



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**BIOMARCADORES DE METALES PESADOS Y
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFATADOS EN
ORGANISMOS ACUÁTICOS DEL RÍO HARDY Y
ALTO GOLFO DE CALIFORNIA**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

L á z a r o C a d e n a C á r d e n a s

La Paz, B.C.S. Marzo de 2010

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 16 del Mes de Febrero del 2010, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Biomarcadores de metales pesados y plaguicidas organofosfatados en organismos acuáticos del Río Hardy y Alto Golfo de California"

Presentada por el alumno:

Lázaro Cadena Cárdenas

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



Dra. Lia Méndez Rodríguez

LA COMISION REVISORA


Dra. Jaqueline García Hernández

INSERTAR NOMBRE
DIRECTOR DE TESIS


Dra. Tania Zenteno Savín

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR


Dra. Norma Hernández Saavedra

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR



Dra. Sara Díaz Castro

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR

INSERTAR NOMBRE
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERRIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Resumen

El Delta del Río Colorado tiene como actividad principal la agricultura desde los años 40's. En esta extensa área existe un sistema de drenaje agrícola que sigue el cauce hasta el Delta del Alto Golfo, donde se ha formado un importante corredor ripario. Inmerso en este ambiente, se localiza el Río Hardy que es el Dren colector principal de los valles de Mexicali y San Luis Río Colorado. Adicionalmente, este sistema, recibe agua residual urbana con residuos de metales como mercurio, selenio, cadmio y plomo de origen natural y antropogénico. Debido a la falta de registro se desconoce la cantidad aplicada de plaguicidas. Con base en ésta problemática, se plantea la hipótesis de que los organismos residentes del Río Hardy están siendo afectados de manera negativa. Para evaluar esta premisa, se tomaron como especies centinelas al balano *Balanus amphitrite* en el parte del río y a *Chione californiensis* en el Alto Golfo de California, y como biomarcadores la actividad de Glutación S Transferasa (GST), Glutación Peroxidasa (GPx), concentración de lípidos peroxidados (TBARS), proteínas carboniladas (ProtCarb) e inhibición de acetilcolinesterasa. La concentración de metales pesados (Hg, Pb, Cd, Cu y Se) y plaguicidas organofosfatados, se analizó también en los organismos. Mediante el gráfico de estrella, se plantea determinar la o las variables con la mejor respuesta en cada punto. Como resultados se determinó que las concentraciones de metales no excedieron los límites permisibles de las normas oficiales. El Malatión fue el único plaguicida organofosforado detectado y cuantificado (0.5 a 3 µg/kg). Se determinó una inhibición de acetilcolinesterasa mayor al 70% en balanos, mientras que en almejas no fue significativa. Las TBARS y Prot Carb son similares a las registradas por otros autores en áreas impactadas por actividades agro-industriales. La actividad de la GST y GPx, muestra que los organismos están en un proceso constante de asimilación y detoxificación de compuestos xenobióticos. El gráfico de estrella muestra

que la variable con mejor respuesta no siempre es la misma en una escala temporal y espacial . Esto hace suponer que a lo largo del cauce del Río Hardy existen aportes de agua adicionales al flujo de agua residual agrícola, con una carga variable de contaminantes. Lo que tiene como consecuencia que en algunos sitios del muestreo, las defensas antioxidantes sean insuficientes y se refleje daño a través de una alta concentración de Prot Carb. Se concluye que el Río Hardy es un ecosistema impactado en donde los organismos residentes (ej. balanos) se han adaptado fisiológicamente para sobrevivir bajo estas condiciones. El impacto que presentan estos organismos, nos hace pensar, que otros organismos acuáticos sésiles mas sensibles, como langostinos, almejas, y otros invertebrados que no cuenten con una respuesta fisiológica efectiva, no pueden sobrevivir en este ambiente hasta que no se realicen labores de restauración que mejoren las condiciones del hábitat.

Abstract

Since the early 40's the agriculture is the principal activity in the Colorado River Delta. This extended area presents a drain system from the border to the upper Gulf of California, where the most extensive riparian corridor in northwest of México is formed. Immerse in this environment the principal collector drain of the Mexicali and San Luis Río Colorado agricultural valley called Río Hardy is located. In addition, this system, achieves elements traces like mercury, selenium, cadmium and lead of urban residual water. Despite the absence of a pesticides application record the amount of this kind of compound is still unknown. Based on this problematic, the proposal could be as the following hypothesis "Negatives effects are present in the inhabitant organisms from the Río Hardy". To evaluated this premise, the barnacle *Balanus amphitrite* like inhabitant of river and the white clam *Chione californiensis*, in the Gulf of California. Like biomarkers battery the Glutathione Peroxidasa (GPx), Glutathione S Transferase (GST), lipids peroxidation (TBARS), Carbonyl proteins (Carb Prot) levels and Acetylcholinesterase inhibition was employed. The heavy metals concentration (Hg, Pb, Cd, Cu and Se) and organophosphorus pesticides levels were analyzed in the organisms. The star plot is proposed to evaluate the best response to determine the IBR in each sample point. As results the levels of heavy metals do not exceed the permitted limit. Only the Malathion presence was detected and quantified (0.5 to 3 µg/kg). Upper than 70 % of inhibition was calculated in barnacles, while in clams were not significant. TBARS and Carb Prot were similar to other reports carried out in agrochemical impact areas. The GST and GPx activities showed a constant process of assimilation and detoxification of xenobiotics compounds. The star plot revealed that the best response is not the same in each case of study. This statement could be indicated a different and

dissimilar effluent discharges along of the Río Hardy. As consequence; in some study stations, the antioxidant defenses are not capable to compensate the attack of reactive oxygen species and damage is observed with high levels of Carb Prot. The intrinsic physiologies of barnacles have contributed successfully in this kind of extreme environments.

INTRODUCCIÓN.....	1
Presencia de contaminantes.....	2
Efectos celulares.....	4
Contaminantes no persistentes.....	9
Biomarcadores.....	12
Biomarcadores de estrés oxidativo.....	13
<i>Balanus amphitrite</i>	21
<i>Chione californensis</i>	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
ÁREA DE ESTUDIO.....	25
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
Objetivos Particulares.....	31
METODOLOGÍA.....	32
Trabajo de Campo.....	32
Trabajo de laboratorio.....	35
Trabajo de escritorio.....	43
RESULTADOS.....	44

Bioensayo	44
Elementos traza.....	45
DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	99

Figuras

Figura 1. Área de estudio. RíoHardy y Alto Golfo de California	27
Figura 2. Área de sitio control, El Estero del Soldado, en Guaymas Sonora.	30
Figura 3. a) Vista de los sitios de muestreo a) y b) Dren Durango, c) y d) Campo Mosqueda e) y f) Campo Muñoz.....	33
Figura 4. Vista de los sitios de muestreo a) y b) Campo Ramona, c) y d) Tapón Norte, e) y f) Tapón Sur.....	34
Figura 5. Tendencia de la concentración de Pb en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).....	47
Figura 6. Tendencia de la concentración de Cd en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).....	49
Figura 7. Tendencia de la concentración de Hg en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).....	51
Figura 8. Tendencia de la concentración de Cu en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).....	53

Figura 9. Tendencia de la concentración de Se en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).....	55
Figura 10. Actividad promedio de la enzima GPx por sitio durante los diferentes meses de muestreo.....	59
Figura 11. Actividad promedio de la enzima GST por sitio durante los diferentes meses de muestreo.....	62
Figura 12. Concentración promedio de lípidos peroxidados, por sitio durante los diferentes meses de muestreo	65
Figura 13. Concentración promedio de Proteínas carboniladas, por sitio durante los diferentes meses de muestreo.	68
Figura 14. Preferencia del substrato en a) el balano <i>B. amphitrite</i> y b) <i>C. californiensis</i> en presencia de acetiltiocolina, butiriltiocolina y el inhibidor isompa.....	69
Figura 15. Porcentajes de inhibición calculados de la enzima acetilcolinesterasa por sitio y meses de muestreo.....	72
Figura 16. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Dren Durango durante los diferentes meses de muestreo	74
Figura 17. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Campo Mosqueda durante los diferentes meses de muestreo.....	75
Figura 18. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Campo Muñoz durante los diferentes meses de muestreo	76

Figura 19. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Campo Ramona durante los diferentes meses de muestreo	77
Figura 20. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Tapón Norte durante los diferentes meses de muestreo	78
Figura 21. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Tapón Sur durante los diferentes meses de muestreo	79
Figura 22. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Alto Golfo durante los diferentes meses de muestreo	80
Tablas	
Tabla I. Coordenadas geográficas en UTM's de cada uno de los sitios del muestreo. ...	28
Tabla II. Actividad promedio de las diferentes enzimas analizadas en balanos en el sitio control.....	45
Tabla III. Concentraciones de Malatión ($\mu\text{g}/\text{kg}$) mensual por sitio de muestreo.....	56
Tabla IV. Actividad promedio mensual de la enzima GPx ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Prot}$) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD $p < 0.05$	117
Tabla V. Actividad promedio mensual de la enzima GST ($\text{nmoles mg}^{-1} \text{Prot}$) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD $p < 0.05$	118

Tabla VI. Concentración promedio mensual de Lípidos Peroxidados (nmoles mg ⁻¹ Prot) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD p < 0.05.....	119
Tabla VII. Concentración promedio mensual de Proteínas Carboniladas (nmol mg ⁻¹ TH) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD p < 0.05.....	120
Tabla VIII. Porcentajes de inhibición observados durante el bioensayo con una mezcla de 6 plaguicidas.	121
Tabla IX. Porcentaje de inhibición observado en balanos y almejas del Río Hardy y Alto Golfo.....	122

INTRODUCCIÓN

A través de los años, gran parte del ecosistema adyacente al histórico delta del Río Colorado, ha sido transformado en campos agrícolas, poblados y grandes ciudades. En la actualidad, únicamente se conservan poco más de 170,000 ha de áreas naturales en territorio mexicano, comprendiendo hábitats riparios, humedales salobres y ambientes intermareales desde la línea fronteriza hasta la desembocadura del Delta del río Colorado en el Alto Golfo de California (Glenn et al., 1996 y 2001). Esta zona ha sido objeto de diversos estudios, siendo el primero el realizado por MacDougal (1905 y 1907) del New York Botanical Garden, quien describió la vegetación del área realizando cortos recorridos desde Yuma Arizona hasta el Alto Golfo de California. Posteriormente Leopold (1949) describió la presencia de una gran diversidad de vegetación, como álamos, sauces, junco y pino salado (Glenn et al., 2001). Gran parte de esta área, en conjunto con una porción de zona marina adjunta, engloban la reserva de la biosfera del Alto Golfo de California y Delta del río Colorado (Morales-Abril, 1994). En esta área natural protegida habitan especies en peligro de extinción como la vaquita marina (*Phocoena sinus*), el palmoteador de yuma (*Rallus longirostris yumanensis*) y el pez cachorrillo del desierto (*Cyprinodon macularius*), con especies de gran importancia comercial como la curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*), el camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*), el camarón azul (*Lithopenaeus stylirostris*), y la almeja blanca (*Chione* sp.).

La biodiversidad de esta importante zona está amenazada por varios problemas, como es el escaso flujo del Río Colorado originado por la construcción de las grandes presas en el alto

Río Colorado, así como por la presencia de agua proveniente del drenaje agrícola (también llamada agua de retorno) que fluye actualmente hacia la desembocadura del Alto Golfo de California a través del Río Hardy (dren colector principal). A lo largo de su cauce existen asentamientos humanos en los que se desarrollan diversas actividades, como el ecoturismo, el turismo sinérgico y la pesca artesanal. Por años, el evidente deterioro del Delta del Río Colorado fue poco atendido, hasta que recientemente se le destinaron, a este gran humedal, significativos esfuerzos de restauración. En este contexto, se han realizado diversos estudios para evaluar la recuperación del sistema. Con esta meta, actualmente se encuentran colaborando diversas organizaciones comunitarias como la Asociación Ecológica de Usuarios del Río Hardy y Colorado (AEURHYC); organizaciones no gubernamentales como el Sonoran Institute (SI), Pronatura Noroeste, universidades como la Universidad de Arizona (UA) y la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y centros de investigación como el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Todas estas instituciones en conjunto realizan un gran esfuerzo encaminado a caracterizar y restaurar esta área. Zamora et al. (2001) reportan que en los últimos 20 años se ha logrado regenerar el 23 % de la vegetación en una franja de 100 km a partir de presa Morelos hacia la desembocadura del Río Colorado.

Presencia de contaminantes

Aunque son numerosos los trabajos efectuados en esta zona, son escasos los relacionados con niveles de contaminantes. Entre la información existente, se encuentra un estudio

realizado por la comisión federal de electricidad (CFE) (1987) donde se estima que el Río Hardy recibe desechos con altas concentraciones de arsénico (As) y Boro (B) de la planta geotérmica de Cerro Prieto. Posteriormente, Gutiérrez-Galindo et al. (1988) determina de 0.01 a 0.32 mg/kg en peso seco (dw) de Hg en almejas y peces de los canales de irrigación y drenes agrícolas del valle de Mexicali, producto de los gases emanados de la planta geotérmica citada anteriormente. Mora y Anderson (1995) determinan en diferentes especies de aves 5.1, 28.8, 2.1 7.6, 4.6 y 10.0 mg/kg (dw) de Selenio (Se), Zinc (Zn), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), y B respectivamente así como 2.1, 14, 0.9, 2.2, 1.4, 2.9 mg/kg (dw) de Se, Zn, Cd, Cu, Cr y B en peces de la misma área en el mismo periodo de muestreo. García-Hernández et al. (2001) quienes registraron de 0.48 a 18.34 mg/kg (dw) de Se en sedimento y biota a lo largo del Río Colorado y en la boca del Alto Golfo. Daesslé et al. (2008) determinan de 3-30 mg/kg (dw) de As, 0.023-0.043 mg/kg de Hg y de 16-40 mg/kg (dw) de Pb en el cauce del Río Colorado. En el Río Hardy las concentraciones de estos mismos metales 1-20, 0.030-0.036 y 5-29 mg/kg. (dw) Shumilin et al. (2007) en la sección marina del Delta determina de 0.38-15 mg/kg (dw) de As.

Mora (1991) detectó concentraciones mayores 5 mg/kg de DDE en huevos de la garcita garrapatera (*Bubulcus ibis*) y determinó que aunque existe un correlación negativa entre la concentración de diclorodifenildicloroetano (DDE) y el grosor de huevo, el éxito reproductivo no se ve afectado por este contaminante. En 1993 la dirección General de Ecología de B.C. estimó que junto con el agua de retorno llegan más de 70,000 T de fertilizantes y 400,000 L de insecticidas empleados durante 1990-91 en los diferentes ciclos

de cultivos. Vega-Cazares (2001) realizó ensayos de actividad de acetilcolinesterasa en cerebro de esta misma ave estimando una inhibición promedio de más del 30% relacionándolo directamente con el uso de plaguicidas organofosfatados en los valles agrícolas de Mexicali y San Luís Río Colorado.

Efectos celulares

La presencia de contaminantes en esta importante región significa un grave riesgo para las especies que ahí habitan, dada su potencial capacidad de inducir estrés oxidativo. Esto ocurre por la acción directa de un elemento o compuesto que intervenga en el ciclo redox o como una consecuencia de una biotransformación a compuestos que alteren el ciclo redox (Halliwell y Gutteridge, 1999; Livingstone, 2001). Los efectos tóxicos de la contaminación ambiental, especialmente a nivel celular puede, en parte ser adjudicada, a las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Regoli et al., 1998). Este efecto tóxico es potencialmente peligroso, dado que el ambiente marino llega a actuar como el receptor de muchos contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), Bifenilos Policlorados (PCBs), metales de transición, hidroxilaminas aromáticas y compuestos nitrogenados aromáticos (Zenteno-Savín, 2002). Los metales pesados presentes en una solución son altamente reactivos y tienen la capacidad de combinarse rápidamente con muchas moléculas. Entre ellas, se encuentran las que constituyen la membrana celular, tales como las proteínas y los fosfolípidos. El mecanismo de la reacción estará determinado por la carga eléctrica (Perkins, 1981), por la presencia de estructuras quelantes, tales como grupos SH, y por la estructura terciaria de las proteínas.

Los metales pesados, dada su alta reactividad, no son capaces de entrar a las células por difusión iónica sin reaccionar con la membrana. Esto se ha comprobado en estudios *in vitro* donde las células son expuestas a compuestos metálicos inorgánicos. *In vivo*, los metales siempre forman complejos con una gran variedad de compuestos ligantes, en lo que están incluidas moléculas como glutatión, cisteína y otros aminoácidos; así como diversos metabolitos, entre ellos el ácido cítrico, aniones inorgánicos, etc. Tales compuestos constituyen la membrana celular y compiten por los metales pesados con ligantes difusibles (Foulkes, 1996). Algunos metales entre los que están incluidos cobalto (Co), Hg, níquel (Ni), Cd, molibdeno (Mo), vanadio (V), Cr, aluminio (Al), Se y As (estos dos últimos pertenecientes al grupo V de la tabla periódica con propiedades intermedias entre metales y no metales) han sido considerados causantes de un incremento en la tasa de producción de ERO, por lo tanto, de estrés oxidativo. En estudios *in vitro* han observado la peroxidación de lípidos en células aisladas expuestas a metales, lo cual se ha confirmado en experimentos *in vivo* en organismos que fueron inyectados con metales. Se ha concluido que la peroxidación puede ser una consecuencia del daño al tejido y la disminución del Glutatión (Foulkes, 1996). Algunos de los elementos que se han registrado en ésta área han sido Pb, Hg, Cd, Se y As, los cuales se discuten con mayor detalle a continuación.

Plomo

Los animales y plantas frecuentemente son expuestos al Pb generado de vehículos automotores, pinturas, baterías de ácido-plomo y por la contaminación de alimentos y bebidas, comúnmente tiene dos valencias, Pb^{+2} y Pb^{+4} , y no cataliza por sí sólo las

reacciones con radicales libres. Este elemento es neurotóxico y puede causar daño a los eritrocitos, al sistema inmune y al riñón. El mecanismo de toxicidad del Pb inhibe el ácido delta-aminoloevolinico, con lo cual se acumula y oxida la hemoglobina a metahemoglobina acompañada de una acelerada formación del radical super oxido ($O_2^{\cdot-}$). El Pb depende de la homeostasis del calcio, lo que le da la posibilidad también de interferir con el liberador del neurotransmisor dependiente del calcio. El Pb^{2+} se introduce a las células a través de los canales de Ca combinándose rápidamente con los grupos $-SH$ de las proteínas. En altas concentraciones puede causar la disminución de GSH (Halliwell y Gutteridge, 1999). En el Delta del Río Colorado se ha determinado hasta $2.0 \mu\text{g/g}$ (dw) en almejas de agua dulce (*Corbicula* sp.) $1.4 \mu\text{g/g}$ (dw) en peces, $3.46 \mu\text{g/g}$ (dw) en sedimentos y $1.7 \mu\text{g/g}$ (dw) en langostinos (García-Hernández et al., 2001).

Mercurio

El Hg es conocido por el impacto que causó en los años 60's en la bahía de Minamata, Japón. Este elemento llegó a dicha región con el agua de desecho del lavado de tanques que almacenaban fertilizantes en los que era uno de sus componentes activos. Los peces y moluscos bioacumularon en su organismo este metal y posteriormente fueron consumidos por los pobladores de esta región, causando daños neurológicos. El Hg es biotransformado a una forma altamente tóxica con metil-mercurio, un potente agente neurotóxico. Su mecanismo de acción es desconocido, sin embargo, se ha sugerido que este compuesto aglutina los grupos $-SH$ y, bajo ciertas circunstancias, acelera la formación de Fe^{2+} que a su vez induce la peroxidación de lípidos. El estrés oxidativo puede originarse como una

consecuencia del daño mitocondrial inducido en el cerebro por CH₃Hg. Se ha reportado que bajas concentraciones Hg²⁺ (< 10⁻⁹ M) pueden producir un exceso de radicales O₂⁻ por neutrófilos humanos, aunque también altas concentraciones de Hg²⁺ disminuyen los radicales O₂⁻ por el daño celular causado (Halliwell y Gutteridge, 1999). En el Delta del Río Colorado este elemento se encuentra en organismos de vida silvestre con una concentración máxima de 0.89 µg/g (dw) (García-Hernandez et al., 2001).

Cadmio

Es considerado uno de los elementos más tóxicos, mutágeno, teratógeno y carcinógeno, su mecanismo de toxicidad es pobremente entendido (Patel et al., 1993; Brines y Robbins, 1992; Kiedrowski, 1997). Experimentos realizados *in vivo* han permitido estimar como consecuencias directas a la exposición del Cd, son la peroxidación de lípidos y el decremento en la actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx). (Zenteno-Zavin, 2002). Se sabe que este elemento induce estrés oxidativo al reducir el complejo glutación almacenado, además de ligar proteínas con grupos sulfidrilos e inhibir la SOD *in vivo*, generando ERO (Brorson et al., 1994; Roettger y Lipton, 1996). En Japón, este metal es el causante de una enfermedad llamada Itai-itai, la cual se observó cuando el Cd procedente de una mina se descargó hacia el interior de un río el cual era empleado para distribuir agua potable a la comunidad (Halliwell y Gutteridge, 1999). En organismos y sedimentos del río Hardy se han observado concentraciones de 0.8 µg/g (dw) (García-Hernandez et al., 2001).

Selenio

El Se tiene propiedades de los elementos metálicos y no metálicos, clasificado como un metaloide. Este elemento es requerido en pequeñas cantidades para todos los organismos, sin embargo, en concentraciones no muy por arriba de las necesarias es altamente tóxico, especialmente en aves y peces. Los casos de envenenamiento por Se en humanos son muy pocos y su mayor efecto lo tiene sobre fetos en desarrollo. En la vida silvestre se ha llegado a determinar que este compuesto causa grave impacto. La vía principal de asimilación de Se en el organismo es la ingesta (Harte et al., 1984). También forma parte importante de la enzima glutatión peroxidasa, al tener en cada molécula de esta enzima un átomo de Se, además de estar en el sitio activo de la selenocysteina (Halliwell y Guttieridge, 1999). De manera natural en el Delta del Río Colorado se observa la presencia de Se, que se arrastra desde las formaciones rocosas del cretácico en las montañas de Colorado, E.E.U.U. Este metaloide se transporta en la columna de agua como selenato (Se IV), que es la forma más disponible, por lo que se bio-concentra a través de la cadena alimenticia, análisis de agua en diversos puntos en la parte alta del Río Colorado han determinado una concentración de Se de 1300 $\mu\text{g/L}$ (0.2 $\mu\text{g/L}$ valores normales) (Presser et al., 1994; Skorupa et al., 1996; García-Hernández et al., 2001). Este compuesto se ha detectado en sedimento (0.8-1.8 mg/kg), agua (5-19 $\mu\text{g/L}$), plantas acuáticas (0.03-0.17 mg/kg dw), peces (2.5-5.1 mg/kg dw) y huevos de aves (5-10 mg/kg dw) del Río Colorado (García-Hernández et al., 2001, García-Hernández, 2006).

Contaminantes no persistentes

Otro tipo de contaminantes encontrados en el Río Hardy son los compuestos orgánicos no persistentes, como los plaguicidas organofosfatados, los cuales inhiben la enzima acetilcolinesterasa, responsable de transmitir el impulso nervioso de una célula nerviosa a un receptor específico como lo puede ser otra célula nerviosa o una célula muscular. En esencia es un interruptor del impulso nervioso, que termina cuando la acetilcolina se rompe generando colina y ácido acético. Sin esta enzima el impulso nervioso continuaría de manera permanente. La inhibición de acetilcolinesterasa es un proceso reversible y el tiempo estimado de recuperación en humanos es de inmediato a 4 días, aunque está en función de la dosis, tipo de pesticida y tiempo de exposición (Ware, 1986; Fukuto, 1987; Baron, 1991).

En los valles agrícolas de Mexicali y San Luis Río Colorado se utilizan diversos plaguicidas para el control de plagas que tienen como objetivo los sembradíos de algodón, trigo, alfalfa, cebolla y algunas otras hortalizas. La Organización Mundial de la Salud estableció en 1967 que “de todos los compuestos venenosos conocidos, los de origen natural son los más fuertes”. La veracidad de esta frase no es tan importante como el hecho de saber que en la naturaleza se encuentran sustancias o compuestos que son efectivos agentes de control de plagas. A continuación se describen los tres grupos principales de plaguicidas que se utilizan en estos campos agrícolas.

Piretroides

Los plaguicidas que se derivan de las plantas se pueden catalogar en varios grupos, uno de los más grandes es el que tiene como origen el piretrum y sus compuestos sintéticos se llaman piretroides, tiene su origen en el crisantemo. Actualmente existen más de 20 piretroides que constituyen el agente de control químico más grande en el mundo (Ray, 1991). Estos compuestos pueden ser extraídos de matrices biológicas o sintetizados en laboratorios comerciales, siendo la matriz más común el tejido vegetal. El desarrollo de estos plaguicidas a partir de orígenes naturales ha crecido enormemente en los últimos años (Kamrin, 1997). Este grupo de plaguicidas interfiere con el balance de iones de sodio en las uniones nerviosas, producen una fuerte reacción colinérgica a los insectos pero no son lo suficientemente fuertes para matarlos (Ray, 1991). En general, estos plaguicidas se consideran moderadamente tóxicos, sin embargo altas dosis de piretroides pueden ser fatales (Ray, 1991). No hay evidencia que sugiera efectos de teratogenicidad o mutagenicidad, a excepción de la cipermetrina que es considerada carcinogénica. El órgano blanco de los piretroides es el sistema nervioso central e hígado (Ray, 1991).

Carbamatos

Los carbamatos fueron desarrollados comercialmente hasta principios de 1950. Se consideran insecticidas, aunque dentro de esta familia se encuentran herbicidas y fungicidas. Han reemplazado a los compuestos organoclorados como plaguicidas para el control de plagas en los sembradíos de cítricos, forraje, algodón, vegetales verdes, pastos y también para el uso doméstico. Son dirigidos hacia una gran variedad de invertebrados como arañas, gusanos termitas, etc. Son inoloros e incoloros, cristalinos a temperatura

ambiente, y estables cuando se exponen a la luz, aire o calor durante su almacenaje (Kamrin, 1997). Se derivan del ácido carbónico, originalmente fueron encontrados en la semilla de calabaza que crece en el oeste de África. Estos extractos contienen un compuesto llamado fisostigmina, que es un ester-metil-carbamato (Baron, 1991). Muchos de sus efectos han sido documentados en compuestos derivados y naturales. Una desventaja de estos compuestos es que no tienen especificidad (Baron, 1991). Aunque los insecticidas carbamatos producen los síntomas relacionados con la inhibición de acetilcolinesterasa, ellos no parecen inducir un retraso neurotóxico en reacciones similares a las observadas con algunos compuestos organofosfatados. Los carbamatos son altamente tóxicos para muchos tipos de aves con dosis letales medias (LD_{50}) de 1.78 mg/kg a 5.34 mg/kg. En organismos acuáticos, estos compuestos se catalogan de moderados a altamente tóxicos con LD_{50} de 0.9 hasta 10 mg/kg (Boron, 1991; Kaloyanova y El Batawi, 1991).

Organofosfatados

Los organofosfatados son los insecticidas más utilizados y se emplean como herbicidas y fungicidas. A pesar de su descubrimiento a principios del siglo XIX no fue sino hasta 1953, que se descubrieron los efectos de estos compuestos. Estos plaguicidas se caracterizan por tener un átomo central del fósforo y numerosas cadenas. Muchos de estos compuestos se componen de demetoxi y dietoxi, estructuras generales del malatión y paratión. Presentan como característica principal una menor persistencia en el ambiente, se consideran altamente tóxicos para los vertebrados. Son más eficaces si son ingeridos o tienen contacto directo con el exoesqueleto de los organismos (Gallo y Lawryk, 1991).

