos accidentales de petróleo.

Localización	Características	Autor
	AMOCO CADIZ	
Francia	THCmáx (1987): 97.4 g/kg p.s THCmáx (1991): 1.61 g/kg p.s	Mille *et al.,* 1998
	EXXON VALDEZ	
Prince Wiliam Sound, Alaska	∑PAH36= 66-389 ug/kg p.s. 1 año después del vertido	Burns *et al.,* 1997
	∑PAH36= 177 ug/kg p.s. 10 años después del vertido	Page *et al.*, 2002
	HAVEN	
Génova, Italia	∑PAH7= 110-44 X 10^3 ug/kg	Lé Dreau *et al.,* 2000
Galicia	∑PAH12= 7-690 (hasta 16200) ug/kg p.s.	Pastor *et al.,* 2001
	SEA PRINCE	
Corea	∑PAH13= 205159 ug/kg p.s.	Yim *et al.,* 2002
	ERIKA	
Costa Francesa/Erika	∑PAH18= 19.7-812 ug/kg p.s.	Tronczynski *et al.,* 2004
	BALTIC CARRIER	
Costa Danesa	∑PAHs15= 48-2160 ug/kg p.s. 11 días después del vertido ∑PAHs15= 33-698 ug/kg p.s. 3 mes después del vertido es ∑PAHs15= 46-612 ug/kg p.s. 9 meses después del vertido	Pécseli *et al*., 2002

Costa Atlántico-Cantábrico	**PRESTIGE** ∑PAH13= 0.9-422 ug/kg p.s. Diciembre 2002-Septiembre 2003	Franco *et al*., 2006
Playas Nemiña / Prestige	∑PAH= 0.02-0.57 ug/kg Enero 2004	Bernabéu *et al*., 2006

El Golfo de México también se ha visto afectado por grandes derrames de petróleo como el provocado por el Pozo Ixtoc-1 en las costas de Campeche el cual derramó 3´100,000 barriles de petróleo durante 9 meses, y el más reciente provocado por la explosión de la plataforma petrolera Deepwater Horizon, de la British Petroleum (BP), el gobierno de los Estados Unidos anunció que durante los tres meses que duró el derrame se vertieron aproximadamente 4.9 millones de barriles de petróleo; es decir, más 932 millones de litros (Alpuche, 2010). En el Golfo de México se localizan las más grandes provincias petroleras del mundo, cuyos recursos se estiman entre 2.24 y 2.29 bbl de petróleo crudo y de 5.48 a 44.4 tct de gas natural (Foote *et al*., 1983).

Las principales áreas de producción incluyen: Luisiana y costas de Texas, EUA; Bahía de Campeche, México; lago Maracaibo, Venezuela y Golfo de Paria, Trinidad y Tobago, la cuales están consideradas además, como zonas de alto riesgo para accidentes petroleros (Rodríguez, 1981) Dentro de nuestro país las principales zonas petroleras se encuentran en el Golfo de México, en los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche.

Los hidrocarburos son sustancias, en general, muy poco solubles en agua, y por lo tanto se encuentran fundamentalmente en la fracción no soluble, asociados a materia orgánica (disuelta y particulada), coloides, gotas lipídicas, formando micelas, absorbidos a partículas de sedimento o en estado sólido forman parte en los tejidos. (Neft, 2002). Sin embargo diversos procesos tales como la liberación directa de gases y la re-suspensión, transportan a los HAP a la columna de agua (Sanders *et al., 1995).*

Algunos de los efectos tóxicos del vertido de hidrocarburos sobre los organismos marinos dependen de los productos vertidos y de la susceptibilidad o capacidad de acumulación de los organismos afectados. Si los organismos son susceptibles se producen grandes mortandades o trastornos en el mantenimiento de sus poblaciones naturales, mientras que si acumulan los hidrocarburos se convierten en una amenaza para sus consumidores, entre ellos el hombre (Iniesta y Blanco, 2005).

Se ha realizado diversos trabajos de investigación a lo largo del Golfo de México, esto con el objetivo de evaluar los niveles de hidrocarburos presentes en sedimentos costeros y marinos de diferentes áreas del Golfo de México y Mar caribe (Cuadro 2).

Cuadro 2. Niveles de hidrocarburos dispersos en las aguas del Golfo de México y Mar Caribe (valores en gl).

Localidad	Año	Concentración Promedio (Intervalo)	Autores
Laguna Madre, Tamaulipas	-	26	Botello *et al.*, 1996
Laguna Pueblo Viejo, Veracruz	-	53	Botello *et al.*, 1996
Laguna Tamiahua, Veracruz	-	31	Botello *et al.*, 1996
Río Tonalá, Veracruz	1982	1189 (18-1829)	Botello, y Páez, 1986
Río Coatzacoalcos, Veracruz	1982	680 (89-2623)	Botello, y Páez, 1986
Laguna del Ostión, Veracruz	1982	120 (16-575)	Botello, y Páez, 1986
Laguna de Alvarado, Veracruz	1982	18 (10-30)	Botello *et al*., 1987
Sistema Lagunar Carmen-Machona, Tab.	1979-1980	46.6 (7-150)	Botello *et al*., 1983
Laguna Mecoacán, Tabasco.	1979-1980	112.2 (11-1060)	Botello *et al*., 1983
Plataforma Continental Tabasco.	1989	1.2 (0.5-3.4)	Botello *et al*., 1991
Laguna de Términos, Campeche	1982	37 (10-50)	Botello y Macko. 1982
Laguna de Términos, Campeche	-	85	Becerra, 1984
Plataforma Continental Campeche	1978-1981	43.3 (3-715)	Botello *et al*., 1987
Laguna Bojórquez, Quinta Roo	1981	12 (8-18)	Botello y Macko. 1982
Laguna Nichupté, Quintana Roo	1985	102 (24-298)	Botello *et al*., 1986
Plataforma Continental de Quintana Roo	1984	70 (51-121)	Botello *et al*., 1987
Golfo de México (PROGMEX)	1983-1984	94 (27-293)	Botello *et al*., 1987

La biodisponibilidad, es decir, la susceptibilidad de un compuesto para ser incorporado por un organismo y su fisiología son las principales variables que determinan el grado de acumulación y retención de contaminantes en invertebrados y en peces de ecosistemas marinos (Soriano, 2009).

Los moluscos filtradores, juegan un rol significativo como organismos centinelas en programas de monitoreo debido a su capacidad para bioacumular contaminantes ambientales debido a la respuesta que adoptan en presencia de algún contaminante (Bebianno y Berreira, 2009; Solé *et al.,* 2007). La bioacumulación es un proceso por el cual un químico es absorbido por un organismo expuesto a éste.

La incorporación de hidrocarburos en los bivalvos varía mucho entre especies debido a diferencias en la tasa de filtración, tasa de absorción, contenido lipídico y capacidad de detoxificación, además de factores externos como la temperatura, salinidad y la cantidad de materia orgánica disuelta y particulada. La tasa de filtración es uno de los factores que regulan en mayor medida la incorporación de hidrocarburos en los bivalvos (Iniesta y Teal, 1973; Fossato y Canzonier, 1976; Lee *et al*., 1977)

Los bivalvos filtradores se alimentan de fitoplancton, que puede acumular grandes cantidades de hidrocarburos disueltos en agua, alcanzando factores de concentración de hasta 1500 en tan solo 12 horas (Wang, 2002).

Los bivalvos son un recurso pesquero de gran importancia y demanda comercial, por lo tanto se ha convertido en uno de los productos de mayor aprovechamiento en el país. El Golfo de México es la región que soporta la mayor parte de la captura nacional de ostión con una aportación del 91%. Los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche, son los mayores productores del país, aportando el 48% de la producción nacional del país (Ruiz, 1985; Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca, 2008).

Es importante mencionar diversos estudios donde se han considerado a los bivalvos como medio para valorar la contaminación de hidrocarburos que ha alcanzado el Golfo de México (Cuadro 3).

Cuadro 3. Niveles de HAPs en moluscos bivalvos del Golfo de México. Valores en ug g^{-1}.

Localidad	Año	Promedio	Autores
Laguna Pueblo Viejo, Veracruz	1975	[a]2	Botello, 1978
Laguna Tamiahua, Veracruz	1975	[a]15	Botello, 1978
Laguna de Alvarado, Veracruz	1975	[a]0.6	Botello, 1978
Río Coatzacoalcos, Veracruz	1986	[b]0.12	Botello *et al*., 1987
Isla Pajaritos, Veracruz	1986	[c]0.13	Botello *et al*., 1987
Laguna Carmen-Machona, Tabasco	1975	[a]34	Botello, 1978
Laguna Carmen, Tabasco	1979-1980	[a]45	Botello *et al*., 1983
Laguna Machona, Tabasco	1979-1980	[a]41	Botello et al., 1983
Laguna Mecoacán, Tabasco	1979-1980	[a]45	Botello et al., 1983
Laguna Carmen, Tabasco	1992-1993	[a]0.23	Gold-Bouchot *et al*., 1997
Laguna Machona, Tabasco	1992-1993	[a]0.4	Gold-Bouchot *et al*., 1997
Laguna Mecoacán, Tabasco	1992-1993	[a]0.22	Gold-Bouchot *et al*., 1997
Laguna de Términos, Campeche	1991	[a]0.32	Gold-Bouchot *et al*., 1995
Laguna de Términos, Campeche	1991	[a]17.3	Noreña-Barroso *et al*., 1999

[a]*Crassostrea virginica (ostión);* [b]*Rangia fleuxosa (almeja);* [c]*Polymesoda caroliniana (almeja chica).*

Se ha demostrado que la exposición de bivalvos a hidrocarburos y a ambientes con altas temperaturas causa daños en la reproducción y crecimiento de los organismos, así como la presencia de daño celular en tejidos (Gold *et al*., 1995; Ruddy, 1974; Lüchman *et al.,* 2011).

Un estudio realizado por Oliver *et al*., 2001 determina la reacción fisiológica de *Crassotrea virginica* expuesto a diferentes contaminantes como HAPs, PCBs, metales pesados y pesticidas, los cuales han demostrado niveles altos de concentración de sustancias xenobióticas en tejidos, las cuales podrían estar asociadas a una elevada actividad de hematocitos.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de la exposición a 30°C de temperatura e hidrocarburos, en los parámetros biológicos así como en la bioacumulación de hidrocarburos en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971).

3.2 Objetivos particulares

- Cuantificar la concentración de HC presentes en el sedimento utilizado en los tratamientos.

- Determinar la bioacumulación de hidrocarburos en ostiones expuestos a sedimentos contaminados a 30°C.

- Comparar los parámetros biológicos; determinación de tallas, tasa de sobrevivencia, comparación de peso promedio e identificación del sexo de los organismos.

- Realizar el análisis histológico a nivel gonádico de la exposición a hidrocarburos a 30°C.

MATERIALES Y METODOS

4.1 Fase de Campo

4.1.1 Colecta de sedimento

Para la realización de este trabajo se llevó a cabo la colecta de sedimento contaminado con HC con ayuda de una draga, con la cual se colectaron 40 kg de sedimento, que se almacenó en recipientes de plástico con tapa para su transportación al laboratorio de Biotecnología Ambiental de Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias dentro de la Universidad Veracruzana.

La colecta se realizó en un área aledaña a la laguna de Tamiahua ubicada en la zona norte del Estado de Veracruz, para esto se tomaron en cuenta las áreas más cercanas y expuestas a la contaminación por hidrocarburo. Una de ellas se encuentra en la comunidad de San Jerónimo dentro del municipio de Tamalín, esta zona se caracteriza por la presencia de yacimientos naturales de petróleo y áreas contaminadas con el mismo, esto como consecuencia de la explosión ocurrida del pozo Dos Bocas en el año 1908.

Al sedimento colectado se le realizó una extracción y cuantificación de hidrocarburo, utilizando el método de reflujo mediante el equipo Soxhlet, esto con el fin de determinar la cantidad de hidrocarburo al que los organismos estuvieron expuestos.