Biomarcadores

A través del tiempo, la humanidad ha tratado de entender las condiciones actuales de los ecosistemas para predecir las futuras. A menudo se ha recurrido a indicadores que son simples supuestos fáciles de interpretar, que permiten aislar aspectos clave del ambiente (NCR, 2000). En realidad son respuestas primariamente biológicas a fenómenos o procesos químicos, biológicos o físicos que se pueden combinar de acuerdo a las necesidades (Noss, 1990; Niemi y McDonald, 2004). Actualmente en el campo de la toxicología ambiental se utilizan las respuestas fisiológicas, bioquímicas y etológicas de los organismos para evaluar las consecuencias de compuestos xenobióticos en medios silvestres; por consiguiente, la elección de la especie objetivo es de vital importancia. El organismo que sea utilizado para evaluar efectos toxicológicos, debe de tener como características esenciales, movilidad nula o escasa, alimentación de tipo filtrador, detritófago o planctófago, y de rápido crecimiento. Algunos otros autores manejan que la presencia, abundancia y distribución de la especie seleccionada debe de ser susceptible a presencia de contaminación (Mejía et al., 2002). Sin embargo, con las herramientas actuales se puede determinar la afectación al medio a través de los cambios a nivel celular (Dahlhoff, 2004). La aplicación y por consecuencia las definiciones de los biomarcadores se han desarrollado de manera conjunta con la tecnología, incorporándose a programas de monitoreo desde la década de los 80's (Narbonne, 2000). Como resultado de estos programas se propuso identificar cambios de tipo biológico debido a la exposición de contaminantes (Nasci et al., 1999). A este conjunto de cambios se le denominó biomarcadores, los cuales pueden ser cuantificados a través de observaciones y/o medidas (Amiard y Amiard-Triquet, 2002) causadas por una amplia

variedad de contaminantes presentes en el ambiente (Lam y Gray, 2003). Aunque típicamente se define a un biomarcador como a una medida cuantitativa de un cambio en el sistema biológico que responde a sustancias xenobióticas que dejan efectos biológicos, la cualidad de responder a diversos compuestos ha dificultado uniformar una definición única y sobre todo para estimar la respuesta del organismo en ambientes no controlados.

Biomarcadores de estrés oxidativo

Todos los organismos aerobios están bajo una presión oxidativa constante por el oxígeno molecular y sus metabolitos, que son productos del proceso metabólico de O_2 , y de una simulación pro-oxidante. Hasta antes de la descripción del anión radical súper-óxido dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich (1969), los estudios que se realizaban acerca de la producción biológica y los procesos fisiológicos de las ERO eran una gran conjetura. A partir de este suceso, muchos otros compuestos endógenos cuyas funciones son el control o regulación de ROMs en los sistemas biológicos han sido definidos. El análisis directo de ROMs en muestras biológicas es muy difícil debido a la reactividad intrínseca. La mayoría de la evidencia asocia su producción con procesos fisiológicos y eventos pato-fisiológicos anormales como resultado de mecanismos de defensa (Cotgrave et al., 1988). Básicamente estas ERO son el producto de una incompleta reducción de oxígeno a agua durante el proceso normal del metabolismo aerobio. Algunos productos secundarios resultantes de esta reacción representan una seria amenaza para todos los organismos aerobios. Las ERO pueden ser oxígeno divalente 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y NO^{\cdot} , que intervienen en etapas cruciales de procesos fisiológicos, antioxidantes bioquímicos (ej. GSH, ácido retinoico, tocoferoles) y

reacciones enzimáticas del hospedero proveen del potencial de reducción necesario para mantener el estado de balance oxido-reducción. La exposición a cambios ambientales tiene como consecuencia un cambio en las condiciones del estatus de óxido-reducción a un estado más oxidado, este cambio en las condiciones celulares es conocido como estrés oxidativo, está acompañado por una disminución en la concentración de antioxidantes por los cuales la célula responde al estrés incrementando la actividad de enzimas antioxidantes restaurando las defensas para re-establecer el balance de oxido-reducción (Dalton et al., 1999). Estos mismos autores (*op.cit*) mencionan que el evento inicial que activa el oxígeno en los sistemas biológicos es un cambio del spin en el electrón apareado, causado por: a) El salto de un electrón a un nivel de energía más alto, lo cual produce electrones no apareados con spin antiparalelos; b) La reducción de un átomo de oxígeno por un electrón; c) por la abstracción de un electrón (o hidrógeno) de un compuesto orgánico donde se producen OH^\bullet que al reaccionar a su vez con $^3\text{o}_2$ producen H_2O_2 y d) por la activación enzimática del oxígeno, que en este caso la enzima óxido-nítrico sintetiza y cataliza la producción de NO^\bullet .

El estrés oxidativo en organismos marinos ocurre cuando el oxígeno actúa como único sustrato en la fosforilación oxidativa, que genera la mayoría del ATP requerido para el metabolismo celular por lo tanto, cuando el oxígeno es parcialmente reducido, es potencialmente peligroso para la mayoría de los organismos multicelulares (Zenteno-Savín, 2002). Los parámetros ambientales como la temperatura, exposición a la luz, alimentación y cantidad de O_2 son factores importantes para la generación de radicales libres. En ambientes marinos la ubicación geográfica, profundidad, alimentación (tanto tipo como

disponibilidad) también pueden influir de una importante manera (Zenteno-Savin, 2002). Los efectos tóxicos de la contaminación ambiental, especialmente a nivel celular, pueden en parte ser adjudicados a las ERO (Regoli et al., 1998). Desde esta perspectiva las especies más estudiadas han sido los mejillones *Mytilus edulis*, *M. galloprovinciales*, el ostión *Crassostrea gigas* y algunos peces pertenecientes al género *Mugil*. Estas especies se ha determinado que metales de transición, como Cu y el Fe, debido a la capacidad de presentar diferentes estados de oxidación, pueden actuar como pro-oxidantes, induciendo la producción de ERO y peroxidación de lípidos (Stohs y Baghi, 1995). Algunos de los efectos tóxicos más severos observados en organismos marinos expuestos a metales pesados se deben a procesos relacionados con la membrana. A continuación se describen los biomarcadores más comúnmente utilizados para evaluar el daño causado por metales y compuestos orgánicos.

COMPLEJO GLUTATIÓN

Glutación Peroxidasa

La glutación peroxidasa fue inicialmente descubierta por Mills en 1957 como un enzima eritrocítica que protege de ataques oxidativos (Michel et al., 2001). GPx pertenece a una familia compuesta por 6 enzimas, desde la GPx1 hasta la GPx6. La GPx1 es la selenoperoxidasa más abundante y común, es expresada en la mayoría de los tejidos, al ser una enzima antioxidante se espera un incremento de su actividad ante la exposición de compuestos que produzcan ERO (Floeh et al., 1973 Rotruck et al., 1973; Cheng et al., 1997, 1998).

A principios de los 70's dos grupos de trabajo demostraron que la GPx1 es una enzima seleno-dependiente (Floeh et al., 1973; Rotruck et al., 1973). Subsecuentemente la selenocisteína (SEC) fue identificada como parte de la molécula de la proteína GPx. Actualmente SEC es reconocida como uno de los 21 aminoácidos esenciales, debido a que presenta una estructura similar a la cisteína. El Se puede encontrarse en muchas presentaciones químicas, como es la selenometionina (Behne y Kyriakopoulos, 2001). Este elemento traza esencial, probablemente le confiere sus funciones metabólicas a las selenoproteínas, especialmente en forma de SEC. Estudios *in vitro* han demostrado la participación del GSH en procesos de detoxificación en los que cataliza la reducción de peróxido de hidrogeno y lípidos peroxidizados.

Glutación Transferasa

Las glutatión transferasas han sido históricamente llamadas Glutathione S-transferasas, comúnmente denominadas como GST. Esta enzima cataliza ataques nucleofílicos por glutatión reducido (GSH) o compuestos no polares que contienen un átomo de sulfuro, nitrógeno o carbón electrofílico (Hayes et al., 2005). Es de mucho interés para toxicólogos y farmacólogos por su capacidad de metabolizar agentes quimioterapéuticos, insecticidas, herbicidas, carcinogénicos, y productos de estrés oxidativo. Por este motivo ha sido el objetivo de muchos medicamentos usados en terapias anti-cancerígenas (Ruscoe et al., 2001). La sobre-expresión de GST en células tumorosas en mamíferos ha sido tomada como una acción de resistencia a varios agentes anti-cancerígenos (Hayes y Pulford, 1995). Elevados niveles de GST han sido asociados con la tolerancia de insecticidas y herbicidas

(Hayes et al., 2005). En microbios, plantas, insectos, peces y mamíferos la expresión de diversas GSTs son seguidas de una exposición a compuestos pro-oxidantes (Allocati et al., 2003). En este contexto se ha determinado la actividad de la GST en organismos marinos como la almeja islándica (*Chlamys islandica*).

Peroxidación de Lípidos (TBARS)

La peroxidación de lípidos está altamente relacionada con la formación de radicales reactivos e inestables a nivel de membrana celular, con subsecuentes reacciones que tienen como consecuencia directa la oxidación y muerte celular (Klaassen y Watkins, 2001). Los peróxidos lipídicos alteran la estructura primaria de las moléculas endógenas a través de la fragmentación de moléculas, destruyendo a los lípidos en las membranas celulares, generando formas tóxicas endógenas como los radicales lípidos, $LOO\cdot$ y $LO\cdot$, especies reactivas de gran vida media, afectando a moléculas como el ADN (Hutchinson, 1985), proceso llamado desintegración hidrolítica del ADN (Klaanssen y Watkins, 2001). La peroxidación de lípidos o lipoperoxidación se ha asociado también con la pérdida de fluidez, reducción del potencial, incremento en la permeabilidad de la membrana a iones y muerte celular. Estudios acerca de los niveles de estos lípidos como respuesta a contaminantes en invertebrados no se han llevado a cabo, en vertebrados acuáticos uno de los relacionados con este trabajo es el de Faimali et al. (2006) donde analizan peces de un sitio prístino y los contrastan con peces en sitios impactados con metales pesados como Cu, Zn, Hg, Pb, Cd, mostrando que los niveles de lípidos peroxidados aumentan en presencia de metales pesados. Verlecar et al. (2005) demostraron que los niveles de lípidos peroxidados

en hepatopáncreas de mejillón verde *P. viridis* expuesto a $1/10$ de L_{50} de Hg clorhídrico durante 5, 10, 15 días con recambios de agua diaria a una razón de 1.5 L/organismo determinando que sólo existen diferencias significativas entre las concentraciones de TBARS de los organismos del control y los organismos del tratamiento de 5 días, pero no con los dos restantes tratamientos con concentraciones menores a $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Dorbal et al. (2005) determinaron en áreas impactadas por químicos agrícolas tejido hepático y suprarrenal en el chupa-lodo *Catostomus commersoni*, mostrando altos niveles de lípidos peroxidados ($8,000 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) tanto en hígado como en hepatopáncreas. En el 2006 Cantú realiza un estudio en la almeja Chocolate (*Megapitaria squalida*), relacionándola con yacimientos de fosforita y plantas termoeléctricas y de almacenaje de hidrocarburos, determinando que los niveles de TBARS ($0.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), no representan efecto por contaminación antrópica. Monserrat et al. (2003) determinan los niveles de estos lípidos en diferentes tejidos de invertebrados, dos especies de poliquetos y un cangrejo, utilizando el método FOX (ferrous oxidation/xylenol orange method) y TBARS, concluyendo que existen marcadas diferencias entre estos métodos, mostrando que el método FOX es más sensible y detecta concentraciones mayores en el tejido completo de poliquetos ($127.05 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) que en branquias de cangrejo ($52.65 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Zanette et al. (2006) determinaron en zonas impactadas por contaminantes urbanos, hasta 1,500 nmoles/tejido húmedo (TH) en el ostión *C. rhizophorae* con el método FOX.

Proteínas carboniladas

El ensayo de las proteínas carboniladas (PC) es considerado como un método general para determinar daño en las proteínas, generado interés, debido a que los metales de transición actúan dañando un sitio específico de las proteínas, transformándose en una fuente de carbonilos (Halliwell y Gutteridge, 1999). La reparación del daño causado en las proteínas, dependerá de la asimilación, distribución, almacenaje, biotransformación y eliminación de los tóxicos. La concentración de PC se ha relacionado estrechamente con la actividad de la enzima antioxidante GST y esta a su vez con la cantidad disponible de GSH el cual sirve como co-factor en la actividad de la GST, esto ha sido documentado en humanos realizando ejercicio (Meister y Anderson, 1983; Li y Leichtweis, 1997; Nussetti et al., 2001; Hamed et al., 2004; Velecar, 2005;), en otras palabras la actividad de la GST decaerá cuando la defensa antioxidante es incapaz de contrarrestar el ataque de las ERO's y la concentración de PC aumentará (Li y Leichtweis, 1997).

En el camarón *Penaeus monodon* expuesto a endosulfan y deltametrin se observó un incremento notable en los niveles de proteínas carboniladas, 2.1 veces sobre los niveles basales (Dorts et al., 2009). Verlecar (*op. cit.*) determina diferencias significativas hasta 10 días de ser expuestos con una concentración no mayor de $30 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Dowling et al. (2006) determina mediante el método blotting, una expresión de casi el doble en manto de la almeja *R. decussatus* cuando es expuesta a diversas concentraciones de Cu disuelto en agua. En el cangrejo estuarino *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, Sabatini et al. (2009) registraron un drástico aumento en la acumulación de metales pesados en función a la

salinidad con lo cual la oxidación de proteínas se aumenta después de 4 semanas de exposición.

Especies Centinelas

La definición de especie centinela o especie indicadora está en función del tipo de estudio. En este caso se acuñará la establecida por Mejía et al. (2002) en la cual se considera a una especie centinela como aquella que es capaz de tener una respuesta a una variación en el ambiente, climática, ecológica, por contaminación y por cualquier otro factor que se suscite en el área o sitio delimitado, presenta como características esenciales presencia en todo el año y en todos los puntos de muestreo, ciclo de vida relativamente corto, filtrador y con la capacidad de bioacumular contaminantes sin que esto represente un afectación letal. Con base a lo descrito por diversos autores como Glenn et al. (1996), Garcia-Hernandez et al. (2001 y 2006), e Hinojosa-Huerta et al. (2007) se ha concluido que la diversidad acuática en Río Hardy es poca observándose algunos ejemplares de tortugas de río o de caparazón blando (*Apalone spinifera*), Carpa común (*Cyprinus carpio*), lobina negra (*Mycropterus salmoides*), bagre (*Ictalurus punctatus*), mojarra aretera, sardina (*Clupeide* sp.), Curvina (*Cyanoson*) y el balano *Balanus amphitrite*. Esta última especie se designó como organismo centinela en el río Hardy y a pesar de que el Alto Golfo es un ambiente completamente marino, debido a las características intrínsecas de esta zona, no se encontraron balanos por lo que se eligió a la almeja blanca, *Chione cortezi*, ya que es la única capturada durante todo el año. Aspectos generales de las especies designadas se describen a continuación.

Balanus amphitrite

B. amphitrite es un balano que pertenece al phylum Arthropoda subphylum Crustacea, Clase Maxilopoda, Subclase Cirripedia, Orden Thoracica y Familia Balanidae (Darwin, 1854), presenta un ciclo de 6 estadios como nauplio, uno como larva cirripedia, la cual tiene la cualidad de elegir el mejor substrato para fijarse y posteriormente desarrollarse, ocurriendo un proceso de metamorfosis dando como resultado un organismo juvenil, la selección del substrato es un tema que se ha discutido ampliamente considerando diversos parámetros ambientales como la temperatura, salinidad y disponibilidad de la comida como factores que influyen directamente (Anil et al., 2001; Desai y Anil, 2004). Generalmente se les encuentra en ambientes estuarinos o marinos, en zona intermareal o submareal. Es sésil, adherida de manera permanente en superficies artificiales boyas, muelles y embarcaciones; o naturales como en raíces de mangles, cangrejos, corales, ballenas, tortugas etc. (Henry y McLaughlin 1965 y 1967, McLaughlin y Henry 1975; Gomez-Daglio, 2002). Zullo et al., (1972) describen a *B. Amphitrite* como una especie tropical que se distribuyó en todo el mundo a consecuencia de la fijación de larvas en barcos y puertos de rutas marítimo-comerciales. Este balano al igual que una gran mayoría de ellos presenta una alimentación planctófaga y tiene como presas objetivo a copépodos, larvas de moluscos, ascidias e inclusive larvas cirripedias (Darwin, 1854; Anderson, 1992; Gomez-Daglio, 2002).

Se ha determinado un tipo de proteína denominada CMP (Cyprid Major Protein) la cual es bioquímica e inmunológicamente similar a la vitalogenina, y está directamente relacionada

con el proceso de fijación de la larva, proceso influenciado por la temperatura (Satuito et al., 1996).

En zonas contaminadas y no contaminadas de Argentina se han reportado los parámetros de crecimiento, producción y dinámica de poblaciones en áreas afectadas por aguas residuales, concluyendo que existe una relación directamente proporcional entre la densidad poblacional y la calidad del agua, que la longitud del orificio en el primer año de vida registra de 4.9 a 5.1 mm y la tasa de crecimiento ha sido la más pequeña que se ha registrado para esta especie (Calagno et al., 1997 y 1998).

Jefrey y Underwood (2001) determinan que la longevidad del balano *Chamaesipho tasmanica* está relacionada directamente con su talla en organismos adultos, sin embargo también existen reportes donde señalan que no se pueden comparar los crecimientos entre organismos de diferentes zonas ya que el crecimiento está afectado por parámetros ambientales que pueden cambiar entre las puntos del área de estudio.

Desde una perspectiva ecotoxicológica *B. amphitrite* ha sido utilizado como especie indicadora de metales pesados en ambientes marinos, dado que presenta un gran capacidad de acumulación ya sea a través del agua o cuando filtra para alimentarse. Desde que Walker et al., (1975) plantearon la posibilidad de que el balano era un buen indicador de la acumulación de Zinc en forma de gránulos depositados en las estructuras del intestino, se ha empleado en programas de monitoreo en China en los que se han obtenido concentraciones de Zn que van de 2,726 hasta 11,990 mg/Kg (Phillips y Rainbow, 1988, Rainbow, 1995). Este mismo autor (2005) determinó la eficiencia de acumulación de

metales pesados como Ag, Cd, Zn en balanos alimentados con diatomeas. Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna (1998) determina en el puerto de Mazatlán (Sinaloa), la concentración de Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en tres especies de balanos, *Balanus eburneus*, *Fistubalanus dentivarians* y *Megabalanus dentivarians* determinando cambios estacionales en Cd y Pb, además de concluir que en la boca del puerto es donde se registran los mayores niveles de estos metales. Faimali et al. (2006), los utilizaron como bioindicadores de afectación toxicológica por exposición a compuestos metálicos y no metálicos considerando la velocidad de natación en estadio larvario como biomarcador. Estos autores determinaron también que a bajas concentraciones de Hg (mercurio clorhídrico), CuPT (piritona de cobre), ZnPT (piritona de zinc), ES (Eserina), MTM (Metomil), Cd (Cadmio clorhídrico), MDT (mercaptodimetor), y CI (cidial), se observa una elevada mortalidad, concluyendo que es un organismo sensible.

A pesar de sus características intrínsecas, el balano *B. amphitrite*, no ha sido estudiado en otros campos de la toxicología.

Chione californensis

Este organismo, conocido como almeja blanca en el alto Golfo de California, es de importancia comercial ya que es un medio de sostén para los pescadores en la época de veda de otras especies más rentables como el camarón y la curvina. Es una especie de regular tamaño que presenta gran abundancia en la boca del alto Golfo de California. En 1975 Nuñez-Esquer determina en estas almejas hasta 20 ppm de DDT, y antiguamente se creía que era una sola especie la que se distribuía en esta zona, pero estudios morfológicos

y genéticos realizados por Licona-Chavez et al. (2007.) mostraron que hay una diferencia entre la especie y *C. californiensis* y *Chione subimbricata*. Goodwin et al. (2001) así como Schoene et al., (2002) determinaron un crecimiento anual de 25 mm ocurriendo principalmente en los meses de verano, sin embargo, no se ha descrito su dinámica poblacional o sus parámetros poblacionales como la tasa intrínseca de crecimiento (K), Longitud infinita (L_{∞}) y Talla de nacimiento (T_0). Cadena et al. (2009) determinó 9.2, 5.70, 189 y 91.8 mg/kg de Pb, Cu, Fe, y Zn respectivamente, atribuyendo las concentraciones de estos metales a la actividad antropogénica ocasionada por la pesca ribereña y de altura, así como por el flujo de las descargas residuales del riego agrícola.

JUSTIFICACIÓN

El inicio de las actividades agrícolas en los márgenes del Delta del Río Colorado tuvo como consecuencia el nacimiento de las actuales ciudades de San Luis Río Colorado y Mexicali, con ello, un gran número de asentamientos humanos sin un sistema de drenaje urbano utilizando los drenes agrícolas desde los años 60's. En esta perspectiva el río Hardy se convirtió en el dren colector principal y en el cuerpo receptor de descargas agrícolas, urbanas e industriales. Recientemente en octubre del 2007 inició el funcionamiento de una planta de tratamiento de agua (Las Arenitas) con una capacidad total de 1.6 m³/s, de los cuales el 50% (0.8 m³/s) se tiene contemplado que entre al Río Hardy.

Con base en lo mencionado anteriormente, el agua vertida en el río Hardy, lleva una gran cantidad de fertilizantes, herbicidas, plaguicidas organofosfatados, carbamatos y piretroides, usados actualmente para controlar las plagas de trigo y algodón sembrados en

invierno y verano respectivamente. Lamentablemente, a pesar de ser una actividad muy antigua se carece de control en el uso, tipo y cantidad de plaguicida aplicado. Como ejemplo, en la temporada del 2004, se registró extraoficialmente el empleo de 52,324 L de metamidofos (plaguicida no autorizado por la CICOPLAFEST) en el cultivo de algodón para cubrir la mitad del área fumigada (Vega-Cazares, 2002).

Establecido lo anterior, se genera la interrogante acerca de la afectación estacional, temporal de elementos traza y compuestos orgánicos en los organismos presentes en el cauce del Río Hardy. El detectar si el grado de la afectación es reversible o irreversible, permitirá estimar el nivel de deterioro del ecosistema y con ello, las bases para la recuperación del mismo. La detección de variaciones fisiológicas y bioquímicas serán indicativos de las estrategias metabólicas que ayudan a las especies acuáticas a sobrevivir en un ambiente con cambios extremos y periódicos.

ÁREA DE ESTUDIO

El Río Hardy es un tributario del Río Colorado que fluye desde aproximadamente 40 km al sur de la planta geotérmica de Cerro Prieto hasta la confluencia con el Río Colorado, cerca del parque turístico, en Campo Flores. Después de la confluencia continúa por un tramo de 17 km hacia el sur. Presenta un cauce permanente que transporta aproximadamente 7.4 a 13.6 millones de m³ (6,000 a 11,000 acres-pie) de aguas residuales agrícolas al año (CNA 1996), con una salinidad de 7 mg/kg en promedio (García-Hernández, 2006). Los flujos actuales en este humedal varían a lo largo del año según los patrones estacionales de riego. La calidad del agua es problemática, especialmente de Julio a Noviembre cuando las tasas

locales de riego son bajas y el flujo en los drenes disminuye. La alta salinidad del suelo permite solamente el establecimiento de pino salado (*Tamarix spp*), una especie invasiva con menor valor ecológico comparado con el resto de la vegetación nativa (Hinojosa-Huerta et al., 2001)

La parte alta del río presenta una profundidad constante durante todo el año que varía entre 1 y 3 metros. Un Tramo del Río Hardy se localiza fuera de la planicie de inundación del Río Colorado, dentro del Distrito de Riego de Mexicali. A diferencia del corredor ripario, en donde el flujo del río está sujeto a reducirse o hasta desaparecer dependiendo de cómo varíe el caudal de la cuenca. Río arriba, en el Hardy, se encuentra un tramo que se desborda con las crecidas del Río Colorado, constituyendo una unidad ecológica integral cuyas funciones dependen de la manera en que el agua fluye a través de las áreas prioritarias para la conservación como humedales, lagunas someras y miles de hectáreas de chamizo y pino salado. En sus márgenes existe poca predominancia de vegetación nativa. En las áreas altas se encuentran mezquites y unos cuantos sauces y álamos a lo largo de las márgenes del río (Fig. 1, tabla I). Así como asentamientos humanos con diversas vocaciones económicas se localizan en sus márgenes, como son el poblado indígena Cucapá y diversos campos turísticos como el Campo Mosqueda.

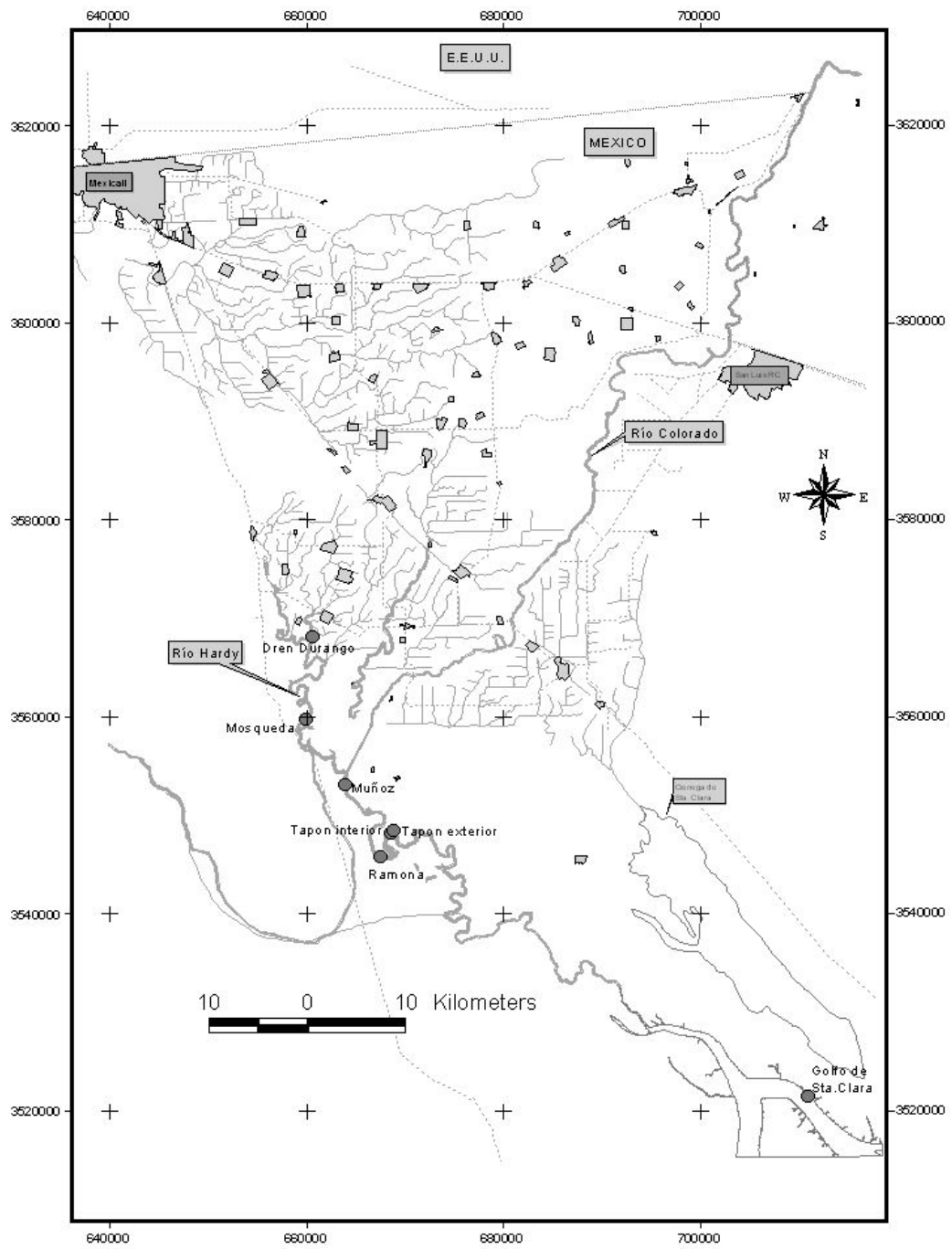


Figura 1. Área de estudio. Río Hardy y Alto Golfo de California

Tabla I. Coordenadas geográficas en UTM's de cada uno de los sitios del muestreo.