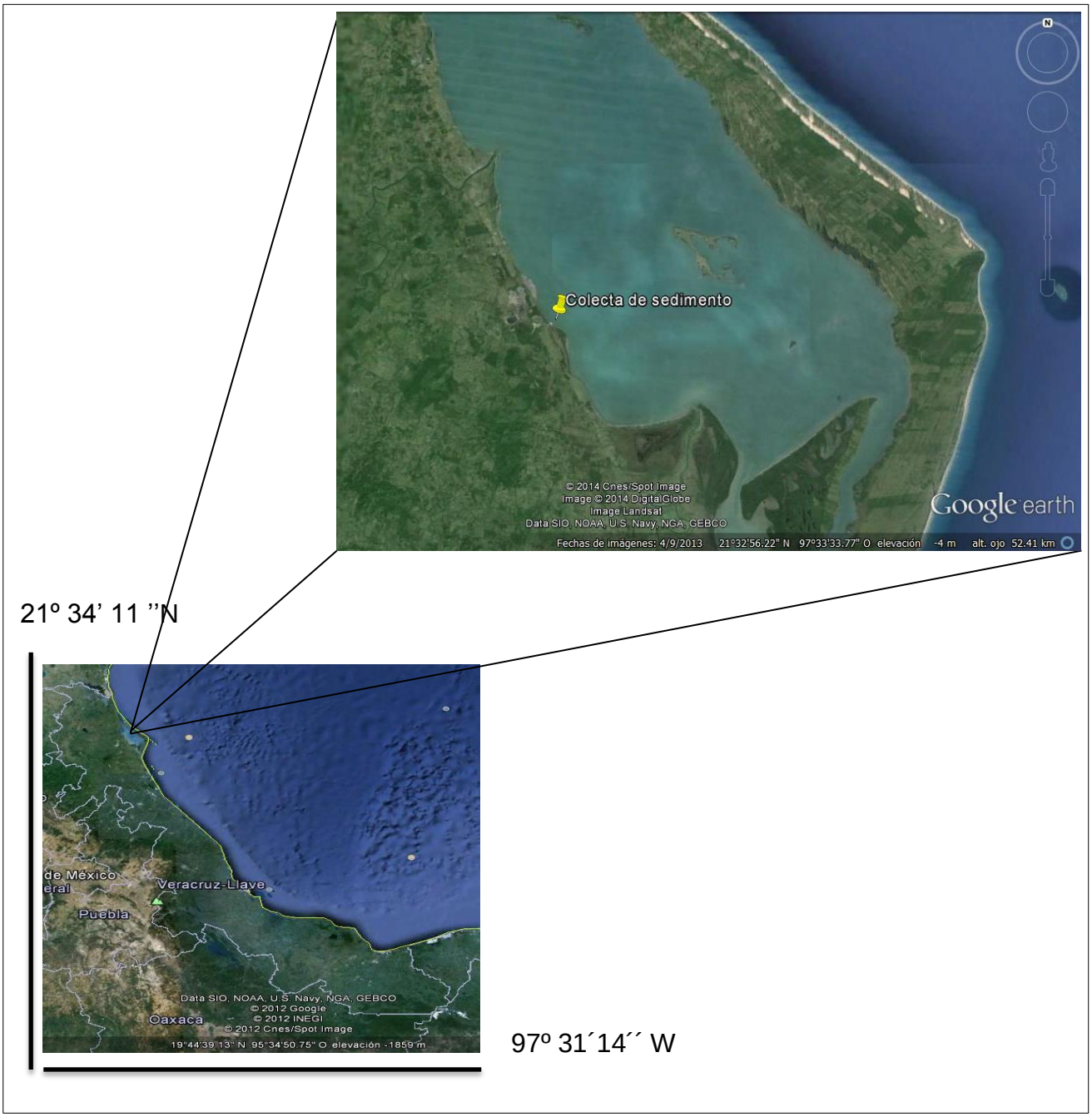


Figura 1. Macro localización geográfica de la comunidad de San Jerónimo aledaña a la laguna de Tamiahua.

4.1.2 Colecta de organismos

La colecta de organismos se llevó a cabo en un área distinta al sitio de colecta del sedimento, previendo así la posible adaptabilidad a los hidrocarburos que pudieran tener los organismos presentes en el área contaminada. Por tal motivo se adquirieron 80 organismos de la cooperativa pesquera ubicada en la laguna de Tampamachoco, en la ciudad de Tuxpan, Veracruz. Los organismos fueron colectados al azar en diferentes puntos de la laguna por los pescadores del lugar, los cuales fueron almacenados en recipientes de plástico para su traslado al laboratorio de Biotecnología Ambiental de Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias dentro de la Universidad Veracruzana.

4.1.3 Proceso de purga de ostiones

Para eliminar los posibles contaminantes o compuestos acumulados en los organismos, estos fueron sometidos a un proceso de purga o limpia, el cual consistió en mantener los ostiones en un ambiente con agua salobre artificial (Oceanic sal marina, GAL aquarium) libre de cualquier tipo de contaminantes, el cambio de agua extraída de la laguna a agua salobre artificial se realizó gradualmente hasta exponer a los ostiones a agua salobre 100% artificial.

4.2 Fase experimental

4.2.1 Implementación de microcosmos y tratamientos

Para evaluar el efecto de la temperatura y los hidrocarburos en ostión americano (*Crassostrea virginica*) fue necesario la implementación de microcosmos los cuales fueron creados en contenedores de vidrio de 50 cm de largo por 28 cm de ancho y 30 cm de altura, con una capacidad de 50 lt. En cada uno de los microcosmos se instaló una bomba de aire para pecera, la temperatura fue regulada utilizando termostatos para acuario (Calentador automático, Vanguardia acuática 50 W).

La fase de experimentación constó de 2 tratamientos expuestos a diferentes temperaturas; 30°C y 26 °C respectivamente en presencia de sedimentos contaminados con hidrocarburos, a su vez se implementaron tratamientos testigos expuestos únicamente a las temperaturas antes mencionadas, así como un tratamiento considerado como blanco, por no tener ningún tipo de agente estresor.

En cada uno de los tratamientos se colocaron 15 organismos previamente pesados y medidos, esto con el fin de determinar la talla correspondiente según las medidas obtenidas. El tiempo de exposición a los tratamientos fue de 30 días, durante los cuales los organismos fueron alimentados diariamente con microalgas del género *Cheatoceros* sp. (2 ml por organismo).

Las características de los tratamientos realizados se describen en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Características de los tratamientos

Características	Blanco	Testigo 1	Tratamiento 1	Testigo 2	Tratamiento 2
Temperatura	sn/t	30 °C	30 °C	Temp. Ambiente (26°C)	Temp. Ambiente (26°C)
Sedimento con HC	sn/s	sn/s	10 kg	sn/s	10 kg
No. de organismos	15 org.	15 org.	15 org.	15 org.	15 org.
Tiempo de exposición	30 días	30 días	30 días	30 días	30 días

Para este bioensayo se consideran como réplicas el número de organismos expuestos en cada tratamiento. Con la finalidad de mantener las condiciones adecuadas para los organismos se monitoreó diariamente la temperatura, salinidad y el nivel de agua de los microcosmos.

4.2.2 Extracción y cuantificación de hidrocarburos

4.2.2.1 Sedimento

Para determinar la cantidad de hidrocarburos (HC) en los sedimentos a los cuales estuvieron expuestos los organismos en los diferentes tratamientos, se realizó la extracción y cuantificación del contaminante siguiendo la técnica del método de reflujo utilizando el equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 ASTM (2003) y 3540 C y 3541 de US EPA (1994, 1996) y de acuerdo a Fernández *et al.,* 2006.

2.2.2 Organismos

Terminado el tiempo de exposición se determinó la bioacumulación de HC en todos los organismos de los diferentes tratamientos. Para este proceso se realizó una disección para extraer las gónadas la cuales fueron fijadas en una mezcla de Buffer PBS adicionando para-formaldehido para histología al 4% para su posterior utilización. El resto de cada organismo fue congelado con nitrógeno líquido y macerado, a continuación fue secado en una estufa (FELISA) a 35°C por 24 horas con la finalidad de eliminar la humedad y obtener el peso neto de cada organismo. Para determinar la bioacumulación de HC de cada organismo se utilizó el método de reflujo utilizando el equipo Soxhlet.

Una vez, obtenidos los valores de extracción de HC se llevó a cabo la cuantificación utilizando la siguiente fórmula según García (2005), donde se obtiene el porcentaje del extracto obtenido:

$$\% \text{ de extracto obtenido} = \frac{A - B}{C} * 100$$

Donde:

A=Peso del matraz más extracto obtenido

B= Peso constante del matraz vacío

C= gramos de muestra

4.2.3 Parámetros biológicos

4.2.3.1 Determinación de tallas

Para llevar a cabo la determinación de tallas se realizó una biometría inicial, calculando la longitud (mm) de cada uno de los organismos, con ayuda de un vernier entre el umbo y la valva central. Los resultados obtenidos fueron comparados con los estándares para la determinación de tallas determinados por Palacios y Vargas, 2002.

4.2.3.2 Tasa de sobrevivencia

Para determinar la sobrevivencia de los organismos a los 30 días de exposición de los tratamientos se utilizó la siguiente fórmula:

TS = (No. Final de organismos/No. Inicial de organismos) * 100

4.2.3.3 Comparación de peso promedio

Para determinar el peso promedio de los organismos se llevaron a cabo tres biometrías durante el tiempo de exposición el cual duró 30 días; al día 1, día 15 y día 30 respectivamente, donde se calculó el peso con ayuda de una balanza analítica (Labtron C Scientific, 4000g X.0.1 g). Los resultados obtenidos fueron comparados y analizados estadísticamente.

4.2.3.4 Identificación de sexos

La identificación de sexos se realizó analizando los cortes histológicos de las gónadas, se observó con ayuda de un microscopio compuesto (NIKON) la presencia de gametos sexuales masculinos (espermatogonias) o femeninos (ovocitos).

4.2.4 Análisis histológico

Este proceso se llevó a cabo al final del tiempo de exposición de los tratamientos, con las gónadas previamente fijadas en el proceso de disección, por lo cual las muestras fueron sometidas a baños en sacarosa a diferentes concentración; 10%, 20% y 30% por 24 horas o hasta que las muestras se coloquen en el fondo de los frascos donde se encuentren. Terminado el proceso de baños en sacarosa, se llevó

a cabo la inclusión en resina (NEG 50) en microtubos de plástico, manteniéndolos por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 24 horas se realizó el proceso de corte utilizando un micrótomo criostato (Microm) a -25°C, realizando cortes transversales de las gónadas con un grosor de 7 µm los cuales fueron colocados en porta objetos esmerilados (Corning) previamente bañados en poli L lisina al 1% (Sigma aldrich).

Una vez obtenidos los cortes se llevó a cabo una tinción celular, para lo cual se utilizó la técnica de Hematoxilina-Eosina, para mejorar la apreciación de la estructura celular. Los porta objetos con los cortes obtenidos fueron analizados con ayuda de un microscopio compuesto (NIKON), se determinó el estadio gametogénico en el que se encontraba el organismo y a su vez se identificó el sexo de cada uno de ellos.

4.2.5 Análisis Estadísticos

Para determinar la dispersión o varianza de los resultados obtenidos respecto a los parámetros biológicos y a la cuantificación de hidrocarburos extraídos de los organismos, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico Rx64 (versión 2.12.0).

RESULTADOS

5.1 Extracción y cuantificación de hidrocarburos

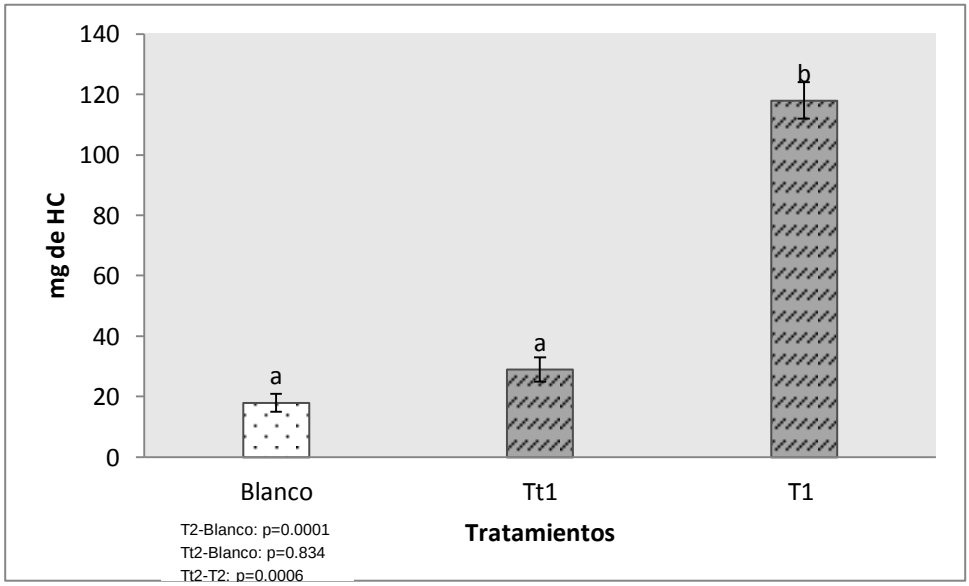
5.1.1 Sedimento

Del primer objetivo planteado para este trabajo se llevó a cabo la extracción y cuantificación de hidrocarburos presentes en los sedimentos utilizados durante la fase experimental, con lo cual se determinó que los organismos estuvieron expuestos a una concentración de **929.29 mg/kg de HC**, lo que se clasifica como fracción mediana, basado en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 la cual establece los límites máximos permisibles, donde cataloga como fracción mediana las concentraciones de HC superiores a los 500 mg/kg HC y menores a 5,000 mg/kg HC.

5.1.2 Organismos

Cumpliendo el segundo objetivo se llevó a cabo la extracción y cuantificación de hidrocarburo bioacumulado en el total de los organismos utilizados en la fase experimental. Se observó que los individuos del tratamiento blanco el cual estuvo libre de HC y a una temperatura de 26°C, obtuvo el promedio de HC más bajo en comparación del resto de los tratamientos puesto que solo el 20% del total de organismos analizados presentaron contenido de HC, obteniendo un valor promedio de 18 mg de HC. En relación al Tt1 el cual tampoco contenía HC y estuvo expuesto a una temperatura de 30°C obtuvo un resultado promedio de 29 mg de HC en el 30% del total de la biomasa. El registro de bioacumulación más alto se presentó en el T1

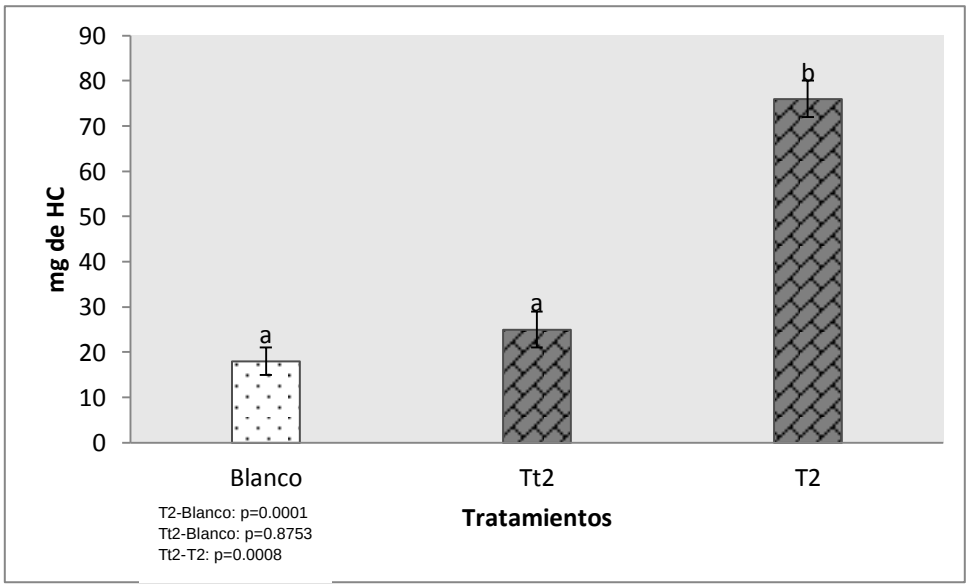
mismo que contenía alrededor de 20 kg de sedimento contaminado con HC y 30 °C, ya que en el 100% de los organismos se registró un promedio de 118 mg de HC bioacumulado. Al llevar a cabo el análisis estadístico ANOVA se obtuvo un resultado de p=0.001 con lo cual se comprobó que existen diferencias significativas entre los promedios de bioacumulación antes mencionados. En base a la prueba Tukey se concluyó que el T1 presentó diferencias altamente significativas con respecto al tratamiento blanco y Tt1 ya que se obtuvieron valores de p=0.0001 y p=0.0006 respectivamente (Figura 2).



*Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa

Figura 2.Valores promedio de bioacumulación de HC en organismos del tratamiento Blanco, Tt1 (26 °C) y T1 (30°C+HC).

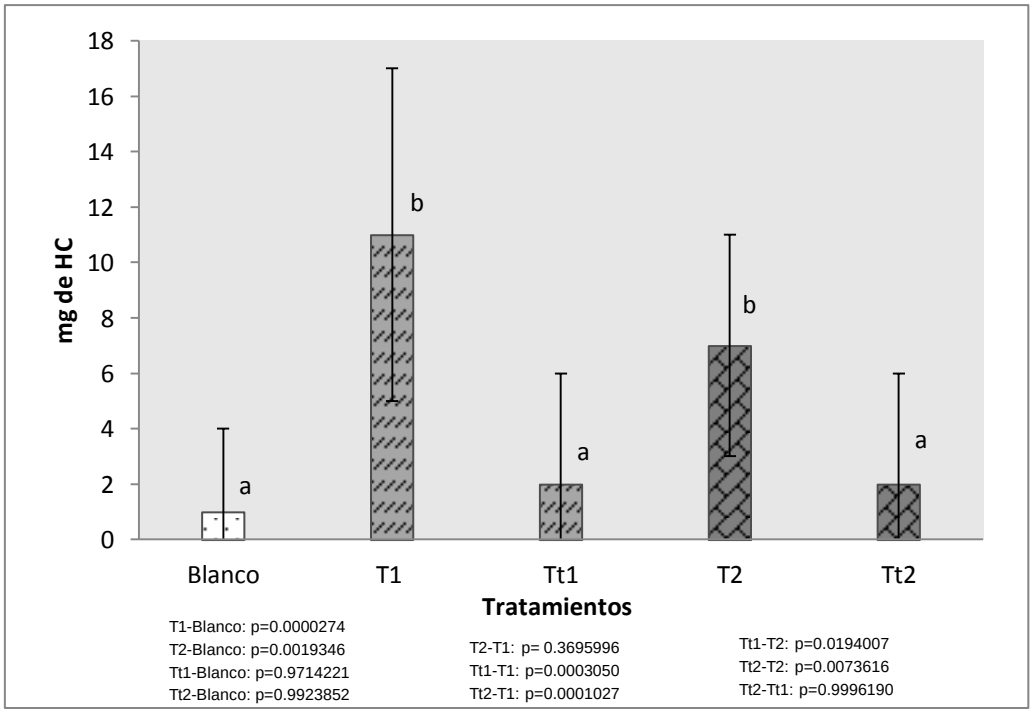
Respecto a los Tt2 y T2, el promedio más bajo de contenido de HC se estimó en los organismos expuestos al Tt2, el cual no fue expuesto a HC, con un contenido promedio de 25 mg del contaminan y se determinó únicamente en el 30% del total de organismos procesados. El tratamiento T2 el cual contenía sedimento con HC y fue expuesto a 26°C presentó el índice más alto de bioacumulación con un promedio de 83 mg de HC, el cual estuvo presente en el 100% de los organismos. Al realizar el análisis estadístico ANOVA se determinó que existen diferencias altamente significativas (p=0.0001) entre el contenido de HC estimado en los organismos de los diferentes tratamientos. Al desarrollar la prueba de Tukey se definió que el T2 presentó diferencias altamente significativas del resto de los tratamientos (p<0.05) (Figura 3).



*Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa

Figura 3. Valores promedio de bioacumulación de HC en organismos del tratamiento Blanco, Tt2 (26 °C) y T2 (26°C +HC).

Al llevar a cabo el análisis estadístico ANOVA entre todos los tratamientos se estableció que existen diferencias significativas entre ellos ($p<0.05$), de acuerdo a la prueba de Tukey se observó que el T1 y el T2 presentan diferencias altamente significativas del resto de los tratamientos, dado que los valores obtenidos de $p<0.05$ (Figura 4).



*Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa

Figura 4. Valores promedio de bioacumulación de HC en organismos de los diferentes tratamientos.

5.2 Parámetros biológicos

Como parte del tercer objetivo planteado se llevó a cabo la determinación de tallas iniciales de los organismos, la tasa de sobrevivencia, la comparación del peso promedio de los organismos y la determinación de sexos.

5.2.1 Determinación de tallas

En base a la biometría inicial realizada a todos los organismos utilizados en los diferentes tratamientos se definió una talla promedio de 80 mm ± 0.3 de longitud. Todos los organismos utilizados para este trabajo pertenecen a la etapa adulta ya que sobrepasan la talla de 40 mm, rango a partir del cual son considerados de acuerdo a lo señalado por Palacios y Vargas (2002).

En el T2 se registró la talla menor con una longitud de 82 mm ± 0.6, los organismos con la talla más alta fueron los pertenecientes al T1 con una longitud de 91 mm ± 0.8 mientras que el resto de los organismos presentaron longitudes muy similares, ya que arrojaron valores promedio de 85, 86 y 87 mm para los tratamientos Blanco, Tt1 y Tt2 respectivamente. En base a la prueba estadística ANOVA se determinó que no existen diferencias significativas entre las tallas de los organismos dado que el valor de $p>0.05$ (Figura 5).

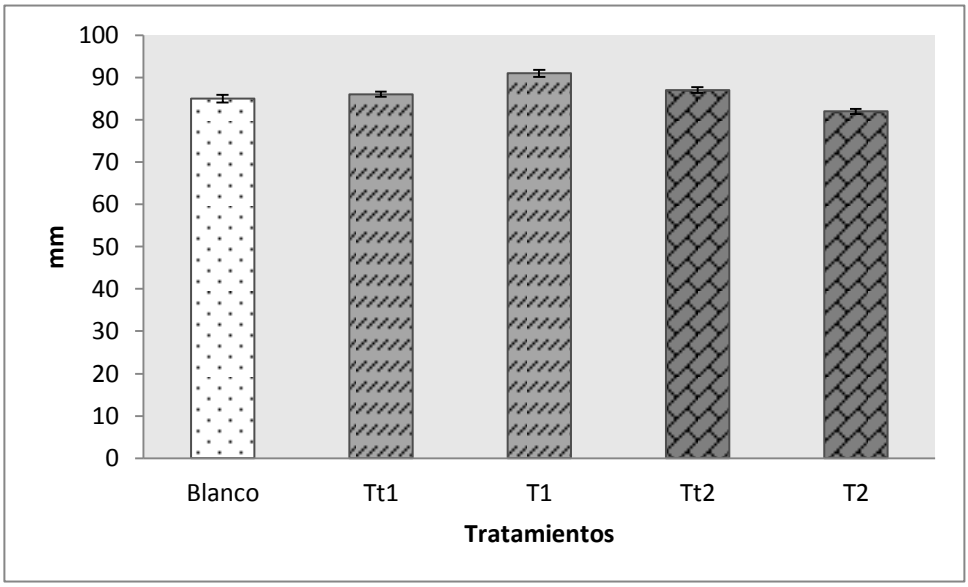
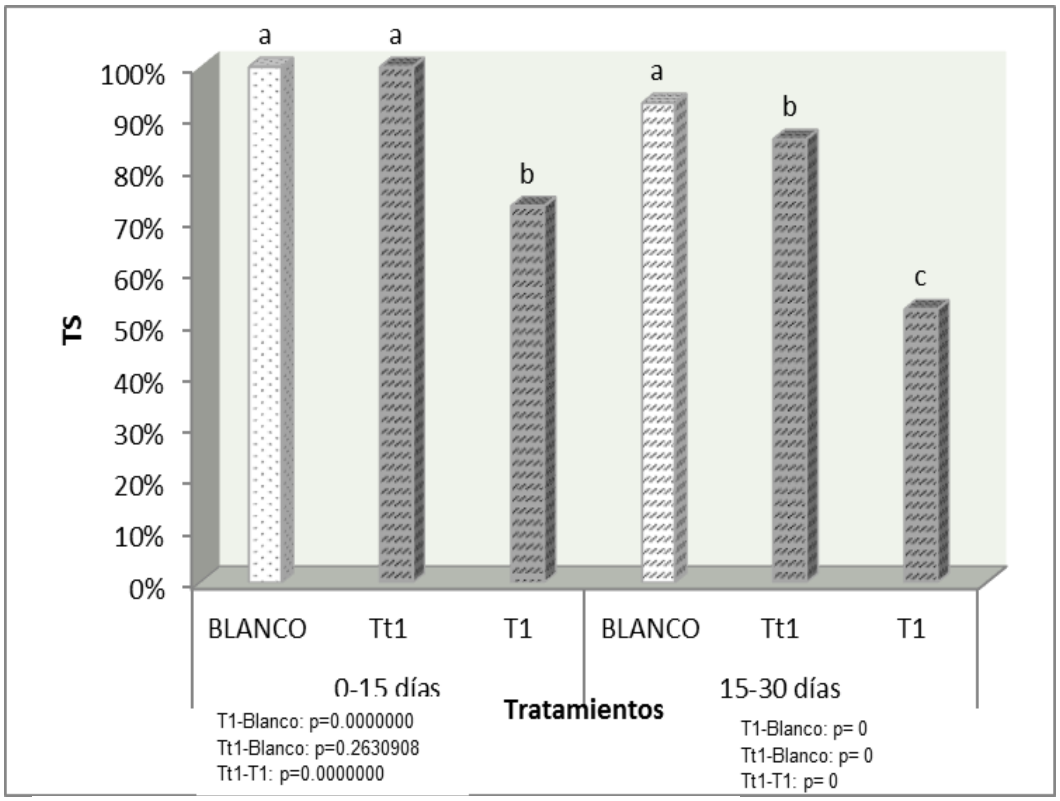


Figura 5. Talla promedio inicial de los organismos utilizados en los diferentes tratamientos.

5.2.2 Tasa de sobrevivencia (TS)

En relación a la tasa de sobrevivencia de los tratamientos expuestos a 30 °C, se observó que entre los 0-15 días el T1 (30 °C + HC) fue el único tratamiento donde la TS disminuyó hasta el 73% mientras que el resto de los tratamientos mantuvieron el 100% de sobrevivencia. En base al estadístico correspondiente ANOVA donde el resultado de p=0.001 se definió que existen diferencia significativas entre los tratamientos y con la prueba estadística Tukey se estableció que el T1 es estadísticamente diferente de los tratamientos Blanco y Tt1.