No.	Sitio	X	Y
1	Dren Durango	663257	3567202
2	Mosqueda	662659	3558848
3	Muñoz	666560	3552213
4	Ramona	670137	3544988
5	Tapón exterior	671246	3547319
6	Tapón interior	671448	3547514
7	Golfo de Santa Clara	713486	3520675

Como zona testigo se estableció el estero del soldado, dado que es una un área prístina donde se considera no hay impacto por actividades antropogénicas. Es una pequeña laguna costera que se localiza, a los 27° 57' 10" LN y 110 58' 40" LO, a 19 km al noroeste del puerto de Guaymas y 9 km al este de San Carlos, en el Estados de Sonora. Este ecosistema tiene un área de 1.85 km² de los cuales 1.57 son espejo de agua con una profundidad media de 0.6 m (Russell, 1981). La boca registra de 15 a 87 m de longitud en marea baja y alta respectivamente con una profundidad promedio de 1.80 m. Se clasifica como un estuario

negativo ya que tiene un gradiente de salinidad inverso, causado por un excedente de evaporación sobre la precipitación y el escaso aporte pluvial lo que ocasiona aguas hipersalinas (40 ppm) y salinidades de 35 ppm en la boca. La vegetación dominante es el manglar, con tres de las 4 especies registradas en el país, *Avicennia germinans* (mangle negro) *Rhizophora mangle* (mangle rojo) y *Laguncularia racemosa* (mangle blanco) (Güereca, 1994). Lo que le da a este sitio una importancia desde una perspectiva ambiental, además de ser un área de crianza y reproducción para peces y aves (Fig. 2).



Figura 2. Área de sitio control, El Estero del Soldado, en Guaymas Sonora.

HIPÓTESIS

A consecuencia de las descargas residuales agrícolas y urbanas de los valles de Mexicali y San Luis Río Colorado, efectos biológicos negativos reversibles asociados a la época del año y flujo del río, serán observados en balanos del Río Hardy y almejas del Alto Golfo de California

OBJETIVO GENERAL

Determinar la afectación toxicológica por contaminantes orgánicos e inorgánicos en balanos y almejas del cuerpo receptor principal de las descargas agrícolas y urbanas del Valle de Mexicali y San Luis Río Colorado y desembocadura del Alto Golfo de California

Objetivos Particulares

Determinar las concentraciones de Se, Hg, Cd y Pb, y plaguicidas organofosfatados en tejido completo de dos organismos centinela, *Balanus amphitrite* y *Chione californiensis*

Estimar la actividad basal y afectación en la actividad de las enzimas GPx y GST, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas carboniladas como secuela del estrés oxidativo ocasionado por la presencia de Se, Hg, Cd, Pb en los organismos centinelas *B. amphitrite* y a *C. californiensis*, así como determinar la actividad y grado de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en el balano *B. amphitrite* y la almeja *C. californiensis*, ocasionado por plaguicidas organofosfatados

METODOLOGÍA

De manera general se presenta una metodología para la colecta, preservación de organismos, número de viajes y toma de parámetros fisicoquímicos, y en cada meta se realizará una metodología más específica:

Trabajo de Campo

Se realizaron 6 viajes de colecta bimensuales durante un año, comenzando en el mes de enero y terminando en noviembre 2007. Cubriendo el ciclo de aplicaciones de plaguicidas de los dos cultivos más importantes en la zona, tomando como criterio de selección de sitios el número y tipo de drenes, barreras naturales y/o artificiales así como su uso de suelo, siendo los sitios seleccionados Dren Durango (Fig.3a y 3b) ya que en convergen drenes de tipo agrícola y urbano. Campo Mosqueda (Fig. 3c y 3d) debido a la actividad turística. Campo Muñoz (Fig. 3e y 3f) por localizarse en una convergencia con el río colorado. Campo Ramona (Fig. 4a y 4b) por ser el último campo turístico antes de la zona estuarina. Tapón Norte (Fig. 4c y 4d), y Tapón Sur (Fig. 4e y 4f) por estar antes y después de una barrera artificial construida para retener el agua en el Río Hardy y evitar que fluya hasta la desembocadura con el Golfo de California, y como punto testigo o blanco el Estero del Soldado, en la bahía de Guaymas Son. En cada punto seleccionado se colectaron troncos, ramas o cualquier substrato con balanos en 6 diferentes zonas (estas zonas siempre serán las mismas, siendo diferente sólo el substrato donde se encuentren los balanos). Los organismos colectados se etiquetaron individualmente y almacenados en frío hasta su congelación previa a los diferentes procesos en el laboratorio.



Figura 3. a) Vista de los sitios de muestreo a) y b) Dren Durango, c) y d) Campo Mosqueda e) y f) Campo Muñoz.



Figura 4. Vista de los sitios de muestreo a) y b) Campo Ramona, c) y d) Tapón Norte, e) y f) Tapón Sur.

Trabajo de laboratorio

Proceso de muestras

Cada balano fue extraído de sus tecas y analizado de forma conjunta hasta registrar el peso necesario para el análisis, el cual consiste en obtener el peso de la muestra para cada técnica determinada sin importar el número de organismos. Se analizaron 6 pools por cada sitio de muestreo y cada uno se analizaron por duplicado.

Bioensayo

Debido a escasas de información del balano *B. amphitrite* expuesto a plaguicidas se realizó 1 bioensayo para observar un cambio en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Consistió en colocar organismos de la zona prístina en acuarios con una solución comercial “SSOP Pesticide Mix 2 Simgma-Aldrich”, la cual contiene 6 plaguicidas a una concentración de 1,000 mg/k. Las concentraciones del bioensayo fueron 2, 5 y 10 $\mu\text{L/L}$

Elementos traza

De manera general se analizara el elemento en su forma inorgánica primeramente se homogenizan y digieren, mediante un sistema de reacción acelerada (MARSx®), 1.0 gr de tejido húmedo de balanos y hepatopáncreas de almejas, agregando 5 ml de H_2NO_3 , 3 de H_2O_2 , en rampa de temperatura y presión controlada. La digestión se hace en un grupo de 9 muestras, más un duplicado, un blanco y una muestra con valor conocido que en este caso se utilizó un material de referencia DORM-2 (Dog fish muscle, Certified Reference Material for Trace Metals and Elemental Species, National Research Council Canada). Las concentraciones de Cd, Pb, Hg y Se fueron determinadas en un espectrofotómetro de

absorción atómica Perkin Elmer 1100. La metodología empleada varió entre elementos. A continuación se describen de manera breve el proceso de análisis para cada uno de ellos

Mercurio

El Hg se detecta mediante un sistema generador de vapor frío. De cada muestra digerida se toman 10 ml a la cual se agregan 250 μ L de dicromato de potasio al 0.05 % para oxidar todas las presentaciones químicas del Hg. Posteriormente en la celda de reacción se mezcla cloruro estañoso (al 10%) con ácido clorhídrico (3M). De esta reacción se libera un vapor en el que se determina Hg a una longitud de onda de 253.7 nm.

Cadmio y Plomo

Para los metales Cd y Pb, se utilizó el método de detección por flama, con el cual se requiere un mínimo de 5 mL. El fundamento de este método se basa en la absorbancia leída a 228.8 nm en Cd y 244.8 nm en Pb.

Selenio

Con él Se se empleó un horno de grafito para aumentar la sensibilidad del equipo y poder detectar a bajas concentraciones. Estos metales son leídos a 196.0 nm en Se.

Plaguicidas

La determinación y detección de plaguicidas organofosforados se realizó en el laboratorio de residuos tóxicos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. unidad Hermosillo, siguiendo la técnica de extracción de plaguicidas organofosforados por dispersión de matriz en fase sólida (DMSF) con fundamento en la Norma Oficial Mexicana

028-ZOO-1999. De manera general la metodología se divide en tres procesos; Preparación de mezcla absorbente, Extracción de plaguicidas y Detección.

La preparación de la mezcla absorbente se prepara con carbón activado, óxido de magnesio y celite en proporción 1:2:4 respectivamente. Previamente el carbón activado se lava con agua destilada filtrándolo en un filtro whatman (#99) sobre un embudo de vidrio. El óxido de magnesio se disuelve en agua destilada y calentando de 70 a 90 °C, posteriormente se lava y filtra en un filtro whatman (#99) sobre un embudo de vidrio. La Celite es lavada con agua destilada hasta lograr un pH neutro y se filtra de la misma manera que el carbón activado y el óxido de magnesio. Una vez realizados los tratamientos anteriores, el carbón, óxido de magnesio y celite, se secan a 150 °C por 12-14 hrs. Posteriormente cada reactivo es macerado en un mortero (lo más fino posible), de éste macerado se elabora la mezcla 1:2:4 de carbón activado, óxido de magnesio y celite respectivamente. Esta mezcla se guarda en desecador hasta el momento de utilizarla en la purificación de las muestras.

La extracción de plaguicidas se realiza considerando dos etapas: a) Dispersión y b) Purificación. A) Dispersión: Fortificado (referencia positiva).- Donde se pesan 0.5 g. de tejido blanco en un mortero y se adiciona la mezcla de plaguicidas organofosforados (100 µl) para integrarlos a la matriz se agregan 0.6 g de sílica y se inicia la dispersión hasta lograr un polvo seco, para extraer a los plaguicidas de referencia de la matriz. De la muestra se pesan 0.5 g. de tejido en el mortero y se agregan 0.6 g de sílica y se inicia la dispersión hasta lograr un polvo seco, para extraer los plaguicidas de la matriz.

Purificación

En fondo de una jeringa de vidrio de 5 ml, se coloca fibra de vidrio, y se adiciona 1 g de mezcla absorbente y la dispersión del mortero. Posteriormente verter diclorometano en el mortero para enjuagar el polvo residual y agregarlo a la jeringa e iniciar la elusión. La elusión es colectada en tubos cónicos hasta completar 40 ml aproximadamente. Llevar a sequedad el eluido mediante evaporación con nitrógeno en un baño con temperatura no mayor a 40°C y con flujo de aire. Cuando se haya evaporado el diclorometano, re-suspender con 100 µl de acetato de etilo e inyectar en el CG.

Detección

Para el análisis de los plaguicidas organofosfatados se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) Varian modelo CP-3800 con un detector de ionización de flama, con columna megaboro (J,& W Scientific, Canadá) DB-5, longitud 30m, diámetro 0.53 mm y 1.5 mm de película. Se utilizó un Programa Star Chromatography Workstation, versión 5.51, bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 100°C por 1 min para luego iniciar un calentamiento a 8° C/min hasta llegar a 250° C manteniéndose esta temperatura 1 min, con un segundo calentamiento a 25° C/min hasta llegar a 280°C permaneciendo a ésta temperatura 4 min. La temperatura del inyector fue de 220° C y del detector de 220°C. Se utilizó como gas acarreador nitrógeno UAP (ultra alta pureza) con un flujo en columna de 30 ml/min para nitrógeno, 140 ml/min, para aire uno, 170ml/min para aire dos y 14 ml/min de hidrógeno.

Glutation Peroxidasas

La actividad de la GPx se analizó utilizando una modificación a la metodología empleada por Folhe y Günzler (1984), en un espectrofotómetro UV-Vis a 340 nm de longitud de onda. La actividad de la GPx se obtiene del monitoreo del decremento continuo de NADPH al mantener constantes los niveles de GSH. Previo al análisis de Para realizar este proceso se pesaron y colocaron 100 mg de balanos sin tecas y/o 100 mg de glándula digestiva de almejas en un tubo eppendorff y 200 o 300 μ L de perlas de vidrio de 0.1 mm y 2 ml de solución para homogenizar y 20 μ L de solución PMSF. Se colocaron en un homogenizador horizontal con agitación continua de 30 s. Este paso se repitió 2 veces. El homogenizado se centrifugó a 3000 G durante 25 min a 4 °C recuperando el sobrenadante para su análisis. Para determinar la actividad de la GPx se elaboraron un blanco experimental, un primer blanco, la muestra y un segundo blanco. En el blanco experimental se agregaron, en una cubeta de cuarzo, 100 μ L de solución amortiguadora de fosfatos 500 mM, 10 μ L de la solución de EDTA, 100 μ L de la solución de azida de sodio, 100 μ L de la solución de NADPH y 500 μ L de agua des-ionizada fría. Leer y corroborar que el cambio en la absorbancia sea cercano a cero. Para la elaboración del primer blanco se agregaron 20 μ L de la solución de GSH y 50 μ L del sobrenadante. La actividad de este blanco se registró durante 40 s en intervalos de 3 s y una longitud de onda de 340 nm. La muestra se preparó partiendo del primer blanco agregando 20 μ L de H₂O₂ registrando la actividad de esta muestra durante 40 s en intervalos de 3 s y una longitud de onda de 340 nm. El segundo blanco se mezcló en una cubeta aparte 100 μ L de KPi, 10 μ L de EDTA, 100 μ L de NaN₃, 100 μ L de GR, 100 μ L de NADPH, 550 μ L de H₂O₂, 20 μ L de GSH y 20 μ L de H₂O. Para la cuantificación de esta enzima se utilizó 6.22 como coeficiente de extinción del NADPH.

Como la matriz de esta muestra es un tejido se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford (Anexo) y los datos se uniformizaron como nmoles GPx/ min mg de proteína en la muestra.

Glutation S Transferasa

El principio se basa en detectar la aparición de complejo tioeter-glutación dinitrobenceno cuando se conjugan la GSH y 1-cloro 2,4-dinitrobenceno. Para determinar la actividad de esta enzima se homogenizo siguiendo los pasos de la prueba anterior. Para este análisis es necesario determinar la actividad de un blanco de reactivos. Colocando la solución de corrida y la solución de sustrato. Posteriormente se analizó para la muestra donde se agregó la misma mezcla del blanco más la muestra. Al igual que el primer blanco se registró la absorbancia a 340 nm cada 30 s durante 6 min.

Peroxidación de Lípidos (TBARS)

Su principio se basa en hacer reaccionar el ácido tiobarbiturico con los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos para formar un compuesto llamado malondialdehído (MDA), generando una solución rosa cristalino el cual registra su absorbancia máxima de 532 a 535 nm. Para determinar la actividad de este compuesto, se homogenizaron 100 mg de tejido en 2 ml de solución salina. Para determinar los niveles de lípidos peroxidados, se realizó una curva de calibración a concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 y 5 nmoles. Una vez que estén listas las muestras y la curva de calibración, los tubos eppendorf, se colocaron en baño de agua a 37°C con agitación constante durante 15 min. Posterior a este paso los tubos se colocaron en un baño de hielo y se adicionó solución TBA al 1%, colocando nuevamente los tubos en

baño de agua a 90 °C por 10 min, seguido de un baño con hielo por unos minutos. Una vez enfriados se centrifugaron a 3,000 G durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una celda para medir la absorbancia máxima a la longitud de onda descrita. Los resultados se expresan en nmol TBARs/ mg proteína

Proteínas carboniladas.

Está basado en el hecho de que algunas ERO tienen como sitio objetivo residuos de aminoácidos en las proteínas (particularmente histidina, arginina y prolina) para producir productos con grupos carbonilos, los cuales pueden ser medidos después con una reacción de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y precipitándolos con ácido tricloroacético (TCA). Se registró la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm (Levine et al., 1990; Stadman y Levine, 2000). Para realizar esta prueba previamente, es necesario homogenizar tejido en una proporción 1:20 (peso:volumen) en ácido sulfosalicílico al 5%, dividir el tejido homogenizado en dos partes y etiquetarlo como A (muestra) y B (Blanco). Ambos extractos fueron centrifugados por 5 min a 13,000 rpm a 4°C, desechando el sobrenadante. Una vez seco se adicionaron al tubo A 500 µL de DNPH y al tubo B 500 µL de HCl, y se agitaron en vortex durante 40 s a intervalos de 15 min por una hora. 500 µL de TCA fueron adicionados y después centrifugados por 5 min a 15,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y los tubos se invirtieron para eliminar todo el exceso de líquido. El precipitado se lavó 3 veces con 1 ml con una mezcla 1:1 de Etanol:etil-acetato y se adicionó un mililitro de clorato de guanidina, seguido de agitación con vortex e incubación en baño de agua a 37°C durante 15 min. Después de este paso se centrifugaron

a 13,000 rpm a temperatura ambiente. En cada celda se colocaron 800 μ L de cada tubo y se registró la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm. Los resultados se reportan en nmol de proteínas carboniladas/g de tejido humedo (TH).

Acetilcolinesterasa

Cada organismo fue disectado y extraído de sus tecas. Para cada análisis se acopiaron el número de balanos necesario para obtener 100 mg de tejido completo. El proceso de homogenizado se realizó mediante un Minibeat beater, 200 mg de perlas de zirconio y 200 μ L de solución buffer tris pH 7.4, centrifugado a 13,000 rpm's a 4 °C. La caracterización de la enzima se realizó determinando su actividad en respuesta a los substratos, Butirilcolina, Propionilacetato, Feniltioacetato y Acetilcolina, además de realizar pruebas de inhibición específica para butirilcolinesterasa con el compuesto isompa (tetraisopropylpyrophosphoramide). Para el método de reactivación química se utilizó el compuesto Pyridine-2-aldoxime methochloride. Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich Co. Una vez seleccionado el substrato se determino la actividad y reactividad de las muestras con las concentraciones y cantidades siguientes: Ioduro de Acetilcolina 0.6 mM, Buteryl thicolina DTNB (5,5'-Dithiobis 2-ácido nitrobenzoico) 0.0404 mM-, 2 Pam 0.6mM, siguiendo el método de Ellman y modificándolo para un ensayo en microplaca con un equipo Uv Biorad ® a 414 nm. Para determinar la efectividad de los reactivos se utilizó extracto de cerebro de ratón libre de contaminantes y dursban® como pesticida comercial (50% clorpirifos y 50 % agua en su mezcla concentrada).

Trabajo de escritorio

Cada uno de los grupos de datos fue sometido a las pruebas normalidad y análisis de varianza del para determinar diferencias significativas entre los diferentes sitios y/o meses de muestreo. Este ejercicio se realizó con la ayuda del software Statistica® ver 7.1

También se evaluará la respuesta de cada de uno de las marcadores propuestos mediante un Índice de Respuesta Biológico (IBR) propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002), donde se emplea una integración de métodos paramétrico y un grafico denominado “de estrella” que se realiza con la ayuda del Software Statistica® ver 7.1 y Excel ®. Este tipo de estudios resulta útil para evaluar la mejor respuesta o el biomacardor sin tomar en cuenta las unidades en las que se esta expresando cada marcador. El análisis Multivariado se emplea para estandarizar los valores de los biomarcadores mediante un análisis de factores. Una vez obtenido el factor, se emplea la siguiente fórmula:

$$A1 = \frac{S1}{2} \text{sen}\beta (S1 \cos\beta + S1 - 1 \text{sen}\beta)$$

Donde

$$\beta = \text{Arctan} \left(\frac{S1+1 \text{Sen } \alpha}{S1-S1+1 \text{Cos}\alpha} \right)$$

Donde $\alpha = \frac{2\pi}{n} \text{ radlans}$

y los radianes son el número de biomarcadores que se estén empleando. Otra bondad de este método es que se puede utilizar para evaluar la respuesta en cualquier punto espacio-temporal del área de estudio. Para este apartado sólo se utilizaron las actividades de GPx,

GST, las concentraciones de TBARS (Lípidos Peroxidados), Prot Carb (Proteínas Carboniladas), y el porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa (Inhibición), los contaminantes no se incluyeron por que el propósito de este modelo fue inferir acerca de la mejor respuesta a la exposición de dichos contaminantes. Con los resultados de este análisis se podría suponer que en este sitio en este mes los organismos estén expuestos a los diferentes mecanismos disparadores de la variable que resulte como mejor respuesta.

RESULTADOS

Bioensayo

Durante el bioensayo se determinó que la actividad de la GPx, no observa una tendencia lineal o directamente proporcional con la concentración; con referencia al blanco o muestra sin presencia de plaguicidas, la actividad aumenta en la primera concentración y en C2 y C3 disminuye. Estadísticamente se observan diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$; tabla II) en C2. La enzima GST, muestra la misma tendencia que GPx con diferencia significativa en C1 (LSD, $p < 0.05$; tabla II). La peroxidación de lípidos muestra también, una tendencia similar a las actividades de GPx y GST. Diferencia significativa se presenta en C1 (LSD, $p < 0.05$, tabla II). En la concentración de proteínas carboniladas existe una tendencia a aumentar en relación a la concentración de plaguicidas. Estadísticamente C3 presenta diferencia significativa (LSD, $p < 0.05$, tabla II)

Tabla II. Actividad promedio de las diferentes enzimas analizadas en balanos en el sitio control.

Bioensayo	GPx	GST	TBARS	ProtCarb
Blanco	210±68.4	49.9±15.5	26.4±3.0	42.3±9.0
2 µg/kg	224±44.8 ^a	341±87.2 ^a	44.3±21.1 ^a	76.9±33.5 ^a
5 µg/kg	103±39.3 ^b	196±110.4 ^b	22.1±11.3 ^b	87±40.9 ^a
10 µg/kg	189±28.8 ^a	98.3±66.4 ^b	26.1±4.0 ^b	198±6.1 ^b

Unidades de Prot. GPx= Glutación Peroxidasa, GST= Glutation S Transferas en $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Prot., unidades de TBARS= peroxidación de lípidos, en nmol mg^{-1} , ProtCarb= Proteínas Carboniladas en $\text{nmol mg}^{-1} \text{TH}$

Elementos traza

Plomo

En el sitio control (ES) la concentración de este metal fue de 34.8 µg/kg. En el área de estudio se observa un promedio global de 64 µg/kg. Temporalmente en el mes de noviembre se observa el valor más bajo (29.9 µg/kg), y en septiembre el valor más alto (116.9 µg/kg).

En el Dren Durango a excepción de noviembre ($0 \mu\text{g}/\text{kg}$) durante todos los meses restantes se observan concentraciones mayores a las del sitio control. La mayor se observa en marzo < 10 veces el sitio control (veces ES). Presenta una tendencia a disminuir la concentración de marzo a noviembre. En Campo Mosqueda durante todo el muestreo las concentraciones fueron mayores que en el sitio control. Siendo septiembre cuando el valor máximo se observó (< 8 veces). Presenta una tendencia a incrementar su concentración de enero a septiembre. En Campo Muñoz las concentraciones mensuales fueron muy similares al sitio control, la mayor concentración se presentó en enero (< 1 veces ES). En el Campo Ramona las concentraciones también fueron muy similares al sitio control, al igual que en ramona la máxima concentración se observó en enero (< 1 veces ES). En el Tapón Norte se presentaron los menores valores, mayo, julio, septiembre, noviembre no registraron la presencia de Pb. En marzo la concentración fue similar a la del sitio control. En el Tapón Sur, la concentración más alta (< 10 veces ES) se registra en enero, con un aparente decremento de enero a septiembre. En el Alto Golfo en los meses de marzo, mayo, julio, noviembre no se registra la presencia de Pb y el valor más alto observado es en septiembre (< 3 veces ES) (Fig. 5).

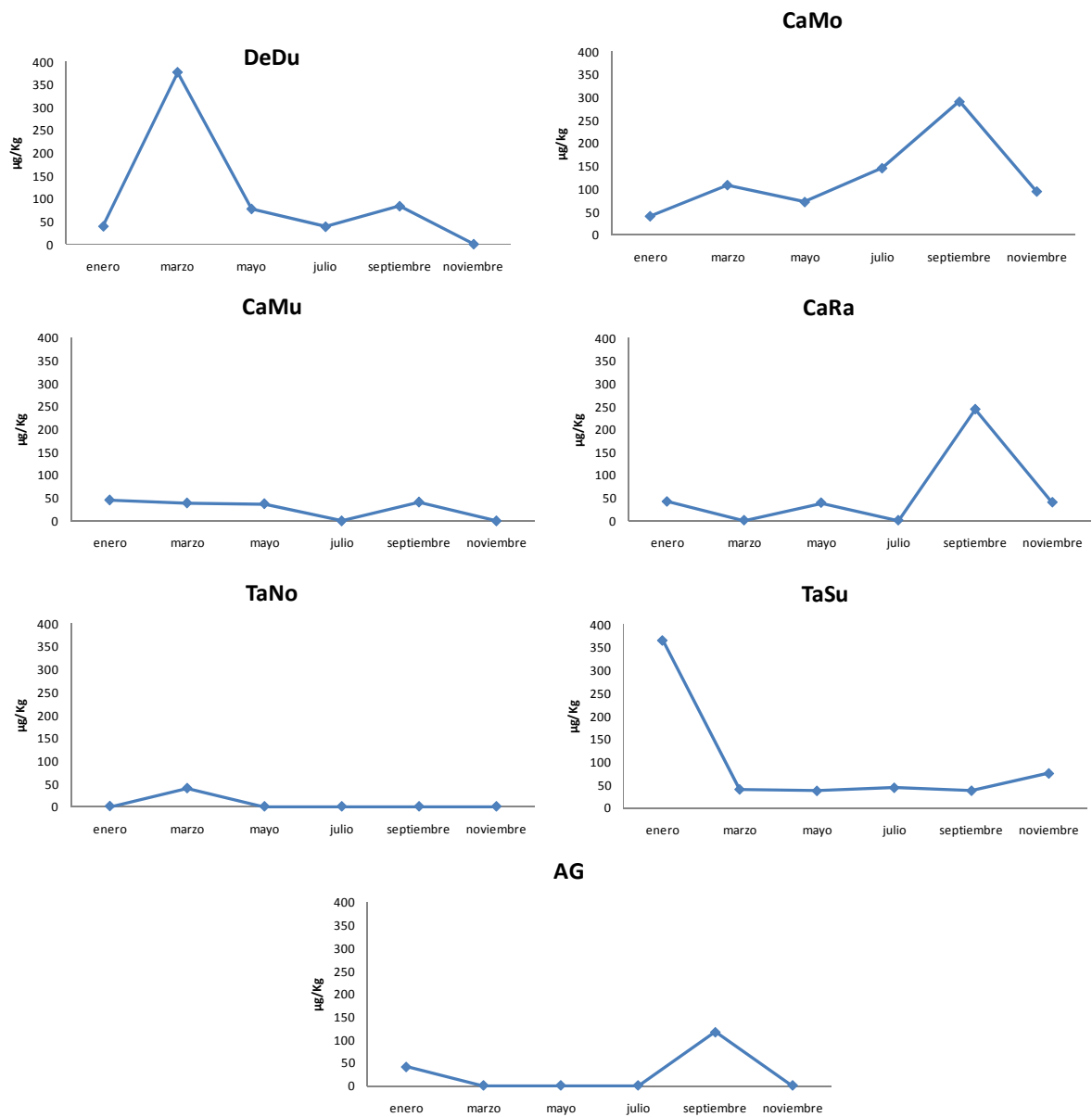


Figura 5. Tendencia de la concentración de Pb en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).