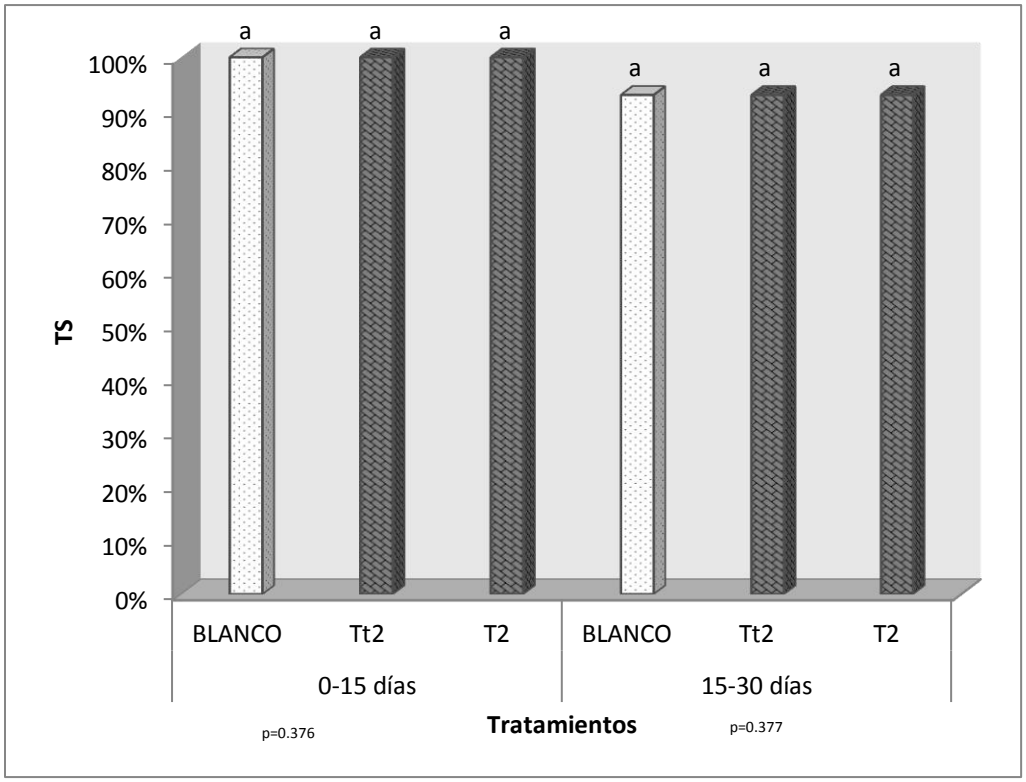
Durante los 15-30 días del tratamiento, se observó que nuevamente el T1 presentó una mayor disminución de la TS con un porcentaje final del 53%, entretanto los tratamientos Blanco y Tt1 obtuvieron un porcentaje final del 93% y 86% de sobrevivencia respectivamente. En este caso se especificó que existe diferencia significativa entre los porcentajes de la TS de los tres tratamientos, de acuerdo al estadístico correspondiente donde el valor de p=0.001 (Figura 6).



*Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa

Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de los tratamientos blanco, Tt1 y T1.

La TS estimada en los tratamientos expuestos a 26 °C Blanco, T2 y Tt2, se determinó que durante los 0-15 días todos los tratamientos mantuvieron el 100% de sobrevivencia, mientras que durante los 15-30 días restantes los porcentajes disminuyeron al 93% de sobrevivencia, en ambos periodos de tiempo no se establecieron diferencias significativas, ya que en base al estadístico ANOVA desarrollado se obtuvieron resultados de p=0.376 y 0.377 respectivamente (Figura 7).

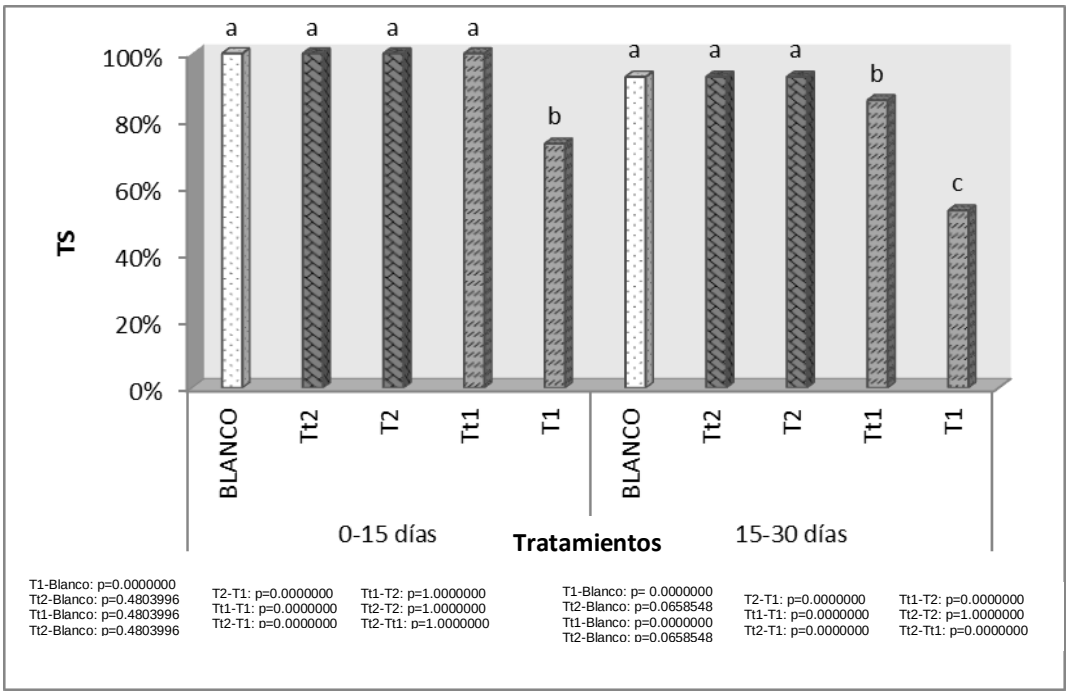


*Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa.

Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de los tratamientos blanco, Tt2 y T2.

Al realizar el análisis estadístico ANOVA de todos los tratamientos durante los 0-15 días del experimento se obtuvo un valor de p=0.001 por lo que se precisó que existen diferencias significativas entre los porcentajes de la TS. Como resultado de la prueba de Tukey se definió que la TS del T1 presentó diferencias altamente significativas (p<0.05) del resto de los tratamientos.

Durante los 15-30 días de exposición también se observaron diferencias significativas debido a que el valor obtenido de p=0.001 al comparar todos los tratamientos. En base a la prueba de Tukey correspondiente se determinó que los tratamientos Tt1 y T1 presentan una TS estadísticamente diferente del resto de los tratamientos, ya que los valores de p<0.05 (Figura 8).



*Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa

Figura 8. Porcentaje de sobrevivencia de los diferentes tratamientos.

5.2.3 Comparación del peso promedio

La comparación del peso promedio realizada a los 0-15 y 15-30 días se determinó que los organismos del tratamiento blanco no presentaron grandes variaciones debido a que se estimaron diferencias de 0.4 gr entre cada uno de los pesos promedio estimados. Los organismos del Tt1 presentaron un aumento del 2.5 gr durante los primeros 15 días, sin embargo en la última biometría realizada disminuyeron un promedio de 4.4 gr. En relación a los organismos del T1 se observó un aumento del 0.9 gr a la mitad del tratamiento, mismo que disminuyó 0.5 gr a los 30 días. Al realizar el análisis estadístico (ANOVA) se determinó que no existen diferencias significativas (p= 0.08) entre los pesos promedio de los tratamientos (Figura 9).

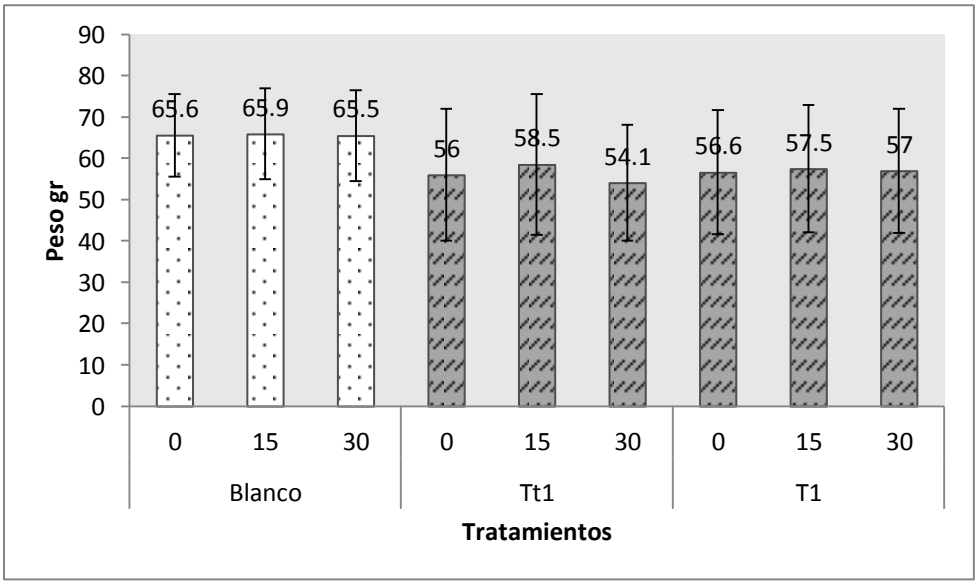


Figura 9. Peso promedio de los tratamientos expuestos a 30 °C.

Con respecto a los tratamientos expuestos a temperatura ambiente (26°C), se describió que durante los primeros 15 días el peso promedio de los organismos de los tratamientos Tt2 y T2 aumentó 1.6 gr y 0.5 gr respectivamente. Durante los últimos días ambos tratamientos registraron una disminución de peso promedio de 0.9 gr y 0.7 gr respectivamente. Al analizar estadísticamente los resultados de estos tratamientos y el tratamiento blanco, no se encontró la existencia de diferencias significativas entre las estimaciones del peso promedio ya que el valor de p=0.126. (Figura 10).

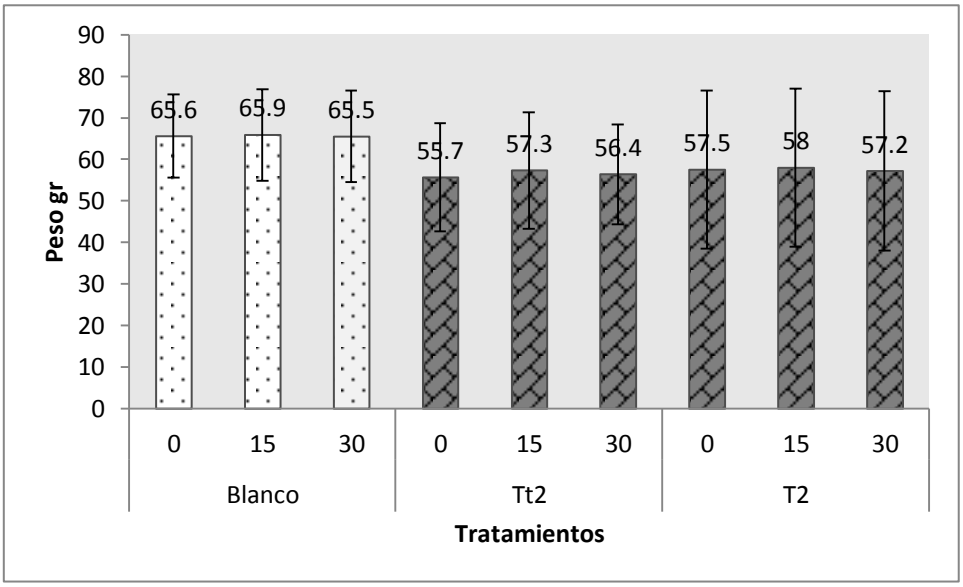


Figura 10. Peso promedio de los tratamientos expuestos a 26 °C.

5.2.4 Determinación de sexos

Respecto a la identificación de sexos se determinó que en los tratamientos testigos; blanco (26°C), Tt2 (26°C) y Tt1 (30°C) se cuantificó el mayor porcentaje de organismos hembras, entre el 61% y 64%, sin embargo únicamente en los tratamientos expuestos a 26°C; blanco y Tt2 se desarrollaron organismos machos con un porcentaje del 28% y 21% respectivamente y en menor cantidad organismos indefinidos. En los tratamientos T1 (30°+CH) y T2 (26°+CH) predominaron los organismos considerados como indefinidos con valores del 75% y 42%, en menor cantidad se identificaron ejemplares hembras con el 25% y 58% respectivamente (Figura 11).