Cadmio

En el sitio control la concentración de Cd fue de 52,314 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que en la zona de estudio el promedio global fue de 16,893 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Temporalmente se observa la mayor concentración en noviembre (30,725 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y la menor en marzo (10,882 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

En el Dren Durango el mes de marzo mostro la mayor concentración (0.46 veces ES). De mayo a noviembre muestra una tendencia a disminuir la concentración. En el Campo Mosqueda la concentración máxima se observó en septiembre (0.82 veces ES). De enero a septiembre presenta un incremento en la concentración. En el Campo Muñoz el valor máximo de Cd se presentó en noviembre (< 2 veces ES), y presenta una tendencia a disminuir la concentración de enero a julio. En el campo Ramona, la concentración máxima se observa en los meses de enero y noviembre (0.6 veces ES), presentando una tendencia a aumentar la concentración de marzo a noviembre. En el Tapón Norte, la concentración máxima se registra en septiembre (0.19 veces ES). Presenta una tendencia a aumentar la concentración de enero a mayo. Para el Tapón Sur enero muestra la mayor concentración mensual (0.53 veces ES). De marzo a noviembre la concentración de Cd muestra incremento. En el Alto Golfo la concentración de Cd observo su valor máximo en los meses de enero y noviembre. Todas las concentraciones fueron más bajas que en el sitio control (Fig. 6)

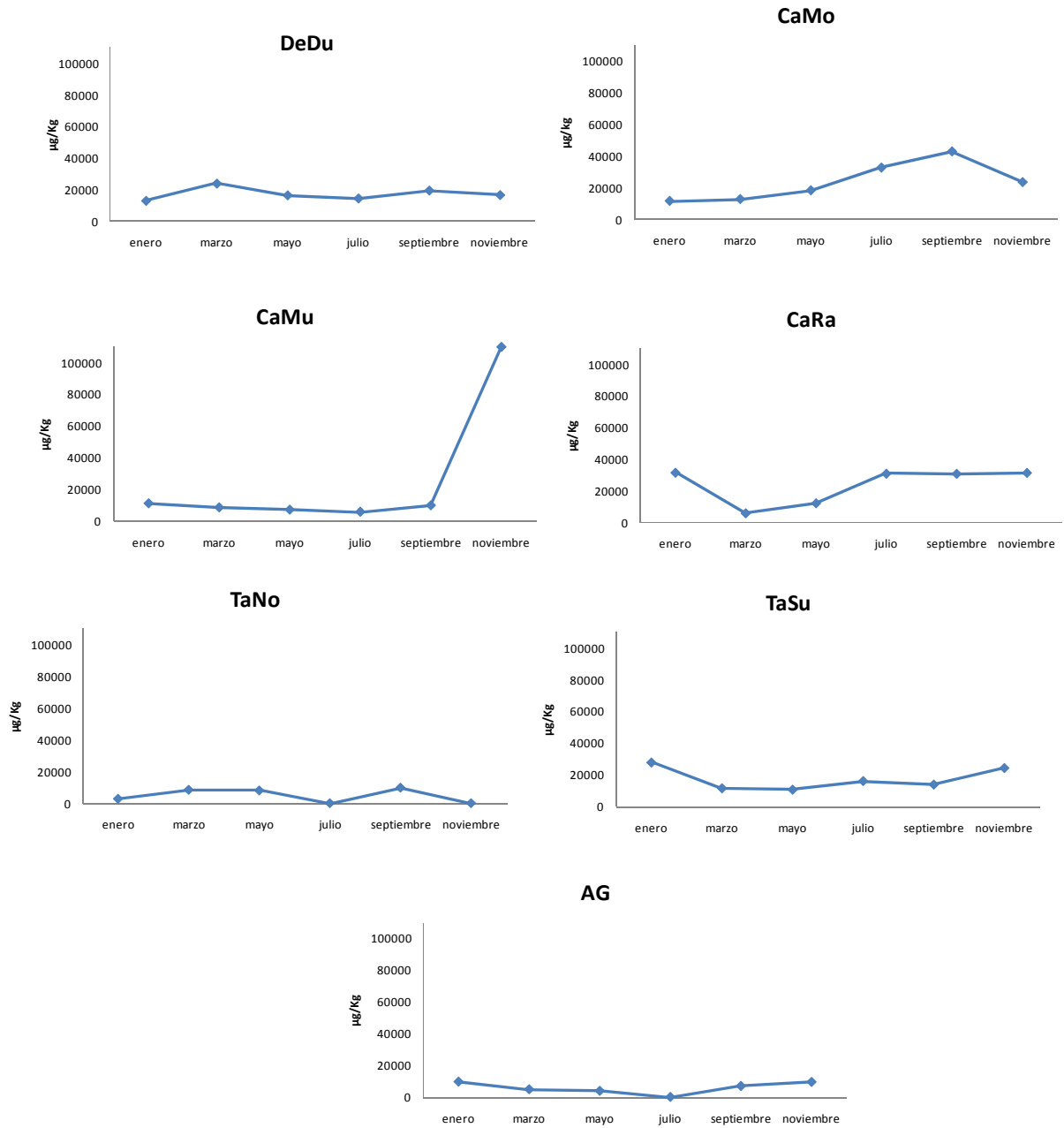


Figura 6. Tendencia de la concentración de Cd en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).

Mercurio

En el estero del soldado la concentración de mercurio fue de 23.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el área de estudio, la mayor concentración se observó en marzo (9 veces ES) y la mínima en julio (1.47 veces ES). Con una concentración media de 81 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En el Dren Durango, la concentración máxima se observó en el mes de mayo (< 2.14 veces ES). La concentración presenta una disminución entre los meses de mayo a noviembre. En Campo Mosqueda la máxima concentración se registra en el mes de noviembre (< 11.69 veces ES). De enero a mayo la concentración muestra incrementos. En el Campo Muñoz la concentración máxima se observa en marzo (3.3 veces ES). Su concentración muestra una tendencia a disminuir de marzo a noviembre. En el Campo Ramona la concentración máxima se registró en mayo (3.28 veces ES). De mayo a noviembre se observa un decremento en la concentración de Hg. En el Tapón Norte la mayor concentración se registró en mayo (< 5 veces ES) y muestra una tendencia a disminuir la concentración de mayo a noviembre. En el Tapón Sur durante el mes de mayo se registró la mayor concentración (< 6 veces ES). A excepción de julio que muestra un incremento de enero a noviembre. En el alto Golfo la mayor concentración de este metal se registró en marzo (< 51 veces ES). De marzo a septiembre muestra un decremento en la concentración (Fig. 7).

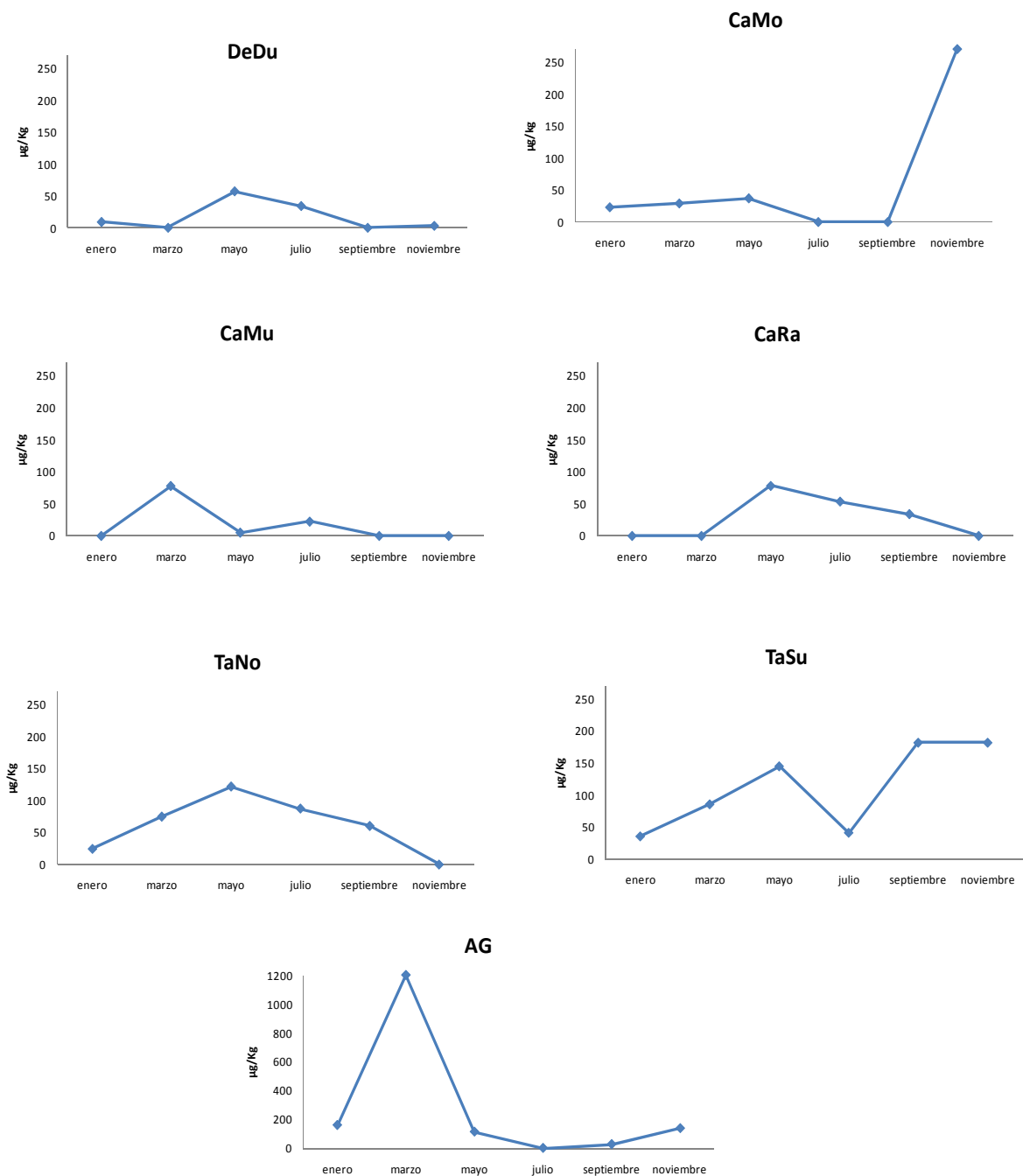


Figura 7. Tendencia de la concentración de Hg en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).

Cobre

En el sitio control la concentración de Cu fue de 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mientras que el promedio global en el sitio de muestro fue de 0.84 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mensualmente en mayo es cuando se registra la mayor concentración (< 22 veces ES) mientras que en marzo y septiembre se registró se la mínima (0.45 veces ES).

En el Dren Durango el Cu registró su máxima concentración en noviembre (1.13 veces ES), presentando incrementos en los meses de mayo y julio. En el campo Mosqueda en mayo se presento la concentración máxima se detectó en el mes de mayo (< 151 veces ES). En los siguientes meses la concentración fue muy baja (>1 veces Es). En el campo Muñoz la concentración más alta se registró en el mes de mayo (1.5 veces ES). Durante los meses de enero, mayo y septiembre se observan incrementos en la concentración. En el campo ramona, fue en septiembre cuando se detectó la concentración más alta (< 3 veces Es). De marzo a septiembre se observa una tendencia a incrementar la concentración. En el Tapón interior Norte las concentraciones son muy bajas, enero, julio y septiembre no se detectó su presencia, la concentración más alta se observo en marzo (< 1 veces ES). De marzo a noviembre se observa que la concentración tiende a disminuir. En el Tapón Sur las concentraciones también son muy bajas, en enero, mayo y septiembre este metal no se registró. La concentración máxima se detectó en julio (1 veces ES). En el Alto Golfo, al igual que en los dos últimos sitios, las concentraciones son bajas también. De enero a julio se observa una disminución en su concentración (Fig. 8).

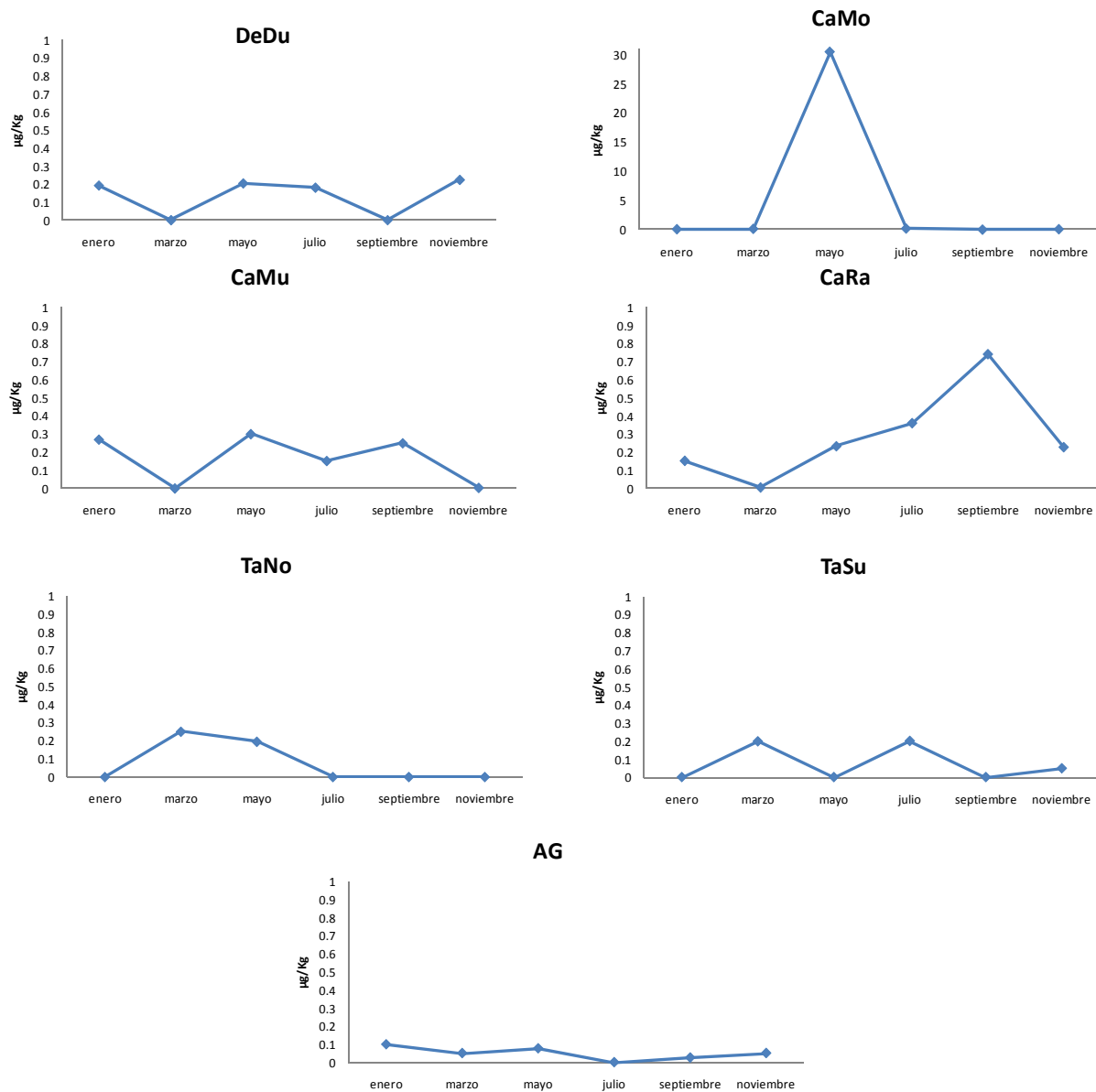


Figura 8. Tendencia de la concentración de Cu en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).

Selenio

Este metal presento una concentración de 710 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La media anual de la concentración en el área de estudio fue de 4,415 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Temporalmente en marzo se registra la concentración más alta (< 18 veces ES). Mientras que en enero se registra la mínima. También se observa que a través del tiempo la concentración disminuye.

En el Dren Durango se observa la concentración más alta en enero (< 8 veces ES). De enero a julio la concentración presenta una tendencia a disminuir. En Campo Mosqueda se observan concentraciones más altas que en el Dren Durango. La concentración más alta se observa en mayo (< 12 veces ES). De enero a mayo observa una tendencia a incrementar la concentración y de mayo a noviembre disminuye. En Campo Muñoz, la concentración más alta se registra en el mes de marzo (< 52 veces ES). A partir de este mes y hasta noviembre se observa una disminución en la concentración. En Campo Ramona la concentración es similar a la del campo muños, en marzo se detecta la concentración más alta en marzo (< 62 veces ES) así como una tendencia a disminuir la concentración a partir de este mes y hasta noviembre. En el Tapón Norte durante enero, septiembre y noviembre no se detectó su presencia. La concentración más alta se observa en julio (< 11 veces ES). De marzo a julio la concentración se incrementa. En el Tapón Sur, la concentración es mayor que en el Tapón Norte. La concentración más alta se registró en septiembre. A partir de enero a septiembre se observan incrementos en la concentración. En el Alto Golfo no se registra la presencia de este metal en alguno de los meses (Fig. 9).

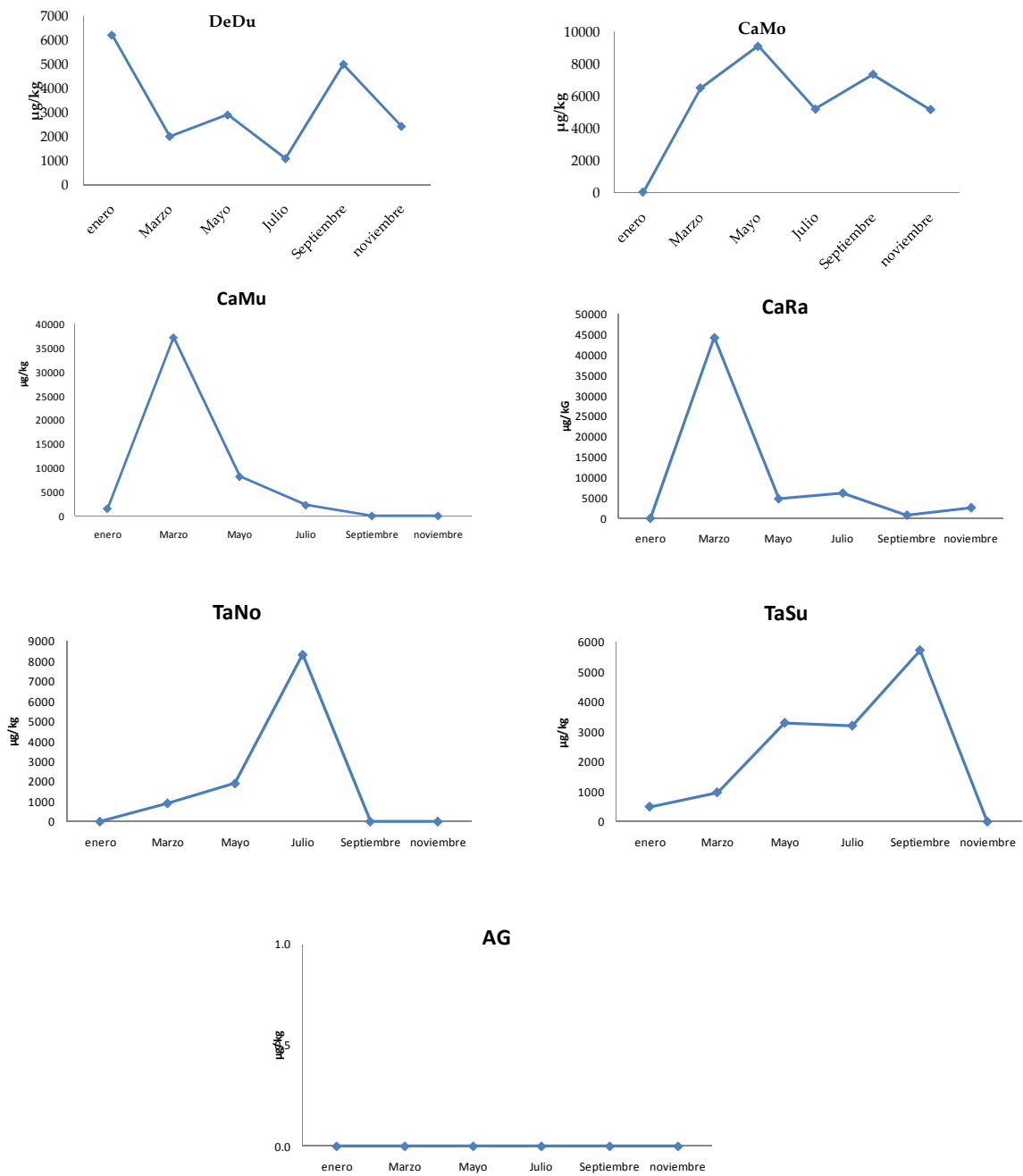


Figura 9. Tendencia de la concentración de Se en los diferentes sitios de muestreo, DeDu (Dren Durango), CaMo (Campo Mosqueda), CaMu (Campo Muñoz), CaRa (Campo Ramona), TaNo (Tapón Norte), TaSu (Tapón Sur), AG (Alto Golfo).

Plaguicidas

De todos los plaguicidas organofosforados que se utilizaron como material de referencia el único que se detectó, y cuantificó en las muestras del Río Hardy fue el Malatión en una concentración de $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los drenes con mayor cantidad de este compuesto fueron: El Dren Durango en el mes de septiembre; Campo Mosqueda en noviembre y Tapón Sur en noviembre. Mientras que presentaron menos concentración fueron: Tapón Sur en enero; Campo Muñoz en julio y Campo Ramona en julio también (Tabla III).

Tabla III. Concentraciones de Malatión ($\mu\text{g}/\text{kg}$) mensual por sitio de muestreo.

Sitio	Enero	marzo	mayo	julio	Septiembre	Noviembre
DeDu	Nd	Nd	0.53	0.87	3.02	0.48
CaMo	0.35	0.57	0.71	0.21	0.39	2.09
CaMu	Nd		0.32	0.405	0.61	Nd
CaRa	Nd	0.53	0.58	0.25	0.34	Nd
TaNo	Nd	0.48	Nd	0.54	0.32	Nd
TaSu	0.19	Nd	0.6	0.545	1.04	0.62

DeDu= Dren Durango, CaMo=Campo Mosqueda, CaMu= Campo Muñoz, CaRa= Campo Ramona, TaNo=Tapón Norte, TaSu= Tapón Sur, Nd= No detectado.

Glutación Peroxidasa

En el Dren Durango se registro un promedio anual de $410 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{Prot}$, lo cual es 1.94 veces mayor que el sitio prístino (ES). La actividad de esta enzima en enero, marzo, julio y noviembre fue mayor que en el sitio control, mientras que en mayo y septiembre la actividad fue menor. La actividad mayor fue detectada en julio (< 5 veces ES). Estadísticamente, hay diferencias significativas en los meses de julio y noviembre (LSD, $p < 0.05$; anexo I, tabla IV). En el Campo Mosqueda el promedio anual fue de $296 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{Prot}$. (< 11 veces ES). Noviembre, septiembre, marzo y mayo presentaron actividades mayores al sitio control. Estadísticamente se muestran diferencia significativa (LSD $p < 0.05$, anexo I, tabla IV) en marzo, mayo y noviembre. Campo Muñoz presentó un promedio anual de $1,294 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{Prot}$. La actividad de mayo, marzo, enero y noviembre fueron mayores que las registradas en el sitio prístino. En enero, marzo, mayo y noviembre se observan diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$; anexo I, tabla IV). En el sitio Campo Ramona el promedio anual fue de $459 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{Prot}$. La actividad en marzo, noviembre, septiembre y mayo fue mayor que en sitio control. En este sitio se observan diferencias significativos (LSD $p < 0.05$, anexo I, tabla IV), en enero, marzo y mayo. En el Tapón Sur el promedio anual fue de $596 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{Prot}$. En julio, septiembre y noviembre se observaron actividades mayores a las del sitio prístino. Diferencias significativos (LSD $p < 0.05$, anexo I, tabla IV) se observan en julio, septiembre y noviembre. Para el Alto Golfo la actividad promedio anual fue de $101 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$

Prot. Sólo en marzo; se observó actividad mayor a del estero del soldado. Marzo, mayo y septiembre muestra incrementos significativos (LSD $p < 0.05$, anexo I, tabla IV) (Fig. 10).

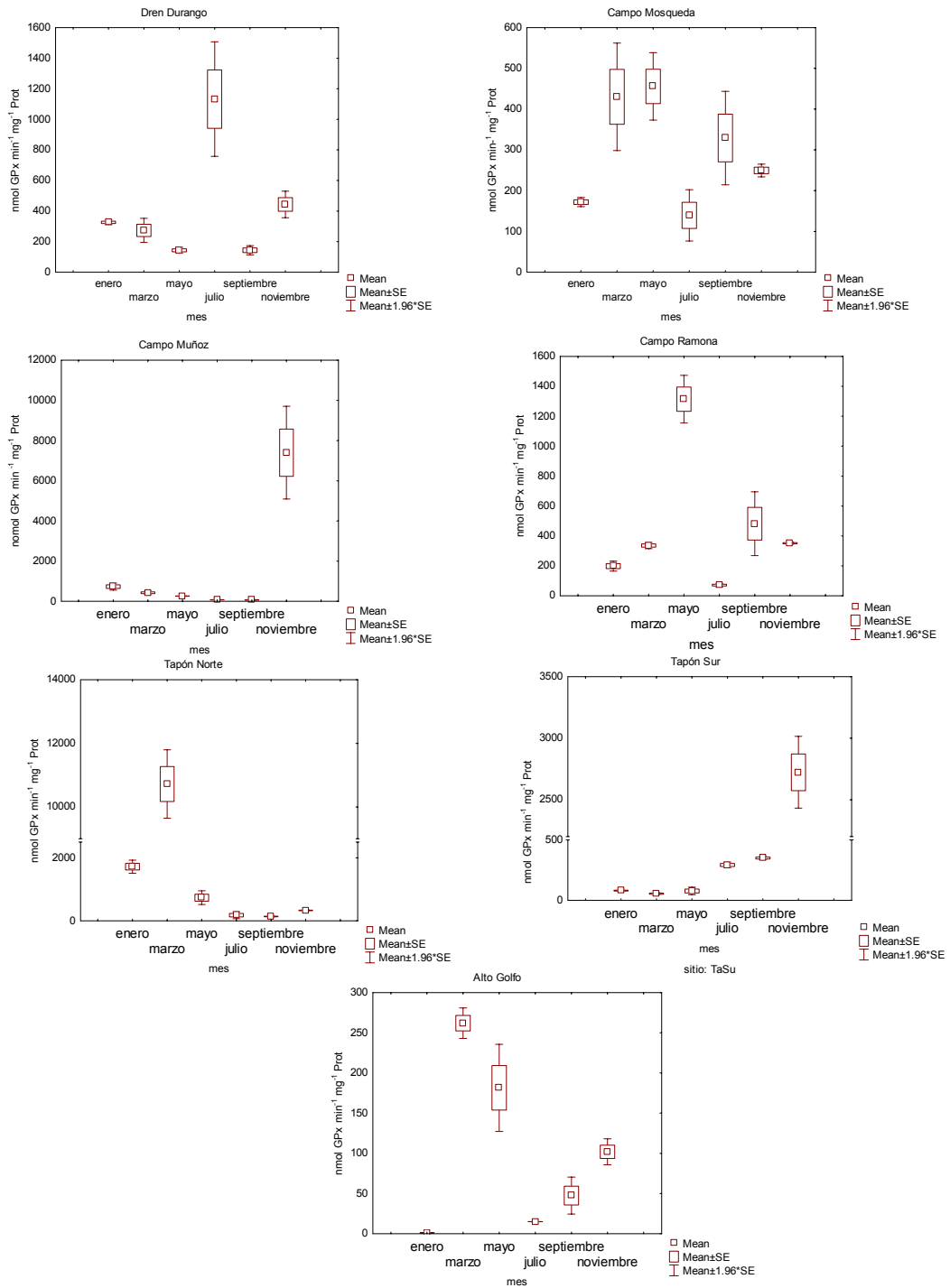


Figura 10. Actividad promedio de la enzima GPx por sitio durante los diferentes meses de muestreo.

Glutación S Transferasa

En el Dren Durango se calculo una actividad anual de $3,042 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot.}$ (< 60 veces ES), la actividad en todos los meses del muestreo fue mayor a la calculada en el sitio control. En septiembre se observa la mínima (3.5 veces ES) y en noviembre la máxima actividad (305 veces ES). Diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$; tabla V) son observadas en enero y noviembre. En el Campo Mosqueda la actividad anual fue de $454 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ (< 9 veces ES). Al igual que en el Dren Durango, la actividad en este sitio de todos los meses es mayor a la del sitio prístino. En noviembre y mayo se observaron las actividades mínima (< 1 veces ES) y máxima (< 17 veces) respectivamente. Estadísticamente existen diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$; tabla V) en marzo, julio, septiembre y noviembre. Para Campo Muñoz la actividad fue de $382 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ (< 7 veces ES). Mostrando que la actividad mensual es mayor que en el sitio control. En septiembre y enero se registran las actividades mínima (< 3 veces ES) y máxima (< 18 veces ES) respectivamente. Diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$; tabla V) se observan en el mes de enero, marzo y mayo. En el Campo Ramona la actividad anual fue de $585 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot.}$ (< 11 veces ES). En este sitio sólo julio mostró actividad inferior al sitio control. Diferencias significativos (LSD, $p < 0.05$; tabla V) se observan en mayo y septiembre. Para el Tapón Norte la actividad anual fue de $2,638 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$ (< 52 veces ES). A diferencia del sitio anterior en todos los meses se observan actividades mayores que en el sitio control, la mínima (< 1 veces ES) y máxima (< 285 veces ES) se registran en septiembre y enero, en este último mes se denota una diferencia significativa

(LSD $p < 0.05$, tabla V). En el tapón Sur la actividad anual fue de $775 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Prot. (< 15 veces ES). En este sitio ocurre lo mismo que en los sitios anteriores, la actividad en los meses muestreados es mayor a la del sitio control. En mayo y noviembre se observa la mínima (1 veces ES) y máxima (< 62 veces) respectivamente. Diferencias significativas (LSD $p < 0.05$, tabla IV) son observados en enero, julio y noviembre. En el Alto Golfo la actividad anual fue de $503 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Prot. (< 10 veces ES). En este sitio, también se determinaron concentraciones mayores a las obtenidas en el sitio prístino. En julio y enero se presentaron las actividades mínima (2.25 veces ES) y máxima (17 veces ES) respectivamente. En los meses de mayo, julio y septiembre se encontraron diferencias significativas (LSD $p < 0.05$, tabla V) (Fig. 11).