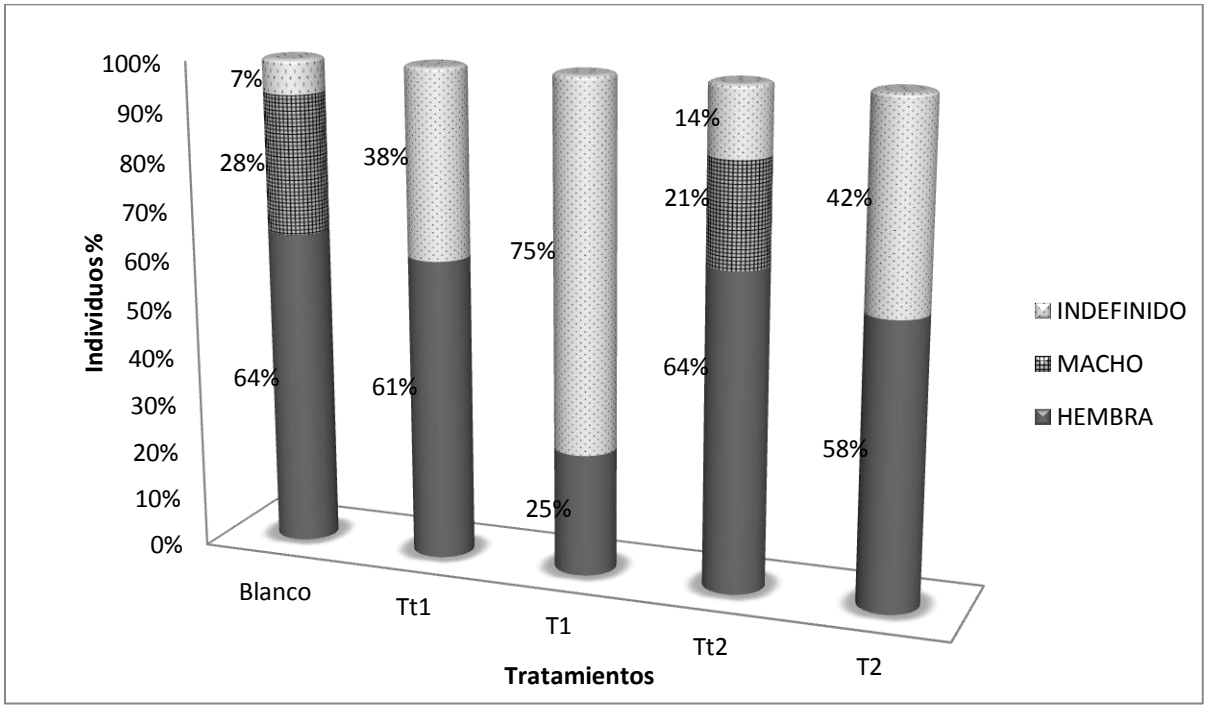


Figura 11. Porcentajes de identificación de sexos de los diferentes tratamientos.

5.3 Análisis histológico

5.3.1 Desarrollo gonadal

Para cumplir el cuarto objetivo, se estableció que los organismos expuestos al TT1 (30°C) y T1 (30°C+HC) presentaron un menor desarrollo visible de la gónada, ya que en los organismos pertenecientes al tratamiento blanco, el cual fue expuesto a 26°C y libre de contaminantes la gónada se observó a simple vista como una masa de coloración blanco-beige que recubre la parte superior del área visceral (Figura 12).

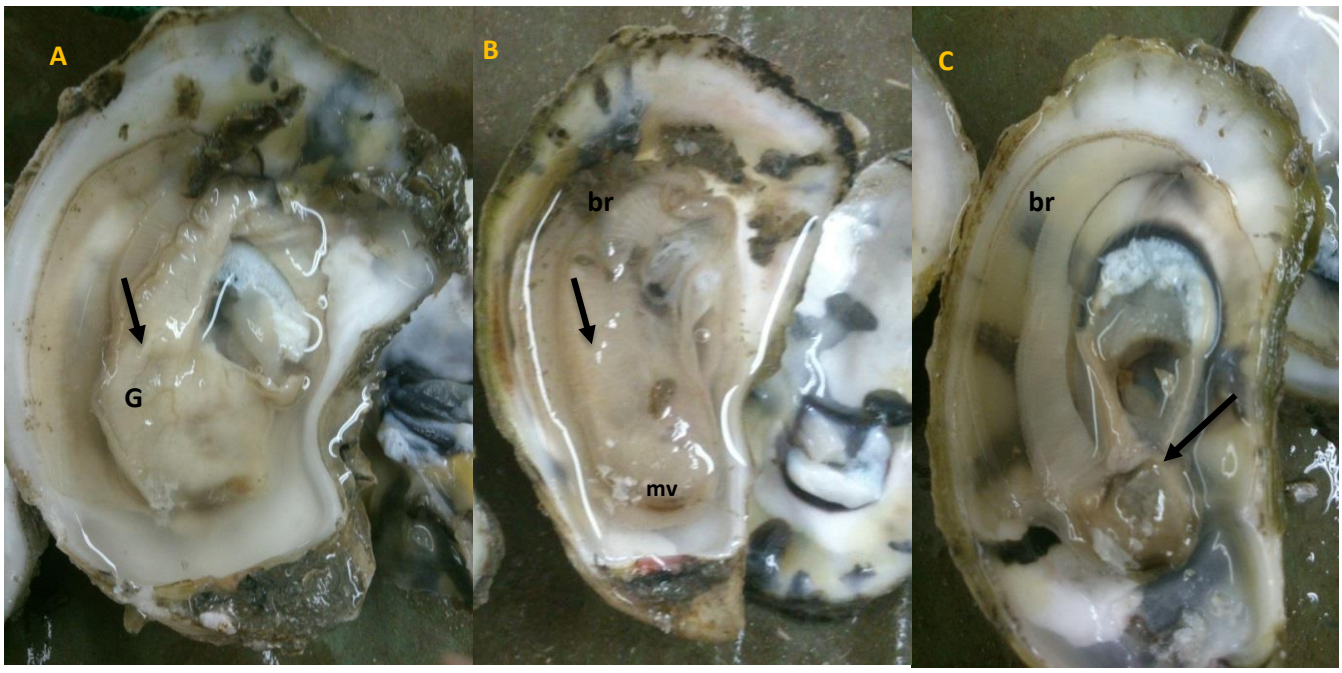


Figura 12. Organismos expuestos a 30 °C donde se observa la ausencia de gónadas desarrolladas (punta de flecha), br; branquia, mv; masa visceral. A) Organismo perteneciente al TB donde se aprecia a simple vista la gónada, B) Organismo perteneciente al T1, C) Organismo perteneciente al TT1.

En el caso de los organismos expuestos al Tt2 (26 °C) y T2 (26 °C +HC) se logró apreciar el desarrollo de las gónadas, aún en organismos expuestos a HC, ya que al realizar la disección de los organismos la gónada se apreció a simple vista, al igual que en los organismos expuestos al tratamiento blanco (Figura 13).

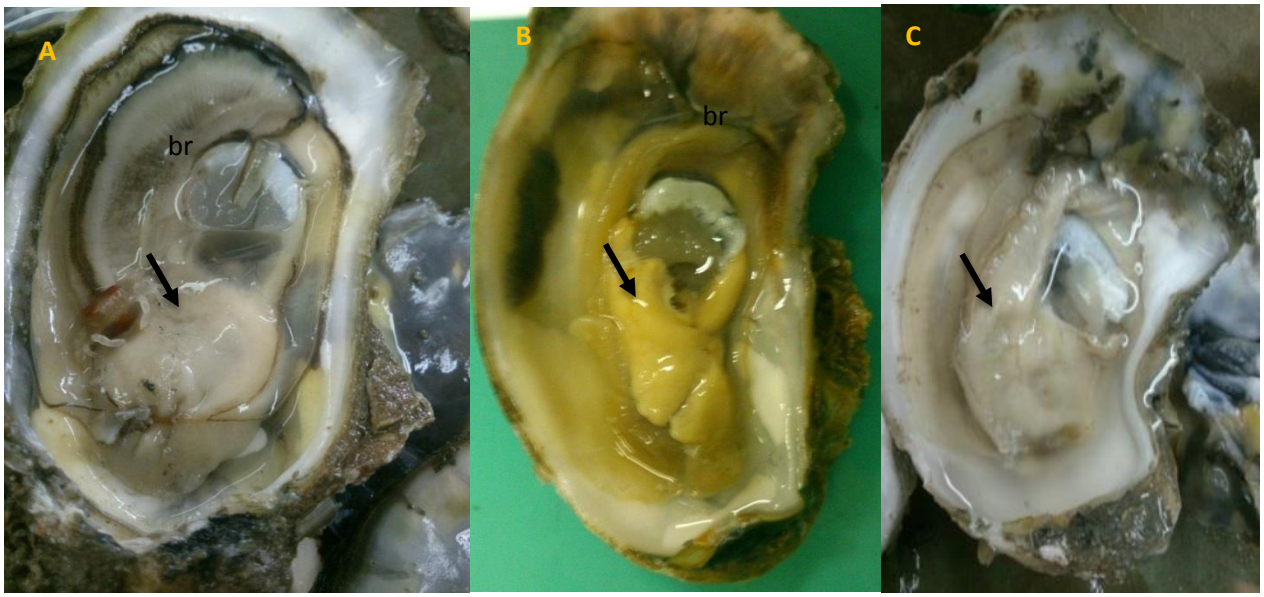


Figura 13. Organismos expuestos a 26 °C donde se puede observar la presencia de gónadas desarrolladas (punta de flecha), branquias; br, A) Organismo perteneciente al TB, B) Organismo perteneciente al TT2, C) Organismo perteneciente al T2.

Al realizar el análisis de los cortes histológicos de las gónadas extraídas se logró identificar el estado gonádico de los organismos en base a los estados de desarrollo gonádico gametogénico descritos por Baqueiro *et al.,* 1992 y Sevilla 1993.

En relación a los tratamientos considerados como testigos; tratamiento blanco y el Tt2 en los cuales los organismos estuvieron expuestos a 26 °C sin presencia de HC se determinó que las hembras se encontraban dentro de la fase de gametogénesis avanzada, en ellos se pudo apreciar la poca cobertura de tejido conjuntivo (tc) y el desarrollo de folículos (f) (Figura 14 A) con presencia de ovocitos (ov) en formación adheridos a las paredes foliculares (pf) (Figura 14 B). En algunos casos se observaron agrupaciones de folículos anastomosados (fa) que comparten las paredes foliculares (Figura 14 C) y en donde se distinguieron ovocitos en desarrollo (Figura 14 D). En el caso de los machos se identificaron dos fases, la primera de ellas fue la gametogénesis inicial en la cual se observó el desarrollo de folículos y espermatogonias (eg) sobre el tejido conjuntivo (Figura 14 E). La segunda fase determinada fue la gametogénesis avanzada distinguiendo la reducción del tejido conjuntivo (tc) así como el desarrollo de espermatocitos primarios (ep) (Figura 14 F).

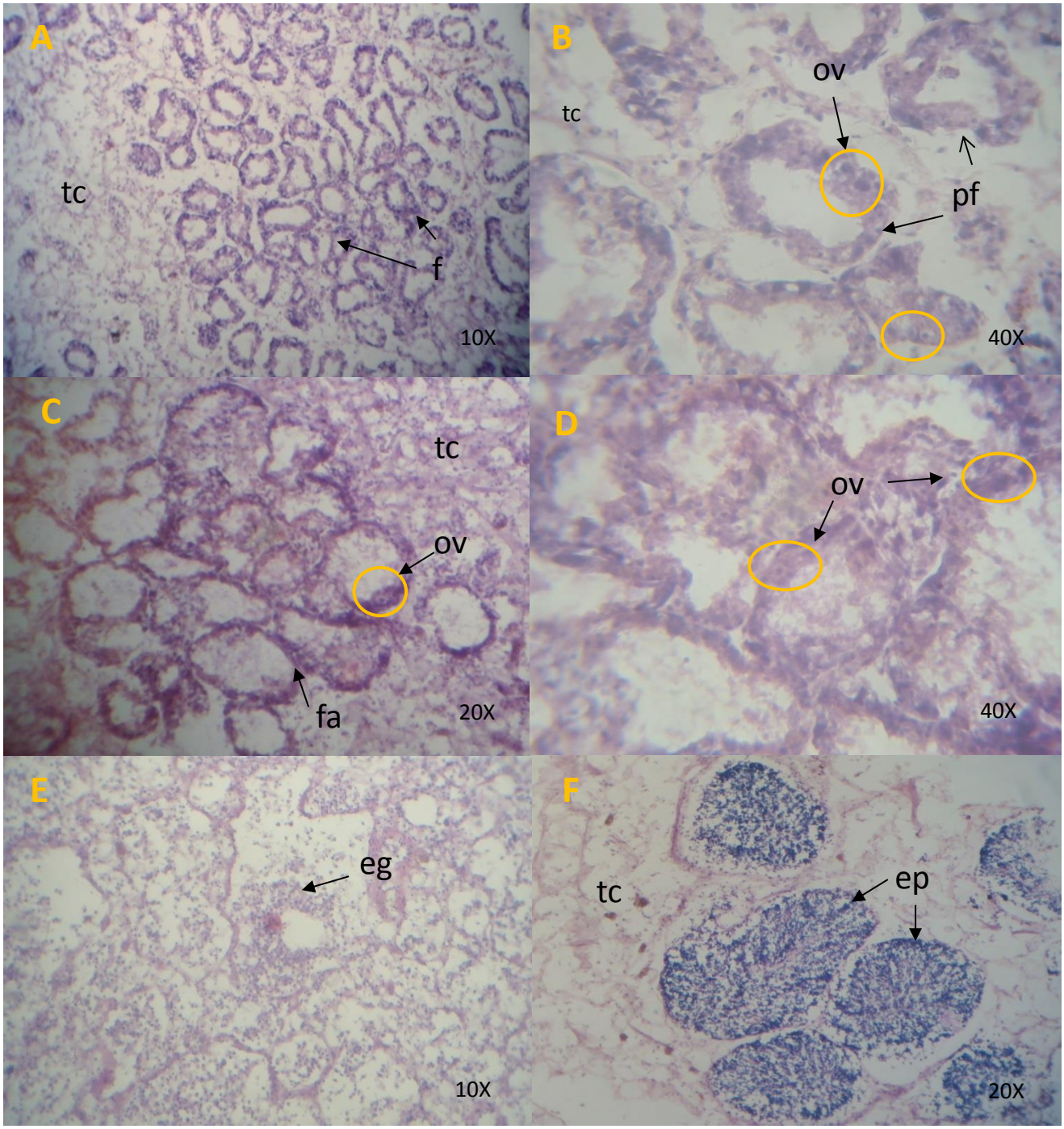


Figura 14. *Crassostrea virginica* vista al microscopio, A) Hembra gametogénesis avanzada, B) Detalle de fig. 14A, C) hembra gametogénesis avanzada, D) Detalle de fig. 14C, E) macho gametogénesis inicial, F) gametogénesis avanzada; tc tejido conjuntivo, f folículos, ov ovocito, pf pared folicular, fa folículos anastomosados, eg espermatogonias, ep espermatocitos. H-E