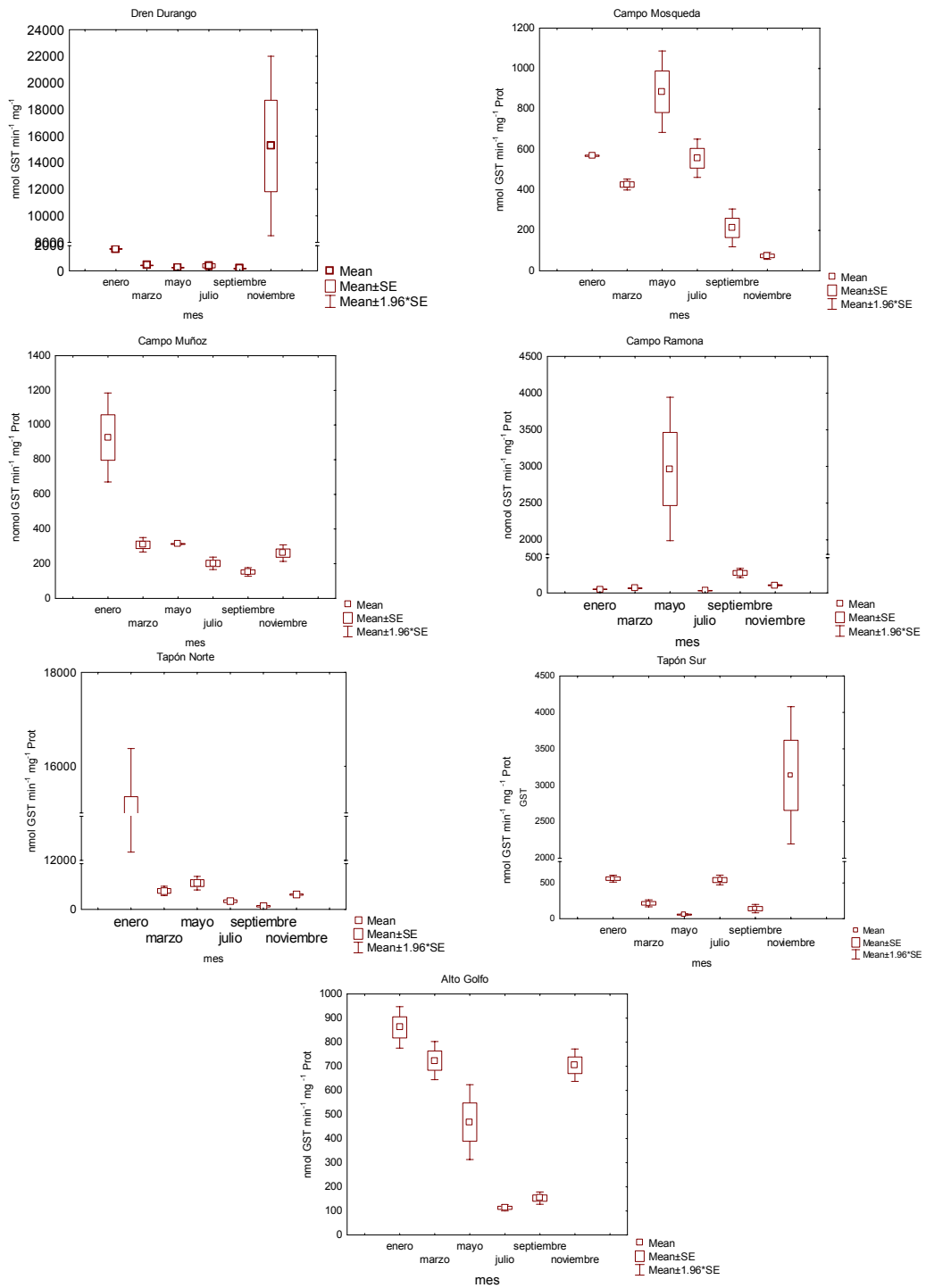


Figura 11. Actividad promedio de la enzima GST por sitio durante los diferentes meses de muestreo.

Peroxidación de lípidos (TBARS)

Espacio-temporalmente en el Dren Durango se observó una concentración anual de 39.7 nmol mg⁻¹ Prot. (1.5 veces ES). En los meses de mayo y septiembre los niveles de peroxidación de lípidos fue menor a la del sitio control (ES), mientras que en los demás meses fue mayor, siendo julio cuando se registra la máxima concentración (4 veces ES). Diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$; tabla VI) son observados en marzo, mayo y septiembre. En Campo Mosqueda se reportó una concentración anual de 29.7 nmol mg⁻¹ Prot., en septiembre y julio la concentración fue menor que en el sitio control, siendo marzo; el valor máximo de peroxidación (< 1 veces ES) mostrando diferencia significativa (LSD, $p < 0.05$; tabla VI). En Campo Muñoz la concentración media fue de 27.4 nmoles mg⁻¹ Prot. Los niveles de peroxidación en julio fueron menores a los observados en el sitio control, mientras que en los meses restantes se registra lo contrario. En enero se detectó el nivel máximo (< 1 veces ES), mostrando diferencia significativa (LSD, $p < 0.05$; tabla VI). En Campo Ramona la concentración anual fue de 54.7 nmol mg⁻¹ Prot (< 2 veces ES). Los niveles de peroxidación en julio y marzo son menores que los obtenidos en el sitio prístino mientras que en noviembre, enero, septiembre y mayo, son mayores. La concentración máxima se determina en mayo (< 6 veces ES), con diferencias significativas en mayo y septiembre (LSD, $p < 0.05$, tabla VI). En el Tapón Norte el nivel de peroxidación anual fue de 36.2 nmol mg⁻¹ Prot (< 1 veces ES). En julio y septiembre los niveles son menores que el sitio control, y en los restantes meses es mayor. En enero se registra la concentración máxima (< 2 veces ES) y se muestra diferencia significativa (LSD, $p < 0.05$; tabla VI) en

julio y septiembre. Para el Tapón Sur se observó una concentración promedio de 122.9 nmol mg⁻¹ Prot (< 4 veces ES). A diferencia de los demás sitios en este, las concentraciones en todos los meses fueron más altas las del sitio prístino. El nivel más alto de peroxidación ocurre en noviembre (< 21 veces ES), mostrando una diferencia significativa (LSD, p < 0.05; tabla VI). En el sitio Alto Golfo media anual en la concentración fue de 13.4 nmol mg⁻¹ Prot. (> 1 veces ES), mientras que las concentraciones medias mensuales observadas son menores a las registradas en el sitio control (Fig. 12)

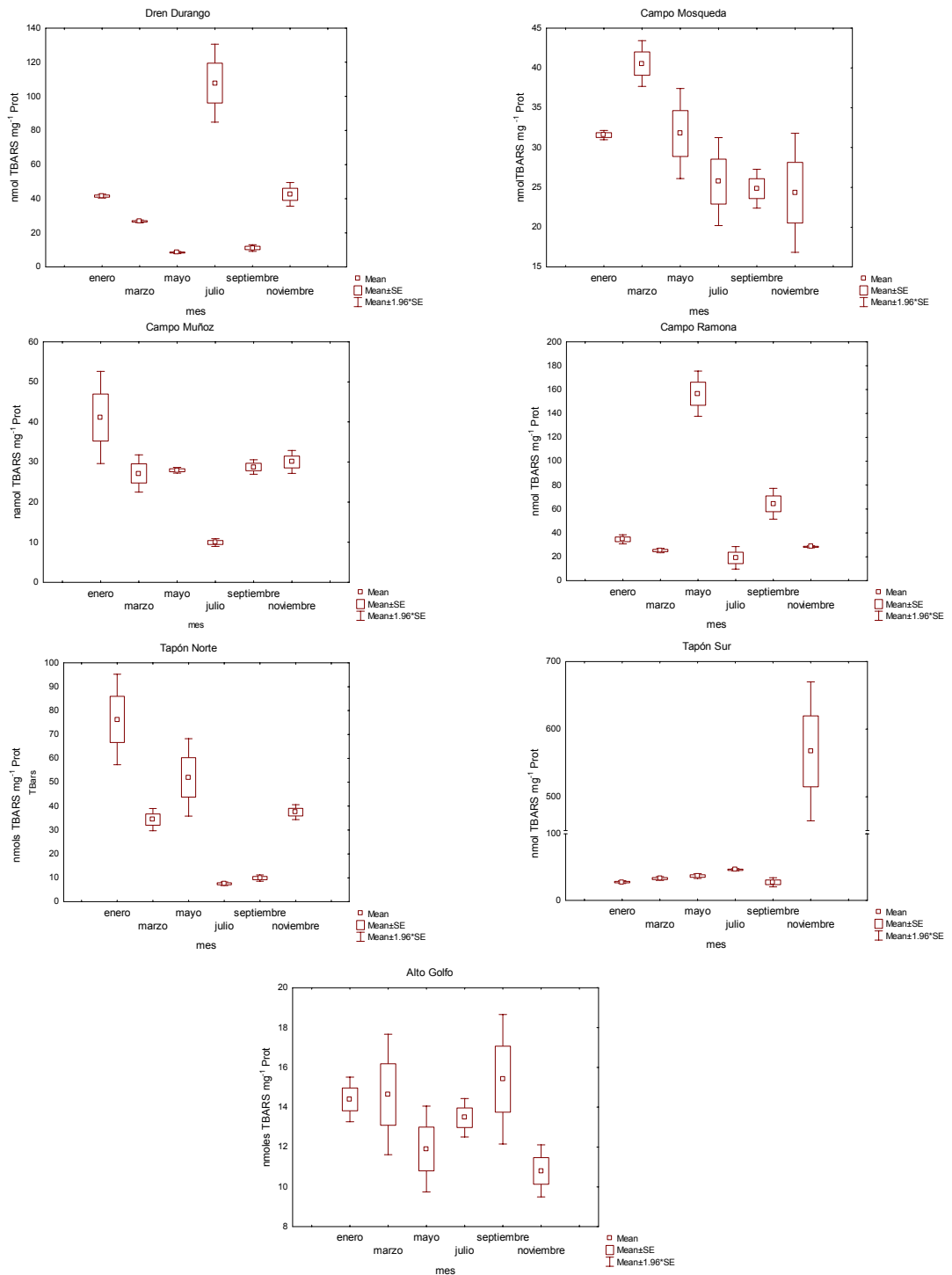


Figura 12. Concentración promedio de lípidos peroxidados, por sitio durante los diferentes meses de muestreo.

Proteínas carboniladas (Prot Carb)

En el Dren Durango se observó una media anual de 260 nmol mg⁻¹ TH (< 6 veces ES). En todos los meses la concentración de Prot Carb fue mayor que en el sitio control, el nivel máximo se registro en julio (< 8 veces ES), mostrando diferencias significativas (LSD, p < 0.05; tabla VII). En el campo Mosqueda la concentración promedio anual de Prot Carb fue de 278.8 nmol mg⁻¹ TH (< 6 veces ES), al igual que en el sitio anterior, los niveles de Prot Carb fueron mayores que en sitio prístino. En enero se observa la máxima concentración (< 8 veces ES). Diferencias significativas se observan en enero, marzo, mayo y noviembre (LSD, p < 0.05; tabla VII). En el Campo Muñoz la concentración anual fue de 138 nmol mg⁻¹ TH (< 3,26). Al igual que en sitios anteriores se observa una tendencia similar en los niveles de ProtCarb, respecto al sitio control. En el mes de marzo se encontró la actividad máxima (<8 veces). Estadísticamente se presentan diferencias en marzo y julio (LSD, p < 0.05; tabla VII). En el Campo Ramona el promedio anual fue de 483.4 nmol mg⁻¹ TH (< 11 veces ES). Los niveles de Prot Carb respecto al sitio control se presentan de forma similar a los demás meses. En julio se detectó la concentración máxima (< 17 veces ES). En septiembre y noviembre existen significativas diferencias (LSD, p < 0.05; tabla VII). En el Tapón Norte la media anual de los niveles fue de 22.31 nmol mg⁻¹ TH (< 5 veces ES). Al igual que en los sitios anteriores los niveles fueron mayores que en el sitio control. Durante noviembre se detectó la concentración máxima (< 7 veces ES), Diferencias significativas se observan en enero, mayo y noviembre (LSD, p < 0.05; tabla VII). En el Tapón Sur la concentración anual fue de 113.9 nmol mg⁻¹ TH (< 2.69 veces ES) y al igual que en los

otros sitios, la tendencia de los niveles de estas proteínas respecto al sitio control es similar. La concentración máxima se observa en mayo (< 4 veces ES). Diferencias significativas se presentan en mayo y noviembre (LSD, $p < 0.05$; tabla VII). En el Alto Golfo ocurre una concentración anual de $124 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ TH}$ (<2 veces ES). Las concentraciones de Prot Carb en este sitio son también, mayores que en el sitio control. En julio se registró el nivel máximo (< 4 veces ES) de Prot Carb y diferencias significativas se presentan en mayo y julio (LSD, $p < 0.05$, tabla VII) (Fig. 13).

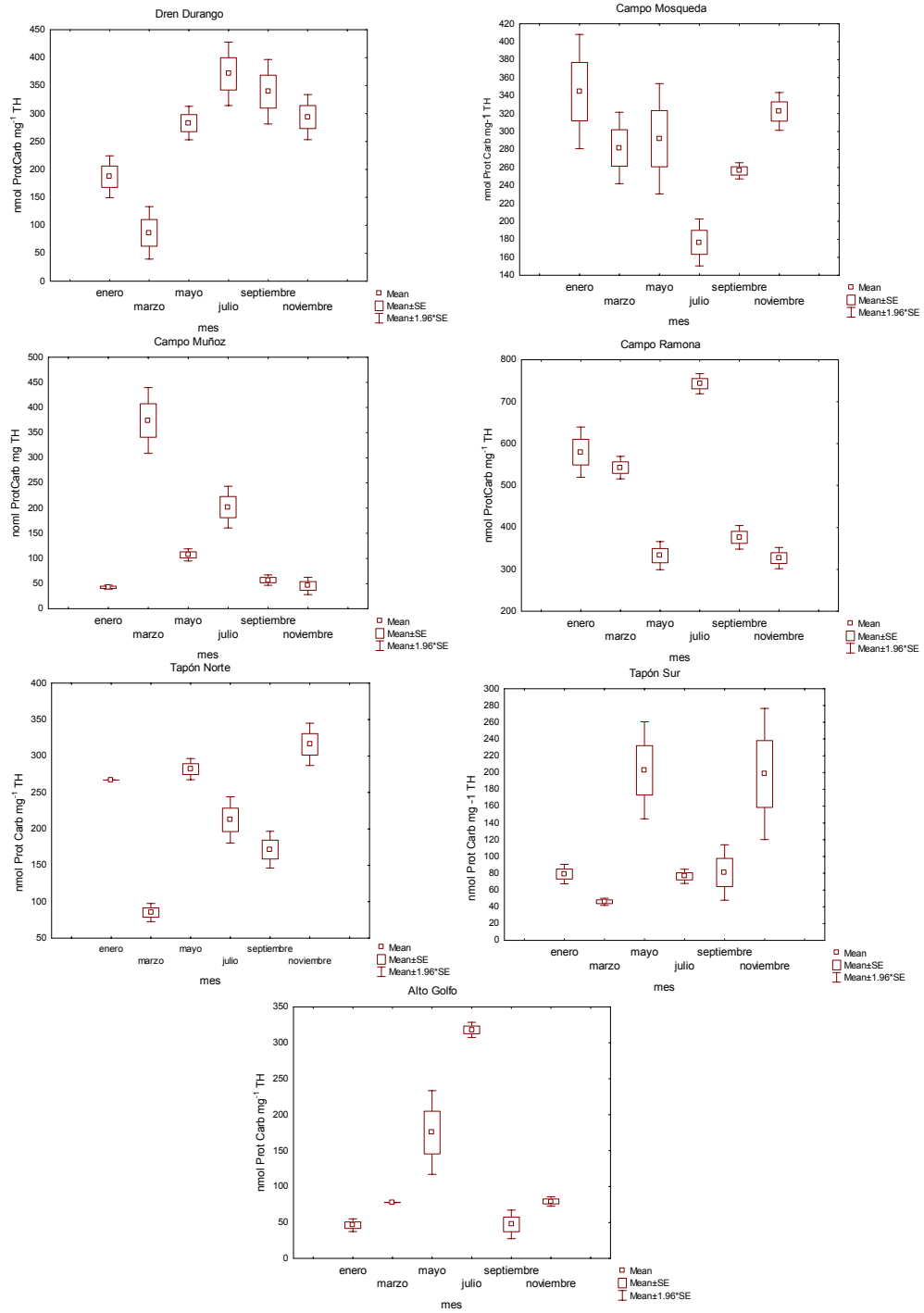


Figura 13. Concentración promedio de Proteínas carboniladas, por sitio durante los diferentes meses de muestreo.

Actividad e inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa

Las diferentes pruebas en la determinación del sustrato mostraron que el tipo de acetilcolinesterasa que está presente en los extractos de hepatopáncreas de almeja y en balanos enteros prefiere la acetilcolina. (Fig. 14 a). El ensayo que se realizó con Isompa (un potente inhibidor de Butirilcolina) no inhibe los sustratos con yoduro de acetilcolina, mientras que los ensayos con sustrato de yoduro de butirilticolina se ven afectados de una manera significativa (Fig. 14b).

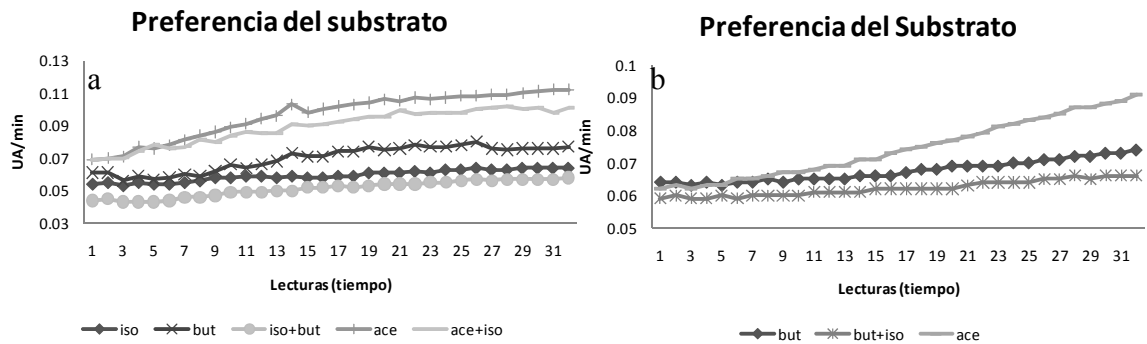


Figura 14. Preferencia del sustrato en a) el balano *B. amphitrite* y b) *C. californiensis* en presencia de acetilticolina, butirilticolina y el inhibidor isompa.

Sitio control y bioensayo

Como se puede apreciar en la tabla VIII (anexo1), el porcentaje de inhibición no presenta una relación directamente proporcional con las concentraciones. Mostrando que la inhibición más grande se obtuvo en la concentración de 5 µg/kg. Los organismos que no fueron expuestos al contaminante, no presentan inhibición de la enzima. Diferencias estadísticas ($P < 0.05$) son observadas en el bioensayo.

En el río Hardy se observó una inhibición promedio del 36.4%. En septiembre se observa la afectación promedio más alta del año (51.2%) y en marzo el más bajo (28.6%).

En el Dren Durango la inhibición promedio fue de 52.3%, en septiembre se detecto la mayor afectación (76.4%), mientras que en mayo la mínima (35.1%) (Fig. 15). Enero, marzo y mayo presentan diferencias significativas (LSD, $p < 0.05$) con julio y septiembre (tabla IX).

En el Campo Mosqueda se observa una inhibición promedio del 37.1%, siendo detectado el nivel más alto en enero (67.2 %) y el menor en julio (12.9%). (Fig. 15). Estadísticamente se muestra diferencias en la tabla IX.

En el sitio Campo Muñoz, la inhibición promedio fue de 32.5%. La máxima se registró en septiembre (49%) y la mínima en julio (18.9%). (Fig. 15). Estadísticamente se observan diferencias significativas en la tabla IX.

En el Campo Ramona la media de la inhibición fue 36.8%, siendo observados el mayor y el menor porcentaje en los meses de mayo (52.6%) y noviembre (14.8%) respectivamente. (Fig. 24). De manera significativa se observan diferencias entre estos meses en la tabla IX.

En el Tapón Norte presentó una inhibición promedio de 35.2%, el valor máximo registrado fue en septiembre (80.5%) y el menor en mayo (7.3%). (Fig. 15). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la Tabla IX.

El Tapón Sur, observó una inhibición promedio del 54.9%, la afectación máxima y mínima en los meses de noviembre (74.1%) y marzo (24.6%) respectivamente (Fig. 15).

En el Alto Golfo, fue muy bajo el porcentaje de inhibición, el promedio fue de 6.2%. El mayor grado de inhibición se mostró en mayo (7.8%) y marzo (7.9%) y el menor en julio (3.3%) (Fig. 15). Sólo se observan diferencias significativas entre los meses de julio, marzo y mayo (Tabla IX).

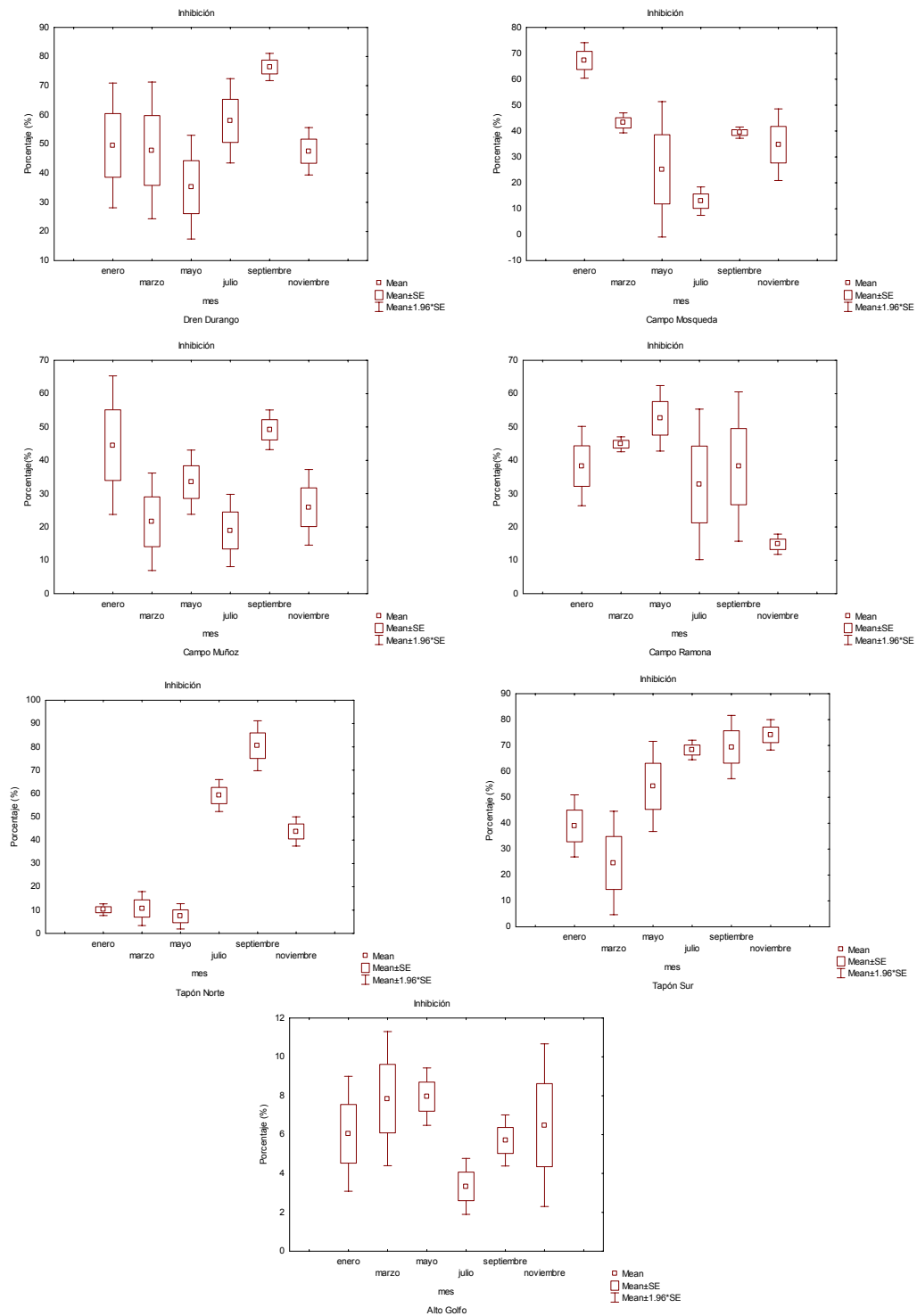


Figura 15. Porcentajes de inhibición calculados de la enzima acetilcolinesterasa por sitio y meses de muestreo

Modelo multivariado

Dren Durango

Como se muestra en la figura 16, la enzima antioxidante GST se considero la mejor respuesta en enero y julio, TBARS en mayo y noviembre e Inhibición en marzo y septiembre.

En el Campo Mosqueda la GST se catalogó como mejor respuesta en los meses de mayo y septiembre. Prot Carb en enero y noviembre. Inhibición en marzo y la GPx en julio (Fig. 17)

En Campo Muñoz la GST se hace notar como la mejor respuesta en marzo, julio y septiembre. Prot Carb en mayo y noviembre y por último TBARS en enero (Fig. 18)

En Campo Ramona, el análisis mostró a la enzima GST como mejor respuesta en enero*, mayo y julio. GPx en septiembre y noviembre. La inhibición en marzo (Fig. 19)

En el Tapón Norte la variable con una mayor respuesta mensualmente fueron GPx en mayo y noviembre. Inhibición en julio y septiembre, y Prot Carb en enero. (Fig. 20).

En el sitio Tapón Sur, la variable Prot Carb tuvo una respuesta mas marcada en marzo, mayo y septiembre. GPx en enero, inhibición en julio y TBARS en noviembre (Fig 21).