Con respecto al tratamiento testigo 1 (Tt1) el cual fue expuesto únicamente a una temperatura de 30 °C se describió que los organismos pertenecían a la fase de desarrollo de gametogénesis inicial, dado que se distinguió una amplia cobertura de tejido conjuntivo (tc) donde se apreciaron folículos en formación (f) en modo de islotes (Figura 15 A y C), mismos que carecían de ovocitos adheridos a las paredes foliculares (pf) (Figura 15 B y D).

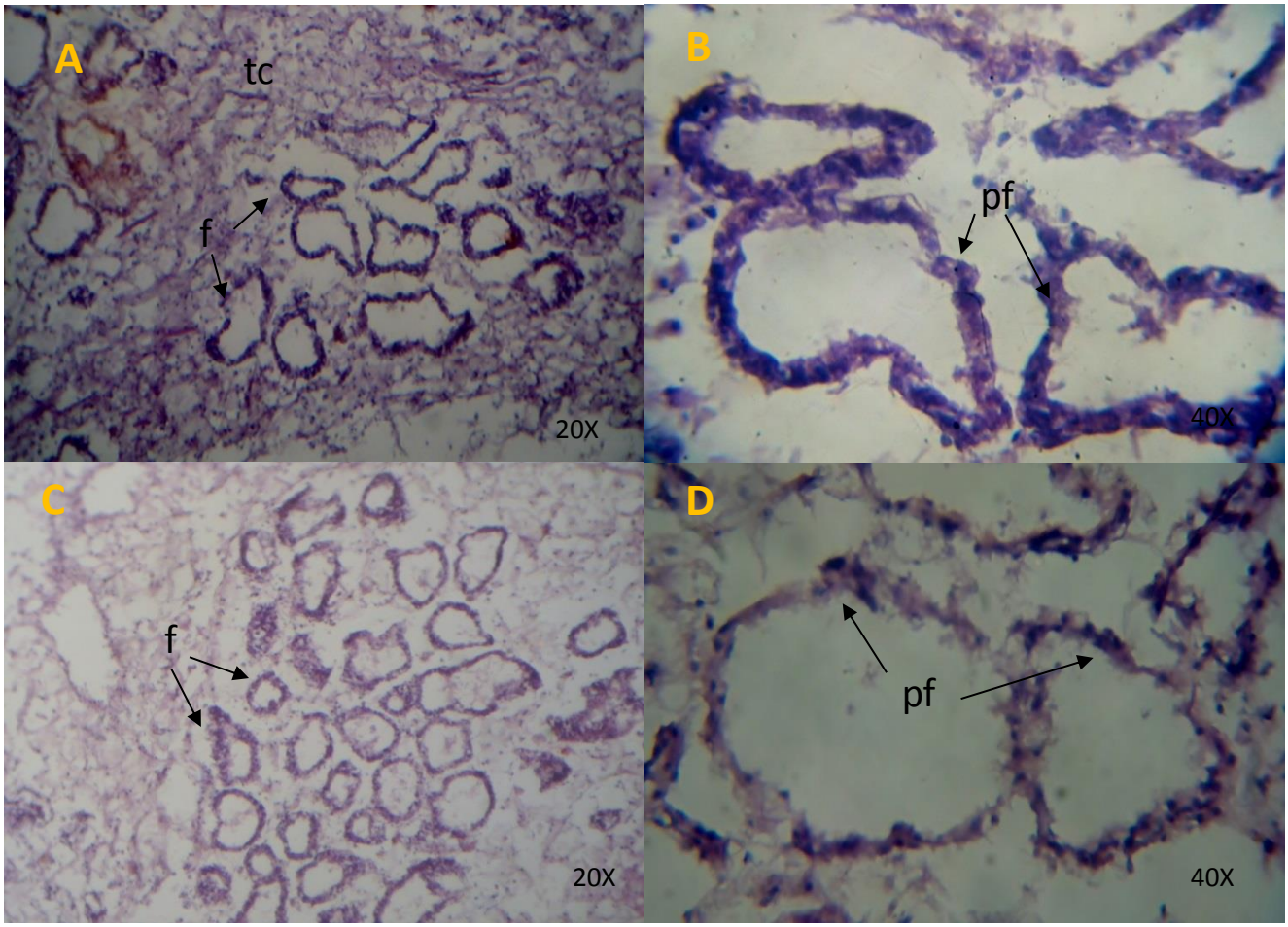


Figura 15. *Crassostrea virginica* vista al microscopio organismos hembra, A) Gametogénesis inicial, B) Detalle de fig. 15 A, C) Gametogénesis inicial, D) Detalle de Fig. 15; tc tejido conjuntivo, f folículos, pf paredes foliculares. H-E

En el caso de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con hidrocarburos y a una temperatura constante de 30 °C (T1), se observó que la mayoría de los organismos presentan una total cobertura de tejido conjuntivo (tc) con presencia de células mesenquimatosas (cm)(Figura 16 A y B), sin embargo no se logró definir alguna de las etapas de desarrollo gametogénico, no obstante en casos aislados se identificó la etapa de gametogénesis inicial donde se pudo distinguir el desarrollo de folículos en modo de islotes (f) (Figura 16 C) carentes de ovocitos en desarrollo en sus paredes foliculares (pf) (Figura 16 D).

Con respecto al T2 expuesto a sedimento contaminado con HC a una temperatura de 26 °C, se redujo el número de organismos indefinidos ya que se observaron organismos dentro de la etapa de gametogénesis inicial donde el tejido conjuntivo (tc) en su mayoría es cubierto por el desarrollo de folículos (f) (Figura 16 E) con presencia de ovocitos inmaduros (ov) adheridos a las paredes foliculares (pf) (Figura 16 F).

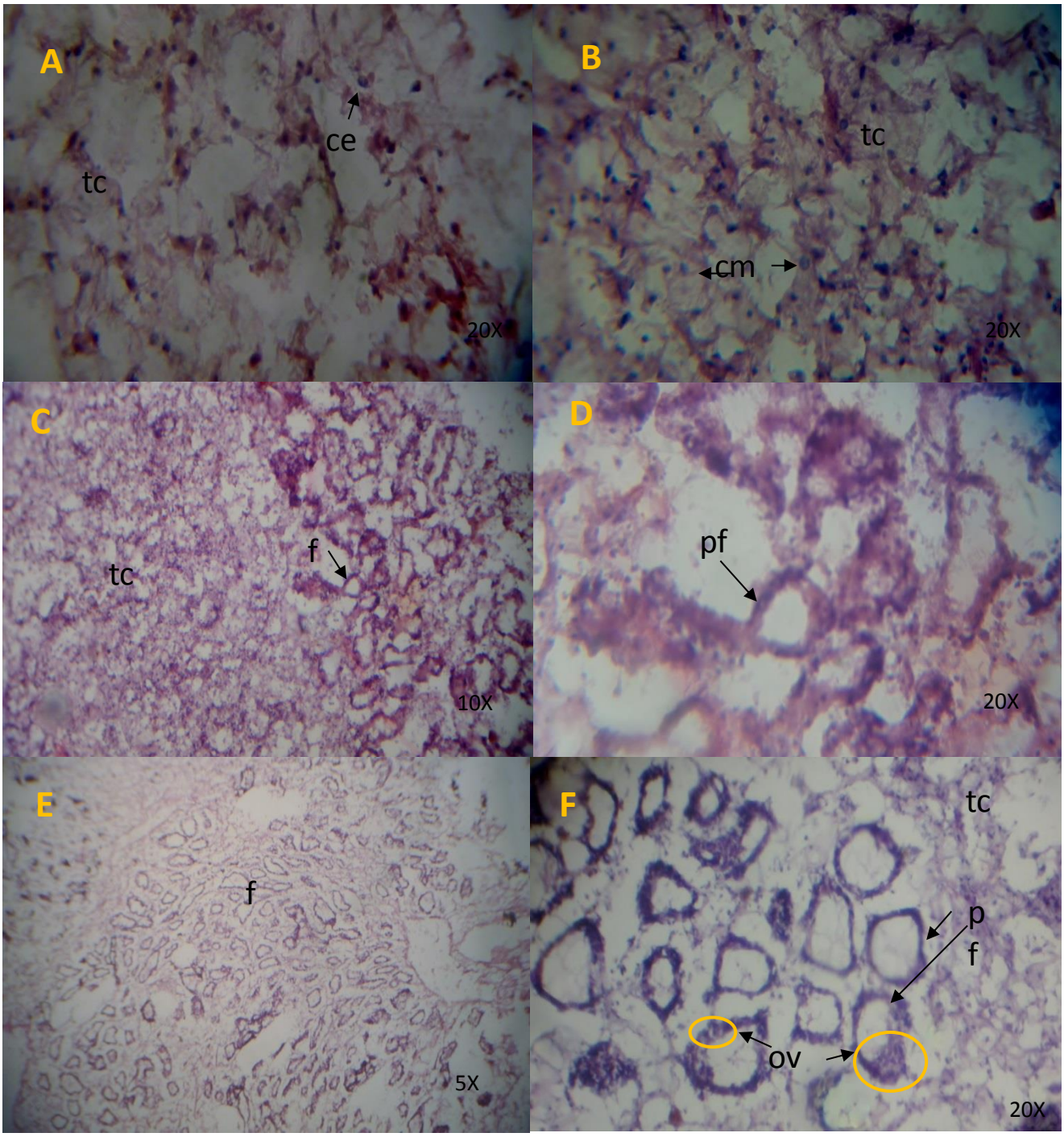


Figura 16. *Crassostrea virginica*, vista al microscopio. A y B) fase indeterminada, C) gametogénesis inicial, D) Detalle de fig. 16B, E) Gametogénesis inicial, F) Detalle de Fig. 16E; tc tejido conjuntivo, cm célula mesenquimatosas, f folículo, pf pared folicular, ov ovocito. H-E

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la influencia de la temperatura en la acumulación de hidrocarburos (HC) en organismos de *C. virginica* en condiciones de laboratorio, dado que los contaminantes orgánicos e inorgánicos tienen la capacidad de persistir en el ambiente presentan un peligro al acumularse en los tejidos de los organismos. Existen diversos factores que influyen en el proceso de bioacumulación, como el tipo de contaminante y las condiciones ambientales entre ellas la temperatura (Hill, 2010).

Durante este trabajo los organismos fueron expuestos a sedimento contaminado con hidrocarburos, con una concentración de 929.29 mg/kg de HC clasificado como fracción mediana, de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, este resultado es alto comparado con el trabajo realizado por San Martín *et al.,* 2012, donde al cuantificar la concentración de HC en sedimento colectado en la misma área de muestreo, determinaron un valor de 440.088 mg/kg de HC catalogado como de fracción ligera, según la norma antes mencionada. Esta diferencia de resultados puede deberse a factores como el punto de muestreo seleccionado dentro de la misma área y la cantidad de muestra colectada, además de factores como la topografía y la dirección del flujo del manto freático (Fernández *et al*., 2006).

Diversos trabajos han evaluado el grado de contaminación en sedimentos posterior a derrames de HC, como el elaborado por Mille *et al.,* 1998 quienes después de 13 años del derrame conocido como “Amoco Cádiz” reportaron una concentración de 947 mg/kg de HC en el medio marino, esta cifra resultó muy similar a lo establecido en los sedimentos utilizados en este trabajo.

En otras investigaciones posteriores a derrames de HC como las realizadas por Tronzynski *et al.*, 2004 tras el derrame ERIKA y Franco *et al.*, 2006 perteneciente a la compañía B/T PRESTIGE, calcularon cantidades menores a las reportadas en el presente trabajo con cuantificaciones de 5.15 mg/kg de HC y 422 mg/kg de HC respectivamente. Las altas concentraciones de HC presente en el sedimento utilizado en este trabajo es influenciado por el severo grado de contaminación en el ambiente acuático y terrestre del sitio de colecta, como resultado de la explosión del pozo de exploración a cargo de la empresa Pearson and Son en el año 1908 el cual en la actualidad no cuenta con las medidas de control y remediación necesarias por lo que la presencia de crudo en el ambiente es constante.

En relación a la cantidad de HC estimada en el tejido suave de los organismos, se determinó que el valor promedio más alto se registró en los individuos expuestos a 30°C (T1) con un promedio de 118 mg /kg HC, el 100% de los organismos expuestos al tratamiento presentaron contenido de HC en sus tejidos. La concentración máxima estimada en este trabajo es menor a la señalada por Torres *et al.,* 2012 ya que cuantificaron un promedio de 584.33 mg/kg HC en organismos de *C. rhizophorae* tras 30 días de exposición con concentraciones de hasta 1,406.13 mg/kg HC en condiciones naturales, durante las temporadas de invierno y verano.

Los valores más bajos de bioacumulación de este trabajo se presentaron en los organismos de los tratamientos testigo; blanco, Tt1 y Tt2, con concentraciones del 18, 29 y 25 mg/kg HC respectivamente, el contenido de HC se presentó en menos del 30% de los organismos. La presencia de HC en los tejidos de los individuos

puede estar relacionada a la capacidad de acumular contaminantes del sitio de colecta y a la poca eliminación del mismo durante el proceso de purga. Este comportamiento fue similar al observado por Di Salvo *et al.*, 1975 donde comprobaron que organismos de *Mytilus edulis* acumularon grandes cantidades de HAP durante 5 días de exposición y tras una semana de depuración los niveles fueron normales, por otra parte Kelly *et al.,* 2008 determinó concentraciones por encima de las cuantificadas en los organismos testigos de este trabajo, estimando un promedio de 66 mg/kg HC en organismos de *Ostrea edulis* 10 meses después de un derrame de más de 10,000 toneladas en el mar mediterráneo.

La presencia de HC en algunos organismos aun después del proceso de purga, puede ser consecuencia de una tasa de eliminación más lenta, causada por el tiempo de exposición y niveles de concentración del contaminante lo que habitualmente provoca la permanencia de pequeñas cantidades en el interior de los organismos (Iniesta y Blanco, 2005).

Al exponer a los organismos a ambientes contaminados con HC pero a una temperatura de 26 °C; T2, se calculó un promedio de 83 mg /kg HC, este resultado es mayor que lo reportado por Luchmann *et al.,* 2011 quienes determinaron concentraciones máximas de 0.292 mg/kg durante 96 horas de exposición a derivados de hidrocarburo (diésel) en condiciones de laboratorio.

Entre la concentración de HC presentes en organismos expuestos a diferentes temperaturas, se detalló que la concentración fue mayor en organismos expuestos a

30°C por lo que se estimó una diferencia de 35 mg de HC entre el T1 y T2, sin embargo esta diferencia no fue significativamente diferente ($p>0.05$), este resultado es similar al señalado por Torres *et al*., 2012, al no encontrar diferencias significativas en los niveles de acumulación de organismos expuestos a ambientes contaminados con HC, en dos temporadas del año en condiciones naturales. Las diferencias en los niveles de acumulación de los organismos en este trabajo podrían haber sido influenciado por diversos factores tales como el grado de contaminación (Establier 1977; López, 1989; Bou *et al*., 1995 y Blasco *et al.,* 2003), el tamaño, peso, diferencias fenotípicas, condiciones fisiológicas así como condiciones reproductivas (Martin *et al.*, 2006).

En relación a este trabajo, existen otras investigaciones como la de Ivanina *et al.*, 2009, donde se evaluó la influencia de la temperatura al utilizar las heat shock proteins (HSP) como un bioindicador de bioacumulación de Cd en organismos de *C. virginicia,* con lo cual estableció que la expresión de las HSP es mayor cuando los organismos se exponen a rangos de temperatura de entre 28-40 °C.

En cuanto a los organismos utilizados en este trabajo se precisó que el total de los individuos pertenecen a la etapa adulta según lo estipulado por Palacios y Vargas (2002), este resultado es similar a lo determinado por Vidal Briseño (2012) y Fuentes Pérez (2010),

Con respecto a la tasa de sobrevivencia (TS) de los organismos se determinó que este parámetro está altamente influenciado por la exposición a HC con una

temperatura de 30°C, ya que durante los 0-15 días los organismos pertenecientes al T1 (HC -30°C) fueron los únicos organismos que presentaron disminución de la TS de hasta el 73%, mismos que durante los 15-30 días del tratamientos redujeron hasta el 53% mientras que los organismos expuestos a HC con una temperatura de 26 °C (T2) presentaron una TS final del 93%.

Al evaluar únicamente el efecto de la temperatura sobre la TS, se logró determinar que este parámetro afecta la sobrevivencia de los organismos en menor medida que la presencia de HC, sin embargo en el Tt1 (30 °C) se estableció la menor tasa de sobrevivencia en comparación con los organismos pertenecientes al Tt2 (26 °C), obteniendo una TS final del 88%. La influencia de la temperatura sobre la TS estimada en este trabajo concuerda con lo descrito por Mazón *et al.*, 2001; Chávez y acosta *1995*; Contreras *et al.*, 2006 y Osuna Duarte, 2006 quienes reportaron mortalidades en condiciones ambientales de 30°C afectando principalmente a organismos adultos en condiciones naturales.

Los organismos correspondientes a los tratamientos Tt2 y blanco (26 °C) registraron una TS final del 93%, lo antes mencionado es similar a lo reportado por Diniz *et al.*, 2008, quienes señalaron el 100 % de sobrevivencia de organismos de *Corbicula fluminea* al exponerlos a una temperatura por debajo de los 26°C durante 28 días en condiciones de laboratorio.

La tasa de sobrevivencia puede estar relacionada con una respuesta de adaptación por parte de los organismos tras un periodo de mayor sensibilidad, que se acentúa

con la presencia de agentes estresores como la temperatura y los HC. La salud de los organismos así como el estadio gametogénico, son dos factores que influyen en la sobrevivencia de los organismos en condiciones de elevadas temperaturas (Quik, 1971).

En base a las biometrías realizadas se observó que las diferencias entre el peso promedio de los tratamientos no representaron diferencias significativas. Resultados similares detallo Rudy *et al.*, 1975, ya que al exponer organismos *C. virginica* a ambientes con temperaturas distintas en condiciones naturales no registró cambios significativos en el peso de los organismos.

En relación a la identificación de sexos se observó que este parámetro fue influenciado por la exposición a un ambiente con sedimento contaminado con HC, debido a que en los tratamientos T1 y T2, se identificó el mayor número de organismos considerados como indefinidos con porcentajes del 75% y 42%, y en menor proporción se observó la presencia de organismos hembras con el 25% y 58% respectivamente. La presencia de organismos considerados como indefinidos es consecuencia del poco o nulo desarrollo de las gónadas, se ha determinado que la exposición de organismos bivalvos a fuentes de contaminación como hidrocarburos o metales pesados afecta el desarrollo gametogénico (Rudy *et al*., 1975).

La exposición de organismos a ambientes libres de HC (testigos) generó una mayor predominancia de organismos hembra, obteniendo porcentajes entre el 61% (30 °C) y el 64% (26 °C). Sin embargo únicamente la exposición a 26 °C; tratamiento blanco

y Tt2, generó el desarrollo de organismos machos con porcentajes entre el 21 y 28% respectivamente por lo que la presencia de organismos indefinidos fue menor al 14%. En los organismos expuestos únicamente a 30 °C (Tt1) el desarrollo de organismos machos fue nulo y el porcentaje de organismos indefinidos fue del 38%.

El favorecimiento de temperaturas por debajo de los 30 °C en el desarrollo de organismos hembras coincide con lo estimado por Oliver *et al.,* 2001, quienes describieron mayor presencia de hembras en condiciones naturales con temperaturas entre los 22°C y 25 °C. Algunos de los factores como la disponibilidad de nutrientes y condiciones ambientales favorables, es decir sin presencia de HC y altas temperaturas, pudieron haber influido en el desarrollo de organismo hembras en ostiones maduros (Sevilla Hernández, 1993).

Existen pocos trabajos donde se determine el daño gonadal causado por la exposición de HC y la influencia de la temperatura, en el presente trabajo se describieron los efectos de las dos variables en el proceso gametogénico. En base a los resultados obtenidos se determinó que los organismos expuestos a 30 °C en presencia de HC presentaron afectaciones en el desarrollo visible de las gónadas, ya que al comparar estos organismos con los considerados como testigos, se logró identificar a simple vista la presencia de las gónadas desarrolladas sobre la glándula digestiva. Este resultado difiere de lo señalado por Rudy *et al.,* 1975, al observar la maduración temprana de gónadas expuestas en un ambiente relacionado con un canal de descarga de una planta hidroeléctrica con temperaturas de hasta 29 °C sin presencia de HC. El mismo autor señala que esta condición favorece la producción

de alimento para los organismos en condiciones naturales, produciendo las condiciones necesarias para una maduración gonadal temprana.

Al analizar histológicamente las gónadas, se observó que la presencia de HC y ambientes con una temperatura de 30 °C, no generó ningún tipo de célula anormal, a diferencia de lo señalado por Gold *et al.*, 1995, quienes al analizar organismos de *C. virginica* provenientes de lagunas contaminadas por metales pesados y HC determinaron daños histopatológicos en branquias, tracto digestivo, divertículo digestivo y tejido conectivo, provocando histopatologías como hiperplasia, edemas, incremento de hematocitos, y necrosis, se considera que los daños presentes en el tracto digestivo dependen del estado de maduración gonadal. No obstante no se presentaron datos del estado gonadal.

En el presente trabajo se analizaron únicamente las gónadas de los organismos sin embargo no se detectó presencia de alguna histopatología pero si se observaron afectaciones relacionadas con desarrollo gametogénico. En los organismos expuestos a sedimento con HC (T1 y T2) predominó el número de organismos que no se encontraban dentro de alguna etapa de maduración gonadal al apreciarse una amplia o total cobertura de tejido conectivo sin desarrollo de gametos, este comportamiento fue mayor al exponer a los organismos a ambientes con 30 °C (T1), y contrasta con lo observado en los organismos de los tratamientos testigo; tratamiento blanco, Tt2 y Tt1, los cuales no estuvieron en contacto con HC, por lo que predominaron los organismos dentro de la etapa de gametogénesis inicial y

gametogénesis avanzada, apreciándose el desarrollo de ovocitos maduros y espermatogonias dentro de los folículos.

El escaso desarrollo gametogénico observado en los tratamientos expuestos a HC, podría ser consecuencia de los productos tóxicos derivados de la exposición a 30 °C de temperatura (Bertilsson y Widenfalk, 2002) además de que influye de manera importante principalmente ante la exposición de metales pesados, provocando efectos directamente en las reacciones fisiológicas (Hochachka y Somero, 2002; Gordon, 2005; Sokolova y Lanning 2008).

Los resultados de este trabajo describen el grado de tolerancia de moluscos bivalvos *Crassotrea virginica* a la exposición de ambientes contaminados con HC a elevadas temperaturas así como los efectos en la bioacumulación en el tejido blando de los organismos y el desarrollo gametogénico, generando un posible panorama ante los cambios de la temperatura global derivados del cambio climático y la influencia en los ambientes contaminados con hidrocarburos.

CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA

- En el presente trabajo los organismos pertenecientes a los tratamientos T1 y T2 fueron expuestos a sedimentos contaminados con hidrocarburos con una concentración de **929.29 mg/kg de HC**, clasificado como fracción ligera según la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

- Los organismos expuestos a hidrocarburos con una temperatura ambiental de 30 °C, presentaron mayor contenido de hidrocarburos con un promedio de **118 mg/kg HC** extraído del tejido blando, ya que en los organismos expuestos a sedimento con hidrocarburos a 26° C se cuantificó un promedio de **83 mg/kg HC**. Obteniendo una diferencia de 35 mg de HC entre los tratamientos.

- El total de organismos utilizados en todos los tratamientos pertenecen a la etapa adulta.

- La tasa de sobrevivencia (TS) de los organismos es influenciada por la exposición a ambientes con **30 °C** de temperatura y su efecto es mayor en presencia de HC (T1) obteniendo una TS del **53%**, presentando los efectos durante los 0-15 días del tratamiento.

- Los organismos expuestos a sedimento contaminado con hidrocarburo con una temperatura ambiental de **26 °C** (T2) no mostraron afectaciones significativas en la TS, ya que obtuvieron un porcentaje final del **93%.**

- **Los tratamientos testigo** presentaron la TS más alta, obteniendo valores del **86%** para los organismos expuestos a **30 °C**, y el **93%** para los tratamientos con **26 °C** respectivamente.