En Alto Golfo de California el análisis de IBR mostro que la enzima GPx presenta una mayor respuesta en marzo, septiembre y noviembre. Inhibición en enero, GST en mayo y Prot Carb en julio (Fig. 22)

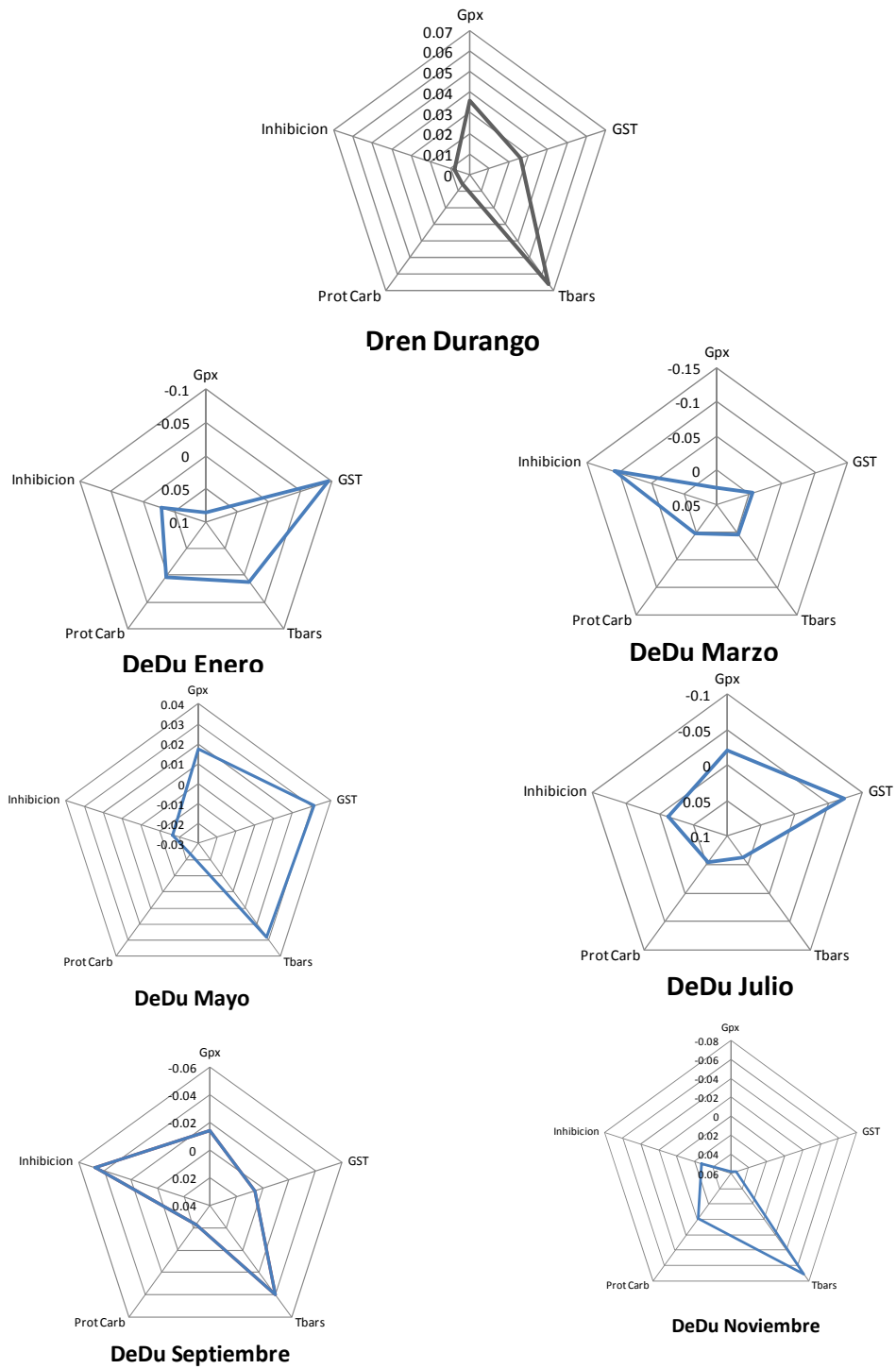


Figura 16. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Dren Durango durante los diferentes meses de muestreo

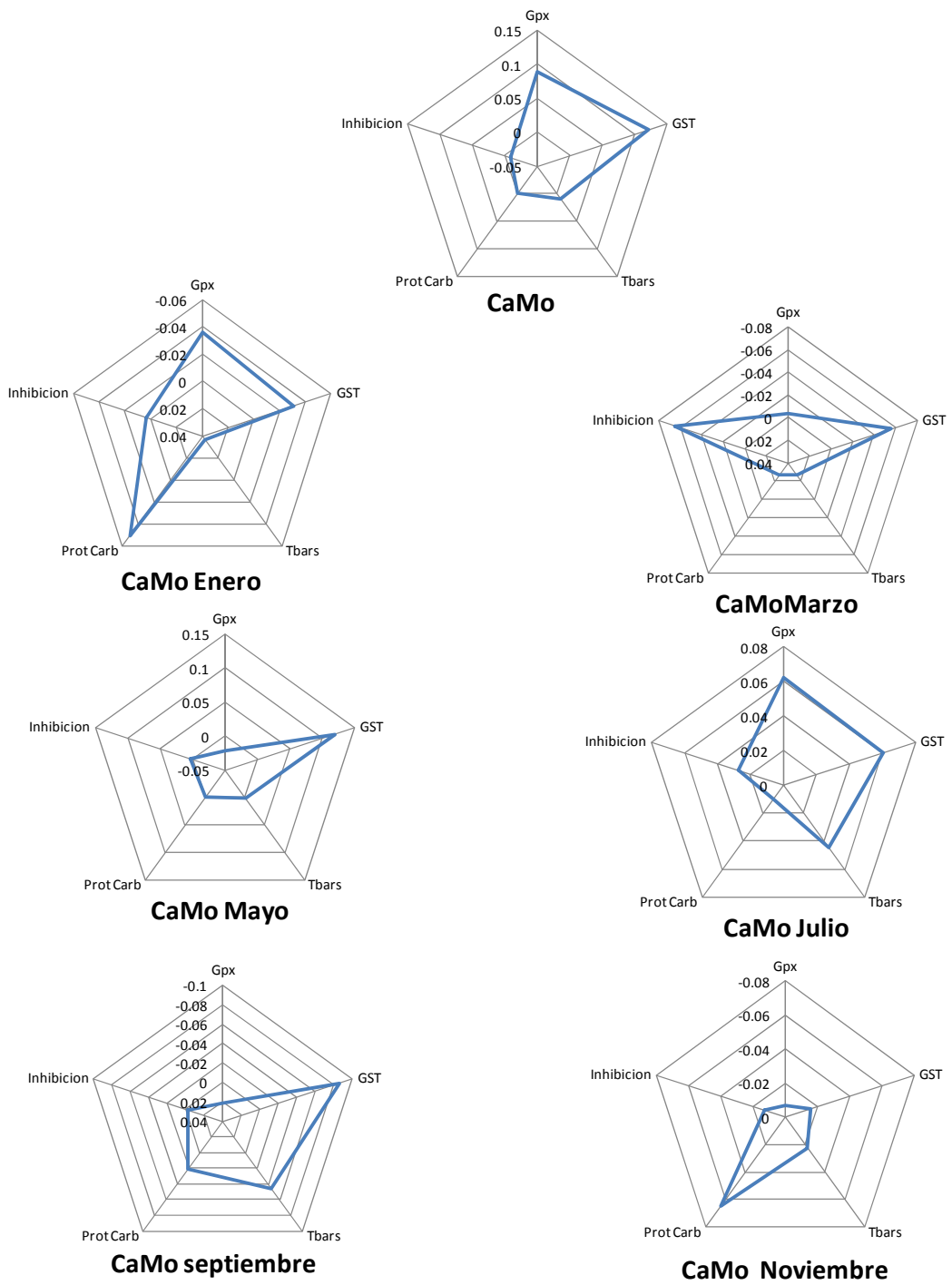


Figura 17. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Campo Mosqueda durante los diferentes meses de muestreo

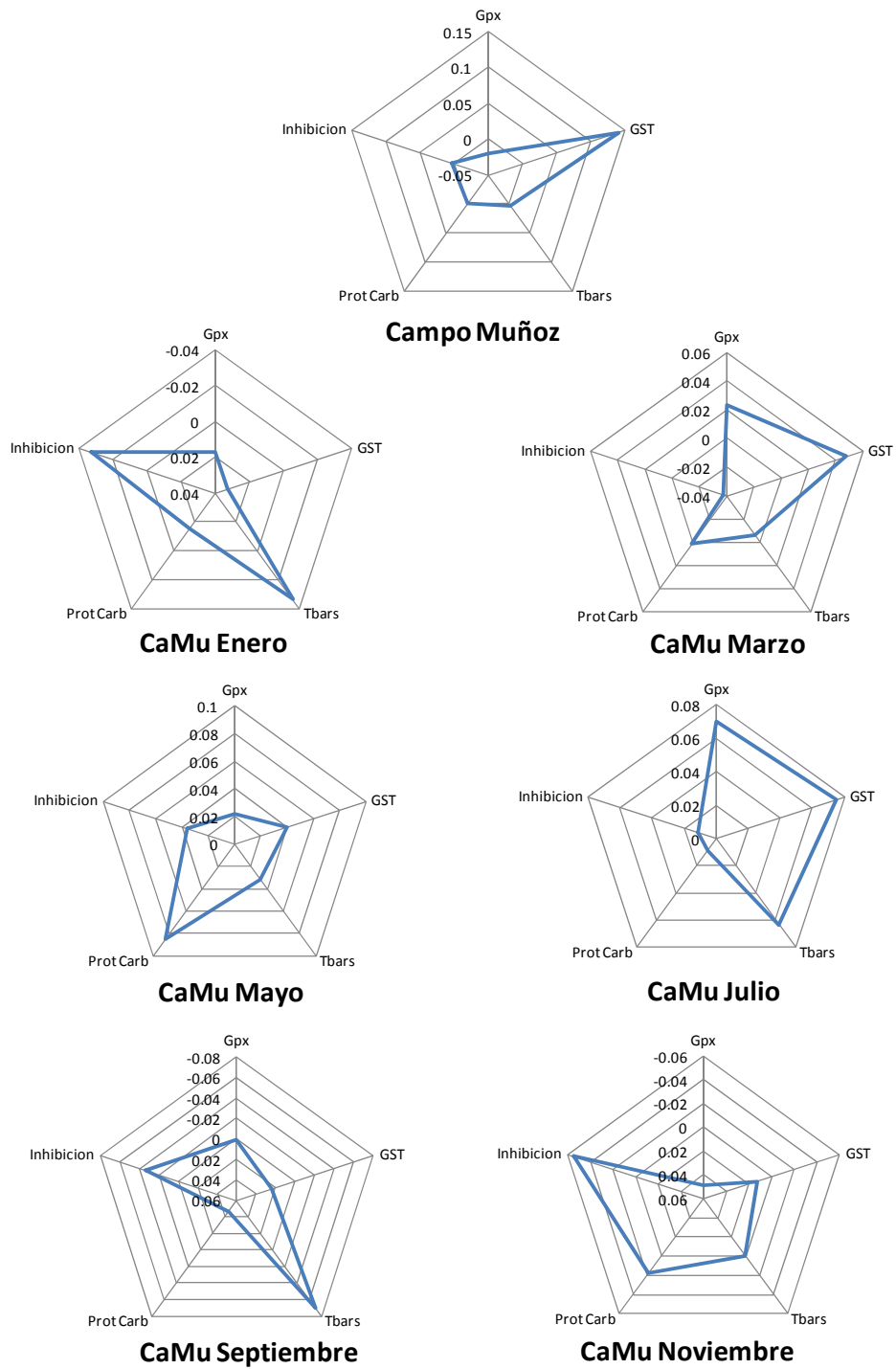


Figura 18. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Campo Muñoz durante los diferentes meses de muestreo

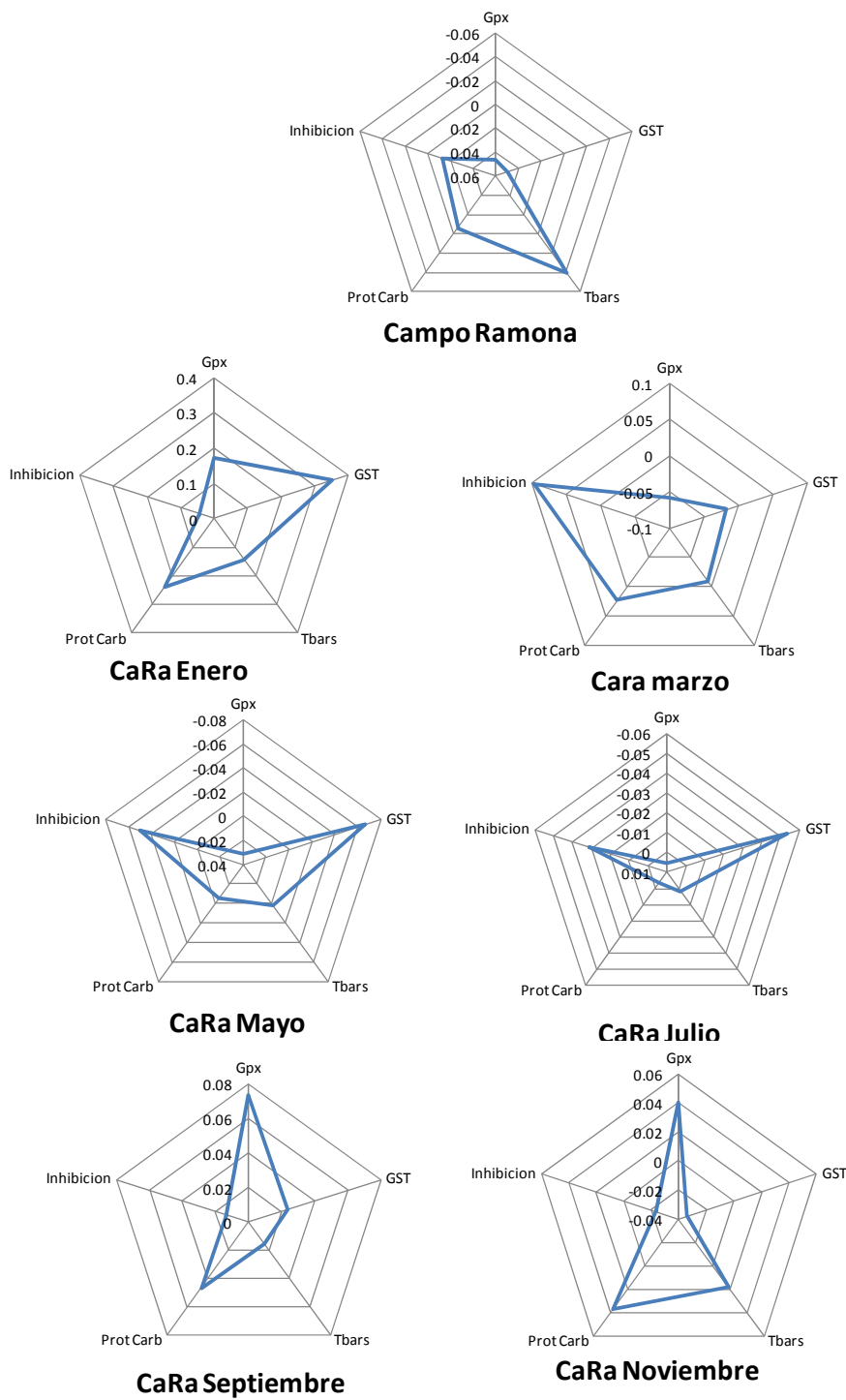


Figura 19. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Campo Ramona durante los diferentes meses de muestreo

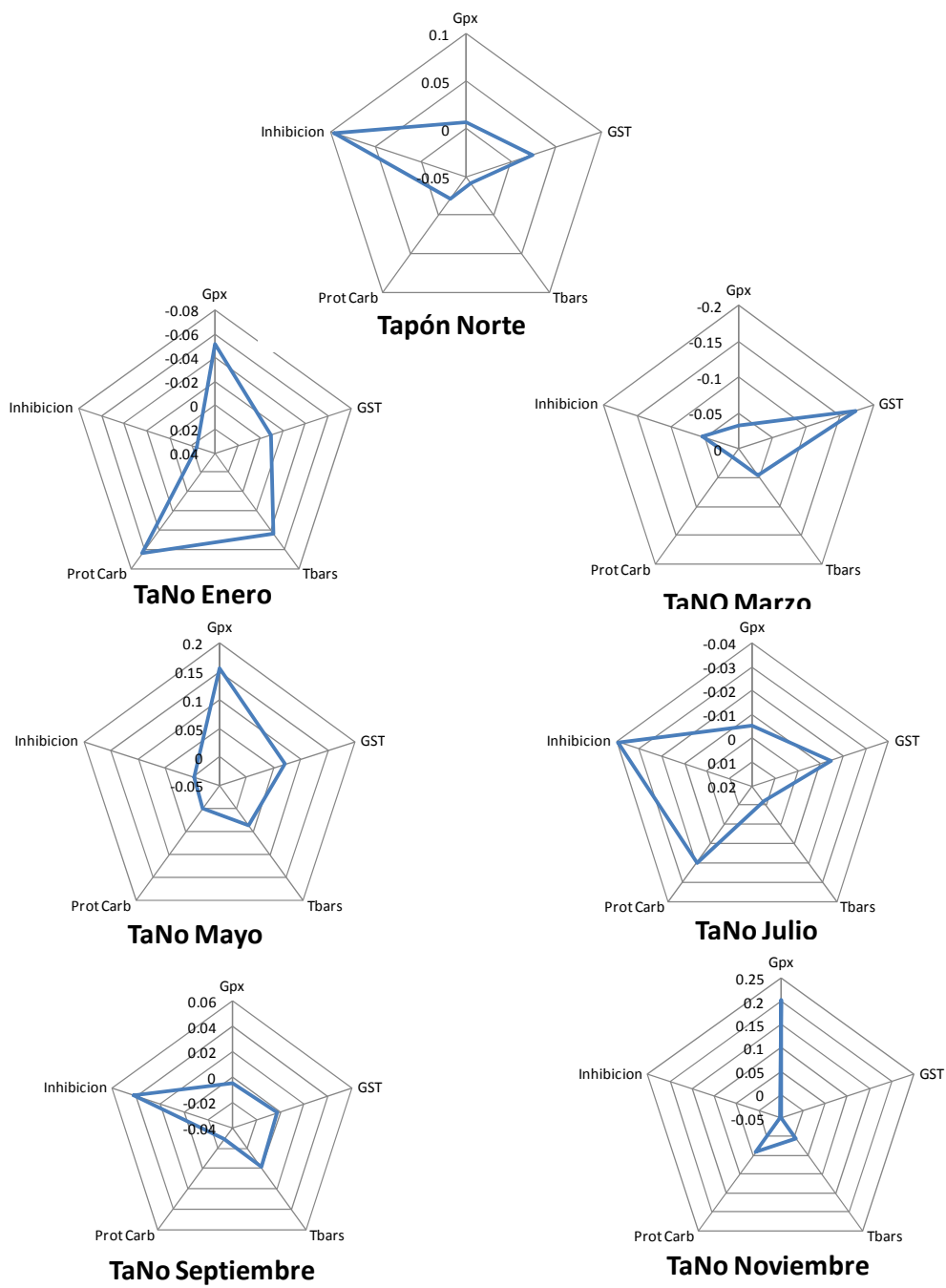


Figura 20. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Tapón Norte durante los diferentes meses de muestreo

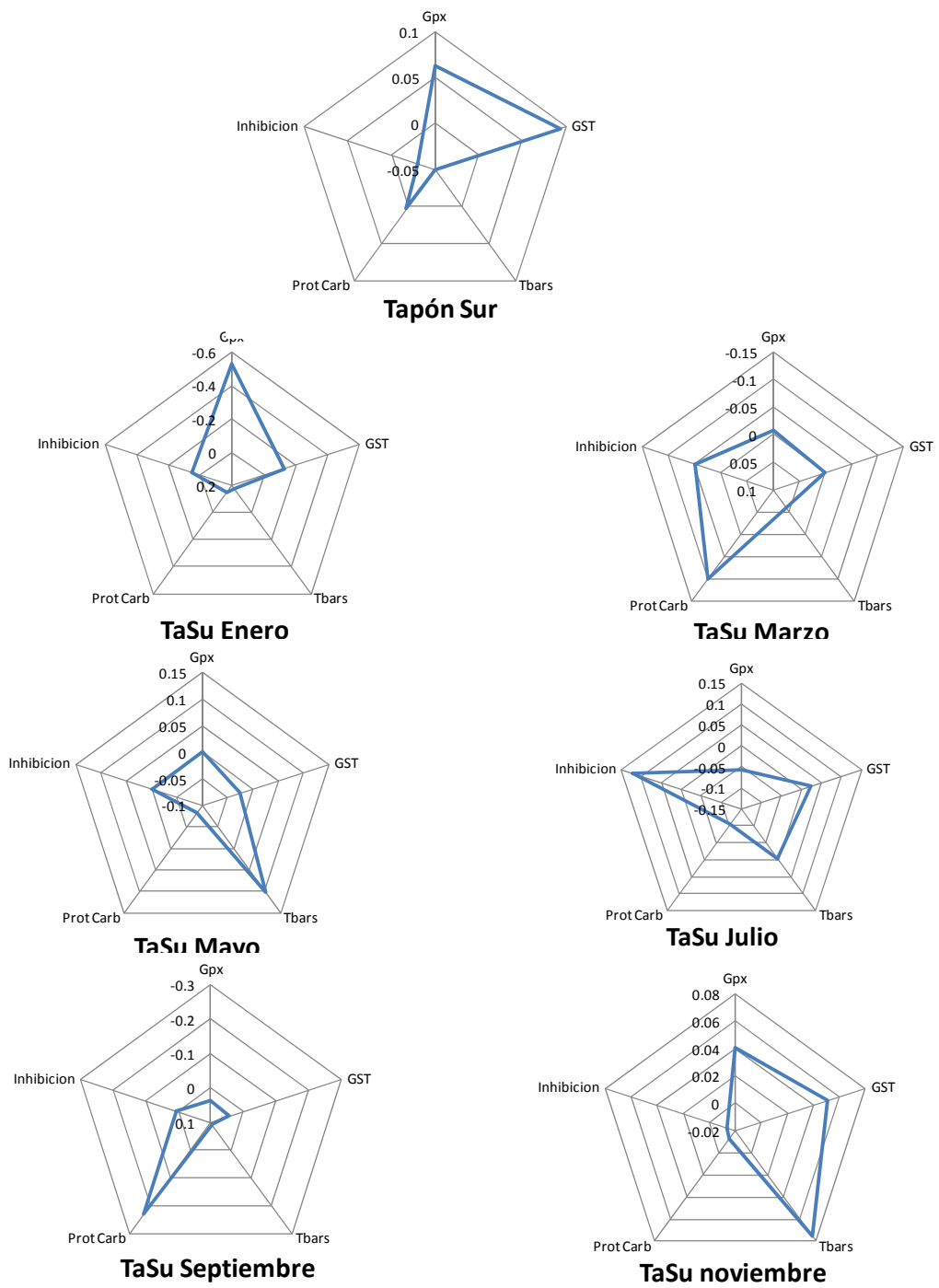


Figura 21. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Tapón Sur durante los diferentes meses de muestreo

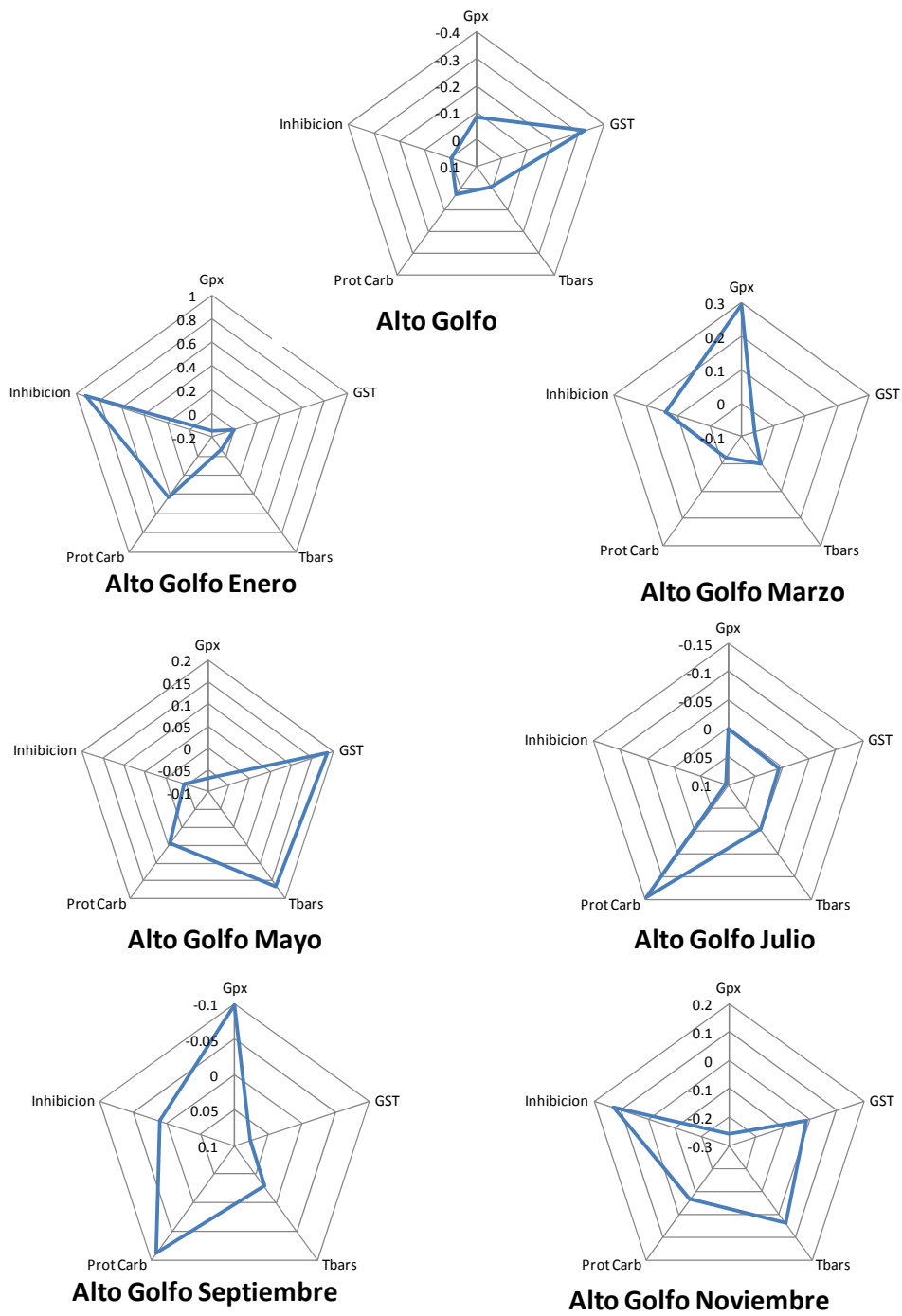


Figura 22. Respuesta de los diferentes biomarcadores en el Alto Golfo durante los diferentes meses de muestreo

DISCUSIÓN

Durante el presente estudio, no se encontró una relación definida con la temporalidad y el sitio de muestreo para los niveles de contaminantes ni para la batería de biomarcadores utilizada; es decir, no se observó el mismo tipo de respuesta en cada uno de los sitios a través del tiempo. El Pb es considerado como contaminante de origen urbano-industrial (Fialkowski y Newman, 1998; Ruelas-Insunsa y Paez-Osuna, 2000; Cadena-Cárdenas et al., 2009). En el estudio actual se encontró que las mayores concentraciones de Pb ocurrieron en el Dren Durango, Campo Mosqueda y Tapón Sur. Lo cual concuerda con el tipo de efluentes que se descargan en estos sitios. En el Dren Durango y en campo Mosqueda se observan asentamientos urbanos y en el Tapón Sur existe una actividad pesquera con pequeños motores y, por consiguiente, pequeñas combustiones de hidrocarburos y residuos de metaloides que pueden contaminar el medio, como se ejemplificó en las almejas del Alto Golfo por Cadena-Cárdenas et al. (2001).

Elevados niveles de Cd han sido documentados en lugares con y sin contaminación por actividades agrícolas (Fialkowski y Newman, 1998), con concentraciones de 14,000 y 6,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. En Mazatlan, Sin., un puerto con actividades industriales Ruelas-Insunsa y Paez-Osuna (2000) detectaron en el balano *F. dentivariasn* hasta 1,800 μg Cd /kg. En diferentes sitios del mar Báltico se registró una concentración máxima de 16,000 μg Cd /kg en áreas con actividades industriales (Martin-Díaz et al., 2007). En sitios impactados por la minería se ha detectado en almejas ¿de qué especie? una concentración máxima de 293,000 μg Cd/kg (Cadena-Cárdenas et al., 2001). Con estas referencias se

puede inferir que la acumulación de Cd en balanos y almejas se debe a la actividad agrícola. En el Dren Durango, Campo Mosqueda y Campo Muñoz las concentraciones de Cd son mayores a las observadas en lugares con actividades agrícolas. En el Campo Muñoz confluye uno de los brazos del colorado con agua residual agrícola (*op. cit.*), el cual se propone que esté contribuyendo a la concentración de Cd. Mientras que en el Tapón Norte y el Alto Golfo las concentraciones no muestran impacto antropogénico.

Las concentraciones de Hg encontradas en el Río Hardy no exceden los límites permisibles de la NOM-032-SSA1-1993, que regula las concentraciones en peces no depredadores tope y organismos acuáticos para consumo humano (0.5 mg Hg/kg), En sitios contaminados por residuos agrícolas y lodos orgánicos en el Lago Salton Sea, se ha determinado una concentración promedio de 13,000 y 11,000 $\mu\text{g Hg/kg}$, respectivamente (Fialkowski y Newman, 1998). Tomando como referencia estas concentraciones se podría inferir que los balanos del Río Hardy y las almejas del Alto Golfo no están impactadas por este metal. Es posible que la forma del metal disponible en los sitios de muestreo esté presente en bajas concentraciones y, por lo tanto, no se acumule en los balanos y almejas. En otro estudio se registró que el ácido sulfídrico reacciona con los metales disueltos en el agua y los precipita en forma de sulfidrilos antes de ser secuestrados por organismos filtradores (Fialkowski y Newman, 1998).

El Cu presenta la misma tendencia que el Pb en el Río Hardy y Alto Golfo, las concentraciones son muy bajas comparadas con sitios impactados por actividades antrópicas. Con base en ésto, se podría deducir que el efecto causado por Cu no es muy

fuerte. Sin embargo, Lang et al. (1980) concluyeron que a concentraciones de menores a 2 $\mu\text{g Cu/kg}$, se observan bajas tasas de mortalidad de larvas del balano *B. improvisus*; mientras que con una dosis de 111.3 $\mu\text{g Cu/kg}$ la mortalidad de las mismas larvas es mayor al 50%. Por otra parte, White y Rainbow (1985), Rainbow (1993) y Rainbow (2007) mencionan que la concentración de Cu requerida por el organismo es de 26.3 $\mu\text{g/kg}$, por lo que habría de considerarse que las concentraciones registradas en el Río Hardy si pueden tener efecto en los organismos, sobre todo en el Campo Muñoz, lugar donde se detectó la mayor concentración de Cu.

El Se, esencial para los seres vivos (ej. en almejas < 5.9 $\mu\text{g/L}$, BNA, 2001), en este estudio presentó más variaciones que los demás metales analizados. En en dos diferentes puntos del Río Hardy, García-Hernández et al. (2001) detectaron una concentración media en sedimentos (3,460 y 1,080 $\mu\text{g Se/kg}$), peces (18,340; 4, 130; 3,550; 2,430; 2,000 y 1,620 $\mu\text{g Se/kg}$) e invertebrados (2,230 y 1,540 $\mu\text{g Se/kg}$). Desafortunadamente, existe poca información acerca de las concentraciones de Se en balanos, por lo que se torna complicado discernir acerca de la contaminación de este metal. En este estudio no se encontraron niveles elevados de Se en balanos del Río Hardy. En ríos con geología similar, como el Río Uncompahgre en Uta y Colorado en E.U.A, se han determinado hasta 1,300 $\mu\text{g Se/L}$ en muestras de aguas somera (Presser et al., 1994). Otra posible razón de los altos niveles de Se en los balanos puede ser por su tipo de alimentación filtradora, adquieren tanto los contaminantes que conforman su alimento como los que se encuentran suspendidos en la columna de agua, y su distribución vertical les permite alimentarse a nivel de superficie o

en el fondo, captando una mayor variedad de contaminantes, así como presentando diversas tasas de excreción, mínimas o nulas comparadas con otros crustáceos, tales como los tretaclitas. Otro aspecto que hay que considerar en el proceso de acumulación del Se es el antagonismo que ha presentado con el Hg, el cual se ha demostrado existe en plantas y algunos peces (Pelletier, 1986).

El proceso de bioacumulación y detoxificación en los invertebrados, sobre todo en el grupo de los crustáceos, es muy peculiar y se debe considerar varios aspectos, entre ellos, el efecto que causa la pre-exposición a metales pesados en la tasa de acumulación y depuración en los invertebrados. Este proceso biocinético ha sido ejemplificado en el mejillón verde *P. viridis* por Blackmore y Wang (2002) y Shit et al. (2003). En el balano *B. amphitrite* Rainbow et al. (2004) demostraron que en presencia de bajas y altas concentraciones de Cd éste se bioacumula de una manera significativa en comparación con los metales a los que no se expusieron previamente los organismos; aparentemente, Ag y Zn no muestran este efecto. Los invertebrados acuáticos asimilan metales, ya sean esenciales o no, lo cual puede tener un potencial efecto tóxico (Rainbow, 2007), mostrando una enorme variabilidad a través de los diferentes grupos taxonómicos (Eisler, 1981; Rainbow, 1990, 1993; Phillips y Rainbow, 1994). La mayor fuente de metales traza en invertebrados, incluyendo los balanos, es el alimento (Wang, 2002; Rainbow, 2007; Wang 1999; Rainbow y Wang, 2001 y 2005), ya que al ser filtradores, adquieren los contaminantes asociados a su alimento y aquellos que están suspendidos en la columna de agua. Aspectos físicos y químicos, como el pH y la temperatura del agua y sedimento,

influyen directamente en la disponibilidad de los metales (Garcia-Hernandez et al., 2001) y, por tanto, su integración a la red trófica. Lo cual concuerda con lo registrado en China, donde este organismo presenta diferentes capacidades de absorción de metales pesados (Rainbow, 1998; 2002; Rainbow et al., 2004; Rainbow y Wang 2005). Un proceso más que se debe de tener en cuenta es la asimilación pasiva hacia el exoesqueleto de los crustáceos que contribuye en muy poco a la concentración total corporal, (White y Rainbow 1984; 1986; 1988; 1989; Rainbow, 1988; Rainbow, 2007). Cuando los metales son captados a través del cuerpo de los crustáceos, ya sea por un la superficie ectodérmica o endodérmica mediante el intestino, éstos están inicialmente disponibles para poder ligarse a moléculas de la célula receptora o a cualquier parte del cuerpo después de viajar a través de la hemolinfa. Cuando se trata de metales esenciales se utilizan en el lugar indicado, e.g. el Cu en la hemocianina. Sin embargo, si dicho metal está presente en exceso, puede causar efectos tóxicos en los tejidos donde se encuentre. Este exceso de metales, esenciales o no, debe de ser detoxificado. Una de las estrategias de detoxificación en los balanos es la formación de gránulos; éstos pueden ser de tres tipos, Tipo A, B y C, los más comunes en balanos son los Tipo B, los cuales están conformados de sulfuros y metales como el Zn y Cu (Al-Mohanna y Nott 1987; 1989; Rainbow, 2007). Se asume que por esta razón las concentraciones de Cu son muy bajas en balanos del Río Hardy. Una vía más de detoxificación es la que ocurre en fase soluble involucrando elementos como Zn, Cu, Cd, Hg, Ag y metalotioneinas, proteínas cistolíticas de bajo peso molecular que secuestran estos metales (Roesijadi, 1993; Amiard y Amiard- Triquet et al., 2006).

La actividad de enzimas antioxidantes, como la GPx y GST, así como la concentración de la peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas han sido usadas como indicadores exposición y daño por contaminantes (Kosower y Kosower, 1978), estos biomarcadores se encuentran estrechamente relacionados entre sí (Field y Thurman, 1996; Halliwell y Gutteridge, 1999). En los sitios muestreados a lo largo del Río Hardy en este estudio, las actividades de las enzimas antioxidantes y las concentraciones de los indicadores de daño oxidativo no mantienen una tendencia a través del tiempo. La actividad registrada en cada punto es un indicador de la presencia/ausencia de diversos contaminantes, incluyendo Se (Doyen et al., 2006; Martín Díaz et al., 2007). En el crustáceo *C. maenas* se registró una actividad basal de GPX de $148 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ (Gamble et al., 1995). Martín-Díaz et al. (2007) encontraron en esta misma especie de cangrejo, tanto en el control negativo en bioensayos como en el sitio control en el Golfo de Cádiz, una actividad GPx de 600 y 700 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ y en glándula digestiva de la almeja *Ruditapes philippinarum* 240 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$, reportando como máxima actividad de GPx, tanto para cangrejo como para almejas en los sitios contaminados, 900 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$. Con esta referencia, en el Río Hardy se observa afectación en el Dren Durango, Campo Muñoz y Tapón Norte. Esta inferencia se respalda cuando consideramos que estos sitios presentan concentraciones de Pb, Cd y Se (*op. cit.*), a consecuencia de los asentamientos urbanos (García-Hernandez et al., 2006; Zamora-Arroyo et al., 2005). En los sitios restantes, las actividades de GPx son muy similares, *de facto*, en el Campo Muñoz, son inclusive más bajas, lo cual se puede explicar si se toma en cuenta la existencia de una gran área de Tule, el cual se considera un agente detoxificante (EPA/625/R99/010, 1999), antes de este punto

de muestreo. El aumento en la actividad de GPx que se da en noviembre puede deberse a que en este punto se encuentra un dren adicional con aportes de agua agrícola y agua sobrante del río Colorado (García-Hernández et al., 2000 y 2001), que presenta una gran cantidad de Se (Epp et al. 1983), que sirve como co-factor para la actividad de esta enzima (Meister y Anderson, 1983, Halliwell y Gutteridge, 1999).

Por otro lado, la enzima GST está ampliamente relacionada con la detoxificación de compuestos extraños al organismo y, generalmente, está involucrada en el metabolismo de herbicidas, pesticidas, xenobioticos (compuestos ajenos) tanto en animales como en plantas. Muchos compuestos xenobioticos son metabolizados por reacción con GSH, reacción catalizada por la GST (Halliwell y Gutteridge, 1999). Este mecanismo se ha reportado en pequeños mamíferos, plantas, hongos, bacterias, peces y algunos invertebrados, (Picket y Lu, 1989; Vos et al., 1990; Field y Thurman, 1996; Strange et al., 2002; Kopecka et al., 2006). Los estudios realizados en bivalvos por Burgeot et al. (1996), Bainy et al. (2000), Lau y Wong (2003), Mandiuzo et al. (2004) y Zanet et al. (2006) encontraron una tendencia a incrementar la actividad de la GST en sitios contaminados con respecto a los controles. En el presente estudio, se observa un decremento en la actividad de la GST en relación a la concentración de la mezcla de plaguicidas empleada en los bioensayos. Fitzpatrick et al. (1997) reportaron, en la almeja *R. decussatus*, que no siempre se encuentra esta relación y que se debe de considerar el tipo de contaminante y sus metabolitos, ya que la enzima GST muestra una propiedad bifásica, primero se observa un incremento en la actividad debido a la activación del sistema natural de defensas

antioxidantes por compuestos xenobióticos (Elia 2007), y la segunda cuando la actividad presenta una disminución en presencia de ciertos compuestos, como el Cu, involucrado en el metabolismo de lípidos peroxidados y carbonilación de proteínas donde el GSSG es mermado, afectando la reacción de la GST (Radwan, 2009). En el Dren Durango, Campo Ramona y Tapón Norte y Tapón Sur, registraron en los meses de invierno actividades muy altas de GST, las cuales concuerdan con las aplicaciones de compuestos organofosforados para el cultivo de trigo. En contraste, en el Campo Mosqueda en esos mismos meses se observa una disminución drástica en la actividad de GST, probablemente por el efecto de dilución de los contaminantes como consecuencia de la represa artificial que existe en este sitio. En el Campo Muñoz, la tendencia negativa a lo largo del año se deba a la presencia de tule, que funciona como filtro natural. En el Alto Golfo se observa que la enzima GST tiene su mayor actividad en los meses de invierno, y decae hacia el verano. Este efecto de estacionalidad se ha documentado en diversos trabajos realizados en glándula digestiva de moluscos (Viarengo et al., 1991; Power and Sheehan, 1996; Niyogi et al., 2001), aunado a la contaminación *per se* de la combustión de hidrocarburos y metales pesados que dejan la actividad pesquera en esa región (*op cit*).

Un indicador de daño en las membranas celulares ocasionado por la presencia de metales pesados y contaminantes orgánicos son los lípidos peroxidados (Romeo y Gnassia-Barelli, 1995; Viarengo et al., 1996; Banni et al., 2005) y en exposiciones controladas en laboratorio (Livingstone, 1991; 1993). Banni et al. (2007) determinaron en la almeja *R. decussatos* un promedio máximo de 17.4 nmol TBARS mg⁻¹ Prot en áreas impactadas por

la agricultura y de 29.6 nmol TBAR mg⁻¹ Prot en zonas donde hay contaminación urbana y 35.3 nmol TBAR mg⁻¹ Prot en sitios con efluentes industriales. En el presente estudio, a excepción de los sitios Dren Durango, y Campo Ramona, existe una tendencia a encontrar las mayores concentraciones de TBAR en los meses de invierno. Estas concentraciones fueron 15 veces más grandes que las registradas por Banni et al., *op. cit.*, por lo que se considera que el Río Hardy está severamente impactado por descargas de la industria agrícola y urbana.

En el caracol *Theba pisana* se encontró que el metal que más afecta a la concentración de lípidos peroxidados (2 nmol mg⁻¹ Prot), es el Cu a una concentración de 5 mg/kg (Radwan et al., 2009). En lo que respecta al presente estudio, no se registraron concentraciones de Cu de ese orden en los organismos analizados; sin embargo, las concentraciones de TBARS son mucho mayores lo que sugiere que los balanos son afectados por otros contaminantes. La estacionalidad es un factor que se ha demostrado que actúa sobre el nivel de las defensas antioxidantes y la generación de ERO (Almeida et al., 2004) En bivalvos se reporta una baja actividad de enzimas antioxidantes en invierno y, paralelamente, un incremento en la concentración de lípidos peroxidados (Viarengo et al., 1991; Power and Sheehan, 1996; Niyogi et al., 2001; Wilhelm Filho et al., 2001). Este mismo suceso se reportó también en los balanos (Tooke et al., 1985) y ostiones (Pazos et al., 1996). En el Golfo de California, utilizando como organismo centinela la almeja *Megapitaria squalida* (Cantu, 2006) y el musculo como órgano diana se determinó que en lugares sin impacto antropogénico la concentración de TBARS (0.15 nmol mg⁻¹ prot) es mayor que en los lugares sin impacto,

mientras que en las gónadas se observa un patrón contrario. En contraste con el presente estudio las concentraciones son inferiores, lo cual podría deberse al órgano en el cual se esté analizando los indicadores.

Un aspecto más que hay que considerar es que la cantidad de ácidos grasos en los organismos, se ha determinado que son de importancia para la concentración de lípidos peroxidados (Passos, 1995; Graeve et al., 1997; Styrislave y Andersen, 2000; Monserrat et al., 2003). También se debe considerar la actividad de las defensas antioxidantes, como la GST que influye directamente en el gasto del GSH y que éste a su vez participa en el metabolismo de los lípidos peroxidados (Radwan, 2009).

Debido a la escases de información sobre los niveles de proteínas carboniladas se tomó en consideración la concentración de $76.9 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ TH}$, la cual es la concentración que se observa cuando los balanos son expuestos a una concentración de $2 \mu\text{g/kg}$ de una mezcla de 6 plaguicidas organofosforados. A partir de esta referencia, podríamos inferir que en todo el Río Hardy los organismos presentan daño oxidativo como efectos de los metales y plaguicidas. En todos los sitios existe una marcada tendencia a presentar las mayores concentraciones de Prot Carb en los meses de verano. Observando que en septiembre y noviembre la defensa antioxidante no es suficiente y la concentración de la ProtCarb se eleva drásticamente. Esto sugiere que, al no haber defensas antioxidantes suficientes, el daño oxidativo es mayor, lo cual coincide con lo reportado por Velecar (2005). Las altas concentraciones de Prot Carb (en promedio mayores a las del Dren Durango) pueden ser causa de efectos sinérgicos entre plaguicidas organofosfatados, metales pesados e

hidrocarburos, ya que éste es un sitio que presenta un asentamiento urbano de tipo turístico donde se emplean deportes acuáticos motorizados (García-Hernández, 2006; Zamora-Arroyo et al., 2005).

La inhibición de acetilcolinesterasa se evaluó en el cuerpo completo del balano *B. amphitrite*, así como en el hepatopáncreas de la almeja *C. californiensis* para valorar si existe una relación con la presencia de plaguicidas y metales pesados en el ambiente. Al realizar los análisis se estimó que el substrato de preferencia es la acetilcolina, esta misma preferencia se ha determinado en otros crustáceos como *Artemia salina*, *A. parthenogenetica* (Varó et al., 2002), *Daphnia magna* (Jemec et al., 2007), el camarón blanco *L. vannamei* (García-de la Parra et al., 2006), en *Palaemon serratus* (Bocquené et al., 1990), el camarón ramoneador *Palaemonetes pugio* (Bolton-Warberg et al., 2007), en bivalvos como *M. galloprovincialis* (Escartin y Portte, 1997), la almeja *Curbicula fluminea* (Mora et al., 1990; Basack et al., 1997) y el ostión *C. virginica* (Bolton-Warberg et al., 2007). Durante los bioensayos, el porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa no presentó una clara tendencia en relación a la concentración de dicho bioensayo. Una posible razón puede ser que esta enzima muestre un actividad bifásica, la cual se ha detectado en enzimas antioxidantes como la GST y GPx y que se interpreta como un estado fisiológico en el que se producen más enzimas antioxidantes (Regoli et al., 2002 y 2005; Radwan, 2009) y en este estudio se presenta este mismo efecto. Otra causa posible es atribuida al efecto sinérgico de todos los plaguicidas unidos en la mezcla empleada (Bocquené et al., 1995), que no se consideró en un principio, ya que es común el empleo de

estas mezclas en estudios de toxicidad (Segala y Fedoroffb, 1989; Hamerd et al, 2000), dado que de esta manera es como se encuentran comúnmente en el ambiente.

Al evaluar la actividad enzimática de acetilcolinesterasa, tanto en los bioensayos como en las muestras colectadas en campo, fue necesario considerar qué porcentaje sería considerado reflejo de afectación por contaminantes. Generalmente se asocia el 50% de la inhibición de la actividad de esta enzima con daño irreversible en el organismo; sin embargo, hay discrepancias al respecto (Peakall, 1992). Jamec et al. (2007) registraron inhibiciones en la actividad de acetilcolinesterasa de hasta el 70 % en *D. magna* sin observar efecto aparente en los organismos. García-de la Parra et al. (2006) evaluaron el efecto de metamidofos en la actividad de acetilcolinesterasa en la antena ocular del camarón blanco *L. vannamei*, concluyendo porcentajes de inhibición del 48% expuestos a 1.17 mg/kg de metamidofos. Ellos indican que entre los parámetros a evaluar en un estudio de toxicidad se encuentra el comportamiento de los organismos, ya que la respuesta es más importante a nivel conductual que bioquímica. En el camarón rosa *Farfantapenaeus duorarum*, Coppage y Matthews (1974) determinaron que una exposición a compuestos organofosfatados, en general a corto plazo, causa una inhibición de 80% de la actividad de la acetilcolinesterasa, el cual se consideró un porcentaje crítico para la sobrevivencia ya que desde un 75% se observó mortalidad. En otro peneido, el camarón ramoneador *P. pugio*, Bolton-Warberg et al. (2006) determinaron una inhibición del 77% de la acetilcolinesterasa en organismos expuestos a una concentración de 0.05 diclorvos/L, lo que provoca efectos mortales en los organismos. Sin embargo, aún en estas especies de camarones, las

variaciones registradas con relación al efecto inhibitorio de compuestos organofosforados son altas; ello se atribuye a la composición química de cada uno de estos compuestos, que se refleja en diferentes afinidades y tasas de fosforilación e hidrólisis de la acetilcolinesterasa (Lignot et al., 1998).

En el presente estudio se observaron porcentajes de inhibición de acetilcolinesterasa de más del 70 %, en el Tapón Sur, lo que indicaría que los organismos están severamente afectados. Considerando como referencia que el 50 % de inhibición (Peakall, 1992) es indicativo de daño irreversible fisiológico, los sitios más afectados son Dren Durango en julio y septiembre, Campo Mosqueda en enero, Campo Ramona en mayo, Tapón Norte en julio y noviembre, así como Tapón Sur de mayo a noviembre. A diferencia de estos sitios, siguiendo con los mismos criterios, la misma prueba nos indica que Campo Muñoz y Alto Golfo no presentan intoxicación o afectación por plaguicidas.

Si consideramos un criterio más estricto con relación a la línea de referencia en el porcentaje de inhibición de acetilcolina del bioensayo, se puede inferir que hay efectos negativos por la presencia de compuestos organofosforados a partir de una disminución de la actividad enzimática del 33.6% debido a que es el porcentaje de inhibición mínimo observado en la exposición de compuestos organofosforados. Con el supuesto anteriormente establecido, se puede inferir que el Dren Durango se encuentra afectado todos los meses del año; el Campo Mosqueda en los meses de enero, marzo, septiembre y noviembre; el Campo Muñoz, enero, mayo y septiembre; el Campo Ramona, de enero a septiembre; el Tapón Norte de julio a septiembre; el Tapón Sur casi todo el año con

excepción de marzo. Sin embargo, según este indicador, en el Alto Golfo no hay ninguna afectación por compuestos organofosfatados. Considerando lo mencionado anteriormente, es posible que la afectación estacional por compuestos orgánicos no solo está directamente relacionada con el flujo del agua en alguno o varios sitios de muestreo. Otros factores también pueden estar interviniendo, como la presencia de Hg. Se ha observado que este elemento influye en la actividad de la acetilcolinesterasa; sin embargo, en esta área de estudio no se observa una relación espacio-temporal entre la concentración de Hg y la inhibición de acetilcolinesterasa, ni tampoco relación alguna con la concentración de los diferentes metales analizados en el presente estudio. Con base en esto, se puede inferir que los porcentajes más grandes de inhibición de acetilcolinesterasa se deben a la acción conjunta del flujo del agua de retorno, desechos urbanos de las poblaciones asentadas. En otra perspectiva, el flujo del agua aumenta de enero a abril, meses en los cuales la afectación disminuye, es decir, el efecto de los plaguicidas disminuye con la cantidad de agua. Sin embargo, de abril a julio tanto el flujo como el efecto presentan su menor nivel, lo cual no sigue la tendencia, si se considerara que el aumento en el flujo de agua disminuye el efecto de los plaguicidas. Por lo tanto, se deduce que la afectación principal es por plaguicidas que provienen de drenes urbanos. En el campo Mosqueda, tampoco se observa una relación directa con el flujo del agua, ya que tiende a mostrar una disminución en el efecto inhibitorio de acetilcolinesterasa de enero a julio. Si se considera la aplicación de pesticidas en el cultivo de trigo el cual ocurre en la época de invierno, se podría inferir que el efecto inhibitorio que se observa se debe a estas aplicaciones. Otro factor que debe ser considerado, es la presencia de una represa que en este sitio mantiene un volúmen constante

de agua. Este sistema debe favorecer un efecto de dilución en las concentraciones de los plaguicidas y, por tanto, causar un menor porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa. En el Campo Muñoz se observa un efecto inhibitorio oscilatorio. Los bajos porcentajes de inhibición probablemente se deban a la existencia de una gran extensión de tule que se encuentra antes del punto de muestreo y a un canal adicional que trae agua del río Colorado. Los efectos inhibitorios altos podrían corresponder al dren adicional que lleva agua de retorno agrícola con compuestos organofosforados.

En el Campo Ramona se observa una relación entre la inhibición de la acetilcolinesterasa y el flujo del agua a principios del año. Esto puede estar muy relacionado con el ciclo de cultivo del algodón, dado que en el Campo Ramona es donde se descargan directamente dos drenes secundarios con agua residual agrícola que vienen directamente de los cultivos. En el Tapón Norte el drástico aumento de la inhibición de acetilcolina se registra de mayo a septiembre y disminuye en noviembre. Este efecto es atribuido al cumulo de agua en este sitio, ya que como se ha mencionado antes, es un represa artificial que tiene el objetivo de mantener el nivel de agua a lo largo de Río Hardy. Este mismo reservorio diluye la concentración de los contaminantes al final del año, y debido a ésto en noviembre el porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa disminuye. Sin embargo, este porcentaje es mayor a la línea base (33%) que se ha planteado con los resultados del bioensayo, como afectación por plaguicidas organofosfatados. En el Tapón Sur, se muestra un elevado porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa a partir del mes de mayo que se incrementa hasta noviembre. Este sitio se ve afectado por la marea del alto golfo, que

acarrea agua de un dren proveniente de una amplia extensión de campos agrícolas y que llega directamente al Tapón Sur (García-Hernández, 2006; Zamora-Arroyo et al., 2005; Hinojosa-Huerta et al., 2007). En el Alto Golfo el porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa no es indicativo de daño por plaguicidas organofosforados. Es factible que al llegar a este sitio, la alta tasa de recambio de las mareas características del alto Golfo (Galindo-Bec et al., 2000; Zamora-Arroyo et al., 2005) eviten que estos compuestos al igual que sus metabolitos, no causen el efecto alguno.

El modelo multivariado que se empleó en el presente estudio fue probado en el Mar Báltico por Beliaeff y Burgeo (2002) provee una herramienta de estandarización para poder comparar variables con diferentes unidades; sin embargo, no hay que pasar por alto que este modelo no explica la biología de los organismos, sino que provee una explicación estadística a la variación de cada uno de los factores. Un ejemplo de esto es cuando se calcula la variable con la mejor respuesta de manera global; es decir, sin tomar en consideración los muestreos mensuales en el Dren Durango, se observa que los lípidos peroxidados explican la mayor parte de la variación, y cuando se realiza esta evaluación de manera mensual, la enzima GST se destaca en 4 de los 7 meses de muestreo. Otro caso que surgió en este trabajo es la respuesta en el Alto Golfo; evaluando el mes de enero se registra a la inhibición de acetilcolinesterasa como la mejor variable cuando, desde una perspectiva toxicológica, en este sitio no se encontró inhibición de acetilcolinesterasa significativa. Debido a esto, el IBR puede ser usado como una herramienta que nos indique tendencias y no como un estadístico concluyente.

CONCLUSIONES

A lo largo del Río Hardy sitios como el Dren Durango, Campo Muñoz, Campo Ramona y Tapón Norte se muestran afectados de manera irreversible debido a los porcentajes de inhibición de acetilcolinesterasa y las concentraciones de los lípidos peroxidados y proteínas carboniladas.

Las diversas alteraciones antropogénicas, como asentamientos urbanos y actividades turístico-recreativas, coadyuvan al impacto negativo de los contaminantes en los organismos.

En el presente trabajo no se demostró que el Alto Golfo muestre impacto por los contaminantes vertidos en los valles agrícolas de San Luis Rio Colorado y Mexicali.

El grupo de biomarcadores utilizados sugiere que los balanos responden a contaminantes agroquímicos.

Las características fisiológicas intrínsecas de los balanos le han permitido sobrevivir en ambientes extremos como en el Río Hardy.

Recomendaciones

Realizar muestreos mensuales para tener una estimación más exacta de las variaciones en las actividades enzimáticas e indicadores de daño. Es posible que no se perciban descargas adicionales en los meses que no se está colectando.

Realizar bioensayos de las muestras de balanos del Río Hardy aclimatándoles con agua natural del río Colorado. Con la finalidad de tener una estimación más exacta de la respuesta de los indicadores usados sin exponerse a los residuos de los contaminantes agroquímicos.

Realizar estudios sobre los parámetros poblacionales del Balano *B. amphitrite*. Para estimar el tiempo de exposición y posibles afectaciones al crecimiento y/o reproducción causados por los residuos de los compuestos

Replantear los puntos de muestreo adicionado canales o drenes secundarios. Para tener una estimación de los indicadores antes de incorporarse al Río Hardy.

BIBLIOGRAFÍA

Allocati N.F., Masuli M.B., Alexeyev M.F. y Di Ilio C.. 2003. Proteus mirabilis glutathione S-transferasa B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stress. *Biochem. J.* 373:305-311.

Almeida E.A, Miyamoto S, Bainy A.C.D., Medeiros M.H. y Mascio P. 2004 Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Poll Bull* 49:386–392

Al-Mohanna S.Y y Nott J.A. 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Mar Biol.* 95:129–37.

Al-Thaqafi K K. y White N. 1991. Effect of shore position and environmental metal levels on body metal burdens in the Barnacle, *Elminius modestus*. *Environmental Pollution.* (69) 2-3: 89-104

Amiard J.C. y C. Amiard-Triquet. 2002 Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* (131) 281–293

Anderson, D. T., 1992. Barnacles: structure, function, development and evolution.

Anil A. C., Desai, D. y L. Khandeparker. 2001. Larval development and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia:Thoracica): significance of food concentration, temperature and nucleic acid. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263:125-141.

- Barbaro A., Francescon A., Polo B y M. Bilio. 1978. *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica). A Potential Indicator of Fluoride, Copper, Lead, Chromium and Mercury in North Adriatic Lagoons. *Marine Biology*. 46. 247-257.
- Barka S., J. F. Pavillon, J. C. Amiard 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. (128) 4: 479-493
- Baron R. L. 1991. Carbamate insecticides. *In Handbook of pesticide toxicology*. Hayes, W. J.Jr., and Laws Eds. Academic Press. New York.
- Behne D y Kyriakopoulos A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21:453–73
- Bodin N., Burgeot T., Stanisiere J.Y., Bocquene G., Menard D., Minier C., Boutet I., Amat A., Cherel Y. y Budzinsky H. 2004. Seasonal Variations of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *C. Bio. Phys. Part C*. 128: 411-427.
- Burrell G.A. y F.M. Siebert. 1916. Gases found in coal mines. *Miner's Circular* 14. Bureau Mines. US Dep. Inter. Washington DC.
- Cadena-Cárdenas L., Méndez-Rodríguez L. C., Zenteno-Savín T., García-Hernández J. y Acosta-Vargas B. 2009. Heavy metal levels in marine mollusks from areas with, or without, mining activities along the Gulf of California, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol*. 57:96–102

Calagno J. A. López G. J. y A. Tablado. 1997. Growth and reproduction of the barnacle *Balanus amphitrite* in an intertidal area affected by sewage pollution. J. Crustacean Biol. 17(3):417-423.