- El peso promedio de los organismos no fue afectado significativamente por la exposición a HC a distintas temperaturas.

- La exposición de organismos a ambientes contaminados con HC afecto el desarrollo de gametos sexuales por lo que la mayor presencia de **organismos indefinidos** se observaron en el **T1 (30 °C) y T2 (26 °C)** con porcentajes del **75% y 42%** respectivamente, observando un menor número organismos hembras equivalentes al 25% y 58%.

- Los **tratamientos testigo** fueron conformados principalmente por organismos **hembras** con porcentajes entre el **61 y 64%** sin embargo únicamente en el tratamiento blanco y Tt2 (**26 °C**) se identificaron organismos **machos** con una cobertura del **28 y 21%** respectivamente, resultando minoría los considerados como indefinidos.

- El desarrollo visible de las gónadas fue determinado en mayor medida por la exposición a HC y este a su vez fue influenciado por la exposición a 30 °C de temperatura.

- Entre el **42 y 75%** de los organismos expuestos a **ambientes con HC** (T1 y T2) **no presentaron desarrollo gonadal**, por lo que la identificación dentro de alguna fase gametogénica fue nula, presentándose en menor proporción organismos en la fase de gametogénesis inicial.

- Los organismos expuestos a ambientes libres de HC considerados como **tratamientos testigo**, pertenecieron a dos fases gametogénicas; **gametogénesis inicial y avanzada**, en las cuales fue evidente el desarrollo de ovocitos maduros y espermatocitos.

- El presente trabajo ofrece un panorama de las posibles afectaciones reproductivas presentadas en el ostión americano *Crassotrea virginica* causadas por la exposición a HC y ambientes con altas temperaturas. Al ser este organismo uno de los principales recursos pesqueros de la región, y presentar disminución en sus poblaciones en los últimos años, el presente trabajo puede fungir como referencia para la elaboración de estudios en campo destinados a la búsqueda de posibles daños a nivel gonadal de los organismos presentes en el ambiente ocasionados por los derrames de hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA

Alpuche, G. L. 2010. Algunas consecuencias del derrame de petróleo en el Golfo de México. Centro EPOMEX. Revista Fomix Campeche,México. 28-34

Anuario estadístico de acuacultura y pesca. 2008. CONAPESCA, SAGARPA, hoja electrónica de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. http://www.conapesca.gob.mx/wb/.

Bayne, B.L., Brown, D.A., Harrison, F., Yevich, P., Varela, D. G. y Webber D.L. 1980.

Mussel health. pp. 193-235. *In:* The International Mussel Watch. National Academy of Sciences, Washington. D.C.

Bebianno, M. y Barreira, L. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons a concentration and biomarkers response in the calm Rudi tapes decussates transplanted in the Ria Formosa lagoon, Ecotoxicology. Environ. Saf. 72.1849-1860.

Benchuey, P. 1999. Las Galápagos, paraíso en peligro. National Geographic 4: 20-31.

Bernabeu, A.M., Nuez de la Fuente, M., Rey, D., Rubio, B., Vilas F., Medina, R., González, M.E. (2006). Beach morphodynamics forcements in oiled

shorelines: Coupled physical and chemical processes during and after the burial. Marine Pollution Bulletin, 52:1156- 1168

Berthou, F., Balouet, G., Bodennec, G y Marchad, M. 1987. The occurrence of hydrocarbons and histophatological anomarlities in oyster for seven years following the wreck of the Amoco Cádiz in Brittany (France). Mar. Environ, Pollut. 23:103-133.

Bertilsson, S. y Widenfalk, A. 2002. Photochemical degradation of PAHs in freshwater and their impact on bacterial growth-influence of water chemistry. Hydrobiologic, 469:23-32.

Botello, A.V., Ponce, G., Toledo, A., Díaz G. y Villanueva, S. 1992. Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México, Ciencia y Desarrollo, XVIII (102): 28-48.

Botello, A.V., 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, p.261- 258. e*n*: A.V. Botello, J Rendo, G.Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias, 2da Edición, Univ. Antón. De Campeche, Univ. Nal. Antón. De México, Instituto Nacional de Ecología, 696 p.

Burns, W.A., Mankiewicz, P.J, Bence, A.E., Page, D.S., Parker, K.R. (1997). A principal component and least-squares method for allocating polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment to multiple sources. Environmental Toxicology and Chemistry, 16:1119-1131

Brooks, J. 1990. Classic petroleum provinces p. 1-8 *In*: J.Brooks (Ed), Classic petroleum. Geological Society Special Publication 50.

Chávez, P.C. y M.J. Acosta. 1995. Desarrollo Gonadal de Crassostrea gigas en la bahía de San Quintín, Baja California, México. Ciencias Marinas (1995), 20(2): 225-242

Clarck, R.C. & D.W. Brown, 1977. Petroeum, properties and analices in biotic system, p 1-89. *In:* D.c. Malins (Ed), Effects of Petroleum on Artic and Subartic Marine Environments and Organisms Vol. 1. Academy Press, New York.

Doubilet, D. 1999. Las Galápagos bajo el agua. National Geographic 4:32-41.

EPA. 2000. Global warming impacts. Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/globalwarming/impacts

Extension Toxicology Network, Toxicology Information Briefs, Defining bioaccumulation, 1993.

Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Hernández, R., Reyes, R., Flores, D. y Arce, J. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. 89 -101.

Foote, R., Martin, R. y Powers, R. 1983. Oil and gas potential of the maritime boundary region in the Central Gulf ok México. The American Association of petroleum geologist bulletin, 67(7):1047-1065.

Fossato, V.U. y Canzonier, W.J. 1976. Hydrocarbon uptake and loss by the mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology 36: 243-250.

Franco, M.A, Viñas, L, Soriano, J.A., Alves, I., Bargiela, J., González, J.J. (2004). Valoración y seguimiento de un derrame de fuel en la ría de Vigo. XII Seminario Ibérico de Química Marina. La Coruña.

Franco, M.A, Viñas, L., Soriano, J.A., De Armas D., González, J.J., Beiras, R., Salas, N., Bayona, J.M., Albaigés, J. (2006). Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the Prestige oil spill. Marine Pollution Bulletin, 53:260-271

García, D. 2005. Manual de análisis de alimentos. Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 69:24-27

Gold, G., Sima, R., Zapata, O. y Güemez, J. 1995. Histopathological Effects of Petroeum Hydrocarbons and Heavy Metals on the American Oyster (*Crassostrea virginica*) form Tabasco, Mexico. Elsevier Science. 439 - 445.

Gordon, C.J. 2005. Temperature and toxicology: An integrative, comparative and environmental approach. Boca Raton, London, New York, Singapore.

Hill, M. k. Understanding Environmental Pollution, Cambridge University Press, 3rd Edition, 2010. 143-155

Hochachka, P.W. y Somero, G.N. 2002. Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press.

Iniesta, R. y Blanco, J. 2005. Bioacumulación en moluscos. 52-82. Bioacumulación de hidrocarburos y metales asociados a vertidos accidentales en especies de interés comercial de Galicia. Revista Galega dos Recursos Mariños (Monog.): 2, 200pp.

Ivanina, A.V., Tylor, C. y Sokolova, I.M. 2008. Effects of elevated temperature and Cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassotrea virginica* (Gmelin). Aquatic toxicology. Elsevier. 91:245-254

Konachy, J. y Maguire, R. 1994. Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic nitrogen heterocyclic in aquatic environments, Sci. Total Environ. 144: 17-31

Le Dréau, Y., Doumenq, P., Lamontagne, J., Kister, J., Mille, G. (2000). PAHs in sediments contaminated by the haven oil spill (GENOESE BAY). Polycyclic Aromatic Compounds, 20:111-122

Lee, R.F., Gardner, W.S., Anderson, J.W., Blaylock, J.W. y Barwell-Clarke, J. 1978 Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in controlled ecosystem enclosures. Environmental Science and Technology 12 (7): 832-837.

Lorente, I., Gamo, D., Gómez, J.L., Santos, R., Flores, L., Camacho, A., Galindo, L. y Navarro, J. 2004. Los efectos biológicos del cambio climático. Asociación Española de ecología terrestre. Ecosistemas 13(1): 103-110.

Lüchman, K., Mattos, J., Siebert, M., Granucci, N., Dorrington, T., Bicego, M., Taniguchi, S., Sasaki S.,Dura, F. y Bainy, A. 2011. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassotrea brasilliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. Aquatic toxicology. p.9

Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L. y Varanasi, U.1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organism. In: Ware, G.W., (Ed.) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 143, pp. 79-165.

Mill, T., Mabey, W., Lan, B. y Baraze, A. 1981. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. Chemosphere 10:1281-1290.

Mille, G., Muñoz, D., Jacquot, F., Rivet, L., Bertrand, J.C. (1998). The Amoco Cadiz Oil Spill: Evolution of Petroleum Hydrocarbons in the Ile Grande Salt Marshes (Brittany) after a 13-year Period. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 47:547-559

Neff, J.M. 2002. Polycyclil aromatic hydrocarbons in the ocean. In: Neff ,J.M. (Ed), Bioaccumulation in Marine Organisms. Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water. Elsevier, Amsterdam, pp. 241-318.

Oliver, M.L., Fisher, S.W., Winstead T.J., Hemmer, L.B. y Long, R.E. 2001. Relatinship between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassotrea virginica*) from five Florida bays. Aquatic Toxicology, 55:203-222.

Palacios, F.M., y Vargas, R. R. 2002. Pesquería del ostión. Pág. 25 – 241. En: La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo. Universidad Veracruzana -Instituto Nacional de Pesca. Xalapa, Veracruz, México.

Pastor, D., Sánchez, J., Porte, C., Albaigés, J. (2001). The Aegean oil spill in the Galica coast (NW Spain).I. Distribution and fate of the crude oil and combustion products in subtidal sediments. Marine Pollution Bulletin, 42:895-904.

Page, D. S., Boehm, P.D., Stubblefield, W.A., Parker, K.R., Gilfillan, E.S. Neff, J.M., Maki, A.W. (2002). Hydrocarbon composition and toxicity of sediments following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska, USA. Environmental Toxicology and Chemistry, 21:1438-1450.

Pécseli, M., Pritzl, G., Andersen, O., Banta, G., Hansen, A.B., Christensen, J., Hviid, T., Malmborg, L., Johansen, K., Lysholdt, J. (2002). The Baltic Carrier Oil Spill. Monitoring and Assessment of Environmental Effects in Gronsund (DK). Storstroms Amt, Teknik-og Miljoforv-altningen, Nykobing F., Denmark.

Pereira, W.E., Hostettler, F.D., Luoma, S.N., Van Green, A., Fuller, C.C. y Anima, R.J. 1999. Sedimentary record of anthropogenic and biogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Bay, California. Marine chemistry, 64: 99-113.

Rahman, L., Spingael, P. y Harms, H. 2003. Elementos a considerar para integrar las bases políticas para la prevención de la contaminación del suelo y remediación.

Ruddy, G.M., Feng, S.Y. y Campbell, S. 1974. The effect of prolonged exposure to elevated temperatures on the biochemical constituents, gonadal developed and shell deposition of the American oyster*, Crassostrea virginica. Comp*. Biochem. Physiol., pp. 157-164.

Ruiz, D.M., 1985. Recursos pesqueros del Golfo de México. Segunda edición, Limusa México, D.F. p.201

Sanders, G., Jones, K. y Hamilton, J. 1993. A simple method to assess the susceptibility of polynuclear aromatic hydrocarbons to photolytic decomposition. Atms Environ. 27: 139-144.

Solé, M., Buet, A., Ortiz, L., Maynou, F., Bayona, J.M. y Albaigés, J. 2007. Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the wáter-accommodated fraction of the Prestige fuel oil. Sci. Mar. Pp 71, 373-382.

Sokolova, I.M. y Lanning, G. 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: Implications of global change. Climate Res. 37, 118-201

Torres, R.J., Cesar, A., Pereira, C., Choueri, R., Abessa, D., do Nascimento, M., Fadini, P. y Mozeto, A. 2012. Bioacumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Mercury in Oysters (*Crassotrea rhizophorae)* from two Brazilian Estuarine Zones. Hidwai Publishing Corporation. International Journal of Oceanography. Pp. 8

Tronczynski, J., Munschy, C., Héas-Moisan, K., Nadège, G., Truquet, I., Olivier, N., Men, S., Furaut, A. (2004). Contamination of the Bay of Biscay by polycyclic aromatichydrocarbons (PAHs) following the T/V "Erika" oil spill. Aquatic Living resources, 17:243-259.

Uria, G. E. y Mora, C. 1996. Apuntes para el curso teórico practico de histología animal. Instituto Politécnico Nacional. Mexico, D.F. 22-34.

Wang, W.X. 2002. Interactions of trance metals and different marine food chains. Marine Ecology. 243:295-03

Yim, U.H., Hong, S.H., Shim, W.J., Oh, J.R., Chang, M. (2005). Saptio-temporal distribution and characteristics of PAHs in sediments from Masan Bay, Korea. Marine Pollution Bulletin, 50:316-326