Calagno J. A. López G. J. y A. Tablado. 1998. Populations dynamics of the barnacle *Balanus amphitrite* in an intertidal area affected by sewage pollution. J. Crustacean Bio. 18(1):128-137.

Cantú-Medellin N. 2006. Variación espacial de los indicadores del estrés oxidativo en tejidos de almeja chocolta (*Megapitaria squalida*) (Sowwerby, 1835) (Bivalva: Veneridae) de Bahía de La Paz. B.C.S. México. Tesis Licenciatura UABCS, La Paz B.C.S. México

Chan H. M., Rainbow P. S. y Phillips D. J. H. 1990. Barnacles and mussels as monitors of trace metal bio-availability in Hong Kong waters. The marine flora and fauna of Hong Kong and southern China II, in Proceedings of the Second International Marine Biological Workshop: The marine flora and fauna of Hong Kong and Southern China, Hong Kong, Morton, B. ed., Hong Kong: Hong

Chen J.C, Lin C.H. 2001. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture 192:55–65

Clements F.C. 1920. Plant indicators. Washinton, DC: Carnegie Inst.

Cockerell A. 1945. The Colorado Desert of California: Its Origin and Biota. Transactions of the Kansas Academy of Science (1903), Vol. 48, No. 1 pp. 1-40. Published by: Kansas Academy of Science

- Cotgrave. A.I., Moldéus P. y Orrenius S. 1988. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28:189-212
- Da Silva E.T., Ridd M., Klumpp D. 2009. The barnacle *Balanus amphitrite* as a biomonitor for Cd: Radiolabelled experiments. *Marine Environmental Research.* 67:177-182
- Daesslé L. W., Lugo-Ibarra K. C., Tobschall H. J., Melo M., Gutiérrez-Galindo E. A., García-Hernández J., Álvarez L. G. 2008 Accumulation of As, Pb, and Cu Associated with the Recent Sedimentary Processes in the Colorado Delta, South of the United States-Mexico Boundary. *Arch Environ Contam Toxicol.*
- Dahlhoff P.E. 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annu. Rev. Physiol.* 66:183-207.
- Dalton P.T., Howard G.S y Puga A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:67-101.
- Darwin, C., 1854. A Monograph on the Sub-class Cirripedia. The Balanidae; the The Balanidae; the Verrucidae. J. Cramer Weinheim, reprint. 684 pp.
- Denley E.J., A.J. Underwood. 1979. Experiments on factors influencing settlement, survival, and growth of two species of barnacles in new south wales. *Journal of Exp. Marine Biol and Ecol.* 36:269-293
- Desai V.D. y Anil A.C. 2004. The impact of food type, temperatura and starvation on larval development of *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia:Thoracica). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306:113-137

- Devi K.P., Pandian S. K y Kumar N.S.S. 2005. Cholinesterase activity in clam *Meretrix casta*: Possible Biomarker for organophosphate pesticide pollution. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74:250-253.
- Doyen P, P. Vasseur, F. Rodius 2006. cDNA cloning and expression pattern of pi-class glutathione S-transferase in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 140. 300 – 308
- Elia A.C., Galarini R., Dorra A.J.M. y Taticchi M.I. 2007 Heavy metal contamination and antioxidant response of a freshwater bryozoans (*Lophopus crystallinus* Pall., Phylactolaemata). Ecotoxicol Environ Safety 66:188–194.
- EPA. 1978. Method 220. Copper (Atomic Absorption, Direct Aspiration). US Environmental Protection Agency. 4 p.
- EPA. 1992. Method 7000A. Atomic Absorption Methods. US Environmental Protection Agency. 14 p. Environmental Protection Agency.
- Faimali M., Piazza F., Greco G., Corra C., Magillo F., Pittore M., Giacco E., Gallus L., Falugi C. y Tagliaferro G. 2006. Swimming speed alteration of larvae of *Balanus Amphitrite* as a behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. Marine Biology. 149:87-96
- Fialkowski W. y Newman W. 1998. A pilot study of heavy metal accumulations in a barnacle from the Salton Sea, Southern California. Marine Poll. Bull. (36) 2:138-143

- Field A. J. y Thurman E.M. 1996. Glutathione Conjugation and Contaminant Transformation. *Env. Sci. & Tech. Ame. Chem. Soc.* (5) 30: 1413-1418.
- Fishman, M, J. 1993, Method I-4138-89. Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory Determination of inorganic and organic constituents in water and fluvial sediments: U.S. Geological Survey Open-File Report 93-125.
- Fitzpatrick P.J. y Sheehan D. 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Xenobiotica* 23:851–861
- Flemer D.A., Ruth B., Bundrick C.M., Moore J.C. 1997. Laboratory effects of microcosm size and the pesticide chlorpyrifos on benthic macroinvertebrate colonization of soft estuarine sediments. *Marine Environmental Research*, (43) 4: 243-263
- Flohe L., GunzlerWA y Schock HH. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32:132–34
- Foulkes E.C. 1996. Metals and Biological Membrans. In *Toxicological of metals*. Eds. Chang W.L., Magos L. y Suzuki T. Lewis Publishers.
- Fukuto R. T. 1987. Organophosphates y carbamate esters: the anticholinesterase insecticides. In *Fate of pesticides in the environment*, Publi. Num. 3320. Biggar J. W. y Silber J. N. Eds. University of California Agricultural Experiment Station Publications, Davis Cal. USA.

Fulton H.M. y Key P.B., 2005. Correlation between 96-h mortality and 24-h acetylcholinesterase inhibition in three grass shrimp larval life stages. *Ecotox. Env. Safety*. 63 (3) 389-392

Galindo-Bect, M. S., Page H. M., Petty, R. L., Hernandez-Ayon J., Aragon-Noriega E.A. y Bustos-Serrano E. 2007. Variación temporal en la abundancia de postlarvas y juveniles de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) el estuario del río Colorado. *Ciencias Marinas*

Gallo, M. A. y Lawryk N. J. 1991. Organic phosphorus pesticides. *In Handbook of pesticide toxicology*. Hayes, W. J.Jr., and Laws Eds. Academic Press. New York.

Galloway T. y R. Handy. 2003. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology*. 12:345-363.

Gamble S.C., Goldfarb C., Porte y D.R. Livingstone. 1995. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterisa rubens*). *Mar. Environ. Res.* 39: 191-195.

García-Hernández J. 2006. Inventario y caracterización de las descargas que afectan la salud de ecosistemas del delta del Río Colorado, México. Reporte CONACyT-SEMARNAT.

García-Hernández J., King, K.A., Velasco A.L., Shumilin E., Mora M.A., Glenn E.P., 2001. Selenium, selected inorganic elements, and organochlorine pesticides in bottom material and biota from the Colorado River delta: *Journal of Arid Environments*, 49:65-89

- Geffard J. C., Amiard C., Amiard-Triquet. 2002. Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. (131) 3:, March 2002, Pages 281-293
- Glenn E., Lee C., Felger R. y Zengel S. 1996. Effects of water management on the wetlands of the Colorado River delta, Mexico. *Conservation Biology*, 10: 1175–1186.
- Glenn E.P, Zamora-Arroyo F, Nagler P.L., Brigg M. y K. Flessa. 2001, Ecology and conservation biology of the E Journal of Arid Environments.
- Glenn E.P, Zamora-Arroyo F., Nagler P.L., Brigg M. y Flessa K. 2001, Ecology and conservation biology of the Journal of Arid Environments.
- Gomez-Daglio L.E. 2003. Sistemática de los balanomorfos de la región sur de la península de Baja California , México. Tesis maestría, CICIMAR-IPN.
- Goodwin D.H. Flessa K.W., Schöne B.R., Dettman, D.L. 2001. Cross-Calibration of daily growth increments, stable isotope variations and temperature in the Gulf of California bivalve mollusk *Chione cortezi*: implications for paleoenvironmental analysis.
- Güereca-Hernández 1994. Contribuciones para la caracterización ecológica del estero del soldado. Guyamas, Sonora. México. Tesis Maestría ITESM.
- Gutierrez-Galindo E. A., Flores-Muñoz G y J.A. Villaescusa-Celaya. 1988. Organochlorine insecticides in fishes from the Mexicaly valley, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 14, 1-22.

- Halliwell B. y Gutteridge M.C.J. 1999. Free Radicals in biology and medicine. Oxford science publications. 936 p.p.
- Hammed R.R., Maharen T.M. y A-M Guindi. 2004. Glutathione and its related enzymes in the Nile fish. *Fish Phys and Biochem.* 30:189-199.
- Hayes D.J., Flanagan U.J. y Jowsey I. R. 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:51-88.
- Hayes J. D. y D. J. Pulford. 1995. The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isozymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445-600.
- Henry, D.P. y. Mclaughlin P.A. 1975. The Barnacles of the *Balanus amphitrite* Complex (Cirripedia, Thoracica). 254 p., 33 figs, 22 pls, paperbound. *Zoologische Verhandelingen* 141.
- Hinojosa-Huerta O., Calvo-Fonseca A., Butrón J y Butrón J.J. 2007. Assessment of the effects of El Tapón sobre la ictiofauna del Río Hardy. Reporte final. Pronatura.
- Hutchings L.W. 1947. The bases for temperature zonation in geographical distribution. *Ecol. Monogr.* 17: 325--335
- Jefrey C.J. y Underwood A.J. 2001. Longevity determines size of an adult intertidal barnacle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256:85-97.
- Kaloyanova F.P. y El Batawi M. A. 1991. Human toxicology of pesticides. CRC Press Boca Raton, FL. USA

- Kamrin M.A. 1997. Pesticide profile. Toxicity, Environmental Impact, and fate. Lewis Publisher. New Yor, USA. 676 p.p. Kong University Press
- Kopecka J., Lehtonen K. K., Barsiene J., Broeg, Vourinen, Gercken J., Pempkowiak J. 2006. Measurments of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and Blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (Southern Baltic). Marine Pollution Bulletin 53 (8-9), 406-421
- Kosower, N. S. y Kosower E. M. 1978. The glutathione status of cells. Int. Rev. Cytol. 54:109–160.
- LeBris H., Maffart P., Bocquene G., Buchet V., Galgani F., Blanc G. 1995. Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. Aquaculture 138:139-144.
- Levine R.L., Willams J.A., Stadman, E.R, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidative modified proteins. Methods Enzymol. 233, 346-357
- Li L.J y S. Leichtweis. 1997. Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidants systems. Age.20:91-10
- Licona-Chavez A., Correa-Sandoval F., De la Rosa-Vélez J. y Camarena-Rosales F. 2007. Análisis genético y morfométrico de *Chione californiensis* y *C. subimbricata* del pacifico oriental mexicano y el Golfo de California. Ciencias Marinas 33:149-171.
- Livingstone D.R. 2001 Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. Marine Poll Bull. 42(8):656-666.

- Martin-Díaz, M.L., Blasco J. Y T.A. DelValls. 2007. Biomarkers study sediments quality assessment in spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. Archives Env. Cont. Toxicol. 53:66-76.
- McCord J.M. y Fridovich F. 1969. Superoxide dismutasa, an enzyme funtion for erythrocuprein, J Biol. Chem. 344: 6049-6055.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. Ann Rev Biochem. 52:711–760
- Mejía J., Yáñez L., Carrizales L. y F. Díaz-Barriga. 2002. Evaluación integral de riesgo en sitios contaminados. Scientiae Naturae.
- Michael A.L., Y.J. kang, stefano L. S, Perdrizet P.G., y Hightower L.E.. 2001. Heavy Metal Ions in Normal Physiology, Toxic Stress, and Cytoprotection. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1113: 159–172.
- Mills G.C. 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J. Biol. Chem. 229:189–97
- Monserrat, J.M., Geracitano L.A., Pinho G.L.L, Vinagre T.M, Faleiros M, Alciati J.C. y Bianchini A. 2003. Determination of Lipid Peroxides in Invertebrates Tissues Using the Fe (III) Xylenol Orange Complex Formation. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45: 177–183.
- Mora M.A.1991. Organoclorines and breeding success in cattle egrets from the Mexicali Valley, Baja California Mexico. Colonial Waterbirds. 14: 127-132
- Morales-Abril G. (1994). Reserva de la biosfera alto golfo de California y delta del Rio Colorado. 3: 26–27. Journal of Arid Environments.

- National Research Council. 2000. Ecological Indicators for the Nation. Washinton, DC: Natl. Acad.
- Niemi J. G. y McDonald M.E. 2004. Application of Ecological Indicators. Annu. Rev. Ecol. Syst. 35:89-111.
- Niyogi S., S. Biswas, S. Sarker, A. G. Datta. 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. Marine Environmental Research, Volume 52, Issue 1, July 2001, Pages 13-26
- Niyogi S., S. Biswas, S. Sarker, Datta A.G. 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. Marine Environ Research. (52) 1:13-26
- Noss R.F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. Conserv. Biol. 4:355-364.
- Nussetti O., Esclapes M., Salazar G., Nussetti y S. Pulido. 2001. Biomarkers of stress oxidative in the polychaete *Eurythoe complanate* (Amphinomidae) under short term cooper exposure. Bull. Environ. Contam Toxicol. 66:576-581
- Perkin Elmer.1988. Atomic Absorption Spectrometer Operator's Manual, Mercury cold vapor and hydride-generation techniques. Germany.
- Phillips D.J.H. y Rainbow P.S. 1988. Barnacles and Mussels as biomonitor, of trace elements: a comparative study. Mar. Ecol. Pro. Ser. 49:83-93.

- Phillips D.J.H. y Rainbow P.S.. 1988. Barnacles and Mussels as biomonitor, of trace elements: a comparative study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49:83-93.
- Pitombo F.B. 2004. Phylogenetic analysis of the Balanidae (Cirripedia: Balanomorpha). *Zoologica Scripta* 33: 261-276.
- Powell M. I y White K.N. 1990. Heavy metal accumulation by barnacles and its implications for their use as biological monitors. *Marine Environmental Research.* (30) 2:91-118
- Presser T.S., Sylvester M.A. y Low, W.H. 1994. Bioaccumulation of selenium from natural geologic sources in western states and its potential consequences. *Environ. Manag.* 183: 423-436.
- Pullen J. S. H, P. S. Rainbow. 1999. The composition of pyrophosphate heavy metal detoxification granules in barnacles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* (150) 2-9:249-266
- Radwan M.A K., El-Gendy S., Gad A. F. 2009. Oxidative Stress Biomarkers in the Digestive Gland of *Theba pisana* Exposed to Heavy Metals. *Arch Environ Contam Toxicol.*
- Rainbow P. S. 1985. Accumulation of Zn, Cu and Cd by crabs and barnacles. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* (21) 5: 669-686
- Rainbow P. S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. *Environmental Pollution.* (120) 3: 497-507

- Rainbow P. S. 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*. (33) 4: 576-582
- Rainbow P. S. y Phillips D.J.H. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*. (26) 11: 593-601
- Rainbow P. S., Tania Y. T. Ng., Shi D. y Wang W.X. 2004. Acute dietary pre-exposure and trace metal bioavailability to the barnacle *Balanus Amphitrite*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (311) 2:315-337
- Rainbow P.S. 1995. Biomonitoring of heavy metals bioavailability in marine environment. *Mar. Poll. Bull.* 31:183-192.
- Rainbow P.S. 1995. Biomonitoring of heavy metals bioavailability in marine environment. *Mar. Poll. Bull.* 31:183-192.
- Rainbow PS y Wang W.X .2001. Comparative assimilation of Cr, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. *Mar Ecol Prog Ser* 218:239–248.
- Raport D.J. 1992. Evolution of the indicator in ecosystem health in: McKenzie D.H, Hyatt D.E y V.J. McDonald eds. 1992. *Ecological Indicators*, Vol. 1, 2. Elsevier.
- Ray D.E. 1991. Pesticides derived from plants and other organisms. *In Handbook of pesticide toxicology*. Hayes, W. J.Jr., and Laws Eds. Academic Press. New York.
- Regoli F., Nigro M. Y E. Orlando. 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology*. 40(4):376-392

Roesijadi, G., 1993. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.* 102: 91–95.

Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179:588–90

Rowell K., Flessa K.W., Dettman D.L. y Román M.. 2005. The importance of Colorado River flow to nursery habitats of the Gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 62: 2874-2885.

Ruelas-Inzunza F., y Páez-Osuna. J 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder organisms in a subtropical coastal environment (Southeast Gulf of California). *Environmental Pollution.* (107) 3: 437-444

Ruscoe J.E., Rosario, L.A., Wang T., Gate L. y P., Arifoglu. 2001. Pharmacologic or genetic manipulations of glutathione S-transferase cell proliferation pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:339-345.

Schone R.B., Lega J., Flessa W.K., Goodwin H.D. y L.D. Dettman. 2002. Reconstructing daily temperatures from growth rates of intertidal bivalve mollusk *Chione cortezi* (northern Gulf of California, México). *Paleo.* 184: 131-146.

Segala L.M. y S. Fedoroffb. 1989. Cholinesterase inhibition by organophosphorus and carbamate pesticides in aggregate cultures of neural cells from the foetal rat brain: The effects of metabolic activation and pesticide mixtures *Toxicology in Vitro.* 3(2):123-128

Sheehan D. y A. Power. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123 (1999) 193–199.

Skorupa J. y Ohlendorf, H.M. 1991. Contaminants in drainage water and avian risk thresholds, in *The economics, and management of water and drainage in agriculture*. Dinar A. y Zilberman D. Eds, Kluwer Academic, Norwell, MA. pp 345-368

Skorupa J.P., Morman S.P. y Sefchick-Edwards J.S. 1996. Guidelines for Interpreting Selenium Exposures of Biota Associated with Nonmarine Aquatic Habitats. National Irrigation Water Quality Program, Sacramento, CA.

Stadman E.R y Levine R.L 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 899, 191-208

Strange R.C., Jones P.W. y J.A. Fryer. 2000. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*. 112-113:357-363.

Thompson H. M. 1999. Esterases as markers of Exposure to Organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*. 8:369-384.

U.S. EPA. 1986. Method 7740 Selenium (Atomic Absorption, Furnace Technique). U.S.

US EPA. 2004. Draft national coastal condition report II. EPA 620/R-03/2002. Washington DC. 362 pp. <http://www.epa.gov/owow/oceans/nccr2/downloads.html>

Vega-Cazares M.A. 2002. Patrón de uso de plaguicidas e inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) en garza ganadera (*Bubulcus ibis*) del Delta del Río Colorado, México. Tesis Maestría. CIAD unidad Mázatlan, México.

- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp Biochem Physiol C*. 97:37-42
- Walker, G. 1977. "Copper" granules in the barnacle *Balanus balanoides*. *Mar. Biol.* 39, 343-349.
- Wang, W.-X., 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Marine Ecology Progress Series* 243, 295-309.
- Ware G. W. 1986. *Fundamentals of pesticides, a self-instruction guide*. Thompson publications, Fresno Cal.
- Watson, P. Foster, Walker G. 1995. Barnacle shells as biomonitoring material. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 31, Issues 1-3, January-March 1995, Pages 111-115
- Xiu-Yan Lin, Chang-Yi Lu, Yong Ye. 2009. *Ecological Engineering*, Volume 35, Issue 4, April 2009, Pages 502-510
- Zamora-Arroyo F., Nagler P.L., Brigs M., Dea, Rodríguez B., Valdes C., Huete A., G E.P. 2001. Regeneration of native trees in response to flood releases from the United States into the delta of the Colorado River, Mexico. *Journal of Arid Environments*.
- Zanette J, Monserrat J.M. y Bianchini A. 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries

Zenteno-Savin T. 2002. Oxidative stress in marine organisms: A review. In Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels. Eds. Johnson P. y Boldyrev A.A. Research signpost publisher. India.

Zullo V.A., Beach D.B. y J.T. Carlton 1972. New Barnacle records (Cirripedia, Thoracica). Proceedings of the California Academy of Sciences, series 4, 39:65-74

Anexo I

Tabla IV. Actividad promedio mensual de la enzima GPx ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Prot}$) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD $p < 0.05$.

Mes	DeDu	CaMo	CaMu	CaRa	TaNo	TaSu	GC
Enero	326±18.8 ^{ac}	171±13.9 ^a	732±219 ^a	198±41.9 ^{ac}	1719±261 ^a	80.2±9.3 ^a	0.94±0.29 ^a
Marzo	273±98.3 ^{ac}	430±164 ^b	429±102 ^b	336±26.5 ^{ad}	10721±1346 ^b	55.2±10.9 ^a	261±23.6 ^b
Mayo	143±24.9 ^a	455±103 ^b	260±18.0 ^c	1314±199 ^b	733±272 ^c	60.9±14.2 ^a	181±67.7 ^c
Julio	1132±468 ^b	139±78.7 ^{ac}	76.7±7.9 ^d	71.5±14.4 ^{ac}	126±93 ^c	292±29.9 ^{bc}	14.9±0.3 ^{ad}
Septiembre	143±38 ^{ad}	329±143 ^b	72.3±19.2 ^d	481±266 ^{cd}	136±24.2 ^c	350±18.9 ^c	47.4±28.8 ^d
Noviembre	442±108 ^{ac}	249±19.5 ^{ac}	7398±2882 ^e	351±9.4 ^{ad}	330±20.9 ^c	2723±364 ^d	101±20.2 ^e
Promedio	451	296	1294	459	2303	597	101

DeDu= Dren Durango, CaMo=Campo Mosqueda, CaMu= Campo Muñoz, CaRa= Campo Ramona, TaNo=Tapón Norte, TaSu= Tapón Sur.

Tabla V. Actividad promedio mensual de la enzima GST (nmoles mg⁻¹ Prot) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD p < 0.05.

Mes	DeDu	CaMo	CaMu	CaRa	TaNo	TaSu	GC
Enero	1737±65.5 ^a	568±7.6 ^a	928±320 ^a	52.5±9.5 ^a	14281±2617 ^a	559±60.4 ^a	861±107 ^a
Marzo	436±53.2 ^b	426±33.4 ^a	309±52.2 ^b	66.5±11.1 ^a	404±126 ^b	214±60.8 ^b	723±98.5 ^b
Mayo	247±26.1 ^b	885±251 ^b	313±6.6 ^{bc}	2965±1221 ^b	574±184 ^c	56.9±16.8 ^c	468±194 ^c
Julio	403±396 ^b	556±118 ^a	202±44.5 ^{bc}	32.1±5.6 ^a	179±73.1 ^d	540±85.2 ^a	112±16.1 ^d
Septiembre	174±43.2 ^c	212±116 ^c	152±30.9 ^b	284±80.5 ^a	68.5±39.7 ^d	140±74.5 ^a	153±31.7 ^d
Noviembre	15256±8430 ^d	73.9±21.7 ^c	261±59.3 ^{bc}	109±14.9 ^a	323±36.9 ^b	3137±1177 ^d	704±84.1 ^b
Promedio	2,654	453	382	585	2,638	775	503

DeDu= Dren Durango, CaMo=Campo Mosqueda, CaMu= Campo Muñoz, CaRa= Campo Ramona, TaNo=Tapón Norte, TaSu= Tapón Sur.

Tabla VI. Concentración promedio mensual de Lípidos Peroxidados (nmoles mg⁻¹ Prot) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD p < 0.05.

Mes	DeDu	CaMo	CaMu	CaRa	TaNo	TaSu	GC
Enero	41.5±1.4 ^a	31.5±0.72 ^a	41.1±14.3 ^a	34.6±4.7 ^a	76.2±23.6 ^a	27.5±2.6 ^a	14.3±1.4 ^a
Marzo	26.7±1 ^b	40.5±3.5 ^b	27.1±5.8 ^b	25.2±2.3 ^{ac}	34.3±5.7 ^b	32.9±3.6 ^{ac}	14.6±3.7 ^a
Mayo	8.4±0.76 ^c	31.7±7 ^a	27.9±0.89 ^b	156±23.6 ^d	52.0±20.2 ^c	36.6±4.5 ^{bc}	11.8±2.6 ^{ab}
Julio	107±28.5 ^d	25.7±6.9 ^c	9.9±1.2 ^c	19.1±11.7 ^{cd}	7.5±0.96 ^d	45.9±2.2 ^d	13.4±1.2 ^{ab}
Septiembre	11.1±2.4 ^c	24.8±3.0 ^{cd}	28.7±2.2 ^b	64.4±16.1 ^b	9.8±1.6 ^d	27.2±8.5 ^b	15.4±4 ^{ac}
Noviembre	42.5±8.6 ^a	27.6±1.7 ^{ac}	30±3 ^b	28.3±1 ^a	37.4±3.9 ^b	567±128 ^e	10.8±1.6 ^b
Promedio	51.5	29.7	27.4	54.7	36.2	122.9	13.4

DeDu= Dren Durango, CaMo=Campo Mosqueda, CaMu= Campo Muñoz, CaRa= Campo Ramona, TaNo=Tapón Norte, TaSu= Tapón Sur.

Tabla VII. Concentración promedio mensual de Proteínas Carboniladas (nmol mg⁻¹ TH) en los diferentes sitios de muestreo. Letras en superíndice muestran diferencia significativa, LSD p < 0.05.

Mes	DeDu	CaMo	CaMu	CaRa	TaNo	TaSu	GC
Enero	186±46.8 ^a	344±79.4 ^a	42.6±5 ^a	579±74.9 ^a	267±0.12 ^a	79±14.4 ^a	46.2±11 ^a
Marzo	86.6±58.5 ^b	281±49.6 ^b	374±81.6 ^b	542±33.5 ^{ac}	85.1±15.6 ^b	45.9±5.3 ^a	77.8±0.37 ^a
Mayo	282±37.4 ^{ce}	292±76.6 ^a	107±15.1 ^c	332±41.9 ^{bd}	281±18 ^a	202±72.2 ^b	175±72.7 ^b
Julio	371±70.9 ^d	176±32.6 ^c	201±51.8 ^d	742±30 ^b	212±39.5 ^c	76.3±10.5 ^a	318±13.1 ^c
Septiembre	339±72.0 ^{cde}	256±11.2 ^{bd}	57±12.8 ^a	376±35.1 ^b	171±31.5 ^d	80.9±41.2 ^a	47.3±83.4 ^a
Noviembre	293±50.2 ^{cde}	322±26.2 ^{abe}	45.3±21.3 ^a	326±31.5 ^{bd}	315±36.1 ^e	198±97.7 ^b	79.3±8.3 ^a

DeDu= Dren Durango, CaMo=Campo Mosqueda, CaMu= Campo Muñoz, CaRa= Campo Ramona, TaNo=Tapón Norte, TaSu= Tapón Sur.

Tabla VIII. Porcentajes de inhibición observados durante el bioensayo con una mezcla de 6 plaguicidas.

	Bco	C1	C2	C3
Bioensayo	0 ^a	43.5±0.7 ^b	57.9±6.0 ^c	33.6±1.1 ^d

C1= concentración de 2 µg/kg, C2= concentración de 5 µg/kg, C3= concentración de 10 µg/kg

Tabla IX. Porcentaje de inhibición observado en balanos y almejas del Río Hardy y Alto Golfo

Sitio	DeDu	CaMo	CaMu	CaRa	TaNo	TaSu	AG
Enero	49.5±10.9 ^a	67.2±3.5 ^a	44.5±10.6 ^a	38.2±6.0 ^a	10.1±1.2 ^a	38.9±6.1 ^a	6.0±1.5 ^a
Marzo	47.7±11.9 ^a	43.1±1.9 ^b	21.5±7.4 ^b	44.8±1.14 ^a	10.6±3.7 ^a	24.64±10.2 ^{ab}	7.8±1.7 ^{ac}
Mayo	35.1±9.0 ^a	25.2±13.3 ^{bc}	33.4±4.9 ^a	52.6±5.0 ^a	7.3±2.7 ^a	54.2±8.8 ^{ac}	7.9±0.7 ^{ac}
Julio	57.9±7.3 ^b	12.9±2.7 ^c	18.9±5.5 ^b	32.7±11.5 ^{ab}	59.1±3.4 ^b	68.2±1.9 ^c	3.3±0.7 ^{ab}
Septiembre	76.4±2.3 ^b	39.3±1.1 ^b	49.1±3 ^{ac}	38.1±11.4 ^a	80.5±5.4 ^c	69.4±6.2 ^c	5.7±0.6 ^a
Noviembre	47.5±4.1 ^a	34.7±7 ^b	25.9±5.7 ^a	14.8±1.5 ^b	43.73.1 ^d	74.1±2.9 ^c	6.4±2.1 ^a

DeDu= Dren Durango, CaMo=Campo Mosqueda, CaMu= Campo Muñoz, CaRa= Campo Ramona, TaNo=Tapón Norte, TaSu= Tapón Sur.